

Aus dem Institut für Virologie
Universität Ulm

Professor Dr. med. Thomas Mertens

**Lymphozytenproliferation und
frühe Zytokinausschüttung
unter Immunsuppressiva und Ganciclovir
*in vitro***

Dissertation zur Erlangung des
Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Universität Ulm

Vorgelegt von
Katharina Macula, geb. Stiber
aus Ulm

2015

Amtierender Dekan: Prof. Dr. rer. nat. Thomas Wirth

1.Berichterstatter: Prof. Dr. med. Thomas Mertens

2.Berichterstatter: PD Dr. med. Franz Maximilian Rasche

Tag der Promotion: 13. Mai 2016

Für meine Familie.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	III
Abkürzungsverzeichnis (alphabetisch).....	V
1 Einleitung.....	1
1.1 Organtransplantation.....	1
1.2 Grundlagen der Transplantationsimmunologie	3
1.2.1 Die Transplantatabstoßung	4
1.2.2 T-Lymphozyten.....	5
1.3 Immunsuppressive Therapie.....	10
1.3.1 Mycophenolsäure: Mycophenolat mofetil ®.....	12
1.3.2 Cyclosporin A, <i>Sandimmun</i> ®	15
1.3.3 Prednisolon, <i>Decortin H</i> ®.....	17
1.3.4 MAP-Kinase Inhibitoren.....	18
1.4 Opportunistische Infektionen.....	20
1.4.1 Cytomegalievirus (CMV) Infektionen	21
1.4.2 Antivirale Therapie von CMV: Ganciclovir	23
1.5 Ziel der Arbeit.....	24
2 Material und Methodik.....	25
2.1 Material	25
2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	25
2.1.2 Chemikalien, Substrate, monoklonale Antikörper.....	25
2.1.3 Pharmaka	26
2.2 Methodik	26
2.2.1 Frühe Lymphozytenaktivierung (Interferon gamma release assay)...	27
2.2.2 Lymphozytenproliferation	32
3 Ergebnisse.....	39
3.1 Einfluss unterschiedlicher immunsuppressiver Substanzklassen auf die frühe Aktivierung und die Proliferation von CD4+- und CD8+-T- Lymphozyten	39
3.1.1 Inosinmonophosphat-Dehydrogenase Inhibitor: Mycophenolat mofetil	39
3.1.2 Calcineurininhibitor: Cyclosporin A.....	43
3.1.3 Glukokortikoid: Decortin H.....	47

3.1.4	MAP-Kinase Inhibitoren.....	51
4	Diskussion.....	60
5	Zusammenfassung	70
6	Literaturverzeichnis.....	72
	Danksagung	83
	Lebenslauf.....	84

Abkürzungsverzeichnis (alphabetisch)

ACV	Aciclovir
AK	Antikörper
AP1	Activator protein 1
APC	In Durchflusszytometrie verwendeter Farbstoff
APC	Antigen-presenting cell
AUC	Area under the curve
BFA	Brefeldin A
CD	Cluster of differentiation
CDI	Zellteilungsindex
CDK	Cyclin abhängige Kinase
CFSE	Zellfarbstoff zum Anfärben von Lymphozyten
CMV	Cytomegalievirus
CO₂	Kohlenstoffdioxid
CSA	Cyclosporin A
CSF	Colony stimulating factor
CYP	Cytochrom P
DAG	Diacylglycerol
DecH	Decortin H
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSO	Deutsche Stiftung für Organtransplantation
EBV	Epstein-Barr-Virus
EC-MPS	Enteric-coated mycophenolate sodium
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
ERK	MAP-Kinase
FACS	Fluorescence-activated cell sorting

FCS	Fetales Kälberserum
FK 778	Immunsuppressivum
FSC	Forward scatter
G1-Phase	Phase des Zellzyklus
G2-Phase	Phase des Zellzyklus
GAS	Superantigen der Gruppe A Streptokokken
GCV	Ganciclovir
GTP	Guanosintriphosphat
HCMV	Humanes Cytomegalievirus
HHV	Humanes Herpesvirus
HIV	Humanes Immundefizienzvirus
HLA	Human leukocyte antigen
HSV	Herpes-Simplex-Virus
HUS	Hämolytisch urämisches Syndrom
IC50	Mittlere inhibitorische Konzentration
IFN γ	Interferon gamma
IKK	Kinasekomplex
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
IMPDH	Inosinmonophosphat-Dehydrogenase
ITAMs	Immunoreceptor tyrosine-based activation motif
JNK	MAP-Kinase
JNKK	MAP-Kinase-Kinase
kD	Kilodalton
LAT	Transmembranes Adaptorprotein in T-Zellen
Lck	Lymphozytenspezifische Tyrosinkinase
MAP	Mitogen-activated protein

MAPK	MAP-Kinase
MAPKK	MAP-Kinase-Kinase
MAP3736	MAP-Kinase-Inhibitor 3736
MAP3830	MAP-Kinase-Inhibitor 3830
MEK	MAP-Kinase-Kinase
MEM	Minimum essentiel medium
MHC	Major histocompatibility complex
MKK	MAP-Kinase-Kinase
MMF	Mycophenolat mofetil
MPA	Mycophenolsäure
MPAG	Mycophenolsäure Glucoronid
M-Phase	Mitose-Phase des Zellzyklus
m-RNA	Messenger-RNA
m-TOR	The mammalian target of rapamycin
NEA	Nicht-essentielle Aminosäuren
NFAT	Nuclear factor activating T-cells
NFκB	Transkriptionsfaktor
NO	Stickstoffmonoxid
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung
PCNA	Proliferating-cell-nuclear-antigen
PCV	Penciclovir
PD	Pharmakodynamik
PE	In Durchflusszytometrie verwendeter Farbstoff
PFA	Paraformaldehyd
PI-3K	Phosphatidylinositol 3'-Kinase
PK	Pharmakokinetik
PMA	Agens zur Zellstimulierung
pp65	CMV-spezifisches Antigen
PTLD	Lymphoproliferative Erkrankung nach Transplantation
RAS	Protein Familie
RPE	In Durchflusszytometrie verwendeter Farbstoff

RPMI	Kulturmedium
rpm	Rounds per minute
RSV	Respiratory Syncytial Virus
S -1-P	Sphingosin-1-Phosphat
SEB	Staphylokokken-Enterotoxin-B
SH	Schwefelwasserstoff
SLP-76	Adaptorprotein
S-Phase	Synthese-Phase des Zellzyklus
src-Kinase	Tyrosinkinase
SSC	Sideward scatter
TC -Platte	Gewebskulturplatte
TcR	T-Zell Rezeptor
TDM	Therapeutisches Drugmonitoring
TGF	Transforming growth factor
TH	T-Helferzelle
TNF	Tumornekrosefaktor
UL 54	Virale Proteinkinase
UL 97	Virale Proteinkinase
VZV	Varizella-Zoster-Virus
Zap -70	Zeta-Ketten assoziierte Proteinkinase

1 Einleitung

Immunsuppressiva greifen in den Zellstoffwechsel eukaryoter Zellen ein und inaktivieren möglichst spezifisch immunkompetente Zellen. Das Ziel der antiviralen Therapie mit Nukleosidanaloga ist eine spezifische Hemmung der Virusvermehrung in infizierten Zellen.

Immunsuppressiva kommen bei der Induktions- und Erhaltungstherapie nach Organtransplantation und zur Behandlung und Abwehr einer Abstoßungsreaktion zum Einsatz. (Halloran 2004) Außerdem werden sie zur Behandlung von Autoimmunerkrankungen verwendet, wie beispielsweise Mycophenolat mofetil (MMF) bei Lupus Nephritis. (Appel et al. 2005)

Nukleosidanaloga werden eingesetzt, um die Virusreplikation im infizierten Organismus selektiv zu inhibieren. Besonders gefährdet durch Virusinfektionen sind immuninkompetente Patienten wie HIV-Infizierte und vor allem Knochenmark- oder Organtransplantierte.

Die Indikation für eine gleichzeitige Gabe von Immunsuppressiva und antiviralen Substanzen wird häufig im Rahmen der Transplantationsmedizin gestellt.

1.1 Organtransplantation

Die Organtransplantation ist eine etablierte Organersatztherapie, die in der Regel nur durch den Einsatz von immunsuppressiven Substanzen möglich ist. In der über 60-jährigen Geschichte der Organtransplantation zeigt sich die enge Verknüpfung des Erfolgs mit der Entwicklung neuer, besonders effektiver Immunsuppressiva. Vor allem die Einführung des Calcineurininhibitors Cyclosporin A (CSA) Ende der 1970iger Jahre brachte den klinischen Durchbruch in der Transplantationsmedizin. (Scherer et al. 2007)

Nach neuesten Daten der Deutschen Stiftung für Organtransplantation (DSO) benötigen in Deutschland über 12.000 Menschen Spenderorgane, davon sind über 8000 für eine Nierentransplantation gelistet. Nierentransplantationen gehören zu den erfolgreichsten Organverpflanzungen. Die Collaborative Transplant Studie (University of Heidelberg 2013) gibt die 5-Jahres-Funktionsrate für Leichennieren mit 70,7 % an. Bei Lebendspenden steigt der Prozentsatz auf 85,3 %. Im

Vergleich liegen die Raten für Herztransplantate (66,6 %), Lebertransplantate (54,7 %) und Pankreastransplantate (67,4 %) darunter.

Das Hauptaugenmerk der Transplantationsmediziner liegt in der Prävention der akuten Abstoßung. Das Abstoßungsrisiko konnte durch ein verbessertes therapeutisches Drug Monitoring (TDM), aber auch durch intensive Infektionsüberwachung in den letzten Jahren auf 20-30 % gesenkt werden. (Flechner et al. 2005; Koyama et al. 1992; Meier-Kriesche et al. 2004)

Trotz der unbestreitbar großen Erfolge der Transplantationsmedizin und der besseren Kenntnis der Wirkungsweisen immunsuppressiver Substanzen handelt es sich nach wie vor um eine invasive Therapie mit der Gefahr von Abstoßungsreaktionen bei suboptimaler Immunsuppression bzw. von opportunistischen Infektionen bei zu starker Immunsuppression.

Die Immunsuppression erhöht grundsätzlich das Risiko von Infektionen. Die häufigste und bedeutendste opportunistische Infektion bei Transplantierten ist die Cytomegalievirus (CMV) Infektion. (Fishman 2007; Mwintshi et al. 2007) Durch verbesserte antivirale Therapie und frühzeitige hochsensitive Diagnostik ist es in den vergangenen Jahren gelungen, die Morbidität und Mortalität durch CMV-Infektionen bei Transplantierten signifikant zu senken.

Im Rahmen der immunsuppressiven Therapie kann es vermehrt zur Entwicklung virusinduzierter Tumore kommen. (Ingelfinger et al. 2005) Beispiele sind das durch Epstein-Barr-Virus (EBV) induzierte Lymphom, das Kaposi Sarkom durch das humane Herpesvirus 8 (HHV-8) und maligne Hauttumore durch humane Papillomviren. (Kasiske et al. 2004)

Zur weiteren Optimierung der immunsuppressiven Therapie nach Transplantation ist es wichtig, nach alternativen immunsuppressiven Substanzklassen zu suchen, die sowohl die akute und chronische Transplantatabstoßung effektiv verhindern, als auch ein günstiges Nebenwirkungsprofil aufweisen. Andererseits wird angestrebt, mit den bereits bekannten Immunsuppressiva eine Therapieoptimierung durch verbessertes Drug Monitoring zu erreichen.

1.2 Grundlagen der Transplantationsimmunologie

Das humane Immunsystem schützt den Organismus vor Infektionskrankheiten durch Bakterien, Pilze, Parasiten und Viren.

Auf Chromosom 6 befindet sich eine Gruppe von Genen, die für Proteine kodieren, die ermöglichen, dass eine Zelle vom eigenen Immunsystem nicht als fremd erkannt wird. Diese Gene sind die MHC-Gene (major histocompatibility complex) und die Proteine die humanen Leukozytenantigene (HLA). (Wucherpfennig et al. 2011) Diese werden auf der Oberfläche vieler Zellen exprimiert. Die Gene für die HLA Moleküle sind hochpolymorph, was bedeutet, dass eine Vielzahl von Allelen für diese Proteine kodieren.

MHC-Moleküle werden in 2 Hauptklassen unterteilt:

MHC-Moleküle der Klasse I (HLA-A, HLA-B, HLA-C) werden auf den meisten somatischen Zellen exprimiert. Über MHC I werden intrazelluläre Antigene (virale, zelleigene Peptide) CD8+-T-Zellen präsentiert.

MHC-Moleküle der Klasse II (HLA-DR, HLA-DQ, HLA-DP) werden nur auf lymphoiden, monozytären und dendritischen Zellen, sowie auf B-Zellen und vaskulärem Endothel exprimiert. Sie präsentieren prozessierte extrazelluläre Antigene (bakterielle Peptide, Apoptose Produkte) CD4+-T-Zellen. (Janeway et al. 2001a)

Ein Transplantat weist fremde HLA-Moleküle auf der Zelloberfläche auf, weshalb das Immunsystem (T-Zellen) des Empfängers das Gewebe als fremd identifiziert. (Dragun 2008) Deshalb wird im Vorfeld einer geplanten Transplantation nach einem Spender mit möglichst großer Übereinstimmung bei den HLA-Molekülen gesucht. Vor allem auf eine Übereinstimmung bei HLA-A, HLA-B und HLA-DR wird großer Wert gelegt. Trotzdem kann es zu Abstoßungsreaktionen unterschiedlicher Art kommen. Bestehen beim Empfänger präexistente Antikörper gegen die Gewebsantigene des Spenders kann es zur hyperakuten Abstoßung innerhalb weniger Stunden kommen. Häufiger jedoch ist die akute T-Zell-vermittelte Abstoßung innerhalb von Tagen bis Wochen nach Transplantation. (Budde et al. 2006; Harris et al. 1999)

1.2.1 Die Transplantatabstoßung

Die Hauptrolle der akuten Abstoßungsreaktion kommt der zellvermittelten Immunität zu.

Es gibt zwei Mechanismen der T-Zell-Erkennung, die als *direkte* und *indirekte* Allo-Antigenerkennung bezeichnet werden.

Antigen-präsentierende Zellen (APC) des Spenders aktivieren auf *direktem Weg* durch ihre fremden MHC-Moleküle passende T-Lymphozyten des Empfängers. Dieser Weg spielt vor allem unmittelbar nach Transplantation eine große Rolle für die akute Transplantatabstoßung.

Der *indirekte Weg* ist die klassische Präsentation von Peptidfragmenten fremder MHC-Moleküle (des Spenders) über die Empfänger-eigenen MHC-Moleküle (Klasse I und II) auf der Zelloberfläche. Diese werden von den T-Zellrezeptoren gebunden und aktivieren CD4+- bzw. CD8+-T-Lymphozyten.

Im Transplantat und im umgebenden Gewebe werden APCs (z.B. dendritische Zellen) des Spenders und des Empfängers durch die fremden HLA-Antigene aktiviert und wandern in die sekundären Lymphorgane aus. Diese antigenpräsentierenden Zellen treten dort mit naiven T-Zellen und mit T-Gedächtniszellen in Kontakt.

Die Effektor-T-Zellen, die aus den Lymphorganen auswandern, infiltrieren das Transplantat und unterhalten die Entzündungsreaktion. Bei der T-Zell-vermittelten Abstoßung wird das Transplantat mit T-Zellen, aktivierten Makrophagen, B-Zellen und Plasmazellen infiltriert. Es kommt zu einer erhöhten Chemokin-Expression, veränderter Kapillardurchlässigkeit und einer Verschlechterung der Funktion des Transplantats. (Halloran 2004) Der Schaden am Transplantat entsteht nicht nur durch eine immunologisch vermittelte Lyse der Zellen, sondern auch durch eine mesenchymale Umwandlung des Transplantatparenchyms und durch einen Zellalterungsprozess. (Halloran et al. 1999)

Die Immunantwort auf das Transplantat unterliegt einem Gewöhnungsprozess, d.h. die Abstoßungsreaktion wird mit der Zeit schwächer. Der Hauptgrund für diese Adaptation liegt darin, dass die Empfänger T-Zellen weniger auf die Spender HLA-Antigene ansprechen, wenn die Antigene länger im Körper vorhanden sind und eine suffiziente Immunsuppression aufrechterhalten wird. (Halloran 2004)

Dies führt zu einer verminderten T-Zell Reaktivität. Diese Tatsache wird in den Therapieprotokollen genutzt, um in der Erhaltungstherapie die immunsuppressive Therapie zu reduzieren.

1.2.2 T-Lymphozyten

Die T-Lymphozyten gehören zu den weißen Blutzellen. Sie entstammen, wie alle Blutzellen, aus dem Knochenmark. Die T-Lymphozyten wandern nach ihrer Reifung im Knochenmark in den Thymus aus. Dort haben sie ersten Kontakt mit Antigenen und reifen über mehrere Stufen der TcR Rekombination zu CD4⁺- und CD8⁺-Thymozyten. (Zuniga-Pflucker et al. 1996) Sie tragen spezifische T-Zell-Rezeptoren (TcR) an der Oberfläche, die sie zur Antigenerkennung befähigen. (Abb. 1) (Singer et al. 1999) T-Zellen erkennen keine freien, sondern auf anderen Körperzellen gebundene Antigene, die ihnen über MHC-Moleküle präsentiert werden.

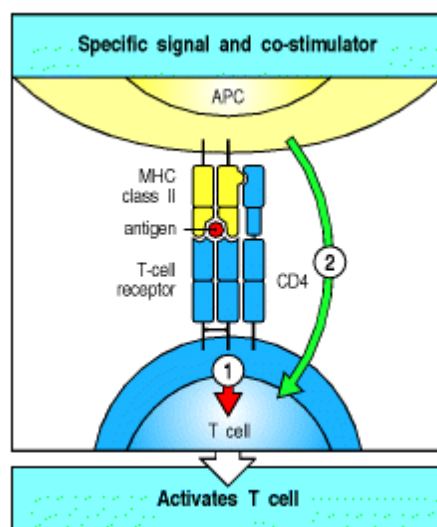


Abb. 1: Schematische Darstellung der Aktivierung einer T-Zelle über den Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC) durch eine Antigen-präsentierende Zelle (APC) (Janeway et al. 2001b)

Der T-Zellrezeptor ist ein Multiproteinkomplex an der Zelloberfläche, der aus 2 Untereinheiten besteht (meist $\alpha:\beta$, selten $\gamma:\delta$), die jeweils wiederum aus einer variablen und einer konstanten Kette bestehen.

$\alpha:\beta$ T-Zellen bilden zwei verschiedene T-Lymphozyten-Subpopulationen, die anhand der Oberflächenmoleküle, den Cluster of Differentiation (CD) in CD4 und CD8 positive Zellen, unterschieden werden. Die CD4- und CD8-Moleküle sind Korezeptoren, die an die konstante Domäne von MHC-Molekülen binden. (Singer

et al. 1999) Diese Bindung erhöht die Affinität des TcRs zum betreffenden MHC-Molekül um den Faktor 100. (Janeway et al. 2001c)

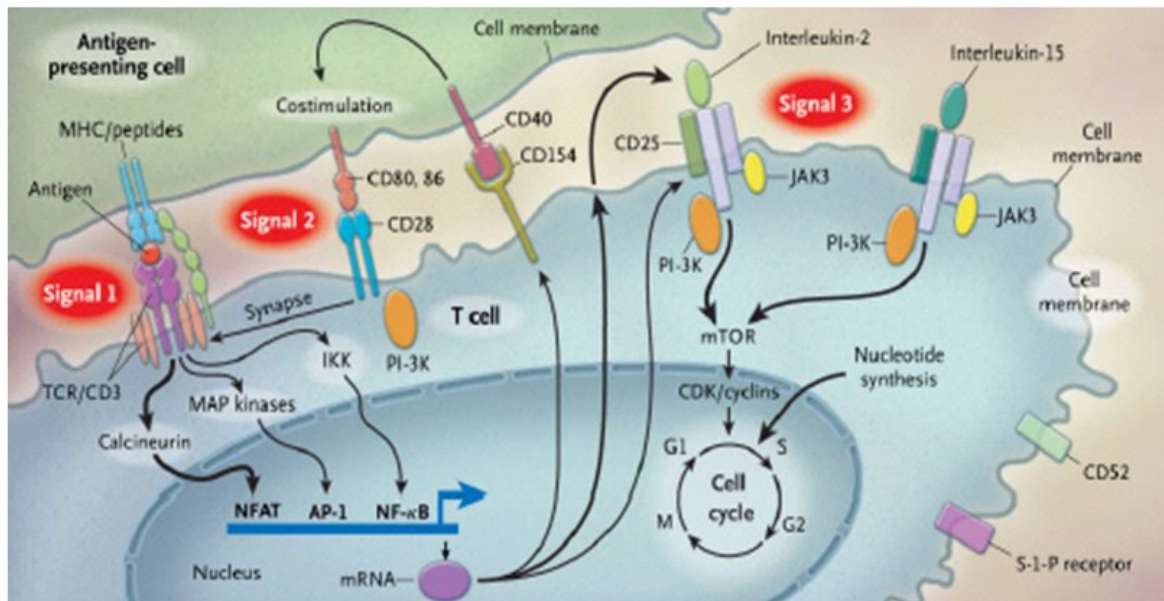
CD4+-T-Zellen sind sogenannte T-Helferzellen (TH), die, aktiviert durch eine antigenpräsentierende Zelle, durch Zytokinsekretion B-Lymphozyten und zytotoxische T-Zellen aktivieren. Sie sind die zentralen Regulationszellen des adaptiven Immunsystems. Die T-Helferzellen können sich in funktionell unterschiedliche Effektorzelltypen differenzieren. TH1- und TH2-Zellen unterscheiden sich vor allem durch ihr unterschiedliches Spektrum an produzierten Zytokinen. (Moser et al. 2000) Für die Etablierung einer suffizienten antiviralen Entzündungsreaktion muss eine TH1-Immunantwort aufgebaut werden, die durch Sekretion proinflammatorischer Zytokine charakterisiert ist. (IFN γ , IL-2, TNF α) (Romagnani et al. 2000) Diese T-Zell Funktion kann durch immunologische Funktionstests nach Stimulation mit spezifischen Antigenen oder Superantigenen untersucht werden.

Eine 3. Subpopulation CD4+-Zellen sind sogenannte Suppressor- oder regulatorische T-Zellen, die eine starke Expression von CD25 an der Oberfläche zeigen. (Maloy et al. 2001; Shevach et al. 2001) Sie inhibieren Helferzellen und zytotoxische T-Zellen durch die Produktion von TGF β und IL-10. (Levings et al. 2000)

CD8+-T-Zellen sind die Effektorzellen der angeborenen Immunität. Durch Sekretion von Botenstoffen (z.B. Granzyme B) oder Induktion von Apoptose über Zell-Zell-Kontakt (z.B. Expression des Fas-Liganden) sind sie in der Lage, Zielzellen spezifisch abzutöten (Zytotoxische Killerzellen). Sie setzen Zytokine wie IFN γ , TNF α und TNF β frei. (König 2002)

1.2.2.1 Aktivierung von T-Lymphozyten

Die Signalwege, über die die T-Lymphozyten durch eine Antigen-präsentierende Zelle aktiviert werden und die darauffolgende intrazelluläre Signalkette in den T-Lymphozyten sind bekannt. (Halloran 2004)



MHC: Haupthistokompatibilitätskomplex, **CD:** Cluster of Differentiation, **JAK 3:** Tyrosinkinase, **IKK:** Kinasekomplex, **PI-3K:** Proteinkinase, **CDK:** Proteinkinase, **m-TOR:** the mammalian target of rapamycin, **m-RNA:** Messenger-RNA, **NFAT:** T-Zell-aktivierender nukleärer Faktor, **AP-1:** Transkriptionsfaktor, **NFκB:** Transkriptionsfaktor, **MAP:** mitogen-activated protein, **TCR:** T-Zellrezeptor, **S-1-P:** Sphingosin-1-Phosphat, **G1-,G2-,S-,M-Phase:** Phasen des Zellzyklus

Abb. 2: T-Zellaktivierung (Signal 1-3) durch eine Antigen-präsentierende Zelle mit nachfolgenden intrazellulären Signalketten (Halloran 2004)

Halloran beschreibt den Ablauf anhand des „3-Signal-Modells“. (Abb. 2) Signal 1 stellt die Präsentation des Antigens über MHC II auf der Antigen präsentierenden Zelle dar und wird durch den CD3 Komplex auf der Oberfläche der T-Zelle nach intrazellulär weitergeleitet. Signal 2 entsteht durch Kostimulation über weitere akzessorische CD-Moleküle auf der Oberfläche der interagierenden Zellen. (CD86, CD80, APC, CD28) Signal 3 stellt den intrazellulären Signalweg dar, der die Aktivierung und die anschließende Proliferation der Lymphozyten stimuliert. Bislang sind mindestens 3 intrazelluläre Signalwege für die Lymphozytenaktivierung bekannt:

- der Calcium-Calcineurin-Weg,
- der RAS / MAP-Kinase Weg und
- der Proteinase C / NFκB-Weg.

Nach dem T-Zellkontakt über den TcR mit dem passenden MHC-Molekül/Peptid-Komplex, oder durch ein Superantigen, startet die intrazelluläre Signalkaskade. Nach Bildung des Komplexes wird die CD4/CD8 assoziierte src-Kinase Lck durch CD45 dephosphoryliert und aktiviert. Die Kinasen p65lck und p59fyn

phosphorylieren die als ITAMs (immuno receptor tyrosine based activation motifs) bezeichneten Bereiche der CD3 Ketten γ, δ, ζ und ϵ . Die Kinase Zap-70 (zeta-chain associated protein kinase of 70 kD) bindet an die phosphorylierten Tyrosinreste der ITAMs über seine SH2 Domäne und wird aktiviert. (Visco et al. 2000) Zap-70 aktiviert die membran-assoziierten Adaptermoleküle LAT und SLP-76. Über eine Kette von weiteren Signaltransduktionsmolekülen, G-Proteinen sowie Enzymen gelangt das Aktivierungssignal durch kaskadenartige Phosphorylierung zur Aktivierung der Phospholipase C. (Karin 1996) Über die Produktion der second messenger-Moleküle DAG (Diacylglycerol) und Inositolphosphaten kommt es zur Aktivierung der Proteinkinase C und einer Kalziummobilisation. (Zenner et al. 1995) Die G-Proteine aktivieren eine Kaskade von Serin-Threonin-Proteinkinasen. Letztendlich kommt es zur Phosphorylierung und Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie NFAT (nuclear factor of activated T-cells), NF κ B (nuclear factor kappa light-chain enhancer binding) und der MAP-Kinasen (mitogen-activated protein). Die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren führt zur Transkription von Genen und Bildung von m-RNA (messenger-RNA) weiterer Aktivierungsmoleküle. Dazu gehören beispielsweise die α -Untereinheit der IL-2 Rezeptoren (CD25), Zytokine wie IL-2 (Budde et al. 2006) und Oberflächenmoleküle wie CD26, CD30, CD54, (Favaloro 1993) und CD69. (Ziegler et al. 1994)

CD69 gehört mit einer Erscheinungszeit innerhalb von 2 Stunden auf der Oberfläche von Lymphozyten zu den frühesten Aktivierungsmarkern. (Testi et al. 1994) In vitro Studien zeigen, dass CD69 als co-stimulierendes Molekül auf die T-Zell Aktivierung und Proliferation wirkt. (Ziegler et al. 1994) CD69 wird als Antwort auf verschiedene Stimuli auf aktivierten T-Zellen exprimiert und kann mittels Immunfluoreszenz und Durchflusszytometer detektiert werden. Dadurch kann er für Immune Assays verwendet werden. (Simms et al. 1996)

Das proinflammatorische Zytokin **Interferon gamma (IFN γ)** hat die Zelle nach 4-6 Stunden in ausreichender Menge synthetisiert. IFN γ besitzt eine Vielzahl an Funktionen, beispielsweise die Aktivierung von Granulozyten oder Makrophagen oder die Hochregulation der Expression von MHC-Molekülen oder Adhäsionsmolekülen auf vielen Zellen. (Zhou 2009)

Die Expression von CD69 und die Produktion von IFN γ können mit dem Interferon gamma release Assay durch spezifische Antikörper in vitro nachgewiesen werden. (Maino et al. 1995)

Einige Stunden nach Beginn der Aktivierung beginnen die T-Zellen mit der Sekretion von IL-2 und der Expression der IL-2 Rezeptoren. Die Bindung von IL-2 an seine Rezeptoren (autokrine Stimulation) stellt das Signal für die Zelle dar aus der G1- Phase in die S-Phase des Zellzyklus einzutreten. Dies führt zur klonalen Expansion der T-Zellen. Lymphoblasten teilen sich in den ersten Tagen nach Stimulation alle 8-12 Stunden. In vitro wird die Zellteilung meist mittels radioaktivem [3H]-Thymidin nachgewiesen. (Barten et al. 2003)

Wir untersuchten die Zellteilung anhand eines sich in Lymphozyten anreichernden speziellen fluoreszierenden Farbstoffes (CFSE), der sich mit jedem Zellteilungsschritt auf die Tochterzellen überträgt und damit „verdünnt“ wird. (Abb. 3)

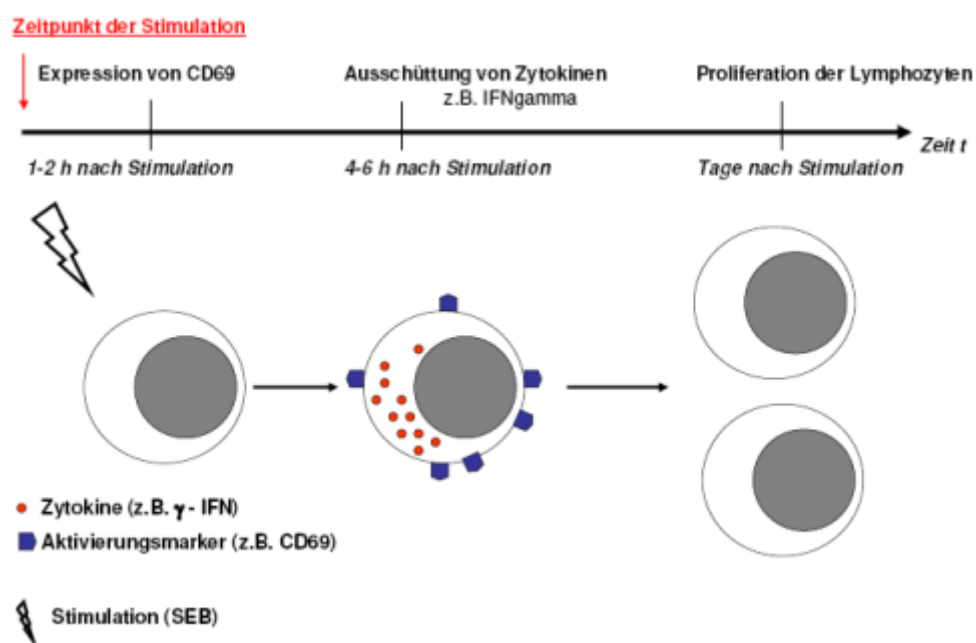


Abb. 3: Schematische Darstellung der Lymphozytenaktivierung (Expression von CD69, Ausschüttung von Interferon gamma (IFN γ) und Proliferation) in vitro durch Staphylokokken-Enterotoxin-B (SEB)

In dieser Arbeit werden die T-Lymphozyten durch ein Superantigen von Staphylococcus aureus, dem Staphylokokken-Enterotoxin B (SEB) aktiviert. Superantigene stimulieren die Immunantwort über eine polymorphe Variante der V β -Kette des T-Zell-Rezeptors und einer Interaktion mit MHC-Molekülen auf der Antigen-präsentierenden Zelle. (Abb. 4)

Trotz der Bindung des CD4+-Moleküls an MHC II reagieren nicht nur CD4+-Zellen, sondern auch CD8+-Zellen mit Proliferation. (Herrmann et al. 1992)

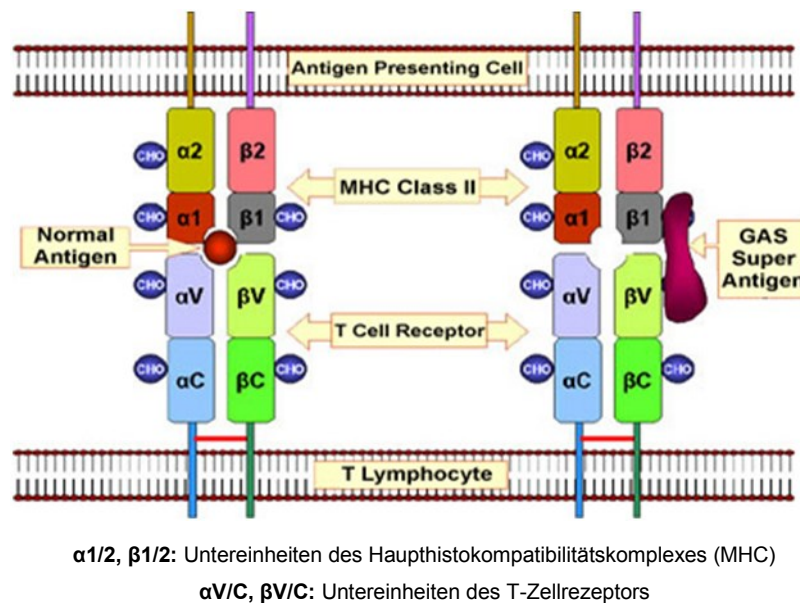


Abb. 4: Aktivierung von T-Zellen durch ein Superantigen der Gruppe A Streptokokken (GAS) im Vergleich zur normalen Aktivierung durch ein Antigen (Mayer 2013)

Bei nur 20 verschiedenen V β -Ketten ist die Stimulation ausreichend vieler T-Zellen im Experiment gewährleistet. In den Tests dieser Arbeit sind dies ungefähr 20 % der betrachteten T-Zellpopulation. Diese Tatsache wurde in der Ergebnisauswertung genutzt um den Prozentsatz an stimulierten zu nicht stimulierten Zellen zu ermitteln. Die T-Zellen reagieren auf die Stimulation zudem mit massiver Zytokinproduktion und nachfolgend mit Anergie, Toleranz und Apoptose. (Uchiyama et al. 1994)

1.3 Immunsuppressive Therapie

Die Geschichte der Immunsuppressiva und der immunsuppressiven Therapie ist relativ jung. In den 60iger Jahren kam der große Durchbruch in der Transplantationsmedizin durch die Einführung von Azathioprin, einem Antimetaboliten, der unspezifisch die Zellproliferation hemmt. Es war das erste Immunsuppressivum, welches breite Anwendung bei der Organtransplantation fand. (Dunea et al. 1965)

Durch bessere Kenntnis des Immunsystems auf molekularer Ebene wurden vor allem in den 1990iger Jahren die Möglichkeiten neue immunsuppressive

Medikamentengruppen zu entwickeln erleichtert und das Medikamentenspektrum konnte breiter gefächert werden. (Gummert et al. 1999) Ein Beleg hierfür sind das Derivat des aktiven Leflunomid Metaboliten FK778 (Zeyda et al. 2005) und die in dieser Arbeit verwendeten MAP-Kinase Inhibitoren, die potentiell neue Gruppen immunsuppressiver Medikamente darstellen.

Heute steht eine Vielzahl von Medikamentenklassen zur Verfügung, die individuell abgestimmte Medikamentenkombinationen zulassen. Die Transplantationsmedizin ist momentan und sicherlich auch in Zukunft damit beschäftigt optimale immunsuppressive Regimes für jeden einzelnen Patienten zu entwickeln. Jedes große Transplantations-Zentrum arbeitet mit eigenen Protokollen und testet Kombinationen. Zusätzlich untersuchen zahlreiche Studien, experimentell oder in klinischen Studien, verschiedenste Medikamentenkombinationen im Hinblick auf Wirksamkeit und Verträglichkeit. (Ekberg et al. 2007)

Die klinische Erfahrung hat gezeigt, dass eine gute Immunsuppression in Verbindung mit einer optimalen Langzeitüberwachung zum besten Transplantat- und Patientenüberleben führt. (Halloran 2004) Große Hoffnungen werden deshalb in die bessere Kenntnis der pharmakodynamischen und pharmakokinetischen Eigenschaften der einzelnen Substanzklassen gesetzt.

Gegenstand der medizinischen Forschung ist es weitere immunsuppressive Substanzklassen zu entdecken und gleichzeitig bereits standardmäßig eingesetzte Substanzen anhand pharmakokinetischer und pharmakodynamischer Profile zu erforschen. Das therapeutische Drug Monitoring wird oft über pharmakokinetische Parameter geleistet. Viele Studien untersuchten die Aussagekraft beispielsweise der AUC von Mycophenolat auf die akute Transplantatabstoßung. (Arns et al. 2006; Barten et al. 2007; Hale et al. 1998; Kuypers 2005) Es besteht wohl eine Korrelation, die klinische Relevanz ist dennoch nicht klar.

Die Untersuchung der Pharmakodynamik der immunsuppressiven Substanzklassen kann zum besseren Verständnis der genauen Wirkungsweise von einzelnen Immunsuppressiva führen. Verschiedene messbare Biomarker, die Indikatoren für normal biologische Prozesse, pathologische Ereignisse und pharmakologische Antworten auf eine therapeutische Intervention sind, könnten helfen die Immunsuppression von Transplantierten besser zu kontrollieren. (Burkhart et al. 2004)

Neben Pharmakokinetik und Pharmakodynamik stellt die Pharmakogenetik ein wichtiges Forschungsgebiet dar, um eine individuell abgestimmte medikamentöse Therapie für einen Patienten zu erreichen.

Die genaue Kenntnis der Immunfunktion und die spezifische Unterdrückung bis hin zur Toleranz fremder Gewebsantigene wird wahrscheinlich in der Zukunft den Transplantierten ein nahezu normales Leben ermöglichen. (Ingelfinger and Schwartz 2005)

Die genauere Charakterisierung der Wirkungsweise von Immunsuppressiva erlaubt Aussagen über ihren möglichen sinnvolleren Einsatz in der klinischen Anwendung. Die Kombinationstherapien der Induktions- und Erhaltungstherapie könnten sich dadurch verfeinern und verändern lassen.

Die heute verfügbaren Immunsuppressiva lassen sich in 3 Gruppen einteilen, in Glukokortikoide, kleinmolekulare Moleküle und Antikörper-basierte Substanzen. Zur Gruppe der kleinmolekularen Moleküle gehören die Calcineurininhibitoren Cyclosporin A und Tacrolimus, die mTOR-Inhibitoren Sirolimus und Everolimus, der IMPDH-Inhibitor Mycophenolat mofetil und einige weitere Substanzen.

1.3.1 Mycophenolsäure: Mycophenolat mofetil ®

Die Mycophenolsäure (MPA) wurde bereits 1893 von Bartolomeo Gosio entdeckt. Der zentrale Wirkmechanismus, die Hemmung des Enzyms Inosinmonophosphat-Dehydrogenase (IMPDH), konnte erst im Jahr 1969 beschrieben werden. (Franklin et al. 1969) Die Einführung von Purinsyntheseinhibitoren basierte auf der Tatsache, dass angeborene Fehler in der *de novo* Synthese, im Gegensatz zu Fehlern im Purin-Salvage Signalweg, zu Immundefizienz führen ohne andere Organe zu schädigen. (Allison et al. 1975)

Mycophenolat mofetil (MMF) wurde erstmals 1995 in den USA für die Behandlung von Nierentransplantierten (Shaw et al. 1995) und 1998 für den Einsatz bei der Herztransplantation zugelassen. (Gummert et al. 1999)

Heute ist MPA weltweit ein wertvolles Standardimmunsuppressivum, welches in Deutschland in über 80% für die initiale Therapie nach Transplantation eingesetzt wird. (Budde et al. 2006) MPA wird nicht nur von der Transplantationsmedizin genutzt. Der Einsatzbereich erstreckt sich über die Transplantationsmedizin

hinaus auf Autoimmunerkrankungen wie z.B. die Lupus Nephritis. (Ginzler et al. 2005; McCune 2005) Auch über antiproliferative Effekte in der Behandlung von Restenosen bei Koronararterien gibt es erste Hinweise. (Voisard et al. 2005) In vitro wurde für MMF in einer Studie eine Aktivität gegen *Pneumocystis jirovecii* nachgewiesen. (Oz et al. 1997)

Unerwünschte Wirkungen betreffen häufig den Gastrointestinaltrakt (Übelkeit, Erbrechen und Diarrhoe) und das hämatologische System (Anämie, Thrombozytopenie, Leukopenie). In einer Studie wurden in der MMF Gruppe, im Vergleich zur Azathioprin Gruppe, mehr opportunistische Infektionen beobachtet. (Kobashigawa et al. 1998) Es gibt Hinweise, dass MMF das Risiko einer CMV-Infektion erhöhen könnte. (Zmonarski et al. 2003)

MMF zählt zu den am besten verträglichen Immunsuppressiva mit einer großen therapeutischen Breite. (Glander et al. 2003) Durch eine Kombination mit MMF lässt sich die Toxizität der immunsuppressiven Therapie verringern, da nebenwirkungsreiche Substanzen, wie Calcineurininhibitoren und Glukokortikoide, eingespart werden können. (Land et al. 2005) Die Kombination von MMF mit Cyclosporin A erhöht die Überlebensrate der Patienten und des Spenderorgans und verringert die akute und chronische Abstoßung. (Meier-Kriesche et al. 2004) Zusätzlich ist MMF das einzige Immunsuppressivum, das einen positiven Effekt auf die chronische Transplantatabstoßung zeigt. (Allison et al. 2005) Everolimus, ein Immunsuppressivum aus der Gruppe der mTOR-Inhibitoren, war in einer Untersuchung gleich wirksam wie MMF, zeigte aber mehr unerwünschte Wirkungen. (Lorber et al. 2005)

Pharmakokinetik

Mycophenolat mofetil (MMF) ist der 2-Morpholinoethylester der Mycophenolsäure und ein Prodrug, das im Körper durch Plasmaesterasen in Mycophenolsäure (MPA) hydrolysiert wird. (Fulton et al. 1996; Gummert et al. 1999) Dies findet im Magen oder in der Mucosa der Dünndarmschleimhaut statt, weshalb sich im Blut nur MPA Spiegel bestimmen lassen. MPA ist im Plasma stark an Albumin gebunden (Nowak et al. 1995), nur etwa 1-2,5 % liegt in freier Form vor. (Holt 2002) Dieser Anteil ist größtenteils für die pharmakologischen Effekte verantwortlich.

In der Leber wird MPA hauptsächlich zu 7-O-MPA-Glucuronid (MPAG) metabolisiert, welches pharmakologisch inaktiv ist und über den Urin (87 %) und die Faeces (6 %) ausgeschieden wird. (Fulton et al. 1996) Des Weiteren werden ein Phenolglukosid und ein Acylglucuronid gebildet, welchen in vitro pharmakologische Aktivität nachgewiesen wurde. (Shaw et al. 2003; van Hest 2006) Der über die Galle eliminierte Teil von MPA unterliegt dem enterohepatischen Kreislauf, indem es durch Bakterien deglucuronidiert und von der Darmschleimhaut erneut resorbiert wird. Daraus resultiert ein zweiter Anstieg der MPA Konzentration 6-12 h nach MMF Gabe. (Bullingham et al. 1996)

Da MMF häufig gastrointestinale Nebenwirkungen verursacht, wurde eine säureresistente, mikroverkapselte Form (EC-MPS) entwickelt. Die unerwünschte Wirkung gestaltet sich dann als problematisch, wenn der therapeutische Wirkspiegel von MPA nicht erreicht werden kann und somit eine Abstoßungsreaktion begünstigt wird. Dadurch, dass bei diesem Präparat die Mycophenolsäure nicht im Magen, sondern erst im Dünndarm freigesetzt wird, erhoffte man sich eine bessere Verträglichkeit. Viele Studien zeigten, dass EC-MPS genauso wirksam und effektiv wie MMF ist. (Salvadori et al. 2004; Sollinger 2004; Tedesco-Silva et al. 2005) Allerdings wurde auch gezeigt, dass die Inzidenz von den gastrointestinalen Beschwerden nicht reduziert werden konnte. (Meier-Kriesche et al. 2005)

Das therapeutische Drugmonitoring für MPA ist Gegenstand verschiedener Untersuchungen. Aufgrund des großen therapeutischen Fensters ist MMF in fester Tagesdosierung zugelassen. (Kasiske et al. 2009) Es gibt zahlreiche Untersuchungen über das TDM anhand der AUC, beispielsweise mit Messungen 4 Stunden nach Einnahme (Sommerer et al. 2010) oder der Messung der IMPDH-Aktivität. (Glander et al. 2004) Insgesamt sind die Ergebnisse unklar und es gilt weitere Informationen zu sammeln, um besonders die Therapie für Hochrisikopatienten zu verbessern. (van Gelder T. et al. 2005)

Pharmakodynamik

Mycophenolsäure (MPA) hemmt die Inosin-Monophosphat-Dehydrogenase (IMPDH), das Schlüsselenzym der *de novo* Purinsynthese, nicht-kompetitiv und reversibel. Während die meisten Zellen einen großen Teil ihrer Nukleinsäuren

wiederverwerten können (Salvage-Pathway), sind T- und B-Lymphozyten vollständig von der *de novo* Synthese abhängig. (Quemeneur et al. 2004) Deshalb wirkt MPA stärker auf die Lymphozyten, wodurch diese nahezu selektiv gehemmt werden. Zudem inhibiert MPA die in Lymphozyten exprimierte Isoform II der IMPDH um das 5-fache (Carr et al. 1993), was eine weitere Erklärung für die Selektivität von MPA darstellt.

MPA hemmt die Proliferation von B- und T-Lymphozyten. (Eugui et al. 1991) Die akute und chronische Abstoßung wird unter anderem durch die Unterdrückung der Rekrutierung mononukleärer Zellen verhindert. MPA vermindert die Zytokin induzierte NO Produktion durch verschiedene NO-Synthetasen. Dieser Effekt ist wohl ein weiterer Mechanismus zur Unterdrückung der Transplantatabstoßung. (Allison et al. 2005)

Zudem scheint MPA Apoptose in T-Zellen induzieren zu können. In Mäusen unter MMF Therapie entspricht dies der schnellen Eliminierung von SEB reaktiven T-Lymphozyten, die den V β 8-Rezeptor exprimieren. (Izeradjene et al. 2001)

Verschiedene pharmakodynamische Untersuchungen konnten berechtigte Hinweise auf eine Beziehung zwischen Pharmakodynamik und dem klinischem Outcome zeigen. Ein Einfluss der IMPDH Aktivität, gemessen vor der Transplantation, auf das klinische Ergebnis konnte bereits gezeigt werden. (Budde et al. 2000) Außerdem ist die gemessene IMPDH Aktivität in isolierten humanen Lymphozyten umgekehrt proportional zur MPA Konzentration im Plasma. (Sanquer et al. 1999)

1.3.2 Cyclosporin A, Sandimmun®

Cyclosporin A, ist ein aus Schlauchpilzen (*Tolypocladium inflatum* und *Cylindrocarpon lucidum*) isoliertes zyklisches Protein aus elf Aminosäuren. Es gehört wie Tacrolimus zu den Calcineurininhibitoren und zählt zu den hoch wirksamen Basisimmunsuppressiva. Sein Immunsuppressiver Effekt wurde erstmals 1977 von Borel beschrieben. (Borel et al. 1977) Bei einer Transplantation wurde Cyclosporin zum ersten Mal 1978 eingesetzt. (Calne et al. 1978) Die Verwendung revolutionierte diesen Teilbereich der Medizin und die Überlebenszeit der Patienten und des Transplantats stieg deutlich. (Burke, Jr. et al. 1994)

Die zahlreichen unerwünschten Wirkungen sind konzentrationsabhängig. Mögliche gravierende Nebenwirkungen sind Schädigung der Nieren, der Leber und des Gastrointestinaltrakts. Außerdem kann Cyclosporin zu Hyperlipidämie, Gingivahyperplasie, Hirsutismus, zu Ödemen, Tremor und zu Bluthochdruck führen. Zudem können ein hämolytisch urämisches Syndrom (HUS) und ein posttransplantärer Diabetes mellitus getriggert werden. (Kahan 1989)

Aufgrund dieser Nebenwirkungen wird CSA in vielen Studien mit neueren Immunsuppressiva verglichen und Protokolle mit reduzierten CSA Dosen oder mit völligem Verzicht auf CSA getestet. (Ekberg et al. 2007) Jedoch zeichnet sich durch widersprüchliche Ergebnisse und fehlende Langzeit-Erfahrung bisher keine eindeutige Tendenz ab. (Scherer et al. 2007) Aktuell scheinen die Calcineurininhibitoren nicht aus der immunsuppressiven Therapie verdrängt werden zu können. (Tedesco et al. 2012) Angewandt wird Cyclosporin zudem bei Colitis ulcerosa, (Meier et al. 2011) bei Hauterkrankungen, bei Glomerulonephritis sowie bei chronischen Entzündungszuständen der Bindehaut und der Hornhaut. (Schrell et al. 2012)

Pharmakokinetik

Die Pharmakokinetik von CSA gestaltet sich sehr variabel sowohl zwischen verschiedenen Patienten als auch im selben Patienten. (Fahr 1993)

CSA wird in der Leber über CYP3A4 metabolisiert, was unter anderem für die Vielzahl an Arzneimittelinteraktionen und die Variabilität in der Bioverfügbarkeit verantwortlich ist. (Budde et al. 2006)

Die geringe therapeutische Breite macht eine Überwachung des Medikamentenspiegels unabdingbar. (Lindholm et al. 1993) Das therapeutische Drugmonitoring für CSA ist im klinischen Alltag etabliert. Zur Therapieüberwachung wird die Blutspiegelkonzentration 2 h nach Einnahme (C2) bestimmt. (Clase et al. 2002; Cole et al. 2003)

Pharmkodynamik

Cyclosporin bindet an Cyclophilin, ein intrazelluläres Molekül der Immunophilinfamilie. Der Komplex aus beiden Molekülen hemmt die

Phosphataseaktivität von Calcineurin und verhindert so die Translokation des Transkriptionsfaktors NF-AT (nuclear factor activating T-Cell). So wird die Transkription von zahlreichen Zytokinen und Zelloberflächenrezeptoren (wie IL-2 und IFN γ) gehemmt. Außerdem wird die Aktivierung und Vermehrung von Lymphozyten gehemmt. (Clipstone et al. 1992)

In der Pharmakodynamik steckt Potential, die klinische Überwachung von CSA weiter zu optimieren. Die Hemmung von Calcineurin-Phosphat kann reproduzierbar in peripherem Blut überwacht werden. (Awni 1992)

Eine Studie beschreibt eine Methode, die den CSA Effekt in vivo anhand der Hemmung von Phytohämagglutinin-P stimulierter IL-2 Produktion mittels ELISA zeigt. (Stein et al. 1999) Eine andere Studie vermutet, dass die Bestimmung von IFN γ einen spezifischeren Marker darstellt. (Grinyo et al. 2004)

1.3.3 Prednisolon, *Decortin H*®

1951 zeigten 2 Studien unabhängig voneinander das verbesserte Transplantatüberleben von Hauttransplantaten durch Glukokortikoidgabe bei Kaninchen. (Billingham et al. 1951; Morgan 1951) Daraufhin wurden die Glukokortikoide in die Transplantationsmedizin eingeführt. Dort gehörte es über 2 Jahrzehnte zur Kombinationstherapie mit Cyclosporin A und MMF. (Halloran 2004) Neuere Studien zielen jedoch darauf ab, ähnlich wie bei den Calcineurininhibitoren, den Einsatz von Glukokortikoiden zu verringern oder ganz auf sie zu verzichten. (Land et al. 2005)

Prednisolon wird bei der Behandlung von rheumatoiden Erkrankungen, entzündlichen Augenerkrankungen, Asthma bronchiale, chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen, Multipler Sklerose und Autoimmunerkrankungen verwendet.

Die immunsuppressive Wirkung ist nicht-selektiv, wodurch besonders bei Langzeitanwendung in hoher Dosierung eine Vielzahl von schweren Nebenwirkungen auftreten. Nebenwirkungen sind eine erhöhte Infektanfälligkeit, arterielle Hypertonie, Dyslipidämie, Stammfettsucht, peptische Ulcera, Pankreatitis und Osteoporose mit der Gefahr von avaskulären Knochennekrosen. Weitere schwere Nebenwirkungen sind die Entwicklung eines Steroiddiabetes, die Kataraktentstehung, eine Pergamenthaut oder periphere Knochenbrüche.

Pharmakodynamik

Prednisolon (1,2-Dehydrocortisol) ist ein synthetisches Glukokortikoid. Es ist außerdem ein aktiver Metabolit des Prednison (*Decortin®*). Prednisolon besitzt eine ausgeprägte immunsuppressive und darüber hinaus eine entzündungshemmende sowie antiallergische Wirkung. Glukokortikoide sind Agonisten der Glukokortikoid Rezeptoren und die vermittelten Effekte sind hauptsächlich transkriptionell bedingt über DNA-Bindung oder Proteininteraktionen des Rezeptorkomplexes mit Transkriptionfaktoren wie NFkB und Aktivator-Protein1. (Karin 1996) Obwohl der komplizierte Wirkmechanismus der Glukokortikoide noch nicht vollständig geklärt ist, sind doch einige Wirkungen bzw. Angriffspunkte bekannt: Sie

- hemmen die Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen aus Makrophagen und dendritischen Zellen, die bei der Aktivierung von Lymphozyten beteiligt sind,
- können zytotoxische T-Zellen durch die Blockierung der IL-2 Produktion von T-Helferzellen hemmen, (Rosenberg et al. 1980)
- verhindern die Entwicklung der Monozyten zu Makrophagen,
- hemmen die Migrations- und Phagozytosefähigkeit der Makrophagen und dendritischen Zellen,
- hemmen die Expression von HLA-Molekülen und kostimulatorischen Molekülen auf Makrophagen und dendritischen Zellen,
- wirken offenbar „membranstabilisierend“ (z. B. antiödematös) und verändern damit die Durchlässigkeit für verschiedene Substanzen.

1.3.4 MAP-Kinase Inhibitoren

Die MAP-Kinase Inhibitoren sind eine potentiell neue immunsuppressiv wirkende Gruppe der C-A-I-R Biosciences GmbH. Sie blockieren Teilschritte des intrazellulären Signalweges, der über die MAP-Kinasen (MAPK) vermittelt wird. MAP steht für mitogen-activated protein und beschreibt einen mehrstufigen intrazellulären Signaltransduktionsweg mit mindestens drei beteiligten Kinasen. Die Phosphorylierungskaskade läuft über eine MAP-Kinase-Kinase-Kinase (MAPKKK), einer MAP-Kinase-Kinase (MAPKK) zu einer MAP-Kinase. Aktiviert werden sie durch verschiedene extra- und intrazelluläre Stimuli, wie

Wachstumsfaktoren, Zytokine oder zellulären Stress. (Robinson et al. 1997; Schaeffer et al. 1999) Dieses System ist biologisch konserviert und existiert in Hefen sowie im Menschen. Die MAP-Kinasen werden durch zweimalige Phosphorylierung an einem Threonin- und einem Tyrosin-Rest aktiviert. Säugetiere exprimieren mindestens 4 verschiedene Subfamilien von MAPK: die ERK1/2 (extracellular signal-related kinases), die JNK-1/2/3 (Jun amino-terminal kinases), die p38 Proteinkinasen (p38alpha/beta/gamma/delta) und ERK5, die aktiviert werden von spezifischen MAPKK: MEK1/2 für ERK1/2, MKK3/6 für p38, MKK4/7 (JNKK1/2) für die JNKs, und MEK5 für ERK5. Verschiedene Stimuli aktivieren einen der MAPK-Wege. Die Aktivierung über Mitogene führt über den ERK1/2 Weg zu Zellwachstum, Zellproliferation und Zelldifferenzierung. (Garnett et al. 2004) Dagegen können Stress oder Zytokine, wie TNF α , über p38 zu Entzündung oder Apoptose führen. Die MAP-Kinase Signalwege können über die Vielzahl an aktivierten Transkriptionsfaktoren zu vielen verschiedenen Effekten führen.

In Studien konnte gezeigt werden, dass durch eine Hemmung des MAP-Kinase Signaltransduktionsweges die Replikation von HCMV vermindert wurde. Es wurde gezeigt, dass HCMV p38 und ERK1/2 aktiviert. (Chen et al. 2002; Griego et al. 2000; Johnson et al. 2000) Dies lässt Spekulationen über einen Einsatz solcher Substanzen als antivirale Therapeutika zu.

Ursprünglich wurden sie zur Behandlung von Autoimmunerkrankungen entwickelt. Im Moment werden die Substanzen noch in vitro und im Tierversuch getestet. Da der MAP-Kinase Signalweg nach Antigenkontakt auch in Lymphozyten aktiviert wird stellt diese Kaskade einen weiteren Angriffspunkt für neue Immunsuppressiva dar.

Die in dieser Arbeit verwendeten Medikamente gehören zur Substanzklasse der trisubstituierten Imidazole. Beide Varianten, 3736 und 3830, hemmen die p38 MAP-Kinasen alpha und beta, und die verwandten Kinasen JNK 1-3. Variante 3736 wirkt selektiver auf die beiden p38 Kinasen, während Variante 3830 beide Kinasetypen ähnlich stark hemmt.

In klinischen Studien wurden die Medikamente bislang noch nicht eingesetzt, sodass es keine Informationen zu therapeutischen Wirkspiegeln oder möglichen Nebenwirkungen gibt.

1.4 Opportunistische Infektionen

Eine immunsuppressive Therapie begünstigt Virusreaktivierungen, deren systemische Streuung (Virämie) und die Entstehung viraler Erkrankungen. Diese sogenannten opportunistischen Infektionen sind für den immunkompetenten Körper keine Gefahr, können jedoch den immungeschwächten Patienten stark gefährden. Opportunistische Infektionen können auch bakteriellen, parasitären oder fungalen Ursprungs sein.

Die Infektionen treten mit Beginn der immunsuppressiven Therapie typischerweise zu bestimmten Zeitpunkten auf. (Abb. 5) Dieses Kenntnis ist hilfreich bei der Behandlung und Prävention der gefährlichsten Erreger.

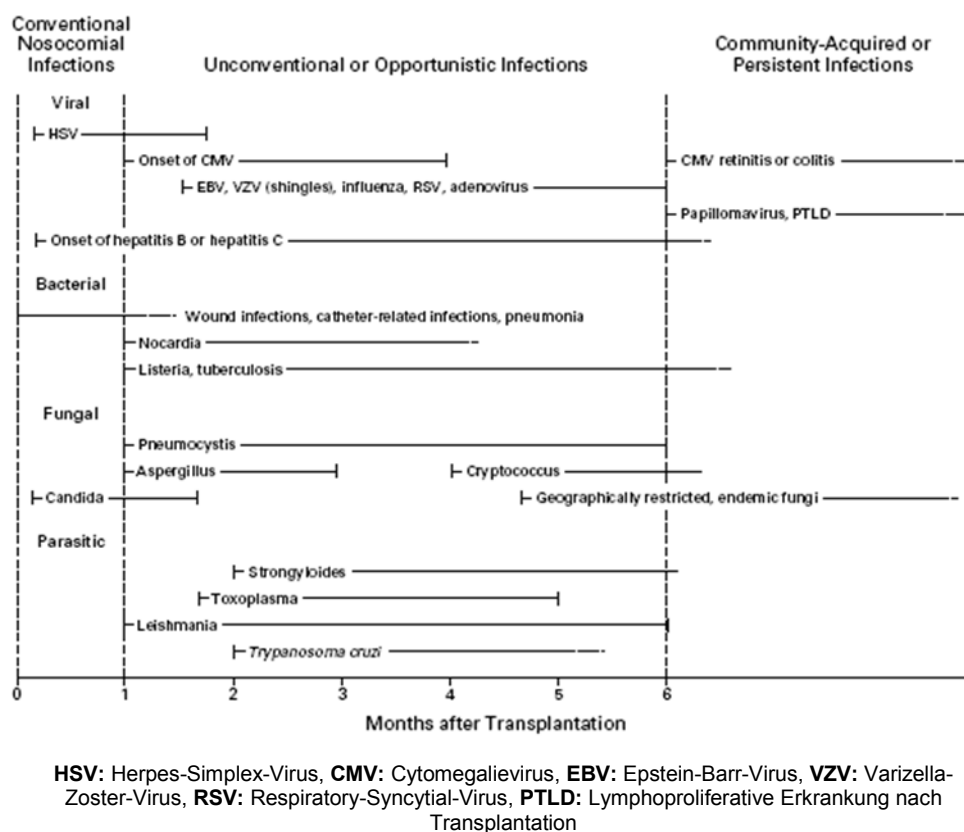


Abb. 5: Darstellung über das Auftreten opportunistischer Infektionen nach Transplantation (Fishman et al. 1998).

In der frühen Phase nach einer Transplantation (1. Monat) treten kaum opportunistische Infektionen auf. Dies liegt an der noch unvollständigen medikamentösen Immunsuppression.

Bis zu 6 Monate nach Transplantation sind vor allem virale Erreger, wie CMV, EBV, VZV und andere Herpesviren, sowie die Transplantatabstoßung

hauptverantwortlich für die meisten Fieberepisoden. (Fishman et al. 1998) Aber auch opportunistische Pilz- oder Bakterieninfektionen treten in dieser Phase vermehrt auf. Diesen wird mit geeigneten präventiven medikamentösen Prophylaxen, wie der antibiotischen Therapie mit Trimethoprim-Sulfamethoxazol gegen *Pneumocystis jirovecii* Pneumonie, entgegen gewirkt. (Fishman 2007)

Nach 6 Monaten verringert sich die Infektionsrate für die Transplantierten, deren Transplantat voll funktionsfähig ist, da die immunsuppressive Therapie bei diesen Patienten reduziert werden kann. Trotzdem haben Transplantatempfänger ein generell erhöhtes Risiko für ambulant erworbene Pathogene. In manchen Patienten können chronische Virusinfektionen Transplantatschäden verursachen. Eine der wichtigsten und bedeutendsten opportunistischen Infektionen stellt die Primärinfektion, die Reaktivierung oder die Superinfektion mit dem humanen Cytomegalievirus dar. (Brennan 2001; Kotton et al. 2010; Rubin 2001)

1.4.1 Cytomegalievirus (CMV) Infektionen

Die CMV-Primärinfektion oder auch die CMV-Reaktivierung wird von den Transplantationsmedizinern gefürchtet. Das Virus kann schwerwiegende Erkrankungen wie Pneumonitis, Hepatitis, Nephritis, Myokarditis, aseptische Meningitis und Retinitis hervorrufen. (Crough et al. 2009)

Das humane Cytomegalievirus gehört zu den Beta-Herpesviren. Der Durchseuchungsgrad in westlichen Industriestaaten beträgt 30-90 %, in Entwicklungsländern werden bis 100 % erreicht. (Crough et al. 2009) Die Primärinfektion verläuft bei Immunkompetenten meist asymptomatisch oder sehr mild. Das Virus persistiert lebenslang im jeweiligen Wirt, beispielsweise in mononukleären Zellen.

In der Frühphase einer CMV-Infektion treten kaum oder keine Symptome auf, jedoch kann zu diesem frühen Zeitpunkt eine Infektion durch geeignete Tests bereits nachgewiesen werden.

Eine Therapie in diesem Stadium kann erfolgreich einen symptomatischen und schweren Krankheitsverlauf verhindern. Wird dieses Stadium nicht erkannt, kommt es zuerst zu grippeähnlichen Symptomen wie Fieber, Abgeschlagenheit, Muskelschmerzen und Blutbildveränderungen. Unbehandelt können die oben

erwähnten schweren bis lebensbedrohlichen CMV-assoziierten Erkrankungen auftreten. Diese gilt es durch gezielte Untersuchungen und medikamentöse Prophylaxe zu verhindern.

Eine CMV-Infektion verschlechtert die Transplantatfunktion und kann eine akute Abstoßungsreaktion hervorrufen. Genauso kann eine Abstoßung auch eine CMV-Reaktivierung auslösen. Es gibt verschiedene Empfänger-Spender-Konstellationen, die es zur Risikoeinschätzung einer CMV-Reaktivierung zu beachten gilt. Am ungünstigsten ist es für einen CMV-negativen Empfänger ein Organ eines seropositiven Spenders zu bekommen. Das Risiko für eine Primärinfektion ist sehr hoch. Eine medikamentöse Präventionstherapie ist in diesem Falle obligat um schwere Infektionsverläufe zu vermeiden. Sehr günstig ist die Konstellation, wenn beide, Spender und Empfänger, seronegativ sind. Natürlich besteht auch hier die Gefahr einer Primärinfektion mit CMV (zum Beispiel über Blutprodukte). Seronegative Spender stellen auch für CMV-positive Empfänger ein niedriges Risiko dar. Hier kann es nur zur Reaktivierung des eigenen bekannten CMV-Stammes kommen. Sind beide seropositiv kann es zu einer Reaktivierung, aber auch zu einer Superinfektion kommen, sofern der CMV-Stamm des Spenders nicht identisch mit dem Virusstamm des Empfängers ist.

(Tab. 1)

Tab. 1: Beziehung zwischen Cytomegalievirus (CMV)-Infektions- und -Erkrankungshäufigkeit sowie Spender- / Empfänger- CMV-Status (Davis 1990)

CMV-Status			Häufigkeit in % (ohne CMV Prävention)		
Spender	Empfänger	Terminologie	Infektion	Erkrankung	Pneumonie
Positiv	Negativ	Primärinfektion	70-88	56-80	30
Negativ	Positiv	Reaktivierung	0-20	0-27	Selten

Bezüglich der Nachweismethoden einer CMV-Infektion wurden in den letzten Jahren wichtige Fortschritte erzielt. (Crough et al. 2009) Als geeignete Nachweismethoden werden heute der direkte quantitative Nachweis von CMV-DNA oder der Nachweis einer pp65-Antigenämie gesehen. (Kotton et al. 2010)

1.4.2 Antivirale Therapie von CMV: Ganciclovir

Antivirale Substanzen sind Medikamente, die zur Verhinderung des Befalls eukaryoter Zellen nach Infektion oder Verhinderung der Replikation der Viren eingesetzt werden. Die Substanzgruppe der Nukleosidanaloga, zu welcher Ganciclovir (GCV) gehört, hemmt die obligat intrazelluläre Virusreplikation. Eingesetzt werden antivirale Substanzen bei schweren Virusinfektionen, wie HIV oder auch CMV im Falle einer Infektion bei immuninkompetenten Erkrankten. GCV oder dessen Prodrug Valganciclovir werden für die Therapie bei CMV-Infektion eingesetzt. Antivirale Wirkung besteht zusätzlich gegen weitere Herpesviren wie HSV-1 und HSV-2, EBV und HHV-6. Ganciclovir ist nur für die Behandlung schwerer CMV-Infektionen zugelassen. Ganciclovir hat viele unerwünschte Wirkungen wie die Schädigung schnell proliferierender Gewebe (Knochenmark), sowie Auslösen von Übelkeit, Erbrechen und Diarrhöe. Ein Grund für die Toxizität ist, dass GCV auch in nicht virusinfizierten Zellen wirksam ist.

Nach erfolgter Organtransplantation wird die medikamentöse CMV-Prophylaxe für 3-6 Monate durchgeführt. (Fishman et al. 1998; Kotton et al. 2010) Einige Transplantatempfänger, wie zum Beispiel diejenigen, die eine höhere immunsuppressive Erhaltungstherapie benötigen, würden eventuell von einer 6-12 Monate dauernden Prophylaxe profitieren. Jedoch besteht bei längerer Behandlung die Gefahr eine Knochenmarksuppression zu provozieren. Resistenzentwicklung gegen Ganciclovir ist möglich. Ursache ist meist eine Mutation im UL97 Gen (virale Proteinkinase) oder im UL54 Gen (DNA-Polymerase). (Fishman 2007)

Pharmakodynamik

Ganciclovir ist ein azyklisches Analogon des Nukleosids Guanosin. Intrazellulär erfolgt die Konversion zu GCV-5-Monophosphat durch die virale Kinase UL97. Anschließend katalysieren zelluläre Kinasen die Bildung von GCV-Triphosphat. Dieses Triphosphat inhibiert als Strukturanalogon kompetitiv den Einbau von dGTP durch die virale DNA-Polymerase. Das phosphorylierte Medikament hat eine höhere Affinität für virale Enzyme.

Das Analogon wird zudem in das virale Genom eingebaut und verlangsamt die Replikation von viraler DNA. (Crumpacker 1996)

1.5 Ziel der Arbeit

In dieser Arbeit soll die Pharmakodynamik funktionell unterschiedlicher Immunsuppressiva untersucht werden (Mycophenolsäure, Cyclosporin A, Prednisolon, MAP-Kinase Inhibitoren). Diese Immunsuppressiva sollen zusätzlich in Kombination mit dem antiviralen Nukleosidanalogon Ganciclovir getestet werden. Es sollen mögliche synergistische Effekte zwischen Immunsuppressiva und Ganciclovir untersucht werden.

Die immunsuppressive Wirkung (Pharmakodynamik) der verschiedenen Substanzen wird durch Immunfunktionstests der spezifischen zellulären Immunität *in vitro* untersucht (CD4+- und CD8+-T-Zellen). Durch die Quantifizierung der Zytokinaktivierung und der Proliferation sollen frühe und späte Schritte der T-Zellaktivierung evaluiert werden, um die Wirkung der verschiedenen Immunsuppressiva besser zu charakterisieren.

Die charakteristischen Wirkprofile der getesteten immunsuppressiven Substanzen sollen helfen ihre Bedeutung für die Induktions- und Erhaltungstherapie sowie für die Mono- oder Kombinationstherapie zu diskutieren. Pharmakodynamische Untersuchungen der spezifischen T-zellulären Immunität sollen in Zukunft dazu beitragen, immunsuppressive Kombinationstherapien gezielter einzusetzen und durch adäquateres Monitoring Über- bzw. Unterdosierungen von Immunsuppressiva zu vermeiden.

2 Material und Methodik

2.1 Material

2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Sterile Arbeitsbank	Heraeus, Hanau (Kendro)
Durchflusszytometer <i>FACSCalibur</i>	Becton & Dickinson
FACS- Analyse-Software <i>CellQuest Pro</i>	Becton & Dickinson
CO ₂ -Begasungsbrutschrank	Heraeus, Hanau
Pipettiergerät	Labsystems
Vortex	Bachofer, Reutlingen
Zentrifuge Allegra 6th	Beckman Coulter, USA
Zählkammer	Neubauer, Brand, Germany
Zählmikroskop	Nikon TMS
Polypropylen-Reaktionsgefäße 15 ml	Falcon (blue cap)
Polypropylen-Reaktionsgefäße 50 ml	Falcon (blue cap)
FACS-Polystyren-Rundbodenröhrchen	Falcon, Becton & Dickinson
TC-Plate 96 well, Rundboden	Cellstar, Greiner
Reaktionsgefäß 1.5 ml	Eppendorf, Hamburg
Petrischale	Cellstar, Greiner

2.1.2 Chemikalien, Substrate, monoklonale Antikörper

Anti-CD4-RPE	DAKO A/S, Denmark
Anti-CD8-APC	Caltag Laboratories
Anti-Hu-IFN- γ FITC, CD69 PE, CD4 PerCP-Cy5.5	Becton & Dickinson
CFSE (5 mM)	Molecular Probes USA
Lymphozytenseparationsmedium Ficoll	PAA Laboratories GmbH
Fetales Kälberserum (FCS)	Gibco, NY, USA
Blocking-Puffer (1:10 humanes IgG, FACS-Puffer)	
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Serva GmbH
Brefeldin A (BFA)	Sigma
1 % Paraformaldehyd (PFA) in PBS	

Einfrierlösung (70 % PBS, 20 % FCS, 10 % DMSO)

FACS-Permeabilizing-Solution Becton & Dickinson

20 µM EDTA

FACS-Lysing-Solution Becton & Dickinson

PBS 0,01 nM

RPMI-Medium 1640 Gibco, NY, USA

MEM-Medium, klar Gibco, NY, USA

- Medien komplettiert mit:

10 % FCS Gibco, NY, USA

1 % 100 IU/ml Penicillin/ Seromed

0.1 mg/ml Streptomycin

1 % 2 mM L-Glutamin Seromed

1 % nicht-essentielle Aminosäuren (NEA) Seromed

FACS-Puffer

- Komplet: 90 % steriles PBS 0,01 nM

10 % FCS

0.02% Natriumacid

SEB-Superantigen (1 µg/ml) Sigma, Taufkirchen

2.1.3 Pharmaka

Heparin (Liquemin ®) Roche, Basel

Mycophenolat mofetil ® Novartis, Basel

Cyclosporin A Novartis, Basel

Decortin H ® Merck Pharma GmbH

MAP-Kinase-Inhibitor 3736, 3830 C-A-I-R Biosciences GmbH

Ganciclovir Roche, Basel

2.2 Methodik

In der vorliegenden Arbeit wurde die Pharmakodynamik verschiedener immunsuppressiv wirkender Substanzklassen in Kombination mit Ganciclovir *in vitro* untersucht. Dazu wurden zwei experimentelle Tests gewählt, ein *Interferon gamma release assay*, der die frühe Lymphozytenaktivierung untersucht, und ein

Proliferationstest. Stimuliert wurden die Lymphozyten mit dem Superantigen SEB (1µg/ml). Jede Einzeluntersuchung wurde 6-12 mal wiederholt.

Die Gewinnung des Vollblutes erfolgte mittels peripherer-venöser Blutentnahme. Zur Antikoagulation wurde die Spritze (20 ml) vor der Entnahme mit Heparin (Liquemin®, Roche) benetzt.

Als Probanden (n=13) dienten gesunde Freiwillige. Für jeden experimentellen Ansatz wurde die Blutentnahme unmittelbar vor Durchführung des Versuchsprotokolls vorgenommen.

2.2.1 Frühe Lymphozytenaktivierung (Interferon gamma release assay)

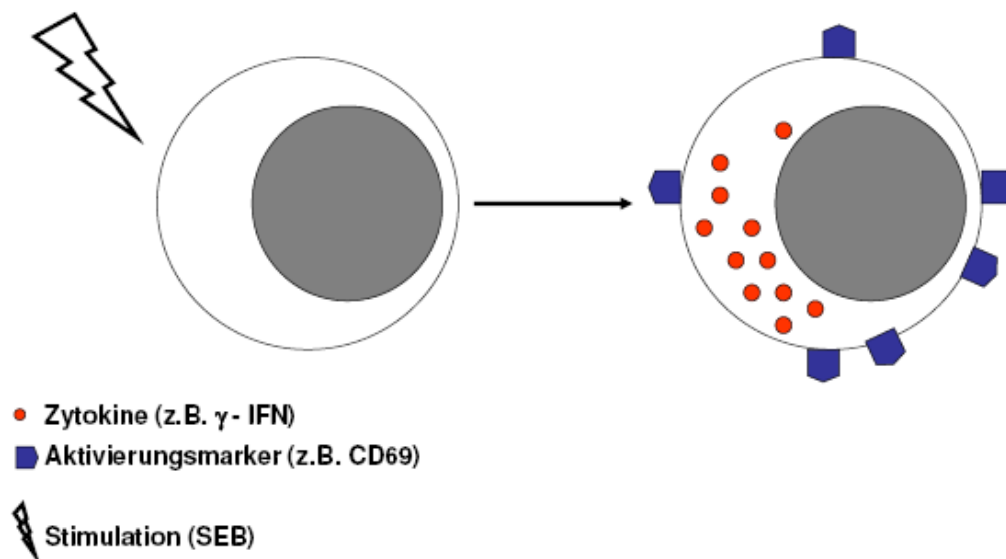


Abb. 6: Schematische Darstellung der frühen Lymphozytenaktivierung anhand der Expression von CD69 und der Produktion von Interferon gamma (IFN γ) durch Staphylokokken-Enterotoxin-B (SEB)

Mithilfe des Interferon gamma release assays wurde die Expression von CD69, sowie die Expression von CD69 und IFN γ durch T-Lymphozyten in heparinisiertem Vollblut nachgewiesen. (Abb. 6) Die Stimulation wurde in 15 ml Reaktionsgefäßen durchgeführt (Falcon Polystyren). In jeden Versuchsansatz wurden verschiedene Konzentrationen des immunsuppressiven Medikaments (50 µl), verschiedene Konzentrationen von GCV (50 µl) und 270 µl heparinisiertes Vollblut gegeben. Stimuliert wurden die Proben mit 30 µl SEB (1 µg/ml, Sigma). Als Kontrollen dienten nicht-stimulierte Vollblut-Proben.

Die Proben wurden im Brutschrank für 2 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

Nach Zugabe von jeweils 8 µl Brefeldin A (BFA) und weiterer Inkubation für 4 Stunden im Brutschrank wurde die Aktivierung mit 50 µl EDTA (20 µM) gestoppt. Nach weiterer Inkubation (15 Minuten bei Raumtemperatur) wurden die Zellen durch Zugabe von FACS-Lysing-Solution (Becton & Dickinson) fixiert und permeabilisiert. Anschließend wurden die Proben 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, abschließend zentrifugiert (5 Minuten bei 1600 rpm, gebremst) und der Überstand dekantiert. Nach erneutem Vortexen erfolgte die sofortige Weiterverarbeitung der Proben oder die Zugabe von 0,5 ml Einfriermedium und die Lagerung bis zur Analyse bei -80 °C.

Vorbereitung der Proben für die Messung am Durchflusszytometer

Die eingefrorenen prästimulierten und fixierten weißen Blutzellen wurden im Wasserbad (37 °C) aufgetaut, mit 2 ml FACS-Puffer gewaschen und bei 1600 rpm 5 Minuten zentrifugiert. Die Überstände wurden dekantiert und die Zellen mittels 500 µl FACS-Permeabilizing-Solution (Becton & Dickinson) lysiert. Die Proben wurden in vorbereitete FACS-Reaktionsgefäße überführt. Nach 10-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur, einem erneuten Waschgang mit 2 ml FACS-Puffer, anschließender Zentrifugation bei 1600 rpm für 5 Minuten, folgte die Markierung der Zellpellets mit 50 µl eines Antikörper-Mix, bestehend aus je 8 µl CD4-CD69-IFN γ -Mix (Becton & Dickinson), 0,2 µl CD8-APC (Caltag Laboratories) und 42 µl Blocking-Puffer pro Probe. Die Proben wurden bei Raumtemperatur und in Dunkelheit 30 Minuten inkubiert. Nach erneutem Waschen und Zentrifugieren wurden die Pellets in 300 µl 1 % PFA in PBS aufgenommen und im Anschluss analysiert.

Durchflusszytometrische Analyse

Die durchflusszytometrische Analyse erfolgte an einem FACSCalibur Gerät (Becton & Dickinson) mit CellQuest pro Software. Die Zellen wurden hinsichtlich Größe und Granularität (FSC, SSC) analysiert. Dabei wurde das Fenster so gewählt, dass die Lymphozytenpopulation gut abgegrenzt werden konnte. (Abb. 7)

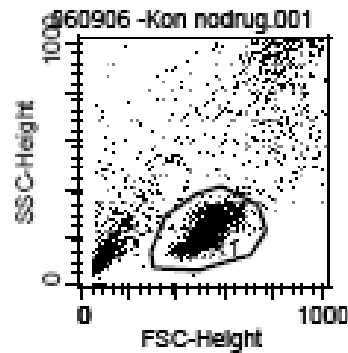


Abb. 7: Durchflusszytometrische Darstellung der Lymphozytenpopulation anhand Größe (FSC) und Granularität (SSC)

Durch die Markierung der stimulierten Blutzellen mit spezifisch fluoreszenzmarkierten Antikörpern (Anti-CD4-RPE, DAKO A/S, Anti-CD8-APC, Caltag Laboratories) konnten beide T-Zellsubpopulationen in der Analyse getrennt dargestellt werden. (Abb. 8)

R2: CD4 positive T-Lymphozyten (T-Helferzellen)

R3: CD8 positive T-Lymphozyten (zytotoxische T-Zellen)

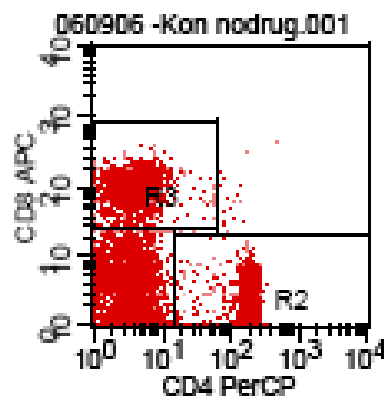


Abb. 8: Durchflusszytometrische Analyse: Trennung der Lymphozyten (CD4+- und CD8+-Zellen) durch Antikörper-Färbung

Durch die Antikörper gegen CD69 und Interferon gamma (Anti-Hu-IFN- γ FITC, CD69 PE, CD4 PerCP-Cy5.5, Becton & Dickinson) konnten in den beiden T-Zell Populationen (CD4+- bzw. CD8+-Zellen) die aktivierten Zellen (CD69 und IFN γ positiv) differenziert werden.

Die nächsten Abbildungen veranschaulichen die Messung anhand einer nicht stimulierten Kontrolle und einer stimulierten Probe. (Abb. 9, Abb. 10)

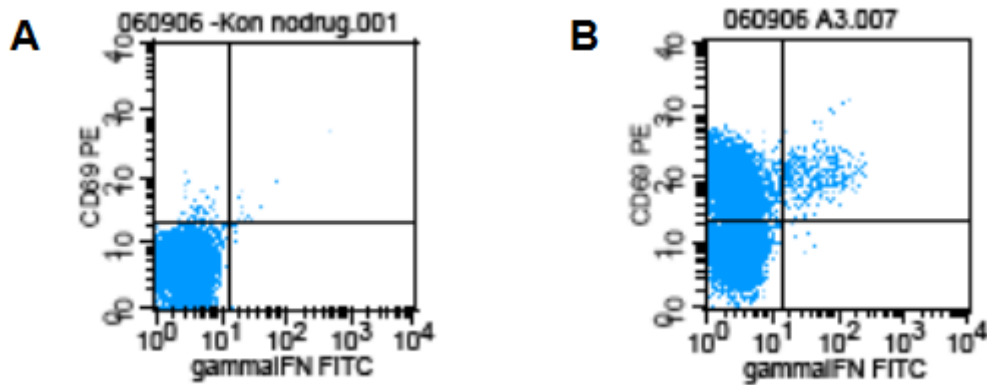


Abb. 9: Durchflusszytometrische Analyse nicht stimulierter (A) und Staphylokokken-Enterotoxin-B stimulierter (B) CD4⁺-Zellen durch Antikörperfärbung

Ein besonders frühes Zeichen der Aktivierung ist die Expression von CD69 (y-Achse), funktionell relevant ist der Nachweis von IFN γ produzierenden CD69⁺CD4⁺-T-Zellen (T-Helfer1-Zellen).

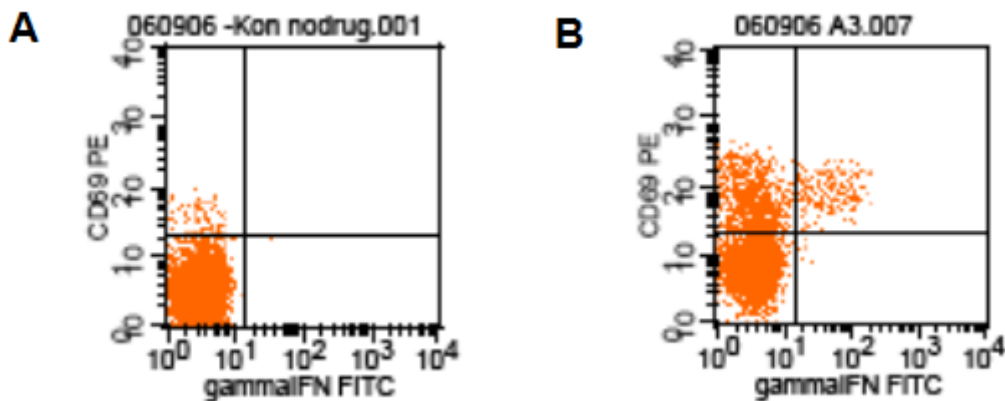


Abb. 10: Durchflusszytometrische Analyse nicht stimulierter (A) und Staphylokokken-Enterotoxin-B stimulierter (B) CD8⁺-Zellen durch Antikörperfärbung

Die Abbildungen gliederten sich in 4 Quadranten:

- Unterer linker Quadrant (LL): Zellpopulation (CD4⁺/CD8⁺-T-Zellen)
- Oberer linker Quadrant (UL): Zellen mit Expression von CD69
- Oberer rechter Quadrant (UR): Zellen mit Expression von CD69 und IFN γ

Der vom Durchflusszytometer erstellten Datentabelle wurden die prozentualen Messwerte für die Evaluation entnommen.

Auswertung der Durchflusszytometrischen Daten

Für die Quantifizierung der frühen Lymphozytenaktivierung untersuchten wir in den beiden T-Zellpopulationen (CD4+- und CD8+-Zellen) den Anteil der CD69+- sowie der CD69/IFN+-Zellen. Für alle Parameter wurde zuvor der Nettowert berechnet, der sich aus den Mittelwerten der Messwerte nach Stimulation abzüglich Mittelwerte der nicht-stimulierten Kontrolle berechnet. In die abschließende Analyse gingen die relativen Nettowerte der verschiedenen Proben ein. Der 100 % Wert wurde dabei für die SEB-stimulierte Probe ohne Medikamentenzugabe definiert. Durch die Verwendung relativer Werte war es möglich alle Untersuchungen zu kumulieren und die mittlere inhibitorische Konzentration (IC50) zu berechnen.

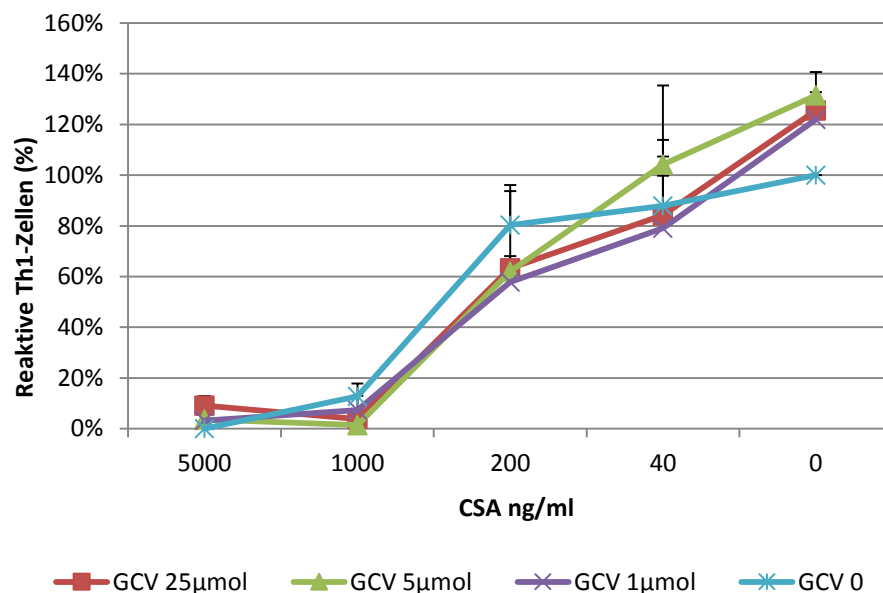


Abb. 11: Beispiel für die graphische Darstellung des Interferon gamma release assay; CD4+-T-Zellen mit Expression von CD69 und Produktion von Interferon gamma, getestet mit Cyclosporin A (CSA) und Ganciclovir (GCV) in verschiedenen Konzentrationen

2.2.2 Lymphozytenproliferation

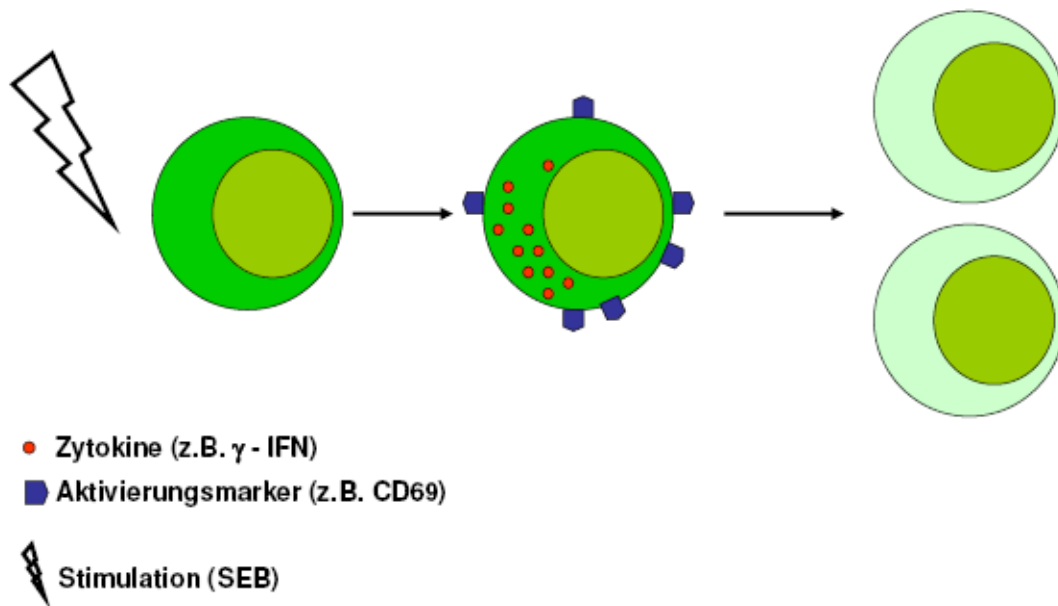


Abb. 12: Schematische Darstellung des nicht radioaktiven Proliferationstests: Stimulierung der Lymphozyten durch Staphylokokken-Enterotoxin-B (SEB), nach Aktivierung der Lymphozyten (CD69 Expression und Interferon gamma (IFN γ) Produktion) kann die Proliferation durch Weitergabe des Zellfarbstoffes CFSE auf die Tochterzellen bestimmt werden

Im Rahmen der Zellteilung (Proliferation) wird der Zellfarbstoff CFSE zu gleichen Teilen auf die Tochterzellen (F1 Generation) weitergegeben. Dadurch kommt es in den proliferierenden Zellen mit jeder Zellteilung zu einer Abnahme der Fluoreszenzintensität.

Für diese Untersuchung etablierten wir einen nicht radioaktiven Lymphozyten Proliferationstest. Die mit einem speziellen (CFSE 5 mM) markierten Lymphozyten wurden 6 Tage nach SEB-Stimulation mittels Durchflusszytometrie untersucht und die proliferierenden Zellen mit verminderter Fluoreszenzintensität quantifiziert. (Abb. 12)

Isolierung von Mononukleären Zellen mittels Ficoll-Separation

Heparinisiertes Vollblut wurde im Verhältnis 1:1 mit PBS (0,01 M) verdünnt. 4 ml des Lymphozytenseparationsmediums (Lymphoprep, PAA) wurden in ein Reaktionsgefäß (15 ml) vorgelegt. Diese wurden mit je 10 ml des Blut-PBS-Gemisches langsam überschichtet, so dass sich das Vollblut nicht mit der Ficoll-

Lösung vermischt. Anschließend wurden die Reaktionsgefäße bei 1400 rpm für 30 Minuten ungebremst zentrifugiert. Dabei werden die verschiedenen Blutbestandteile aufgetrennt. Die Verteilung im Reaktionsgefäß stellte sich nach Entnahme der Proben aus der Zentrifuge wie folgt dar: (Abb. 13)

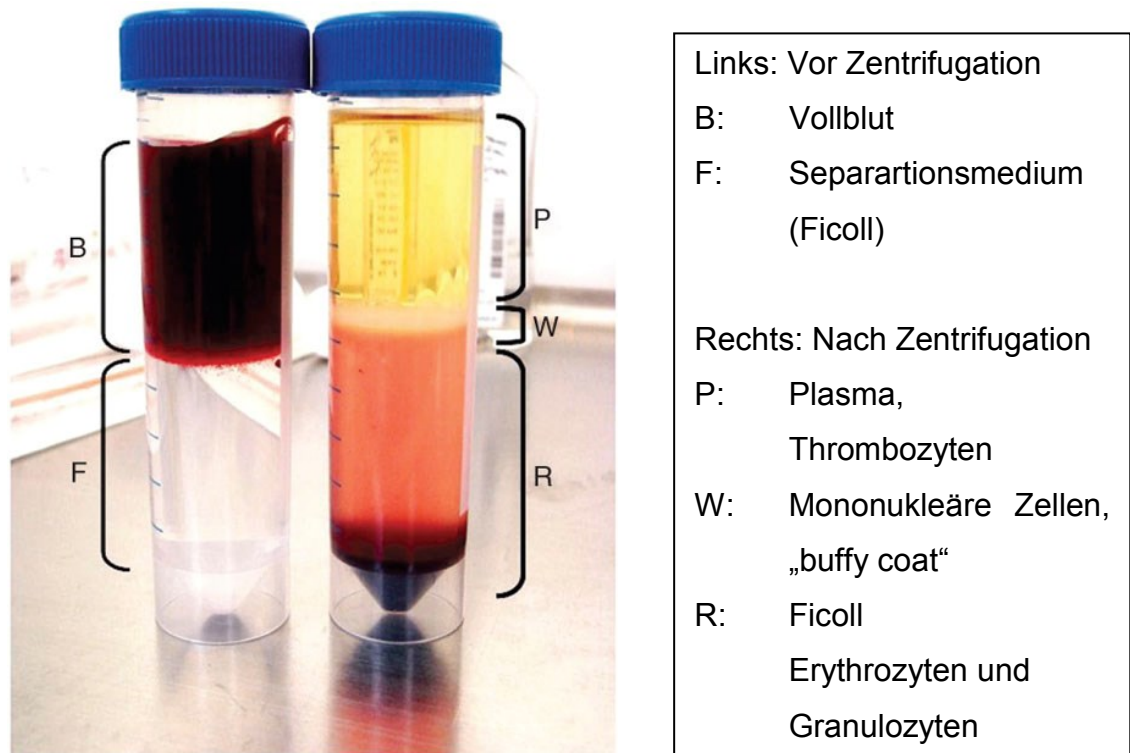


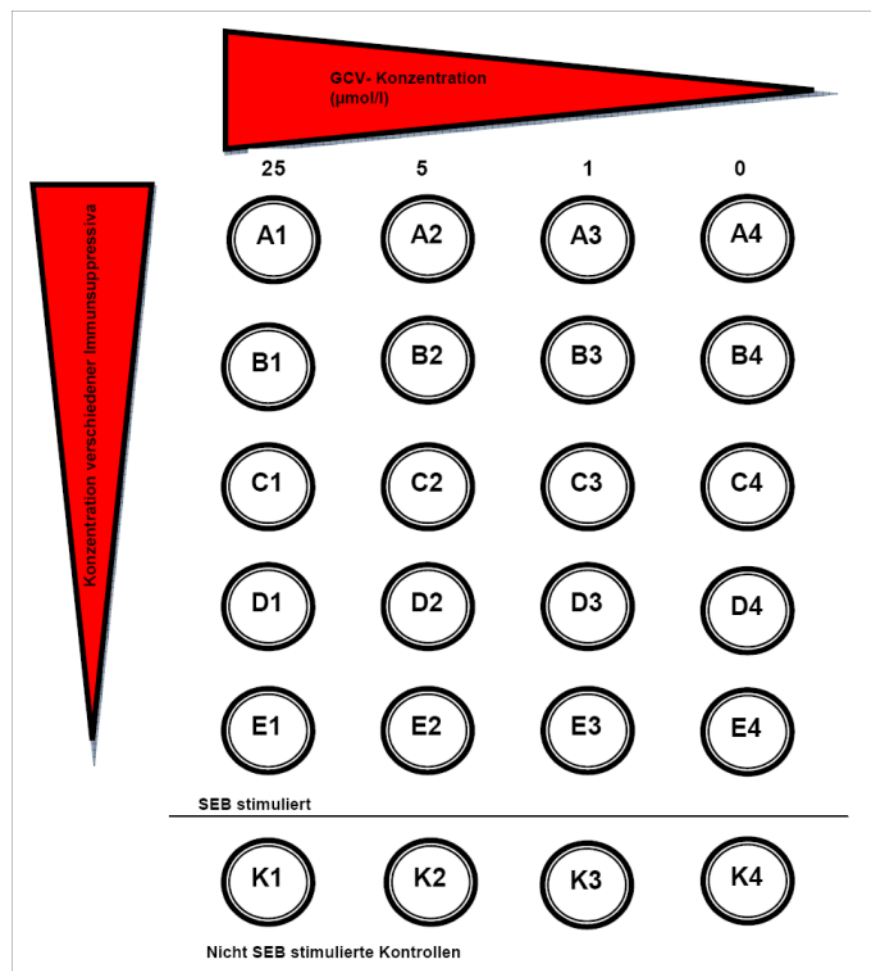
Abb. 13: Lymphozytenseparation mittels Ficoll (McGuckin et al. 2008)

Die mononukleären Zellen reicherten sich nach der Zentrifugation in der Interphase an und stellten sich als weißer Ring dar. Dieser wurde mit einer Pipette abgenommen und in ein steriles Reaktionsgefäß (15 ml) überführt. Es folgten 2 Waschvorgänge mit PBS und anschließender Zentrifugation bei 1800 rpm bzw. 1400 rpm. Die Überstände wurden verworfen. Nach Färben der Lymphozyten mit 2 ml eines Gemisches aus 40 ml PBS und 5 µl CFSE (5 nM) für 10 Minuten im Wasserbad bei 37 °C und anschließendem Waschen mit 10 ml des Lymphozytenmediums RPMI (komplett, Gibco), wurden 100 µl der Zellsuspension zur erforderlichen Zellzahlbestimmung entnommen. Die gelösten Zellen wurden erneut bei 1400 rpm zentrifugiert, und nach Dekantieren des Überstands in 10 ml RPMI-Medium aufgenommen und für eine halbe Stunde bei 5 % CO₂ und 37 °C im Brutschrank inkubiert. Nach Inkubation und erneuter Zentrifugation bei 1400 rpm, wurden die isolierten CFSE-gefärbten Zellen in einer Konzentration von 2×10^6 /ml in Medium aufgenommen.

Zellzahlbestimmung mittels Neubauer Zählkammer

Aus der entnommenen Zellsuspension wurde die Anzahl der mononukleären Zellen bestimmt. Hierzu wurden 180 μ l Trypanblau (1:5 mit PBS) in eine Rundbodenplatte vorgegeben und mit 20 μ l der Zellsuspension gemischt. Diese Zählmischung wurde in einer Neubauer Zählkammer vorgelegt und im Phasenkontrastmikroskop ausgezählt.

Schachbrettitration



1-4: Verschiedene Ganciclovir (GCV) Konzentrationen. A-E: Verschiedene Konzentrationen immunsuppressiver Medikamente stimuliert durch Staphylokokken-Enterotoxin-B (SEB). K: nicht SEB stimulierte Kontrollen.

Abb. 14: Schematische Darstellung Schachbrettitration

Die 96-well Rundbodenplatte (Cellstar) wurde mit 5 µl SEB (1 µg/ml) zur Stimulation und mit verschiedenen Konzentrationen von GCV (25 µl) und dem zu untersuchenden Immunsuppressivum (25 µl) vorbereitet. Anschließend wurden in jede Vertiefung 145 µl der gelösten Zellen pipettiert. (2×10^6 /ml). Als Kontrollen dienten 4 nicht-stimulierte Proben. (Abb. 14).

Die Proben wurden für den Proliferationstest für 6 Tage bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank inkubiert.

Vorbereitung der Proben für die Messung am Durchflusszytometer

Die für 6 Tage kultivierten Zellen wurden aus dem Brutschrank genommen, in ein FACS-Reaktionsgefäß überführt und die Lymphozytenproliferation durch Weiterverarbeitung auf Eis gestoppt (4 °C). Die Zellen wurden mit 2 ml FACS-Puffer gewaschen und bei 1600 rpm zentrifugiert. Es wurde ein Antikörper-Mix aus 50 µl Blocking-Puffer und je 0,2 µl CD4-RPE (DAKO A/S) und CD8-APC (Caltag Laboratories) pro Probe hergestellt. Der Überstand wurde dekantiert und die Zellen mit 50 µl des Antikörper-Mix gefärbt. Bei Dunkelheit und Raumtemperatur wurden die Zellen 30 Minuten inkubiert. Es folgte ein erneuter Waschgang mit FACS-Puffer und Zentrifugation (1600 rpm, 5 min, gebremst). Der Überstand wurde dekantiert und die Zellen in 300 µl FACS-Puffer für die durchflusszytometrische Analyse aufgenommen.

Durchflusszytometrische Analyse

Die Lymphozytenpopulation wurde entsprechend Größe (FSC) und Granularität (SSC) eingestellt. (Abb. 15)

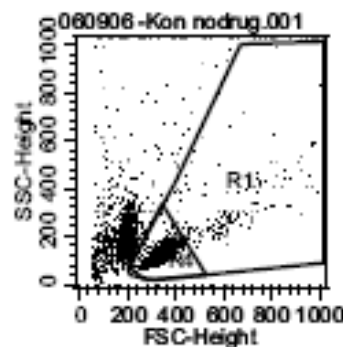


Abb. 15: Durchflusszytometrische Darstellung der Lymphozytenpopulation aus dem Proliferationstest anhand Größe (FSC) und Granularität (SSC)

Mithilfe der CFSE-Färbung in Kombination mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern konnten durchflusszytometrisch folgende Lymphozytensubpopulationen unterschieden werden. (Abb. 15, Abb. 16, Abb. 17)

- R1: gemessene Zellpopulation
- R2: nicht-proliferierte CD4+-T-Zellen
- R3: proliferierte CD4+-T-Zellen
- R5: nicht-proliferierte CD8+-T-Zellen
- R6: proliferierte CD8+-T-Zellen

Proliferierende Zellen (CFSE low, R3 bzw. R6) konnten aufgrund verminderter Fluoreszenzintensität von ruhenden Zellen (CFSE high, R2 bzw. R5) unterschieden werden. (Abb. 16)

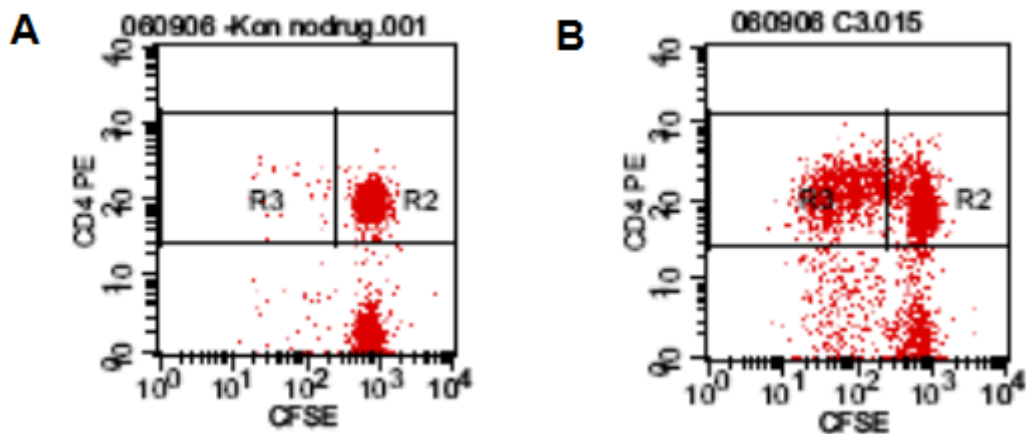


Abb. 16: Durchflusszytometrische Analyse der CD4+-Lymphozyten durch Zellfarbstoff (CFSE) und Antikörperfärbung. A: nicht-stimulierte Probe, B: Staphylokokken-Enterotoxin-B stimulierte Probe

R2: CD4+-Lymphozyten

R3: CD4+-Lymphozyten nach mehreren Zellteilungsschritten

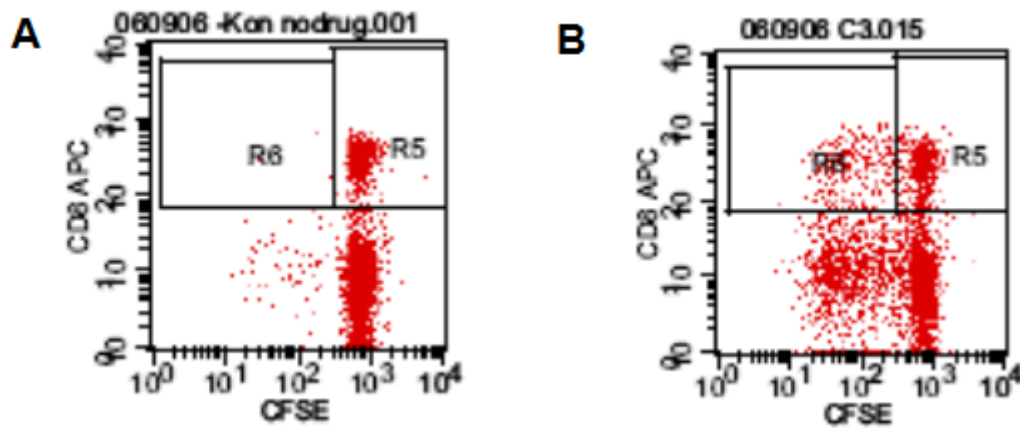


Abb. 17: Durchflusszytometrische Analyse der CD8+-Lymphozyten durch Zellfarbstoff (CFSE) und Antikörper-Färbung: A: nicht-stimulierte Probe, B: Staphylokokken-Enterotoxin-B stimulierte Probe

R5: CD8+-Lymphozyten

R6: CD8+-Lymphozyten nach mehreren Zellteilungsschritten

Die quantitativen Werte wurden anschließend graphisch und statistisch analysiert.

Auswertung der Durchflusszytometrischen Daten

Für die Standardisierung der Untersuchung wurden die Messwerte der proliferierten CD4+- und CD8+-T-Zellen in Beziehung zu den quantitativen Werten der nicht-proliferierten Zellen gesetzt. Der Zellteilungsindex CDI (cell division index) wurde nach Mannering (Mannering, 2003) jeweils für CD8+- und CD4+-Zellen berechnet.

$$\text{Zellteilungsindex} = \frac{(\text{geteilte Zellen}_{\text{stim}} / (\text{geteilte Zellen}_{\text{stim}} + \text{nicht geteilte Zellen}_{\text{stim}}))}{(\text{geteilte Zellen}_{\text{unstim}} / (\text{geteilte Zellen}_{\text{unstim}} + \text{nicht geteilte Zellen}_{\text{unstim}}))}$$

Hier steht „unstim“ für die Zellen, die nicht mit SEB-Antigen stimuliert wurden, „stim“ dagegen für die stimulierten Zellen.

Die relativen Werte wurden im prozentualen Verhältnis zur Proliferation ohne Immunsuppressiva (100 %) berechnet, einschließlich Mittelwert und Standardabweichung. Die graphische Darstellung zeigt als Ordinate die Proliferationsrate in Prozent, als Abszisse die verschiedenen Konzentrationen des Immunsuppressivums und als einzelnen Graphen die eingesetzten GCV-Konzentrationen. (Abb. 18)

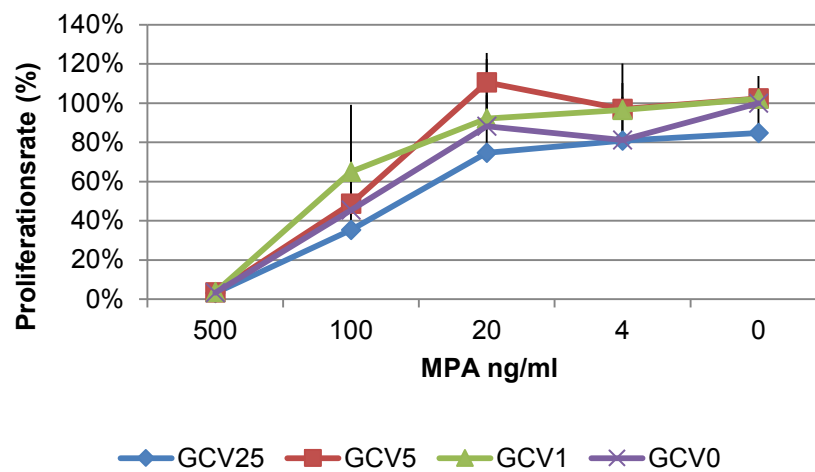


Abb. 18: Beispiel für die graphische Darstellung des Proliferationstests: Proliferationsrate der CD8+-T-Lymphozyten unter verschiedenen Konzentrationen von Mycophenolat (MPA) und Ganciclovir (GCV)

3 Ergebnisse

3.1 Einfluss unterschiedlicher immunsuppressiver Substanzklassen auf die frühe Aktivierung und die Proliferation von CD4+- und CD8+-T-Lymphozyten

Die Pharmakodynamik jeder immunsuppressiven Substanz wurde anhand der Modulation der CD69 Expression, der CD69 Expression und INF γ Produktion, sowie der Lymphozytenproliferation untersucht. Die Analyse wurde separat für die Lymphozytensubpopulationen Th1-Helferzellen (CD4+) und zytotoxische T-Lymphozyten (CD8+) durchgeführt. Die zusammenfassenden Ergebnisse aus je 3 Wiederholungsexperimenten wurden gemeinsam in einer graphischen Abbildung dargestellt, um das pharmakodynamische Wirkprinzip der Substanzklassen zu verdeutlichen.

3.1.1 Inosinmonophosphat-Dehydrogenase Inhibitor: Mycophenolat mofetil

Wir konnten zeigen, dass Mycophenolat mofetil *in vitro* bei einer Konzentration von 500 ng/ml die Proliferation von CD4+- und CD8+-T-Lymphozyten komplett hemmt. Die Hemmung ist konzentrationsabhängig. Die IC₅₀ (50 %-Hemmung) lag für CD4+-Zellen bei einer Konzentration von 96,72 ng/ml und für CD8+-Zellen bei 99,05 ng/ml.

Mycophenolat mofetil zeigte weder bei CD4+- noch bei CD8+-Zellen einen Einfluss auf die frühen Schritte der Lymphozytenaktivierung (Expression von CD69 und Produktion von INF γ).

MMF ist also ein hochpotenter Lymphozyten-Proliferationshemmer ohne Aktivität gegen nicht-proliferierende Zellen. (Abb. 19)

Einfluss von Mycophenolat auf die Funktion CD4 und CD8 positiver T-Zellen

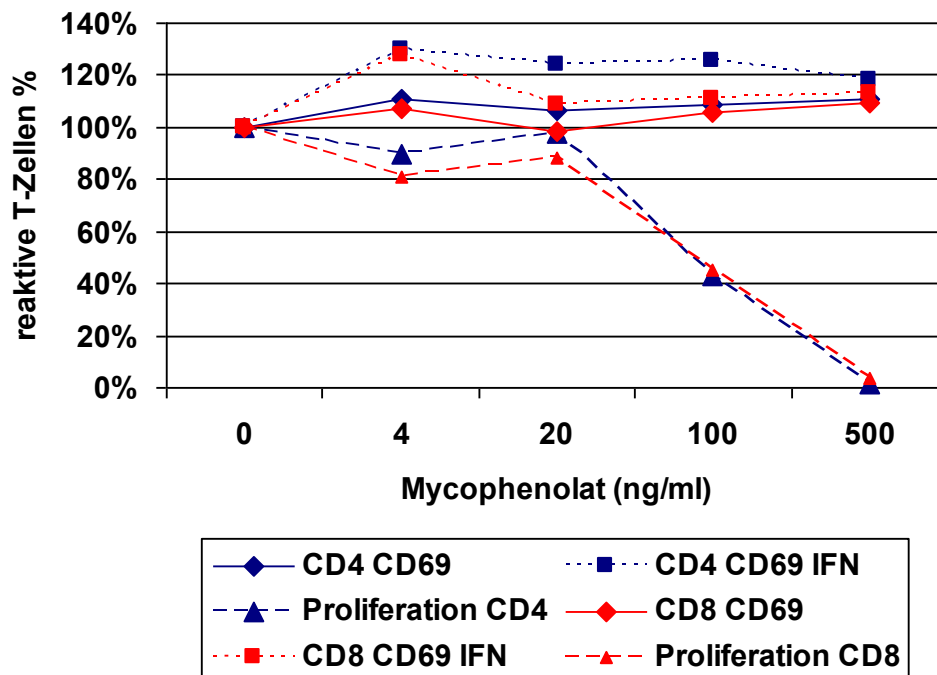


Abb. 19: Gesamtübersicht der Pharmakodynamik von Mycophenolat mofetil: CD4+- und CD8+-Zellen mit jeweils eigenen Graphen für CD69 Expression, CD69 Expression und Interferon gamma (IFN γ) Ausschüttung und Lymphozytenproliferation

Kombinationstherapie mit Ganciclovir

Jedes Immunsuppressivum wurde in Kombination mit dem Nukleosidanalogen Ganciclovir (25 $\mu\text{mol/l}$, 5 $\mu\text{mol/l}$ und 1 $\mu\text{mol/l}$) getestet. Auf mögliche Medikamenteninteraktionen, wie eine additive Wirkung der beiden Substanzklassen in Kombination, wurde geachtet.

Wir konnten, weder für CD4+- noch für CD8+-T-Zellen, eine signifikante synergistische, additive oder antagonistische immunsuppressive Wirkung von GCV in Kombination mit MMF zeigen. (Abb. 20 und Abb. 21)

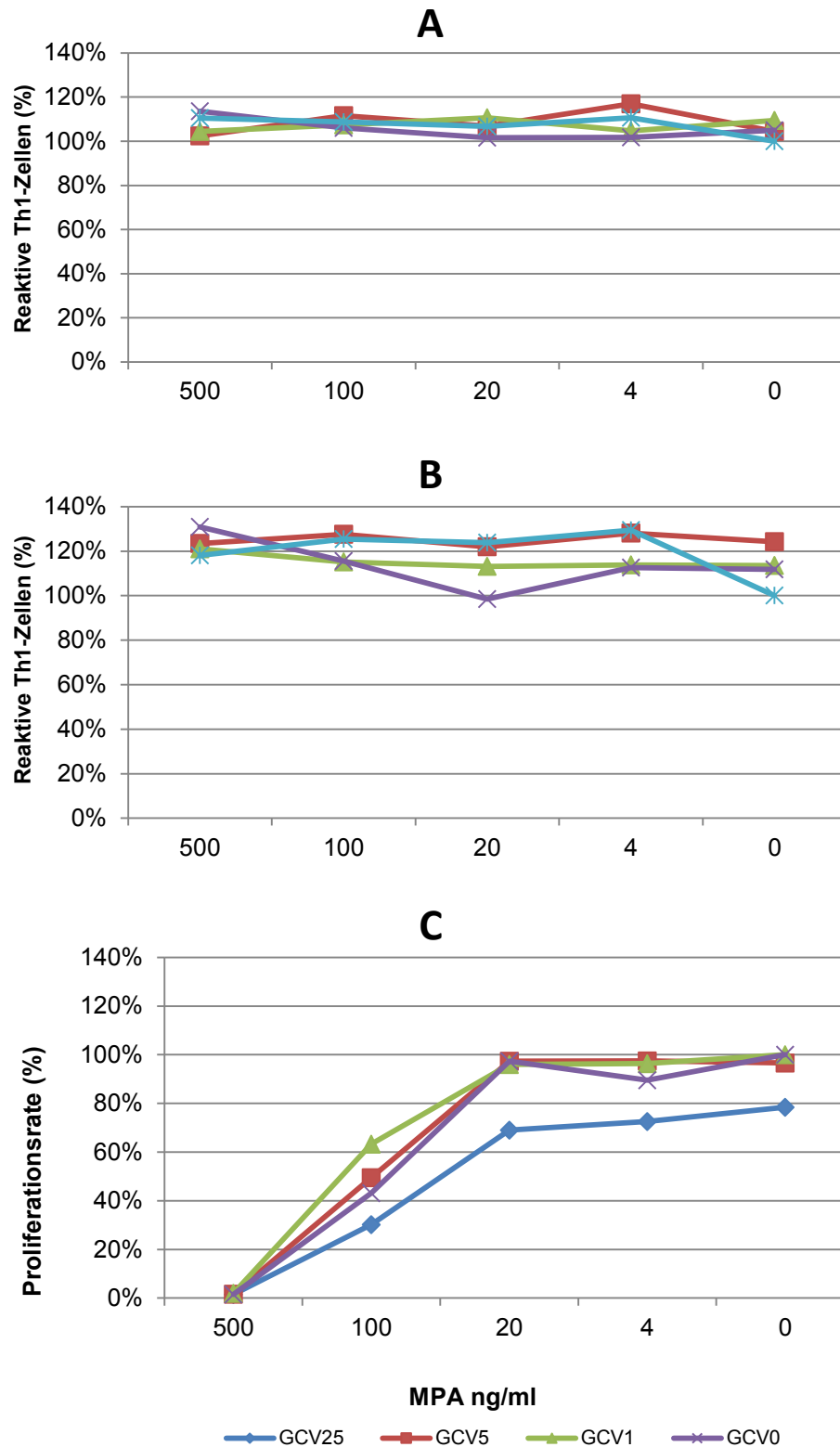


Abb. 20: Einfluss der Kombinationstherapie von Mycophenolat (MPA) und Ganciclovir (GCV) auf CD4+-T-Zellen.

A: Expression von CD69

B: Expression von CD69 und Produktion von Interferon gamma

C: Proliferation von CD4+-T-Zellen

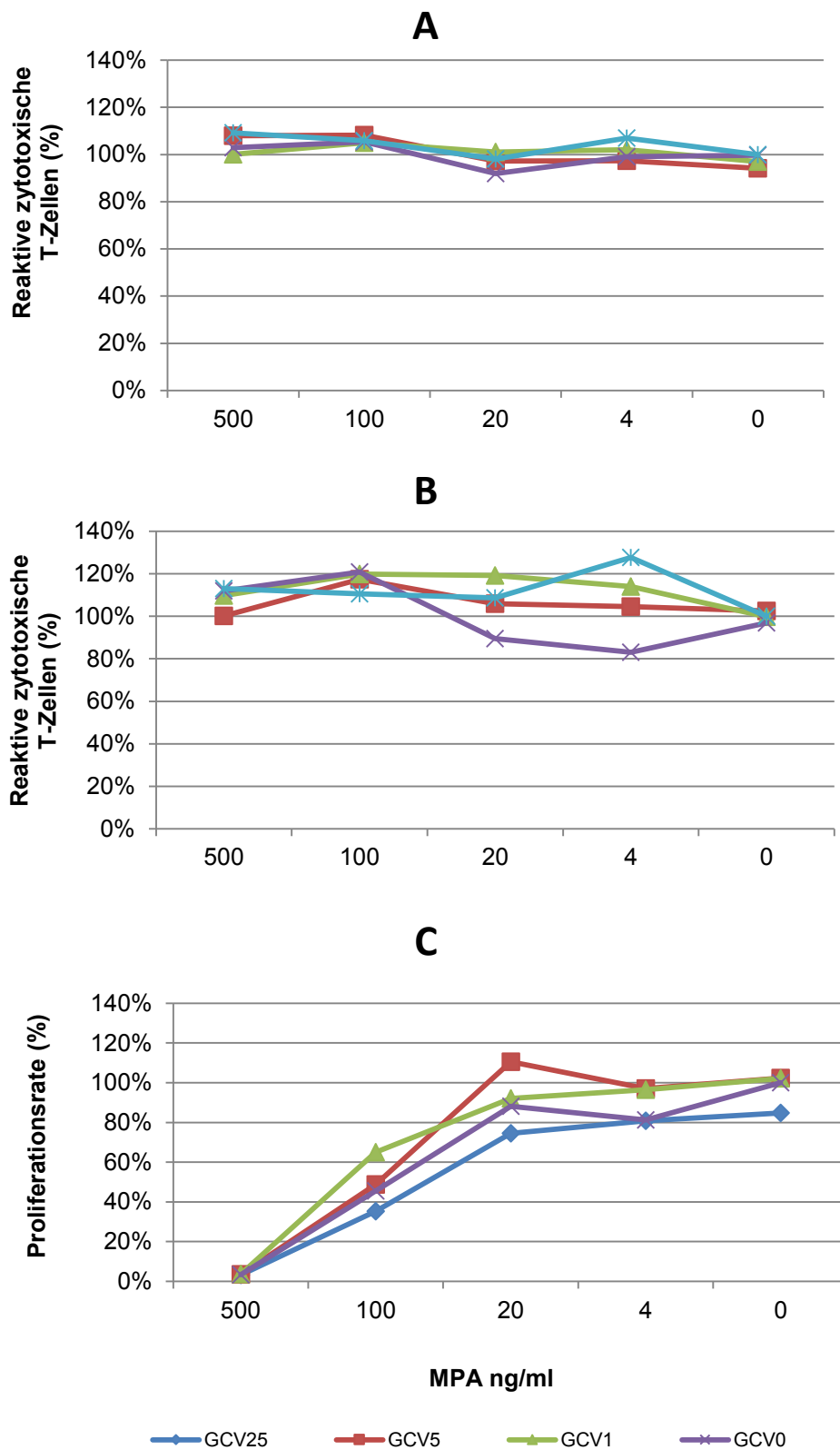


Abb. 21: Einfluss der Kombinationstherapie von Mycophenolat (MPA) und Ganciclovir (GCV) auf CD8+-T-Zellen

A: Expression von CD69

B: Expression von CD69 und Produktion von Interferon gamma

C: Proliferation von CD8+-T-Zellen

3.1.2 Calcineurininhibitor: Cyclosporin A

Wir konnten zeigen, dass Cyclosporin A konzentrationsabhängig die Produktion von INF γ , sowohl in CD4+- als auch CD8+-T-Zellen, hemmt. Eine komplette Hemmung konnten wir bei einer CSA-Konzentration von 5000 ng/ml erreichen, die IC₅₀ lag für CD4+-Zellen bei 432,59 ng/ml und für CD8+-Zellen bei 254,13 ng/ml. Zusätzlich konnte eine dosisabhängige Hemmung der Proliferation der CD4+- und CD8+-Zellen nachgewiesen werden. Eine vollständige Hemmung der Lymphozytenproliferation konnte mit den eingesetzten Konzentrationen nicht erreicht werden. Die Th1-Helferzellen wurden bis zu 70 % gehemmt, die zytotoxischen T-Zellen nur bis zu 40 %.

Dagegen konnten wir in allen experimentell eingesetzten Konzentrationen (40-5000 ng/ml) keine Inhibition der Expression des zellulären Aktivierungsmarkers CD69 nachweisen.

CSA ist also ein Inhibitor der nicht-proliferierenden Zellen, indem es die INF γ Produktion unterbindet. Zudem besteht eine inkomplette Wirkung als Inhibitor der Lymphozytenproliferation. (Abb. 22)

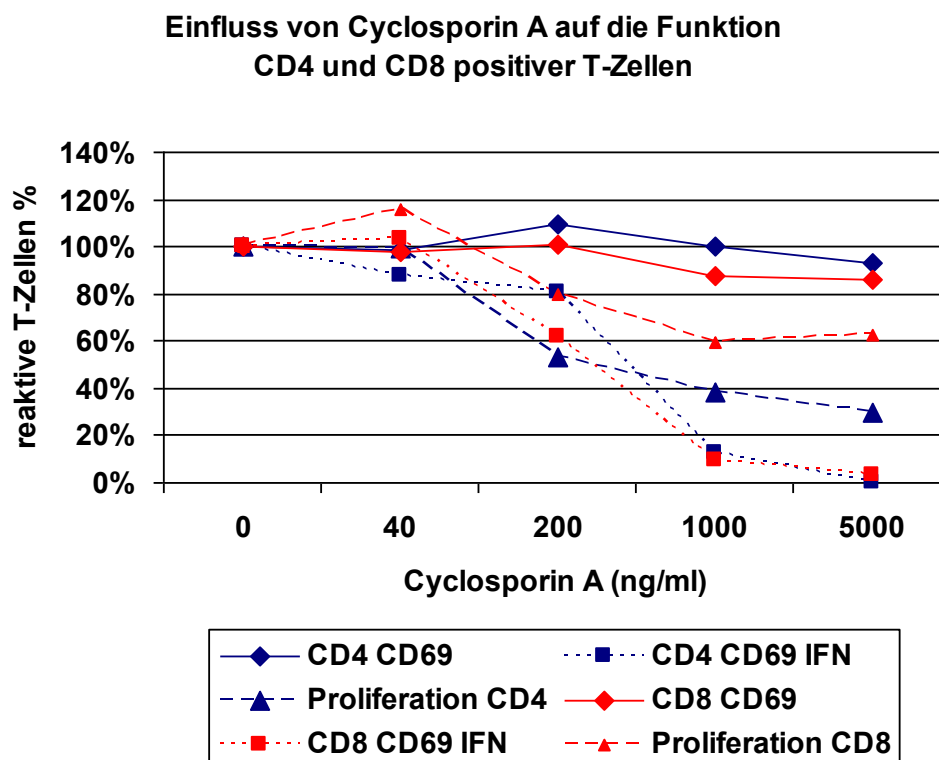


Abb. 22: Gesamtübersicht der Pharmakodynamik von Cyclosporin A. CD4+- und CD8+-Zellen mit jeweils eigenen Graphen für CD69 Expression, CD69 Expression und Interferon gamma (INF γ) Ausschüttung und Lymphozytenproliferation

Kombinationstherapie mit Ganciclovir

Für CSA konnten wir, ersichtlich am nahezu identischen Kurvenverlauf, für die untersuchten Subpopulationen keine synergistischen, additiven oder antagonistischen Wirkungen in der Kombination mit Ganciclovir zeigen. (Abb. 23 und Abb. 24)

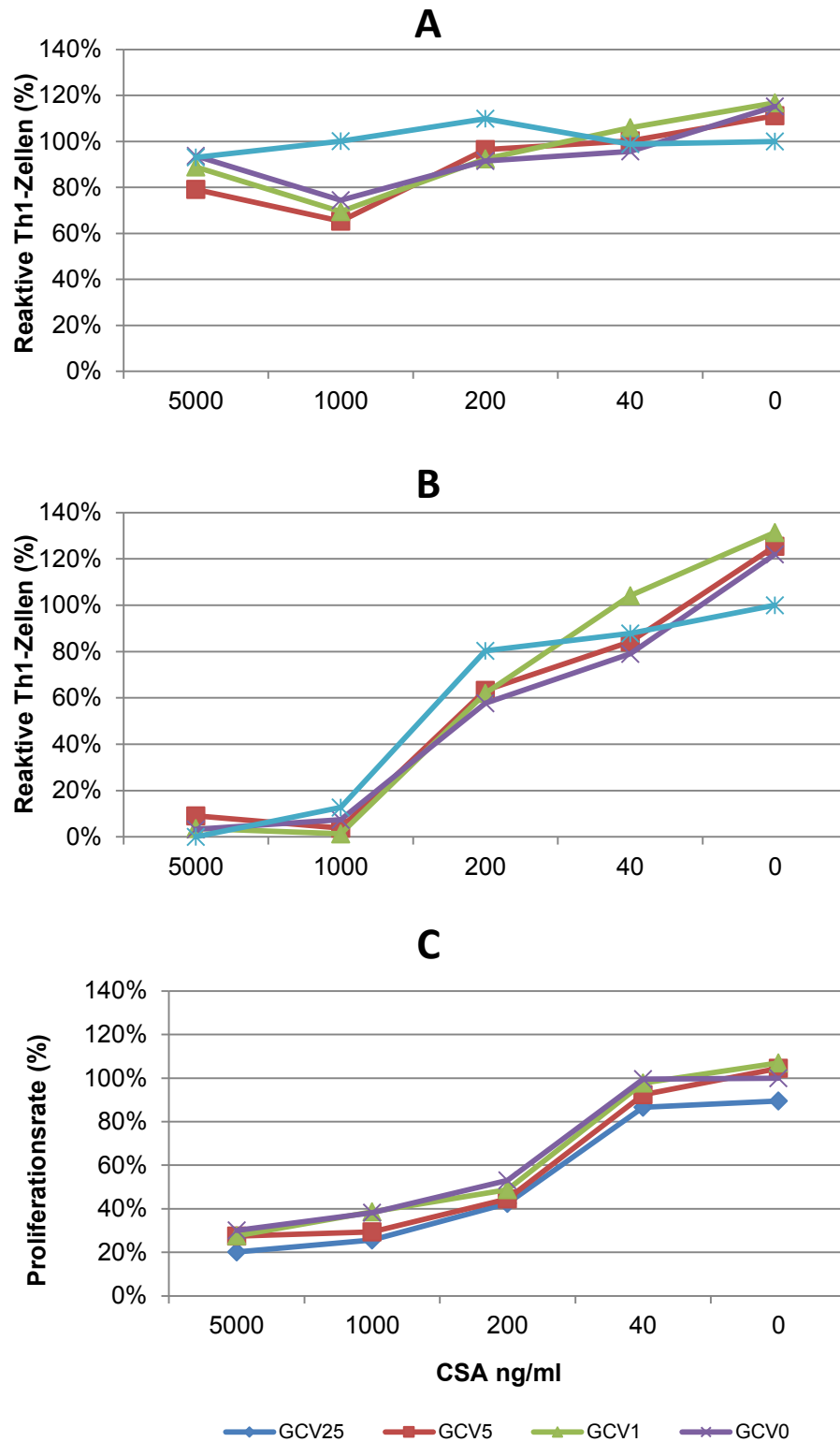


Abb. 23: Einfluss der Kombinationstherapie von Cyclosporin A (CSA) und Ganciclovir (GCV) auf CD4+-T-Zellen

A: Expression von CD69

B: Expression von CD69 und Produktion von Interferon gamma

C: Proliferation von CD4+-T-Zellen

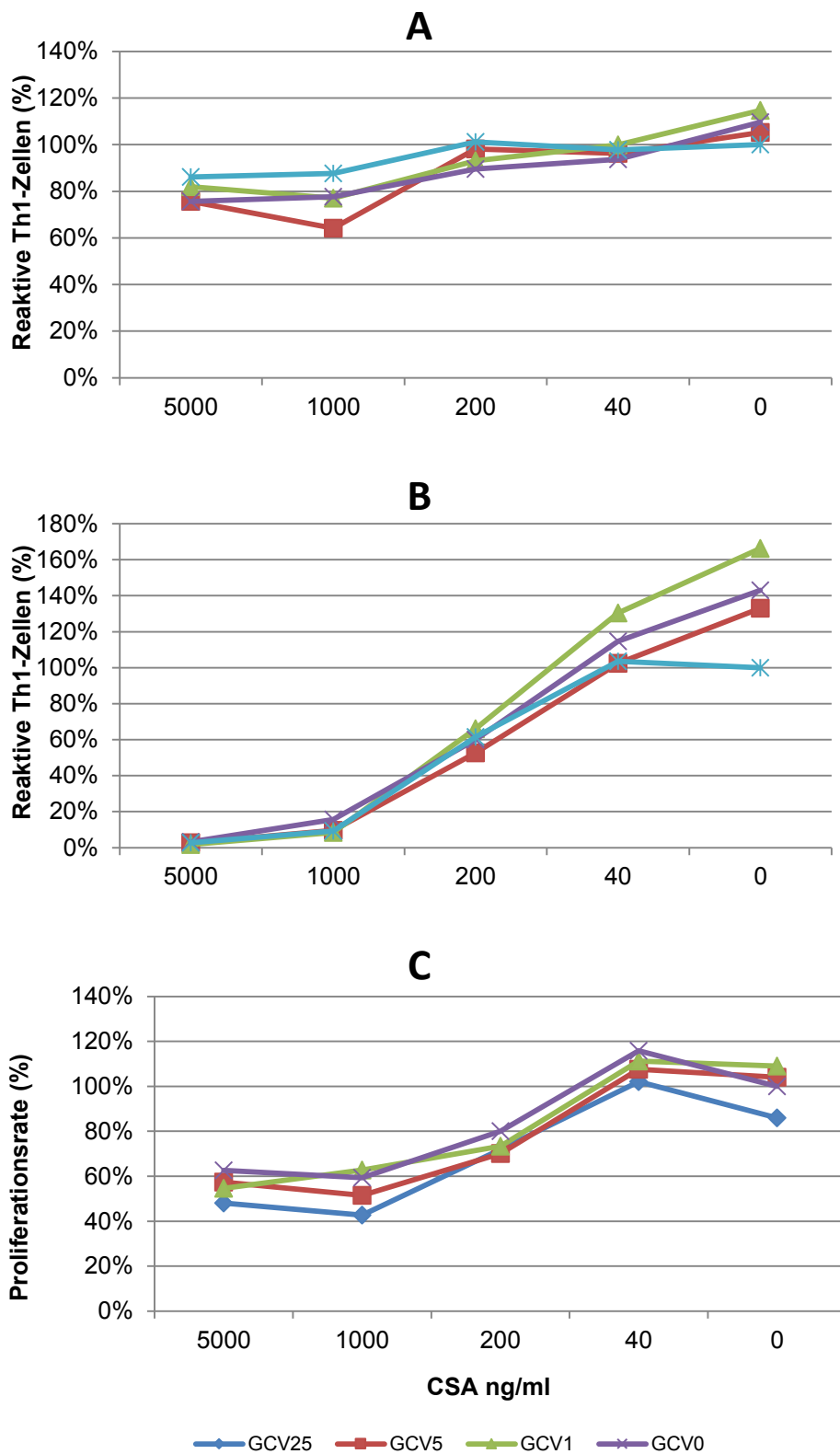


Abb. 24: Einfluss der Kombinationstherapie von Cyclosporin A (CSA) und Ganciclovir (GCV) auf CD8+-T-Zellen

A: Expression von CD69

B: Expression von CD69 und Produktion von Interferon gamma

C: Proliferation von CD8+-T-Zellen

3.1.3 Glukokortikoid: Decortin H

Wir konnten für Decortin H eine inkomplette dosisabhängige Hemmung der CD69 Expression für die Th1-Helferzellen (ca. 20 %) und für die zytotoxischen T-Zellen zeigen (ca. 30 %).

Die Produktion von Interferon gamma wurde ebenso inkomplett und dosisabhängig zu ca. 60 % in beiden Subpopulationen gehemmt.

Auf die Proliferation ergab sich in den eingesetzten Konzentrationen (3,2-1600 µg/ml) kein Einfluss. Die experimentell höchst verwendete Konzentration (1600 µg/ml) erweist sich als toxisch für die Lymphozyten. (Apoptose)

Eine IC50 konnte nicht sinnvoll bestimmt werden.

Die mäßige Suppression der Aktivierung der T-Lymphozyten kann die hochpotente klinische Wirkung von Decortin H nicht erklären. Dafür müssen zusätzliche Effekte auf das Immunsystem verantwortlich sein. (Abb. 25)

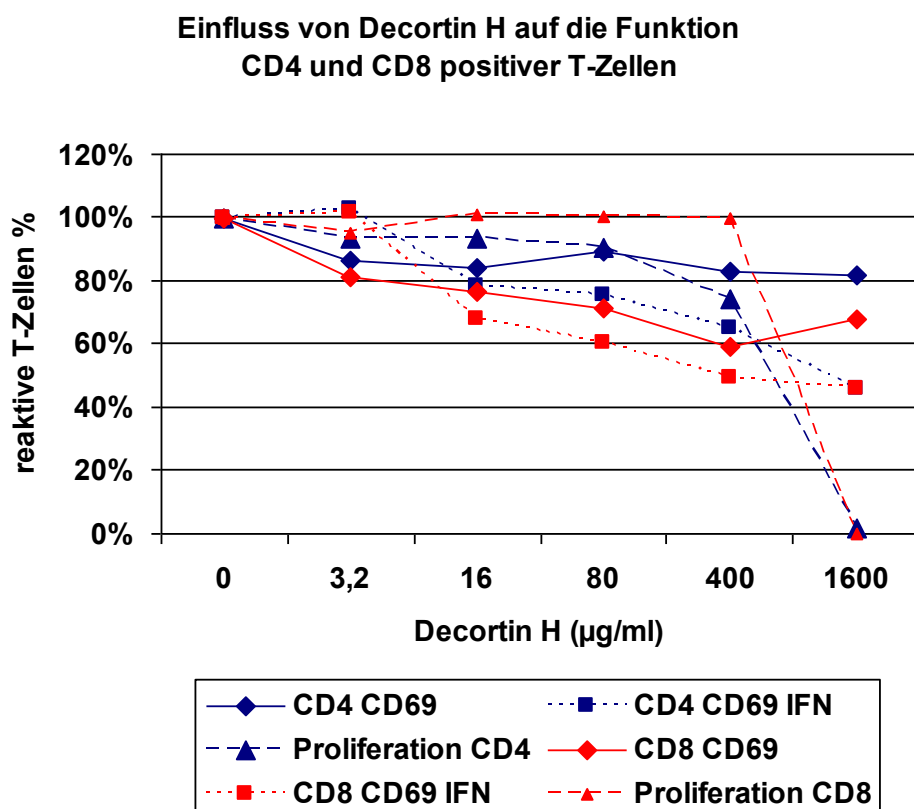


Abb. 25: Gesamtübersicht der Pharmakodynamik von Decortin H. CD4+- und CD8+-Zellen mit jeweils eigenen Graphen für CD69 Expression, CD69 Expression und Interferon gamma (IFN γ) Ausschüttung und Lymphozytenproliferation

Kombinationstherapie mit Ganciclovir

In Kombination mit GCV zeigten sich weder für CD4+- noch für CD8+-T-Zellen zusätzliche immunsuppressive Effekte. (Abb. 26 und Abb. 27)

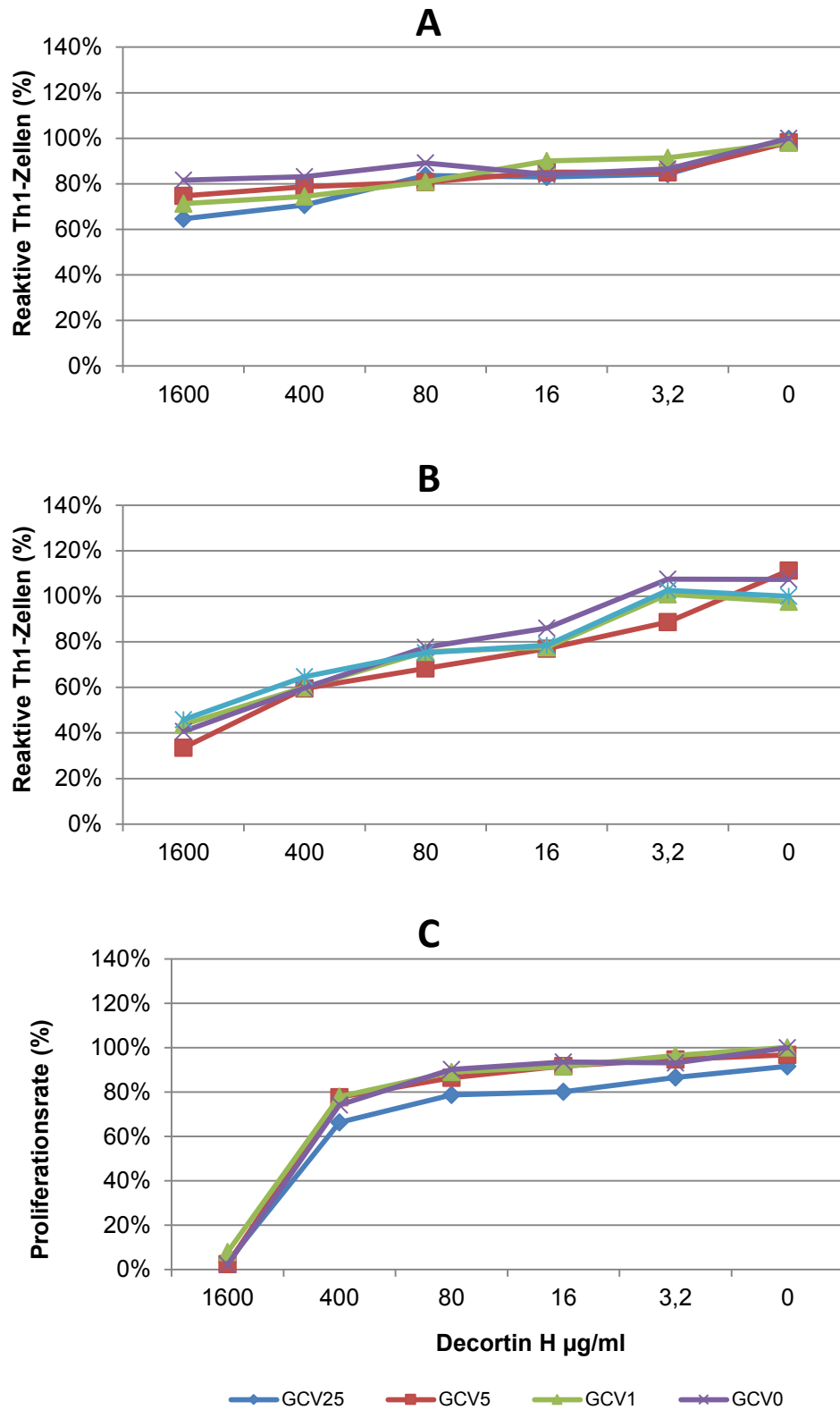


Abb. 26: Einfluss der Kombinationstherapie von Decortin H und Ganciclovir (GCV) auf CD4+-T-Zellen

A: Expression von CD69

B: Expression von CD69 und Produktion von Interferon gamma

C: Proliferation von CD4+-T-Zellen

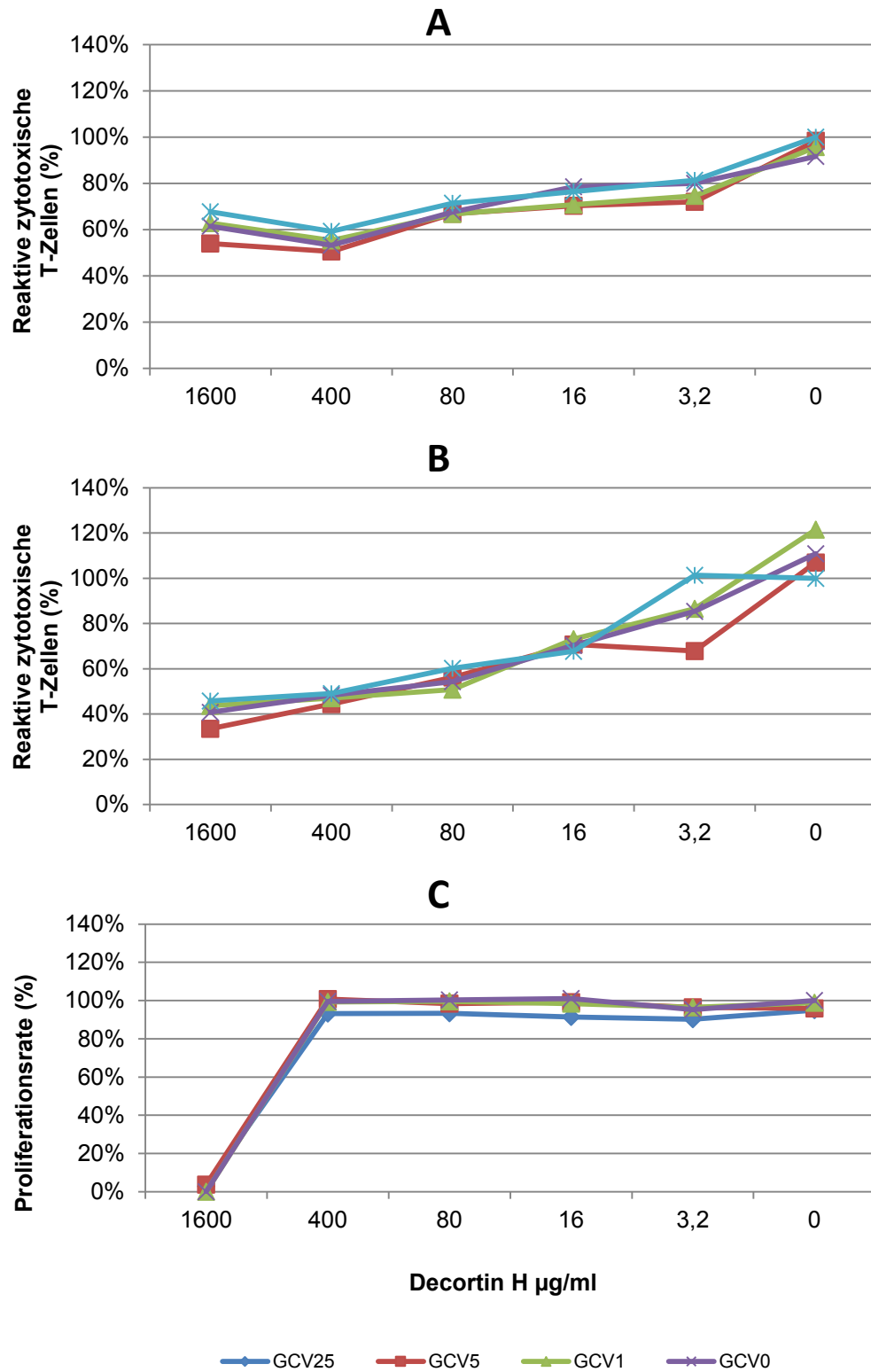


Abb. 27: Einfluss der Kombinationstherapie von Decortin H und Ganciclovir (GCV) auf CD8+-T-Zellen

A: Expression von CD69

B: Expression von CD69 und Produktion von Interferon gamma

C: Proliferation von CD8+-T-Zellen

3.1.4 MAP-Kinase Inhibitoren

3.1.4.1 3736

Wir konnten zeigen, dass der MAP-Kinase Inhibitor 3736 konzentrationsabhängig die CD69 Expression, die IFN γ Produktion und die Lymphozytenproliferation von CD4 $^{+}$ - und CD8 $^{+}$ - Zellen vollständig hemmt. Die eingesetzten Konzentrationen in vitro erwiesen sich als nicht toxisch und wurden experimentell bestimmt. Die IC₅₀ wurde beispielsweise für die Unterdrückung der IFN γ Produktion bei 0,11 μ mol/l (CD4 $^{+}$ -Zellen) bzw. 0,45 μ mol/l (CD8 $^{+}$ -Zellen) berechnet. (Abb. 28)

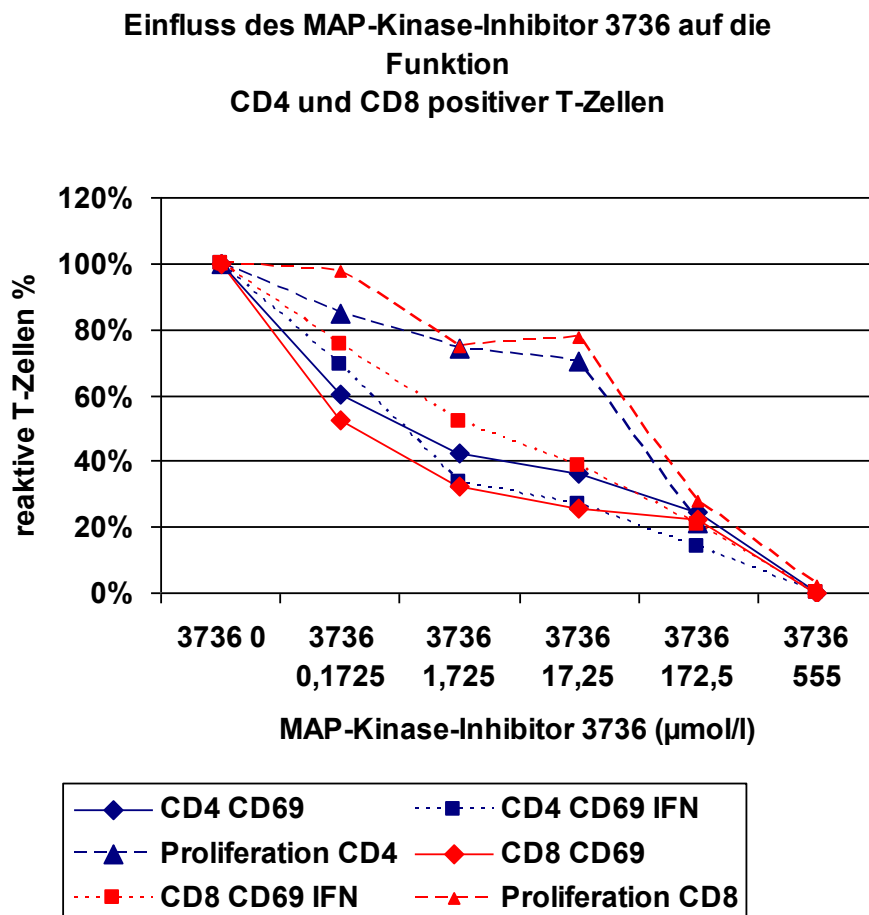


Abb. 28: Gesamtübersicht der Pharmakodynamik des MAP-Kinase Inhibitors 3736. CD4 $^{+}$ - und CD8 $^{+}$ -Zellen mit jeweils eigenen Graphen für CD69 Expression, CD69 Expression und Interferon gamma (IFN γ) Ausschüttung und Lymphozytenproliferation

Kombinationstherapie mit Ganciclovir

Zusätzliche immunsuppressive Effekte in der Kombination mit GCV konnten nicht gezeigt werden. (Abb. 29, Abb. 30)

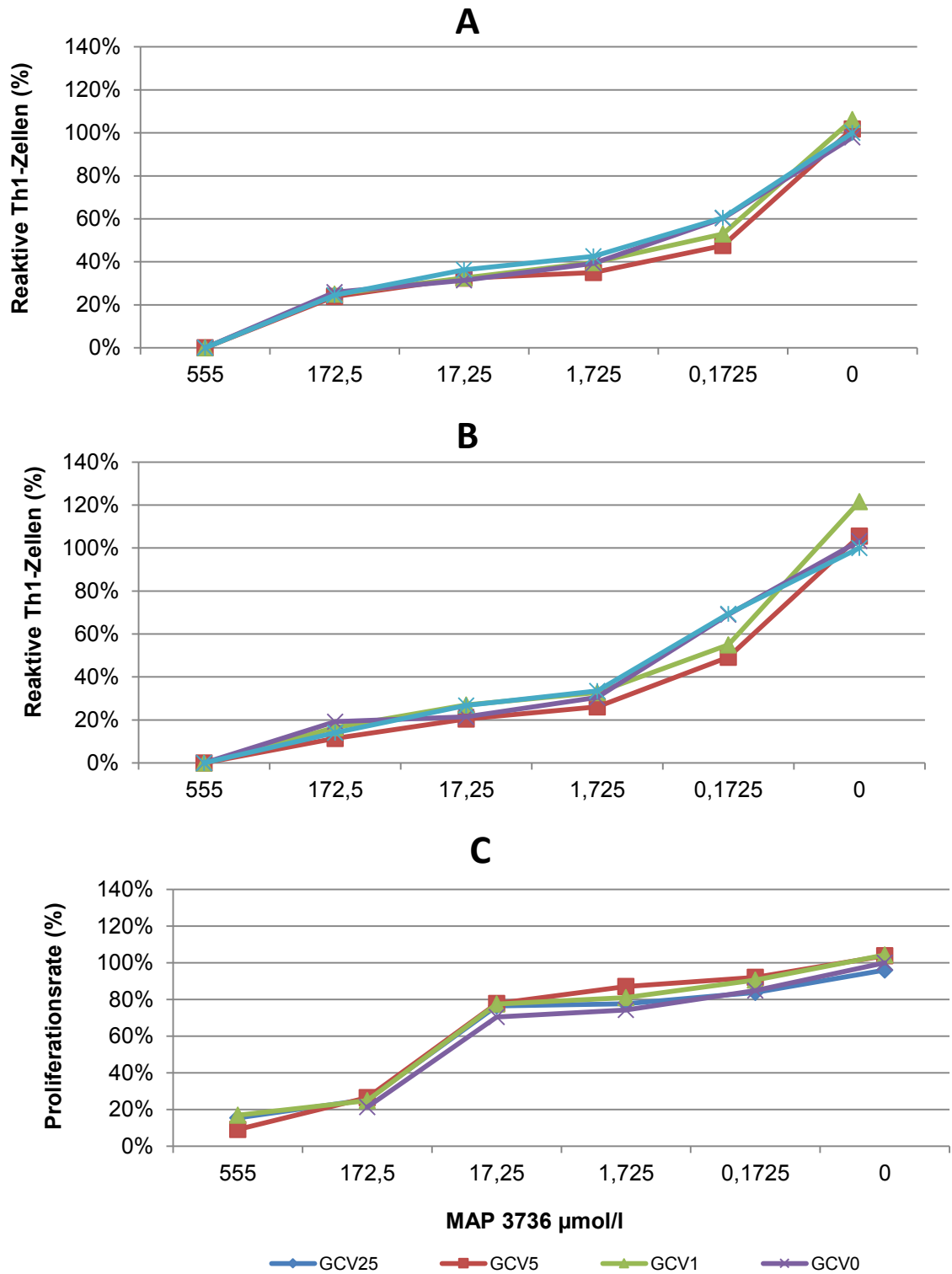


Abb. 29: Einfluss der Kombinationstherapie von MAP-Kinase Inhibitor 3736 und Ganciclovir (GCV) auf CD4⁺-T-Zellen

A: Expression von CD69

B: Expression von CD69 und Produktion von Interferon gamma

C: Proliferation von CD4⁺-T-Zellen

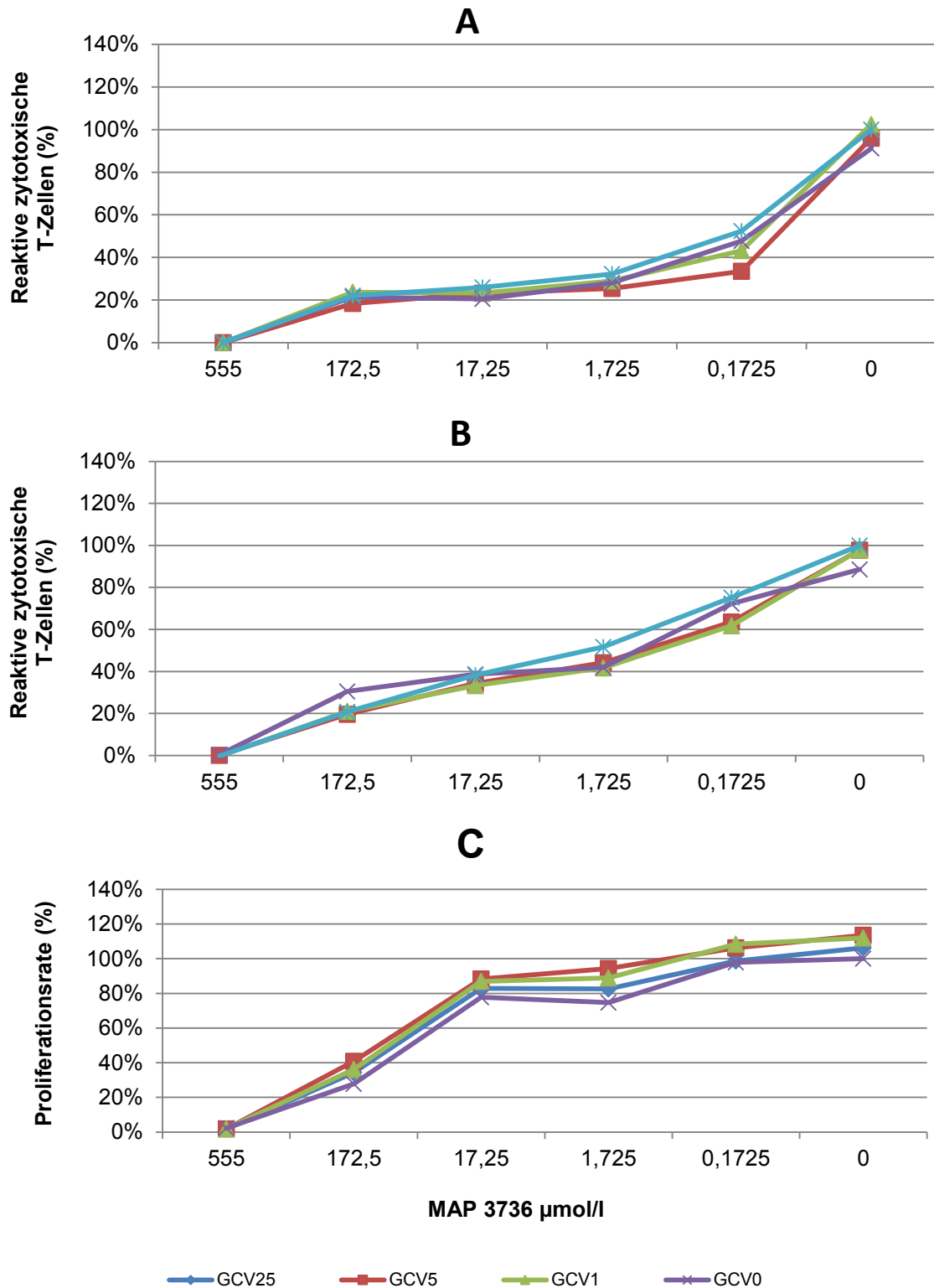


Abb. 30: Einfluss der Kombinationstherapie von MAP-Kinase Inhibitor 3736 und Ganciclovir (GCV) auf CD8+-T-Zellen

A: Expression von CD69

B: Expression von CD69 und Produktion von Interferon gamma

C: Proliferation von CD8+-T-Zellen

3.1.4.2 3830

Wie für den MAP-Kinase Inhibitor 3736 konnten wir auch für den zweiten MAP-Kinase Inhibitor 3830 ein analoges pharmakodynamisches Wirkprofil zeigen.

Die IC₅₀ lag für die Produktion von IFN gamma bei 0,01 µmol/l (CD4+-Zellen) bzw. bei 0,69 µmol/l. (CD8+-Zellen). (Abb. 31)

Diese Medikamentengruppe konnte also die nicht-proliferierenden und die proliferierenden Zellen zu jedem in dieser Arbeit untersuchten Teilschritte der Lymphozytenaktivierung beeinflussen und stellt somit die experimentell potenteste immunsuppressive Gruppe dar.

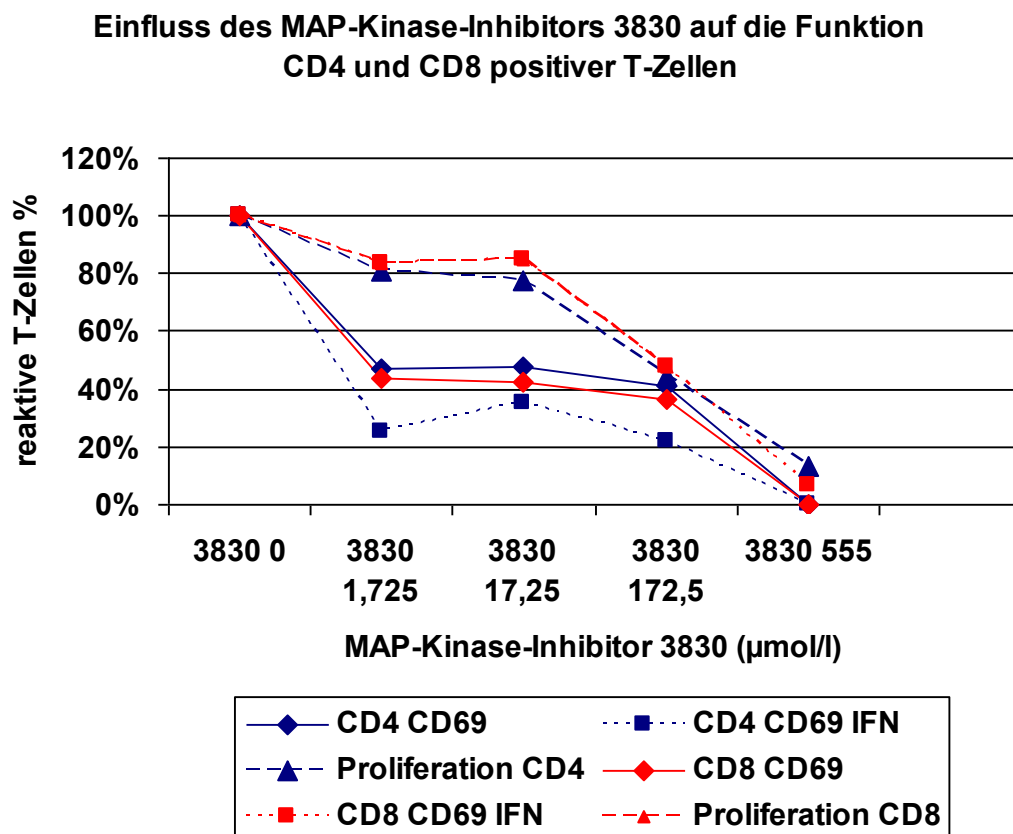


Abb. 31: Gesamtübersicht der Pharmakodynamik des MAP-Kinase Inhibitors 3830. CD4+- und CD8+-Zellen mit jeweils eigenen Graphen für CD69 Expression, CD69 Expression und Interferon gamma (IFN γ) Ausschüttung und Lymphozytenproliferation

Kombinationstherapie mit Ganciclovir

Auch bei diesem Immunsuppressivum konnten keine synergistische, additive oder antagonistische immunsuppressive Wirkung in Kombination mit GCV gezeigt werden. (Abb. 32, Abb. 33)

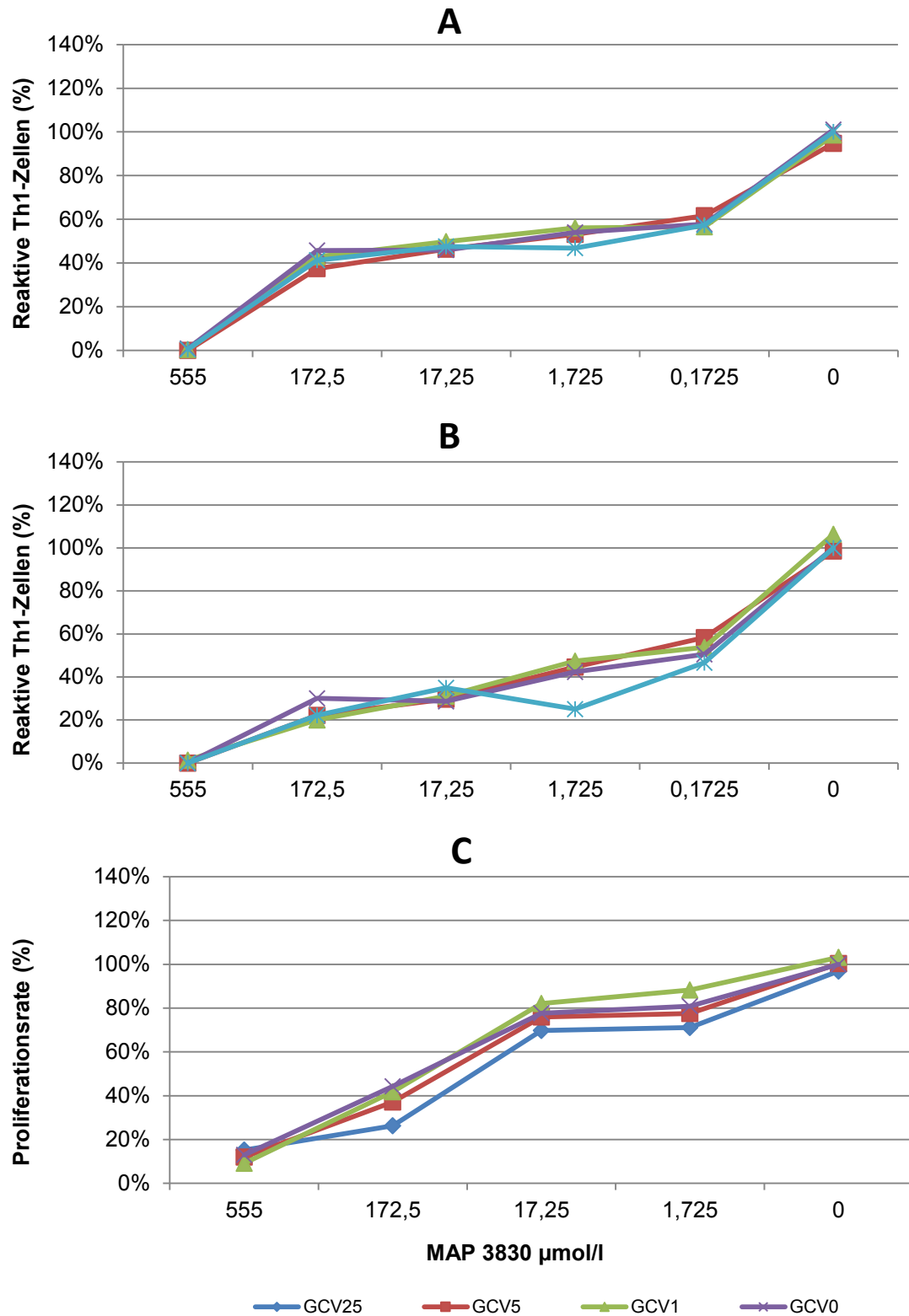


Abb. 32: Einfluss der Kombinationstherapie von MAP-Kinase Inhibitor 3830 und Ganciclovir (GCV) auf CD4+-T-Zellen

A: Expression von CD69

B: Expression von CD69 und Produktion von Interferon gamma

C: Proliferation von CD4+-T-Zellen

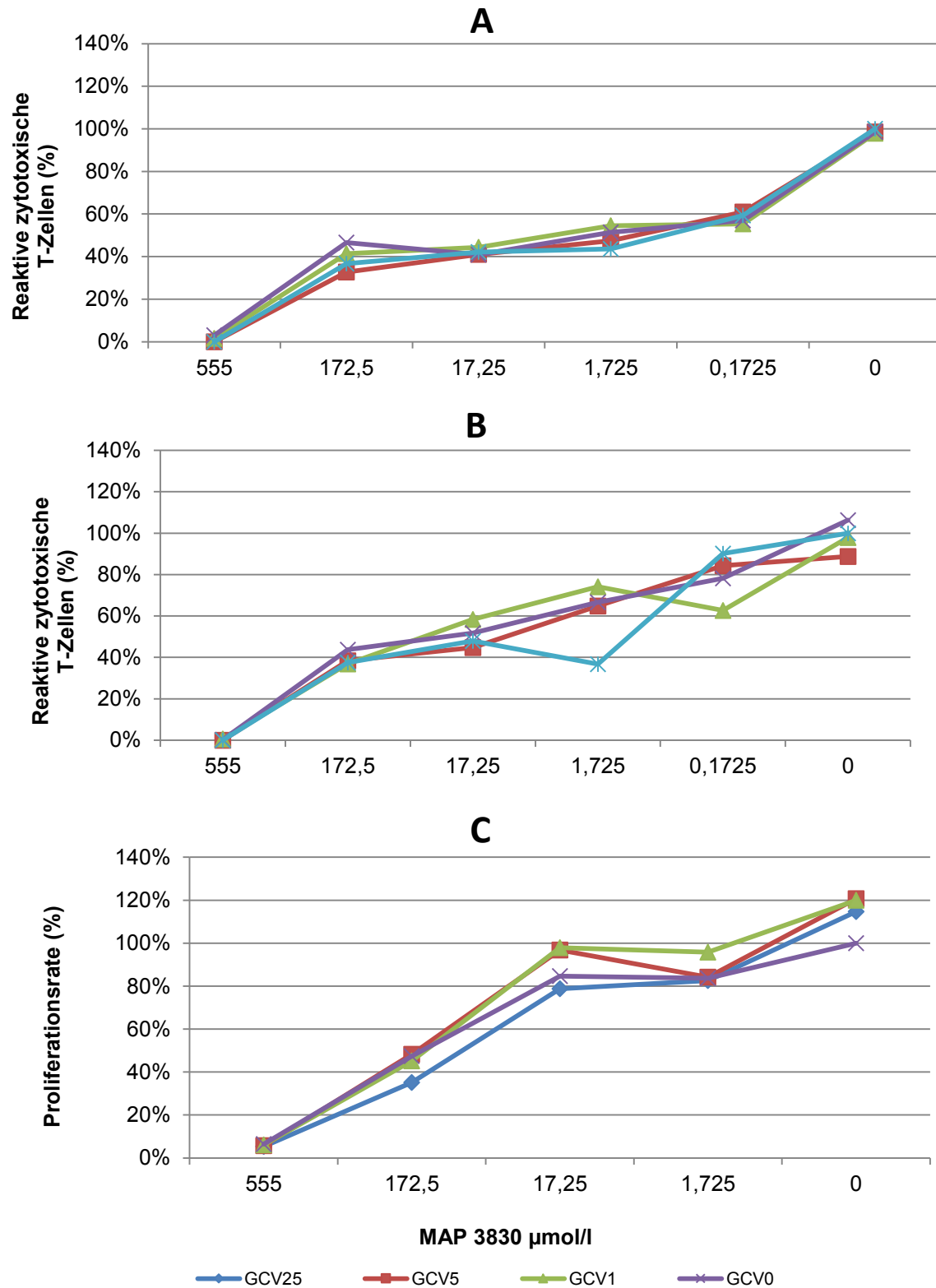


Abb. 33: Einfluss der Kombinationstherapie von MAP-Kinase Inhibitor 3830 und Ganciclovir (GCV) auf CD8+-T-Zellen

A: Expression von CD69

B: Expression von CD69 und Produktion von Interferon gamma

C: Proliferation von CD8+-T-Zellen

Tabelle 2 fasst die charakteristischen Wirkprofile der verschiedenen immunsuppressiven Substanzklassen zusammen und zeigt die substanzspezifischen Unterschiede auf.

Es zeigt sich hier eine komplette dosisabhängige Hemmung der frühen Lymphozytenaktivierung und der Proliferation für die Gruppe der MAP-Kinase-Inhibitoren. Cyclosporin A hemmt dagegen dosisabhängig komplett die frühe Lymphozytenaktivierung durch Inhibition der IFN γ Produktion, ohne einen Einfluss auf den frühen Aktivierungsmarker CD69 zu haben. Zudem wird eine unvollständige Hemmung der Lymphozytenproliferation beobachtet. MPA zeigt sich als reiner dosisabhängiger Lymphozytenproliferationshemmer.

Decortin H ist ein Immunsuppressivum mit unspezifischer Wirkung mit jeweils inkompletter dosisabhängiger Hemmung der CD69 Expression und der IFN γ Produktion ohne Einfluss auf die Lymphozytenproliferation. Interessanterweise stellten sich zudem höhere Decortin H Konzentrationen als zelltoxisch heraus. Diese Ergebnisse stellen einen weiteren Teilschritt dar, um die Wirkungsweise von Glukokortikoiden besser zu verstehen.

Auffallend ist, dass sich die Ergebnisse für die beiden Subpopulationen CD4 $^{+/-}$ und CD8 $^{+/-}$ -Zellen nahezu entsprechen.

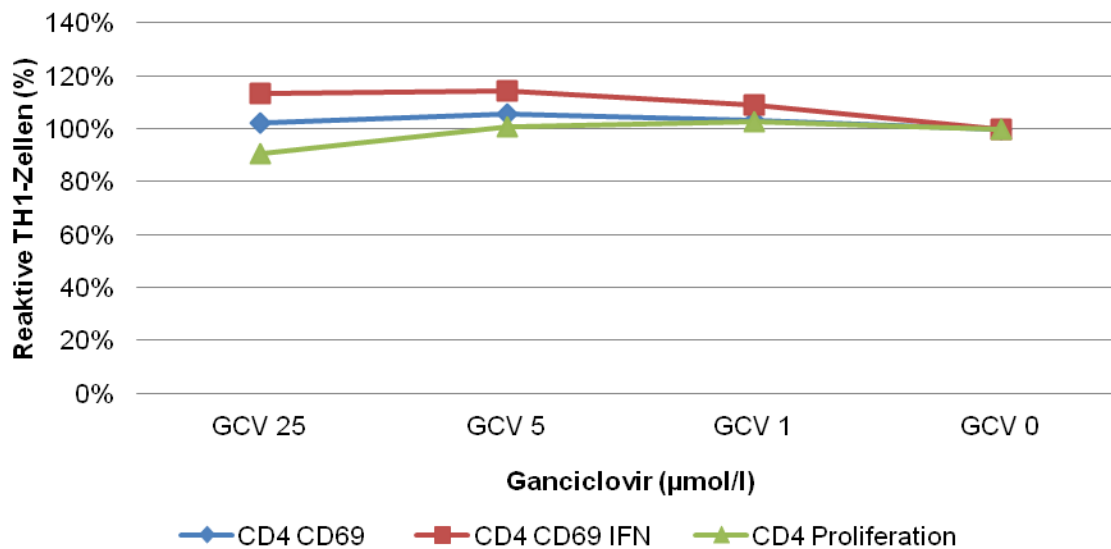
Tab. 2: Zusammenfassung der immunsuppressiven Wirkung anhand CD69 Expression, Interferon gamma (IFN γ) Produktion und Proliferation der CD4+- und CD8+-T-Zellen

- kein Effekt; +/- inkomplette Hemmung; + komplette Hemmung			
* toxisch bei 1,6 mg/dl			
	CD69	CD69 IFN γ	Proliferation
Mycophenolat (CD4+)	-	-	+
Mycophenolat (CD8+)	-	-	+
Cyclosporin A (CD4+)	-	+	+
Cyclosporin A (CD8+)	-	+	+/-
Decortin H (CD4+)	+/-	+/-	- *
Decortin H (CD8+)	+/-	+/-	- *
MAP-Kinase Inhibitor 3736 (CD4+)	+	+	+
MAP-Kinase Inhibitor 3736 (CD8+)	+	+	+
MAP-Kinase Inhibitor 3830 (CD4+)	+	+	+
MAP-Kinase Inhibitor 3830 (CD8+)	+	+	+

Einfluss von Ganciclovir auf die Lymphozytenaktivierung

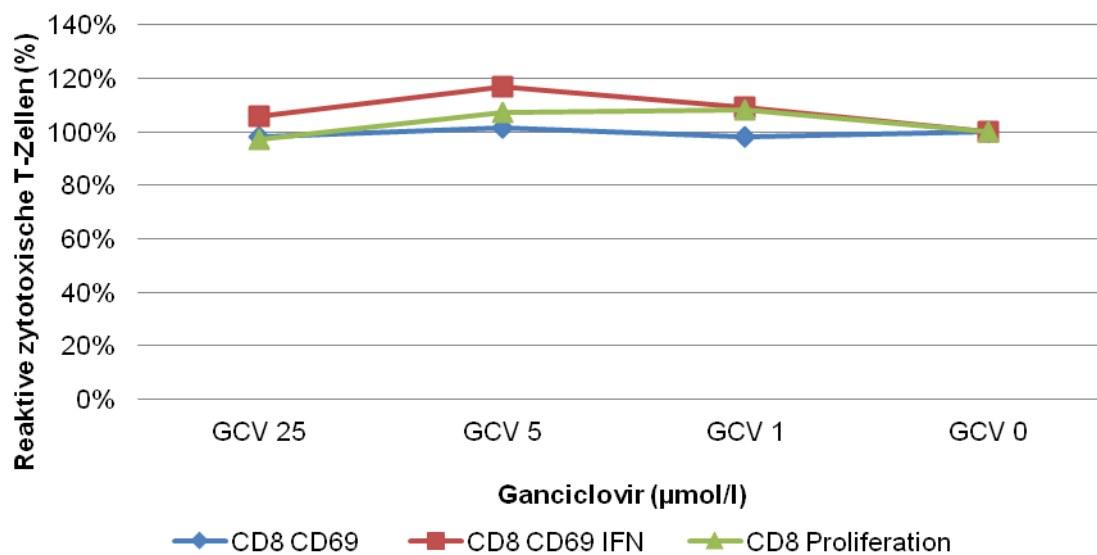
Bei jedem Versuchsansatz wurden nicht-stimulierte Kontrollen mit GCV in der höchst verwendeten Konzentration und stimulierte Proben mit verschiedenen GCV Konzentrationen getestet.

Die Kontrollen zeigten keine Toxizität von GCV auf die kultivierten Lymphozyten. Wir konnten keinerlei immunsuppressive Wirkung von GCV durch unsere experimentellen Tests nachweisen. (Abb. 34, Abb. 35)



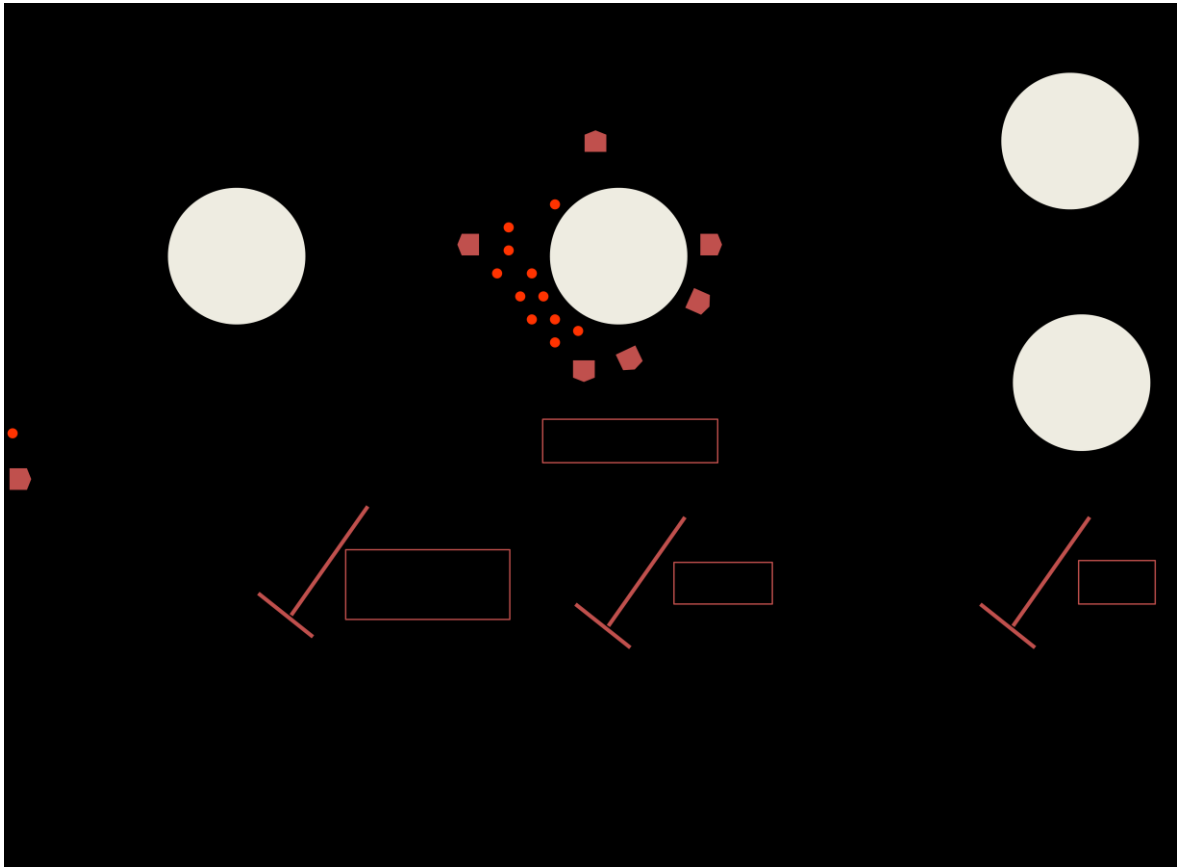
Blau: CD4+-T-Zellen mit Expression von CD69. **Rot:** CD4+-T-Zellen mit Expression von CD69 und Produktion von Interferon (IFN) gamma. **Grün:** proliferierende CD4+-T-Zellen

Abb. 34: Einfluss von Ganciclovir (GCV) auf die Lymphozytenaktivierung CD4+-T-Zellen.



Blau: CD8+-T-Zellen mit Expression von CD69. **Rot:** CD8+-T-Zellen mit Expression von CD69 und Produktion von Interferon (IFN) gamma. **Grün:** proliferierende CD8+-T-Zellen

Abb. 35: Einfluss von Ganciclovir (GCV) auf die Lymphozytenaktivierung CD8+-T-Zellen.



In dieser Arbeit konnten die untersuchten Immunsuppressiva MMF, CSA, Decortin H, und die beiden MAP-Kinase Inhibitoren bzgl. ihrer individuellen Wirkung auf die T-Zell Aktivierung charakterisiert werden (Abb. 36).

Mycophenolat mofetil konnte als ausschließlicher Proliferationshemmer charakterisiert werden.

MMF findet bereits als Standardimmunsuppressivum breite Anwendung in der immunsuppressiven Therapie. (Budde et al. 2006) Die pharmakokinetischen und pharmakodynamischen Eigenschaften von MMF sind günstig für einen sicheren Einsatz im medizinischen Alltag. (Glander et al. 2003) Der späte Zeitpunkt des Eingriffs in die Lymphozytenaktivierung mag die große therapeutische Breite von MMF erklären.

MMF ist ein Medikament, das über die Transplantation hinaus auch bei Autoimmunerkrankungen und renalen Erkrankungen als Therapieoption gilt. (Appel et al. 2005) Das Auftreten von unerwünschten Wirkungen scheint eher mit der verabreichten Tagesdosis einherzugehen, als mit jeglichem pharmakokinetischen Parameter. (Arns et al. 2006) Ein therapeutisches Drug Monitoring ist möglich, scheint jedoch bei der großen therapeutischen Breite nicht notwendig zu sein.

Land et al. (Land et al. 2005) zeigten bereits, dass durch Kombination mit MMF, Calcineurininhibitoren und Glukokortikoide eingespart werden können. Im Vergleich zum mTOR-Inhibitor Everolimus war MMF in einer Studie gleich immunsuppressiv wirksam bei besserem Nebenwirkungsprofil. (Lorber et al. 2005)

Die Ergebnisse dieser Arbeit sprechen für einen weiteren Einsatz von MMF als spezifischer Lymphozytenproliferationshemmer in der Transplantationsmedizin. Als Immunsuppressivum mit spezifischem Wirkungsprofil kann MMF als unverzichtbares Medikament in verschiedenen Kombinationstherapien gelten. Das Wirkprofil von MMF konnte mit unseren Tests gut untersucht werden.

Cyclosporin A konnte funktionell als Inhibitor der Zytokinproduktion (INF γ) und inkomplett auch der Lymphozytenproliferation charakterisiert werden.

Als erster Calcineurininhibitor hat CSA die immunsuppressive Therapie revolutioniert. (Burke, Jr. et al. 1994) CSA hat viele unerwünschte Wirkungen, wie beispielsweise die Nephrotoxizität oder Leberfunktionsstörungen, weshalb neue Wirkstoffe aus der Gruppe der Calcineurininhibitoren, wie Tacrolimus, entwickelt wurden. Es ist anzunehmen, dass die Ergebnisse dieser Arbeit auf die gesamte Gruppe der Calcineurininhibitoren übertragbar sind.

Calcineurininhibitoren sollten nach Transplantation in Kombination mit anderen Immunsuppressiva, wie beispielsweise mit MMF, eingesetzt werden. Durch die unterschiedlichen Angriffspunkte der kombinierten Medikamente sollte es möglich sein die Dosen der einzelnen Immunsuppressiva bei gleichbleibender Immunsuppression herabzusetzen und dabei Nebenwirkungen zu reduzieren.

In der klinischen Anwendung konnte mit reduzierten Calcineurininhibitor dosierungen (Cyclosporin und Tacrolimus) nach Lebertransplantation im Vergleich zu einer Kontrollgruppe eine bessere Nierenfunktion und normale Leberwerte beobachtet werden ohne histologischen Hinweis auf chronische Abstoßung. Diese Arbeitsgruppe stellt einen möglichen Verzicht von Calcineurininhibitoren in der Langzeitbehandlung in Aussicht. (Barbier et al. 2013)

Eine aktuelle retrospektive Studie bei Nierentransplantatierten konnte zeigen, dass eine Tacrolimus Monotherapie ab dem 6. Monat nach Transplantation bei Patienten mit niedrigem immunologischem Risiko eine sichere Variante im Vergleich zu der Standardtherapie mit MMF und Tacrolimus sein kann. Allerdings wird eine Anwendung vor allem bei MMF Unverträglichkeit empfohlen. (Augusto et al. 2013)

Trotz vieler Versuche auf Calcineurininhibitoren zu verzichten, existieren bisher kaum vielsprechende Alternativen. (Tedesco et al. 2012) Das bereits etablierte therapeutische Drug Monitoring mittels Talspiegel und C2 Spiegelbestimmung (Clase et al. 2002; Cole et al. 2003) und die pharmakodynamische Charakterisierung in dieser Arbeit sprechen für den weiteren Einsatz von CSA und anderen Substanzen aus der Gruppe der Calcineurininhibitoren in der Akuttherapie sowie in dosissparenden Kombinationstherapien in der Langzeittherapie.

Die MAP-Kinase-Inhibitoren sind als Immunsuppressiva bisher nicht im klinischen Einsatz.

MAP-Kinasen wurden bereits in vielen Studien als mögliche Angriffsziele für neue Medikamente gesehen. 4-(4-fluorophenyl)-2-(4-hydroxyphenyl)-5-(4-pyridyl)1H-Imidazol wurde bereits als Anti-HCMV Präparat beschrieben, welches die Synthese/Aktivierung von zellulären und/oder antiviralen Faktoren, die zur Aktivierung der DNA Replikation nötig sind, hemmt. (Johnson et al. 1999)

Die Hemmung des p38-MAPK- und JNK-Signalweges ist auch attraktiv für die Behandlung von Hirnentzündungen und Gliosen, da sie nicht nur die Synthese der proinflammatorischen Zytokine reduzierte, sondern auch deren intrazelluläre Signalwege hemmte. (Kaminska et al. 2009) MAP-Kinasen spielen eine wichtige Rolle in der Pathogenese der rheumatoiden Arthritis und stellen ein mögliches Angriffsziel für neue Medikamente dar, wenn es gelingt besonders die unnormale Entzündungsreaktion, welche die chronische Erkrankung auslöst, zu unterbinden. (Thalhamer et al. 2008) MAP-Kinasen wurden ebenfalls als Ziel für Therapeutika bei kardialen Erkrankungen beschrieben. (Ravingerova et al. 2003)f

Diese Arbeit zeigt das große immunsuppressive Potential dieser Medikamentenklasse. Sie sind ein sehr früher Inhibitor der Lymphozytenaktivierung, einschließlich der Hemmung der Expression früher Oberflächenmarker (CD69) und der nachfolgenden Aktivierungsschritte. (Zytokinausschüttung und Proliferation)

Diese Eigenschaft lässt Spekulationen über einem möglichen Einsatz als Monotherapie in der Transplantationsmedizin zu. Allerdings liegen bislang keine Informationen über therapeutische Wirkspiegel und Nebenwirkungsprofile vor, weshalb die Bedeutung dieser Substanzgruppe nicht umfassend beurteilt werden kann. Weitere klinische Studien werden die Einsatzmöglichkeiten dieser Gruppe in den nächsten Jahren beleuchten. Entscheidend werden das Nebenwirkungsprofil und die Möglichkeit des therapeutischen Drugmonitorings sein.

Steroide sind die ältesten therapeutisch eingesetzten Immunsuppressiva und dennoch ist die genaue Wirkungsweise von Substanzen aus dieser Wirkgruppe, wie **Decortin H**, nicht vollständig geklärt. Decortin H lässt sich als wenig selektiver

Inhibitor der Lymphozytenaktivierung ohne spezifisch identifizierbare Angriffspunkte charakterisieren.

Die heterogenen, dosisabhängigen Ergebnisse dieser Arbeit weisen darauf hin, dass die Wirkungsweise nur durch multimodale Interaktion mit verschiedenen zellulären Immunfunktionen zu erklären ist. Glukokortikoide greifen als körpereigene Stoffe in viele zelluläre Funktionen ein, was einerseits das pharmakodynamische Monitoring nahezu unmöglich macht und andererseits die zahlreichen und sehr unterschiedlichen unerwünschten Wirkungen erklärt.

Decortin H sollte in der Transplantationsmedizin als Hochdosistherapie bei der akuten Abstoßung aufgrund der langjährigen klinischen Erfahrung weiterhin eingesetzt werden. Trotz dieses langjährigen klinischen Einsatzes ist aber eine rationale Steuerung der Steroidtherapie kaum möglich. Dies ist einer der wesentlichen Gründe, warum in der Transplantationsmedizin ein Verzicht auf Glukokortikoide in der immunsuppressiven Langzeittherapie angestrebt wird. (Land et al. 2005)

Eine über 2 Jahre durchgeführte prospektive Studie bei Lebertransplantierten konnte zeigen dass ein Verzicht auf Glukokortikoide bei einer Therapie mit Basiliximab, Calcineurininhibitor und Mycophenolsäure ohne Einschränkung in der Sicherheit und Effektivität der Therapie möglich ist. (Ramirez et al. 2013)

Steiner (Steiner 2012) gibt in seiner Übersichtsarbeit über steroidfreie, chronische Immunsuppression bei Nierentransplantierten jedoch zu bedenken, dass die bisherigen Daten suboptimal sind, da sie häufig nur für bestimmte Subgruppen der Transplantierten gelten. Durch die bessere Kenntnis und Neuentwicklung weiterer immunsuppressiver Substanzklassen sollte der Verzicht auf Glukokortikoide in der Dauertherapie nach Transplantation in naher Zukunft möglich werden.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass eine individualisierte immunsuppressive Therapie abhängig von Therapieindikation und Stadium der Transplantation angestrebt wird, wobei die Inhibition früher und später Phasen der Lymphozytenaktivierung sehr individuell gesteuert werden kann. Das in dieser Arbeit angewendete Gliederungsprinzip kann im klinischen Einsatz zur Wahl des geeigneten Therapieregimes herangezogen werden.

Durch dieses Gliederungsprinzip kann der Einsatz der im klinischen Alltag bereits verwendeten immunsuppressiven Substanzklassen sicherer gestaltet werden.

Dies kann auch durch die Verbesserung der bekannten Methoden des therapeutischen Drugmonitorings ergänzt werden.

Traditionell wird das **therapeutische Drugmonitoring** über pharmakokinetische Parameter geleistet. Die Pharmakokinetik ist jedoch nicht geeignet direkte pharmakologische Effekte auf die relevanten Zielzellen abzuleiten. Die Pharmakodynamik dagegen ist die direkte Messung der pharmakologischen Wirkung auf die Immunzellen. Es wird angenommen, dass die Messung der pharmakodynamischen Variabilität die Wirksamkeit und Sicherheit einer Medikamentenklasse erhöhen könnte (Dambrin et al. 2000) und helfen sollte neue immunsuppressive Substanzen zu entwickeln und zu charakterisieren. (Klupp et al. 2002)

In den letzten Jahren wurden viele Methoden entwickelt, um Immunfunktionen zu testen. Von diesen untersuchten bislang nur wenige die Pharmakodynamik immunsuppressiver Substanzklassen. Dazu gehören die Bestimmung der Zytokinproduktion nach Mitogenstimulation mittels ELISA aus dem Serum, durchflusszytometrische Analysen von Vollblut oder der Nachweis von m-RNA. (Hartel et al. 2002; Stalder et al. 2003; Stordeur et al. 2003)

Die in dieser Arbeit verwendeten Tests untersuchen die Pharmakodynamik der einzelnen Immunsuppressiva nach Mitogenstimulation (SEB) im Vollblut von gesunden Probanden. Der Interferon Gamma Release Assay (CD69, IFN γ) und der Proliferationstest mittels CFSE Färbung mit anschließender durchflusszytometrischer Analyse stellen in vitro gute Möglichkeiten des Drugmonitorings dar. Wie unsere Ergebnisse zeigen lässt sich mit diesen Tests die IC₅₀ der einzelnen Substanzklassen gut darstellen und auch Medikamentenkombinationen können getestet werden.

Für die Untersuchung der PD etabliert sind bislang vor allem die Bestimmung der Aktivität von Zielenzymen, beispielsweise Calcineurin oder IMPDH. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Hemmung von Calcineurin mit den höchsten Blutspiegelkonzentrationen 2 h nach Medikamentengabe korreliert. (Grinyo et al. 2004) und dass die Kenntnis der IMPDH-Aktivität vor Transplantation das Outcome nach Transplantation beeinflusst. (Budde et al. 2000)

Nachteile der Enzymbestimmung sind, dass sie allein die Enzymaktivität messen, nicht die zahlreichen Effekte auf die Immunzellfunktion, welche durch die Enzymhemmung zustande kommen. Ebenfalls können die Effekte von Kombinationstherapien durch diese Bestimmung nicht erfasst werden. (Barten et al. 2007)

In früher angewendeten Assays konnte die Lymphozytenfunktion lediglich mit Tritium markiertem Thymidin ($[^3\text{H}]$ -TdR) gemessen werden. (Ferron et al. 1998)

Barten et al. (Barten et al. 2003) etablierten nicht radioaktive Vollblut Assays um verschiedene Medikamentenkombinationen und ihren Einfluss auf die Lymphozytenfunktion und Proliferation zu untersuchen. Mittels durchflusszytometrischer Analyse betrachteten sie die Oberflächenmarker CD25, CD154 und ein proliferierendes nukleäres Zellantigen (PCNA).

Durch die Untersuchung der Lymphozytenproliferation mittels CFSE Färbung konnte auch in dieser Arbeit auf Radioaktivität verzichtet werden.

Das Potential, welches in der Analyse der Expression von T-Zelloberflächenmarkern liegt, konnte bereits 1996 von Chang et al. gezeigt werden. (Chang et al. 1996) Bei Herztransplantierten korrelierte eine Erhöhung der Expression von CD4 und CD25 auf T-Zellen mit dem Grad der Abstoßung.

Bei Nierentransplantierten konnte unter Therapie mit Cyclosporin A ein signifikanter immunsuppressiver Effekt, einerseits durch die verringerte Expression von Oberflächenmarkern wie CD25 und CD95 auf der T-Zelloberfläche und andererseits auf die Lymphozytenproliferation, nachgewiesen werden. Ein Vergleich erfolgte hierbei mit gesunden Probanden. (Hutchinson et al. 2004; Stalder et al. 2003) Beide Untersuchungen nutzten durchflusszytometrische Analysen oder die Einbringung von radioaktiven Nukleotiden um den Medikamenteneffekt zu bestimmen.

Barten et al. zeigten (Barten et al. 2007) zum ersten Mal den Wert des pharmakodynamischen Drugmonitorings der immunsuppressiven Therapie (CSA, Tacrolimus und Sirolimus) im peripheren Blut bei herztransplantierten Patienten. Außerdem beobachteten sie, dass Veränderungen der T-Zellfunktion über die Zeit in immunsupprimierten Transplantatempfängern eng mit der Schwere histopathologischer Ereignisse im Transplantatgewebe korrelieren. Sie vermuteten, dass Variationen in der Korrelation zwischen PD-Effekten und PK-

Konzentrationen zu bestätigen scheinen, dass Immunsuppressiva eine Vielzahl an unterschiedlichen Antworten in Patienten hervorrufen, selbst wenn Blutspiegel und Dosierung ähnlich sind.

Die in dieser Arbeit verwendeten Tests sind bislang experimentell und müssen ihre klinische Tauglichkeit als diagnostisches Verfahren noch beweisen. Wichtig ist es die besten Parameter und Methoden herauszufinden, die sich zudem schnell und kostengünstig bestimmen lassen. (Ekberg et al. 2007)

Herausforderungen stellen die Anzahl der gemessenen Parameter, die Art der Gewebeprobe, der gewählte ex vivo Stimulus, die bisher meist fehlenden Korrelation zwischen Pharmakodynamik und Pharmakokinetik oder auch die Medikamentendosis und die meist arbeitsintensiven und beurteilungsintensiven Methoden dar. (Barten et al. 2007)

Weitere Vor- und Nachteile zeigen sich in der in vitro Stimulation mittels Mitogenen. Sindhi et al. (Sindhi et al. 2001) konnten zeigen, dass die Stimulierung mittels Mitogen in einem korrelierenden Verhältnis zu Antigenstimulierung steht. Besonders die EC50 für den CSA-Effekt auf die Zytokine IL-2, IFN gamma und IFN alpha, korrelierten bei Stimulierung mittels PMA-Ionomycin oder SEB. Die Antwort auf einen Antigen Stimulus zeigte sich in einer weiteren Untersuchung geringer als auf einen Mitogenstimulus. (Sindhi et al. 2003)

Die in dieser Arbeit angewendeten Tests zur Untersuchung der Lymphozytenaktivierung sowie die Untersuchung der Lymphozytenproliferation mittels CFSE Färbung können die erste Grundlage für die diagnostische Untersuchung der Pharmakodynamik von Immunsuppressiva im Rahmen eines therapeutischen Drugmonitorings sein. Allerdings sind die Untersuchungen sehr zeitaufwendig und nicht standardisierbar und bleiben daher spezialisierten Zentren vorbehalten.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es die einzelne Immunsuppressiva in Kombination mit einer **antiviralen Substanz** (GCV) zu testen, um eventuell vorliegende synergistische Wirkmechanismen zu beschreiben. Ob antivirale Substanzen einen Einfluss auf das Immunsystem haben, wurde bislang erst in wenigen Studien untersucht.

Dass synergistische Effekte zwischen Immunsuppressiva und Virostatika möglich sind, zeigten Neyts et al. (Neyts et al. 1998) Sie fanden heraus, dass MMF in therapeutischer Plasmakonzentration in höchstem Maße die Antiherpesvirusaktivität von Aciclovir (ACV), Ganciclovir (GCV) und Penciclovir (PCV) in vitro und in vivo potenziert. Der Mechanismus besteht in einer Entleerung des endogenen dGTP Pools, was den hemmenden Effekt der Triphosphate von ACV, GCV und PCV auf die virale DNA Polymerase begünstigt.

Daniela Vetter (Vetter 2011) konnte solche Synergismen mit GCV in vitro auch für die Immunsuppressiva Decortin H, die MAP-Kinase Inhibitoren 3736 und 3830 sowie CSA zeigen.

Lori et al. (Lori et al. 2005) fanden heraus, dass niedere zytostatische Hydroxyurea Konzentrationen die Zellproliferation und auch die HIV-Replikation in vitro hemmen, da antivirale und zytostatische Aktivität optimal ausgenutzt wurden. Dies zeigt die Wichtigkeit der optimalen Betrachtung des Wirkmechanismus der einzelnen Medikamente. Außerdem wurde die Bedeutung der Inosinmonophosphat-Dehydrogenase als Ziel für die immunsuppressive und antivirale Therapie und auch als Ziel für die Krebstherapie belegt, was den möglichen Zusatzeffekt von Immunsuppressiva zu anderen Medikamentenklassen unterstützt. (Jain et al. 2004)

Eine Studie konnte eine signifikante Hemmung der Lymphozytenproliferation bei Nierentransplantatempfängern unter Valganciclovir im Vergleich zu Valaciclovir zeigen. Ebenfalls wurden weniger aktivierte T-Zellen in der Valganciclovir-Gruppe gefunden. (Reischig et al. 2011)

Ganciclovir zeigt in dieser Arbeit keine eigenständigen oder additiven immunsuppressiven Effekte sowohl auf die Expression früher Oberflächenmarker oder die Ausschüttung von INF γ , als auch auf die Proliferation stimulierter Lymphozyten. Weder in Kombination mit verschiedenen Konzentrationen von Immunsuppressiva noch als Einzelwirkstoff konnten in vitro signifikante Effekte auf die Lymphozytensubpopulationen gemessen werden. Daraus kann auf einen sichereren Einsatz dieser beiden Medikamentenklassen in Kombination geschlossen werden.

Es ist zu diskutieren, ob eine fehlende Aktivierung von Ganciclovir durch die Phosphorylierung durch eine virale Kinase (UL97) vorliegt. Da in den

durchgeführten Versuchen keine virusinfizierten Zellen betrachtet wurden, ist es möglich, dass Ganciclovir überhaupt nicht aktiviert wurde.

Diese Fragestellung kann nur mithilfe von Infektionsmodellen und in klinischen Studien mit durch CMV Reaktivierung betroffenen Patienten untersucht werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit geben in vitro keinen Anhalt für zusätzliche immunsuppressive oder auch toxische Effekte auf die Immunfunktion. Jedoch lassen die oben erwähnten Studien weiterhin Raum für Spekulation über das Vorliegen von additiven oder synergistischen Effekten von Immunsuppressiva und antiviralen Substanzen.

5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden die pharmakodynamischen Eigenschaften verschiedener immunsuppressiver Substanzklassen (Proliferationshemmer, Calcineurininhibitor, Glukokortikoid, MAP-Kinase Inhibitoren) untersucht. Zusätzlich wurde die einzelnen Immunsuppressiva in Kombination mit der antiviralen Substanz Ganciclovir getestet.

Ziel war es die Wirkungsweise der einzelnen immunsuppressiven Substanzklassen genauer zu charakterisieren und auf diese Weise sinnvolle Kombinationsmöglichkeiten zu beschreiben und mögliche synergistische immunsuppressive Effekte in der Kombination mit Ganciclovir aufzuzeigen.

Zur Vermeidung opportunistischer Infektionen sollte die optimale Kombination verschiedener Immunsuppressiva mit verschiedenen Angriffspunkten auf Zellebene gesucht werden. Die detaillierte Charakterisierung der Wirkprofile der verschiedenen immunsuppressiven Substanzgruppen dieser Studie soll einen Beitrag zu einem verbesserten rationalen Einsatz dieser Pharmaka leisten.

Die Pharmakodynamik wurde durch zwei Immunfunktionstests der spezifischen zellulären Immunität in vitro untersucht. Es wurden CD4+ und CD8+ T-Zellen betrachtet. Mittels des Interferon gamma release Assays wurde die sehr frühe Lymphozytenaktivierung durch die Expression des Oberflächenmarkers CD69 und die frühe Aktivierung durch die Ausschüttung von Interferon gamma untersucht. Der Lymphozytenproliferationstest, bei welchem der fluoreszierende Zellfarbstoff CFSE eingesetzt wurde, untersuchte die Lymphozytenproliferation nach 6 Tagen. Es wurden in vitro verschiedene Medikamentenkonzentrationen eines Immunsuppressivums in Kombination mit verschiedenen Ganciclovirkonzentrationen nach Stimulation mit einem Superantigen (Staphylokokken-Enterotoxin-B) untersucht. Die Auswertung erfolgte mittels Durchflusszytometrie und anschließender graphischer Darstellung.

Es zeigten sich Unterschiede bezüglich der Pharmakodynamik der verschiedenen immunsuppressiven Substanzklassen. Interessanterweise wurden CD4+- und CD8+- Zellen durch die Substanzgruppen dosisabhängig nahezu identisch gehemmt.

Für die einzelnen Substanzgruppen wurden spezifische Profile der Lymphozytenhemmung nachgewiesen.

Es konnte eine wenig einheitliche, aber dosisabhängige Wirkungsweise von Glukokortikoiden gezeigt werden, welche die wichtige Bedeutung in der Akuttherapie und die Probleme in der Langzeittherapie gleichermaßen belegt.

Mycophenolsäure und Cyclosporin A konnten durch die Methoden des immunologischen Drugmonitorings in ihrer unterschiedlichen Wirkungsweise gut charakterisiert werden. Durch ihre verschiedenen Angriffspunkte im Aktivierungsablauf der T-Lymphozyten sind sie sinnvoll kombinierbar.

Die MAP-Kinase Inhibitoren konnten als neue, globale Inhibitoren der Lymphozytenaktivierung charakterisiert werden, deren in vitro Effekt nun auch in klinischen Studien betätigt werden muss.

Ein Synergismus zwischen Ganciclovir und den untersuchten Immunsuppressiva konnte dagegen nicht nachgewiesen werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein nicht radioaktiver Test etabliert, mit welchem die Lymphozytenproliferation experimentell gut untersucht werden kann. Diese Methode kann in Zukunft für das therapeutische Drugmonitoring genutzt werden.

Zu diskutieren ist, ob die in vitro erhobenen Ergebnisse in klinischen Studien und Infektionsmodellen bestätigt werden können. Dies ist spezialisierten Zentren vorbehalten. Ebenso gibt es Studien, die synergistische Effekte von Virostatika und Immunsuppressiva vermuten lassen, diese Arbeit konnte, möglicherweise durch die Betrachtung nicht virusinfizierter Zellen im Versuchsansatz, diese Annahme nicht bestätigen.

Die Arbeit zeigt, dass neue Substanzgruppen wie z.B. MAP-Kinase Inhibitoren durch neue molekulare Angriffspunkte neue therapeutische Möglichkeiten im Rahmen der Transplantationsmedizin eröffnen und durch bessere Kenntnis der Pharmakodynamik bereits eingesetzten Substanzklassen besser abgestimmte Therapieregime möglich sind, um dadurch die Patientensicherheit weiter zu verbessern.

6 Literaturverzeichnis

References

1. Allison A. C. and Eugui, E. M.: Mechanisms of action of mycophenolate mofetil in preventing acute and chronic allograft rejection. *Transplantation* 80: 181-190 (2005)
2. Allison A. C., Hovi, T., Watts, R. W. and Webster, A. D.: Immunological observations on patients with Lesch-Nyhan syndrome, and on the role of de-novo purine synthesis in lymphocyte transformation. *Lancet* 2: 1179-1183 (1975)
3. Appel G. B., Radhakrishnan, J. and Ginzler, E. M.: Use of mycophenolate mofetil in autoimmune and renal diseases. *Transplantation* 80: 265-271 (2005)
4. Arns W., Cibrik, D. M., Walker, R. G., Mourad, G., Budde, K., Mueller, E. A. and Vincenti, F.: Therapeutic drug monitoring of mycophenolic acid in solid organ transplant patients treated with mycophenolate mofetil: review of the literature. *Transplantation* 82: 1004-1012 (2006)
5. Augusto J. F., Subra, J. F., Onno, C., Villemain, F., Croue, A., Dussaussoy, C., Picquet, J., Coeffic, B. and Sayegh, J.: Long-term maintenance immunosuppressive regimen with tacrolimus monotherapy. *Ann.Transplant.* 18: 368-377 (2013)
6. Awni W. M.: Pharmacodynamic monitoring of cyclosporin. *Clin.Pharmacokinet.* 23: 428-448 (1992)
7. Barbier L., Garcia, S., Cros, J., Borentain, P., Botta-Fridlund, D., Paradis, V., Le Treut, Y. P. and Hardwigen, J.: Assessment of chronic rejection in liver graft recipients receiving immunosuppression with low-dose calcineurin inhibitors. *J.Hepatol.* 1223-1230 (2013)
8. Barten M. J., Dhein, S., Chang, H., Bittner, H. B., Tarnok, A., Rahmel, A., Mohr, F. W. and Gummert, J. F.: Assessment of immunosuppressive drug interactions: inhibition of lymphocyte function in peripheral human blood. *J.Immunol.Methods* 283: 99-114 (2003)
9. Barten M. J., Rahmel, A., Boldt, A., Dhein, S., Bittner, H. B., Tarnok, A., Mohr, F. W. and Gummert, J. F.: Pharmacodynamic monitoring of the immunosuppressive therapy in patients after heart transplantation: whole blood flow cytometric analysis of lymphocyte function. *Comput.Biol.Med.* 37: 1367-1373 (2007)
10. Billingham M. E., Krohn, P. L. and Medawar, P. B.: Effect of locally applied cortisone acetate on survival of skin homografts in rabbits. *Br.Med.J.* 2: 1049-1053 (1951)

11. Borel J. F., Feurer, C., Magnee, C. and Stahelin, H.: Effects of the new anti-lymphocytic peptide cyclosporin A in animals. *Immunology* 32: 1017-1025 (1977)
12. Brennan D. C.: Cytomegalovirus in renal transplantation. *J.Am.Soc.Nephrol.* 12: 848-855 (2001)
13. Budde K., Giessing, M., Liefeldt, L., Neumayer, H. H. and Glander, P.: Modern immunosuppression following renal transplantation. Standard or tailor made? *Urologe A* 45: 9-17 (2006)
14. Budde K., Glander, P., Bauer, S., Braun, K., Waiser, J., Fritsche, L., Mai, I., Roots, I. and Neumayer, H. H.: Pharmacodynamic monitoring of mycophenolate mofetil. *Clin.Chem.Lab Med.* 38: 1213-1216 (2000)
15. Bullingham R. E., Nicholls, A. and Hale, M.: Pharmacokinetics of mycophenolate mofetil (RS61443): a short review. *Transplant.Proc.* 28: 925-929 (1996)
16. Burke J. F., Jr., Pirsch, J. D., Ramos, E. L., Salomon, D. R., Stablein, D. M., Van Buren, D. H. and West, J. C.: Long-term efficacy and safety of cyclosporine in renal-transplant recipients. *N.Engl.J.Med.* 331: 358-363 (1994)
17. Burkhart C., Heusser, C., Morris, R. E., Raulf, F., Weckbecker, G., Weitz-Schmidt, G. and Welzenbach, K.: Pharmacodynamics in the development of new immunosuppressive drugs. *Ther.Drug Monit.* 26: 588-592 (2004)
18. Calne R. Y., White, D. J., Thiru, S., Evans, D. B., McMaster, P., Dunn, D. C., Craddock, G. N., Pentlow, B. D. and Rolles, K.: Cyclosporin A in patients receiving renal allografts from cadaver donors. *Lancet* 2: 1323-1327 (1978)
19. Carr S. F., Papp, E., Wu, J. C. and Natsumeda, Y.: Characterization of human type I and type II IMP dehydrogenases. *J.Biol.Chem.* 268: 27286-27290 (1993)
20. Chang D. M., Ding, Y. A., Kuo, S. Y., Chang, M. L. and Wei, J.: Cytokines and cell surface markers in prediction of cardiac allograft rejection. *Immunol.Invest* 25: 13-21 (1996)
21. Chen J. and Stinski, M. F.: Role of regulatory elements and the MAPK/ERK or p38 MAPK pathways for activation of human cytomegalovirus gene expression. *J.Virol.* 76: 4873-4885 (2002)
22. Clase C. M., Mahalati, K., Kiberd, B. A., Lawen, J. G., West, K. A., Fraser, A. D. and Belitsky, P.: Adequate early cyclosporin exposure is critical to prevent renal allograft rejection: patients monitored by absorption profiling. *Am.J.Transplant.* 2: 789-795 (2002)
23. Clipstone N. A. and Crabtree, G. R.: Identification of calcineurin as a key signalling enzyme in T-lymphocyte activation. *Nature* 357: 695-697 (1992)
24. Cole E., Maham, N., Cardella, C., Cattran, D., Fenton, S., Hamel, J., O'Grady, C. and Smith, R.: Clinical benefits of neoral C2 monitoring in the long-

term management of renal transplant recipients. *Transplantation* 75: 2086-2090 (2003)

25. Crough T. and Khanna, R.: Immunobiology of human cytomegalovirus: from bench to bedside. *Clin.Microbiol.Rev.* 22: 76-98, Table (2009)

26. Crumpacker C. S.: Ganciclovir. *N.Engl.J.Med.* 335: 721-729 (1996)

27. Dambrin C., Klupp, J. and Morris, R. E.: Pharmacodynamics of immunosuppressive drugs. *Curr.Opin.Immunol.* 12: 557-562 (2000)

28. Davis C. L.: The prevention of cytomegalovirus disease in renal transplantation. *Am.J.Kidney Dis.* 16: 175-188 (1990)

29. Dragun D.: Humoral responses directed against non-human leukocyte antigens in solid-organ transplantation. *Transplantation* 86: 1019-1025 (2008)

30. Dunea G., Nakamoto, S., Straffon, R. A., Figueroa, J. E., Versaci, A. A., Shibagaki, M. and Kolff, W. J.: Renal Homotransplantation in 24 Patients. *Br.Med.J.* 1: 7-13 (1965)

31. Ekberg H., Tedesco-Silva, H., Demirbas, A., Vitko, S., Nashan, B., Gurkan, A., Margreiter, R., Hugo, C., Grinyo, J. M., Frei, U., Vanrenterghem, Y., Daloze, P. and Halloran, P. F.: Reduced exposure to calcineurin inhibitors in renal transplantation. *N.Engl.J.Med.* 357: 2562-2575 (2007)

32. Eugui E. M., Mirkovich, A. and Allison, A. C.: Lymphocyte-selective antiproliferative and immunosuppressive activity of mycophenolic acid and its morpholinoethyl ester (RS-61443) in rodents. *Transplant.Proc.* 23: 15-18 (1991)

33. Fahr A.: Cyclosporin clinical pharmacokinetics. *Clin.Pharmacokinet.* 24: 472-495 (1993)

34. Favaloro E. J.: Differential expression of surface antigens on activated endothelium. *Immunol.Cell Biol.* 71: 571-581 (1993)

35. Ferron G. M. and Jusko, W. J.: Pharmacokinetic and pharmacodynamic interactions between prednisolone and sirolimus in rabbits. *Pharm.Res.* 15: 1888-1894 (1998)

36. Fishman J. A.: Infection in solid-organ transplant recipients. *N.Engl.J.Med.* 357: 2601-2614 (2007)

37. Fishman J. A. and Rubin, R. H.: Infection in organ-transplant recipients. *N.Engl.J.Med.* 338: 1741-1751 (1998)

38. Flechner S. M., Feng, J., Mastroianni, B., Savas, K., Arnovitz, J., Moneim, H., Modlin, C. S., Goldfarb, D., Cook, D. J. and Novick, A. C.: The effect of 2-gram versus 1-gram concentration controlled mycophenolate mofetil on renal transplant outcomes using sirolimus-based calcineurin inhibitor drug-free immunosuppression. *Transplantation* 79: 926-934 (2005)

39. Franklin T. J. and Cook, J. M.: The inhibition of nucleic acid synthesis by mycophenolic acid. *Biochem.J.* 113: 515-524 (1969)
40. Fulton B. and Markham, A.: Mycophenolate mofetil. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and clinical efficacy in renal transplantation. *Drugs* 51: 278-298 (1996)
41. Garnett M. J. and Marais, R.: Guilty as charged: B-RAF is a human oncogene. *Cancer Cell* 6: 313-319 (2004)
42. Ginzler E. M. and Aranow, C.: Mycophenolate mofetil in lupus nephritis. *Lupus* 14: 59-64 (2005)
43. Glander P., Hambach, P., Braun, K. P., Fritsche, L., Giessing, M., Mai, I., Einecke, G., Waiser, J., Neumayer, H. H. and Budde, K.: Pre-transplant inosine monophosphate dehydrogenase activity is associated with clinical outcome after renal transplantation. *Am.J.Transplant.* 4: 2045-2051 (2004)
44. Glander P., Hambach, P., Braun, K. P., Fritsche, L., Waiser, J., Mai, I., Neumayer, H. H. and Budde, K.: Effect of mycophenolate mofetil on IMP dehydrogenase after the first dose and after long-term treatment in renal transplant recipients. *Int.J.Clin.Pharmacol.Ther.* 41: 470-476 (2003)
45. Griego S. D., Weston, C. B., Adams, J. L., Tal-Singer, R. and Dillon, S. B.: Role of p38 mitogen-activated protein kinase in rhinovirus-induced cytokine production by bronchial epithelial cells. *J.Immunol.* 165: 5211-5220 (2000)
46. Grinyo J. M., Cruzado, J. M., Millan, O., Caldes, A., Sabate, I., Gil-Vernet, S., Seron, D., Brunet, M., Campistol, J. M., Torras, J. and Martorell, J.: Low-dose cyclosporine with mycophenolate mofetil induces similar calcineurin activity and cytokine inhibition as does standard-dose cyclosporine in stable renal allografts. *Transplantation* 78: 1400-1403 (2004)
47. Gummert J. F., Ikonen, T. and Morris, R. E.: Newer immunosuppressive drugs: a review. *J.Am.Soc.Nephrol.* 10: 1366-1380 (1999)
48. Hale M. D., Nicholls, A. J., Bullingham, R. E., Hene, R., Hoitsma, A., Squifflet, J. P., Weimar, W., Vanrenterghem, Y., Van de Woude, F. J. and Verpooten, G. A.: The pharmacokinetic-pharmacodynamic relationship for mycophenolate mofetil in renal transplantation. *Clin.Pharmacol.Ther.* 64: 672-683 (1998)
49. Halloran P. F.: Immunosuppressive drugs for kidney transplantation. *N.Engl.J.Med.* 351: 2715-2729 (2004)
50. Halloran P. F., Melk, A. and Barth, C.: Rethinking chronic allograft nephropathy: the concept of accelerated senescence. *J.Am.Soc.Nephrol.* 10: 167-181 (1999)
51. Harris P. E., Cortesini, R. and Suciu-Foca, N.: Indirect allorecognition in solid organ transplantation. *Rev.Immunogenet.* 1: 297-308 (1999)

52. Hartel C., Fricke, L., Schumacher, N., Kirchner, H. and Muller-Steinhardt, M.: Delayed cytokine mRNA expression kinetics after T-lymphocyte costimulation: a quantitative measure of the efficacy of cyclosporin A-based immunosuppression. *Clin.Chem.* 48: 2225-2231 (2002)
53. Herrmann T., Waanders, G. A., Chvatchko, Y. and MacDonald, H. R.: The viral superantigen Mls-1a induces interferon-gamma secretion by specifically primed CD8+ cells but fails to trigger cytotoxicity. *Eur.J.Immunol.* 22: 2789-2793 (1992)
54. Holt D. W.: Therapeutic drug monitoring of immunosuppressive drugs in kidney transplantation. *Curr.Opin.Nephrol.Hypertens.* 11: 657-663 (2002)
55. Hutchinson P., Jose, M., Atkins, R. C. and Holdsworth, S. R.: Ex vivo lymphocyte proliferative function is severely inhibited in renal transplant patients on mycophenolate mofetil treatment. *Transpl.Immunol.* 13: 55-61 (2004)
56. Ingelfinger J. R. and Schwartz, R. S.: Immunosuppression--the promise of specificity. *N.Engl.J.Med.* 353: 836-839 (2005)
57. Izeradjene K. and Revillard, J. P.: Apoptosis of superantigen-activated T cells induced by mycophenolate mofetil treatment. *Transplantation* 71: 118-125 (2001)
58. Jain J., Almquist, S. J., Ford, P. J., Shlyakhter, D., Wang, Y., Nimmesgern, E. and Germann, U. A.: Regulation of inosine monophosphate dehydrogenase type I and type II isoforms in human lymphocytes. *Biochem.Pharmacol.* 67: 767-776 (2004)
59. Janeway, C A, Travers, P J, Walport, M and Shlomchik, M J: *Immunobiology, 5th edition* New York, Garland Science, S.43-45 (2001a)
60. Janeway, C A, Travers, P J, Walport, M and Shlomchik, M J: *Immunobiology, 5th edition* New York, Garland Science, S.307 (2001b)
61. Janeway, C A, Travers, P J, Walport, M and Shlomchik, M J: *Immunobiology, 5th edition* New York, Garland Science, S.201-203 (2001c)
62. Johnson R. A., Huong, S. M. and Huang, E. S.: Inhibitory effect of 4-(4-fluorophenyl)-2-(4-hydroxyphenyl)-5-(4-pyridyl)1H - imidazole on HCMV DNA replication and permissive infection. *Antiviral Res.* 41: 101-111 (1999)
63. Johnson R. A., Huong, S. M. and Huang, E. S.: Activation of the mitogen-activated protein kinase p38 by human cytomegalovirus infection through two distinct pathways: a novel mechanism for activation of p38. *J.Virol.* 74: 1158-1167 (2000)
64. Kahan B. D.: Cyclosporine. *N.Engl.J.Med.* 321: 1725-1738 (1989)
65. Kaminska B., Gozdz, A., Zawadzka, M., Ellert-Miklaszewska, A. and Lipko, M.: MAPK signal transduction underlying brain inflammation and gliosis as therapeutic target. *Anat.Rec.(Hoboken.)* 292: 1902-1913 (2009)

66. Karin M.: The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases. *Philos.Trans.R.Soc.Lond B Biol.Sci.* 351: 127-134 (1996)
67. Kasiske B. L., Snyder, J. J., Gilbertson, D. T. and Wang, C.: Cancer after kidney transplantation in the United States. *Am.J.Transplant.* 4: 905-913 (2004)
68. Kasiske B. L., Zeier, M. G., Craig, J. C., Ekberg, H., Garvey, C. A., Green, M. D., Jha, V., Josephson, M. A., Kiberd, B. A., Kreis, H. A., McDonald, R. A., Newmann, J. M., Obrador, G. T., Chapman, J. R., Vincenti, F. G., Balk, E. M., Wagner, M., Raman, G., Earley, A. and Abariga, S.: KDIGO clinical practice guideline for the care of kidney transplant recipients. *Am.J.Transplant.* 9: 1-155 (2009)
69. Klupp J., Holt, D. W. and van, G. T.: How pharmacokinetic and pharmacodynamic drug monitoring can improve outcome in solid organ transplant recipients. *Transpl.Immunol.* 9: 211-214 (2002)
70. Kobashigawa J., Miller, L., Renlund, D., Mentzer, R., Alderman, E., Bourge, R., Costanzo, M., Eisen, H., Dureau, G., Ratkovec, R., Hummel, M., Ipe, D., Johnson, J., Keogh, A., Mamelok, R., Mancini, D., Smart, F. and Valantine, H.: A randomized active-controlled trial of mycophenolate mofetil in heart transplant recipients. Mycophenolate Mofetil Investigators. *Transplantation* 66: 507-515 (1998)
71. Konig R.: Interactions between MHC molecules and co-receptors of the TCR. *Curr.Opin.Immunol.* 14: 75-83 (2002)
72. Kotton C. N., Kumar, D., Caliendo, A. M., Asberg, A., Chou, S., Snyderman, D. R., Allen, U. and Humar, A.: International consensus guidelines on the management of cytomegalovirus in solid organ transplantation. *Transplantation* 89: 779-795 (2010)
73. Koyama H. and Cecka, J. M.: Rejection episodes. *Clin.Transpl.* 391-404 (1992)
74. Kuypers D. R.: Immunosuppressive drug monitoring - what to use in clinical practice today to improve renal graft outcome. *Transpl.Int.* 18: 140-150 (2005)
75. Kuypers D. R. and Vanrenterghem, Y. C.: Tailoring immunosuppressive therapy. *Nephrol.Dial.Transplant.* 17: 2051-2054 (2002)
76. Land W. and Vincenti, F.: Toxicity-sparing protocols using mycophenolate mofetil in renal transplantation. *Transplantation* 80: 221-234 (2005)
77. Levings M. K. and Roncarolo, M. G.: T-regulatory 1 cells: a novel subset of CD4 T cells with immunoregulatory properties. *J.Allergy Clin.Immunol.* 106: 109-112 (2000)
78. Lindholm A. and Kahan, B. D.: Influence of cyclosporine pharmacokinetics, trough concentrations, and AUC monitoring on outcome after kidney transplantation. *Clin.Pharmacol.Ther.* 54: 205-218 (1993)

79. Lorber M. I., Mulgaonkar, S., Butt, K. M., Elkhammas, E., Mendez, R., Rajagopalan, P. R., Kahan, B., Sollinger, H., Li, Y., Cretin, N. and Tedesco, H.: Everolimus versus mycophenolate mofetil in the prevention of rejection in de novo renal transplant recipients: a 3-year randomized, multicenter, phase III study. *Transplantation* 80: 244-252 (2005)
80. Lori F., Foli, A., Groff, A., Lova, L., Whitman, L., Bakare, N., Pollard, R. B. and Lisiewicz, J.: Optimal suppression of HIV replication by low-dose hydroxyurea through the combination of antiviral and cytostatic ('virostatic') mechanisms. *AIDS* 19: 1173-1181 (2005)
81. Maino V. C., Suni, M. A. and Ruitenberg, J. J.: Rapid flow cytometric method for measuring lymphocyte subset activation. *Cytometry* 20: 127-133 (1995)
82. Maloy K. J. and Powrie, F.: Regulatory T cells in the control of immune pathology. *Nat.Immunol.* 2: 816-822 (2001)
83. Mayer G.: Response to Antigen: Processing and Presentation, <http://pathmicro.med.sc.edu/bowers/ant-pres.htm>. (2013)
84. McCune W. J.: Mycophenolate mofetil for lupus nephritis. *N.Engl.J.Med.* 353: 2282-2284 (2005)
85. McGuckin C., Jurga, M., Ali, H., Strbad, M. and Forraz, N.: Culture of embryonic-like stem cells from human umbilical cord blood and onward differentiation to neural cells in vitro. *Nat.Protoc.* 3: 1046-1055 (2008)
86. Meier J. and Sturm, A.: Current treatment of ulcerative colitis. *World J.Gastroenterol.* 17: 3204-3212 (2011)
87. Meier-Kriesche H. U., Davies, N. M., Grinyo, J., Heading, R., Mamelok, R., Wijngaard, P., Oellerich, M. and Maes, B.: Mycophenolate sodium does not reduce the incidence of GI adverse events compared with mycophenolate mofetil. *Am.J.Transplant.* 5: 1164-1166 (2005)
88. Meier-Kriesche H. U., Schold, J. D., Srinivas, T. R. and Kaplan, B.: Lack of improvement in renal allograft survival despite a marked decrease in acute rejection rates over the most recent era. *Am.J.Transplant.* 4: 378-383 (2004)
89. Morgan J. A.: The influence for cortisone on the survival of homografts of skin in the rabbit. *Surgery* 30: 506-515 (1951)
90. Moser M. and Murphy, K. M.: Dendritic cell regulation of TH1-TH2 development. *Nat.Immunol.* 1: 199-205 (2000)
91. Mwintshi K. and Brennan, D. C.: Prevention and management of cytomegalovirus infection in solid-organ transplantation. *Expert.Rev.Anti.Infect.Ther.* 5: 295-304 (2007)
92. Neyts J., Andrei, G. and De, C. E.: The novel immunosuppressive agent mycophenolate mofetil markedly potentiates the antiherpesvirus activities of

acyclovir, ganciclovir, and penciclovir in vitro and in vivo. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42: 216-222 (1998)

93. Nowak I. and Shaw, L. M.: Mycophenolic acid binding to human serum albumin: characterization and relation to pharmacodynamics. *Clin.Chem.* 41: 1011-1017 (1995)

94. Oz H. S. and Hughes, W. T.: Novel anti-Pneumocystis carinii effects of the immunosuppressant mycophenolate mofetil in contrast to provocative effects of tacrolimus, sirolimus, and dexamethasone. *J.Infect.Dis.* 175: 901-904 (1997)

95. Quemeneur L., Beloeil, L., Michallet, M. C., Angelov, G., Tomkowiak, M., Revillard, J. P. and Marvel, J.: Restriction of de novo nucleotide biosynthesis interferes with clonal expansion and differentiation into effector and memory CD8 T cells. *J.Immunol.* 173: 4945-4952 (2004)

96. Ramirez C. B., Doria, C., Frank, A. M., Armenti, S. T. and Marino, I. R.: Completely steroid-free immunosuppression in liver transplantation: a randomized study. *Clin.Transplant.* 27: 463-471 (2013)

97. Ravingerova T., Barancik, M. and Strniskova, M.: Mitogen-activated protein kinases: a new therapeutic target in cardiac pathology. *Mol.Cell Biochem.* 247: 127-138 (2003)

98. Reischig T., Prucha, M., Sedlackova, L., Lysak, D., Jindra, P., Bouda, M. and Matejovic, M.: Valganciclovir prophylaxis against cytomegalovirus impairs lymphocyte proliferation and activation in renal transplant recipients. *Antivir.Ther.* 16: 1227-1235 (2011)

99. Robinson M. J. and Cobb, M. H.: Mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr.Opin.Cell Biol.* 9: 180-186 (1997)

100. Romagnani P., Annunziato, F., Piccinni, M. P., Maggi, E. and Romagnani, S.: Th1/Th2 cells, their associated molecules and role in pathophysiology. *Eur.Cytokine Netw.* 11: 510-511 (2000)

101. Rosenberg J. C., Kaplan, M. P. and Lysz, K.: Mechanisms of steroid suppression of immune function: effect of methylprednisolone on lymphocyte activation and proliferation. *Surgery* 88: 193-201 (1980)

102. Rubin R. H.: Cytomegalovirus in solid organ transplantation. *Transpl.Infect.Dis.* 3: 1-5 (2001)

103. Salvadori M., Holzer, H., de, M. A., Sollinger, H., Arns, W., Oppenheimer, F., Maca, J. and Hall, M.: Enteric-coated mycophenolate sodium is therapeutically equivalent to mycophenolate mofetil in de novo renal transplant patients. *Am.J.Transplant.* 4: 231-236 (2004)

104. Sanquer S., Breil, M., Baron, C., Dhamane, D., Astier, A. and Lang, P.: Induction of inosine monophosphate dehydrogenase activity after long-term treatment with mycophenolate mofetil. *Clin.Pharmacol.Ther.* 65: 640-648 (1999)

105. Schaeffer H. J. and Weber, M. J.: Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers. *Mol.Cell Biol.* 19: 2435-2444 (1999)
106. Scherer M. N., Banas, B., Mantouvalou, K., Schnitzbauer, A., Obed, A., Kramer, B. K. and Schlitt, H. J.: Current concepts and perspectives of immunosuppression in organ transplantation. *Langenbecks Arch.Surg.* 392: 511-523 (2007)
107. Schrell C., Cursiefen, C., Kruse, F. and Jacobi, C.: Topical cyclosporine A 0.05% in the treatment of keratoconjunctivitis sicca. *Klin.Monbl.Augenheilkd.* 229: 548-553 (2012)
108. Shaw L. M., Korecka, M., Venkataramanan, R., Goldberg, L., Bloom, R. and Brayman, K. L.: Mycophenolic acid pharmacodynamics and pharmacokinetics provide a basis for rational monitoring strategies. *Am.J.Transplant.* 3: 534-542 (2003)
109. Shaw L. M. and Nowak, I.: Mycophenolic acid: measurement and relationship to pharmacologic effects. *Ther.Drug Monit.* 17: 685-689 (1995)
110. Shevach E. M., McHugh, R. S., Piccirillo, C. A. and Thornton, A. M.: Control of T-cell activation by CD4+ CD25+ suppressor T cells. *Immunol.Rev.* 182: 58-67 (2001)
111. Simms P. E. and Ellis, T. M.: Utility of flow cytometric detection of CD69 expression as a rapid method for determining poly- and oligoclonal lymphocyte activation. *Clin.Diagn.Lab Immunol.* 3: 301-304 (1996)
112. Sindhi R., Allaert, J., Gladding, D., Haaland, P., Koppelman, B., Dunne, J. and Sehgal, S.: Modeling individual variation in biomarker response to combination immunosuppression with stimulated lymphocyte responses-potential clinical implications. *J.Immunol.Methods* 272: 257-272 (2003)
113. Sindhi R., Allaert, J., Gladding, D., Koppelman, B. and Dunne, J. F.: Cytokines and cell surface receptors as target end points of immunosuppression with cyclosporine A. *J.Interferon Cytokine Res.* 21: 507-514 (2001)
114. Singer A., Bosselut, R. and Bhandoola, A.: Signals involved in CD4/CD8 lineage commitment: current concepts and potential mechanisms. *Semin.Immunol.* 11: 273-281 (1999)
115. Sollinger H.: Enteric-coated mycophenolate sodium: therapeutic equivalence to mycophenolate mofetil in de novo renal transplant patients. *Transplant.Proc.* 36: 517-520 (2004)
116. Sommerer C., Muller-Krebs, S., Schaiyer, M., Glander, P., Budde, K., Schwenger, V., Mikus, G. and Zeier, M.: Pharmacokinetic and pharmacodynamic analysis of enteric-coated mycophenolate sodium: limited sampling strategies and clinical outcome in renal transplant patients. *Br.J.Clin.Pharmacol.* 69: 346-357 (2010)

117. Stalder M., Birsan, T., Holm, B., Haririfar, M., Scandling, J. and Morris, R. E.: Quantification of immunosuppression by flow cytometry in stable renal transplant recipients. *Ther.Drug Monit.* 25: 22-27 (2003)
118. Stein C. M., Murray, J. J. and Wood, A. J.: Inhibition of stimulated interleukin-2 production in whole blood: a practical measure of cyclosporine effect. *Clin.Chem.* 45: 1477-1484 (1999)
119. Steiner R. W.: Steroid-free chronic immunosuppression in renal transplantation. *Curr.Opin.Nephrol.Hypertens.* 21: 567-573 (2012)
120. Stordeur P., Zhou, L., Byl, B., Brohet, F., Burny, W., de, G. D., van der Poll, T. and Goldman, M.: Immune monitoring in whole blood using real-time PCR. *J.Immunol.Methods* 276: 69-77 (2003)
121. Tedesco D. and Haragsim, L.: Cyclosporine: a review. *J.Transplant.* 2012: 230386 (2012)
122. Tedesco-Silva H., Bastien, M. C., Choi, L., Felipe, C., Campestrini, J., Picard, F. and Schmouder, R.: Mycophenolic acid metabolite profile in renal transplant patients receiving enteric-coated mycophenolate sodium or mycophenolate mofetil. *Transplant.Proc.* 37: 852-855 (2005)
123. Testi R., D'Ambrosio, D., De, M. R. and Santoni, A.: The CD69 receptor: a multipurpose cell-surface trigger for hematopoietic cells. *Immunol.Today* 15: 479-483 (1994)
124. Thalhamer T., McGrath, M. A. and Harnett, M. M.: MAPKs and their relevance to arthritis and inflammation. *Rheumatology.(Oxford)* 47: 409-414 (2008)
125. Uchiyama T., Yan, X. J., Imanishi, K. and Yagi, J.: Bacterial superantigens--mechanism of T cell activation by the superantigens and their role in the pathogenesis of infectious diseases. *Microbiol.Immunol.* 38: 245-256 (1994)
126. University of Heidelberg: CTS - Collaborative Transplant Study, <http://ctstransplant.org/public/graphics/sample.shtml>. (2013)
127. van Gelder T. and Shaw, L. M.: The rationale for and limitations of therapeutic drug monitoring for mycophenolate mofetil in transplantation. *Transplantation* 80: 244-253 (2005)
128. van Hest R. M.: Population-specific limited sampling strategies for therapeutic drug monitoring of mycophenolic acid. *J.Postgrad.Med.* 52: 244 (2006)
- 129.Vetter, D.: Replikation des humanen Zytomegalievirus unter Immunsuppressiva und Ganciclovir in vitro. Med Dissertation, Universität Ulm (2011)
130. Visco C., Magistrelli, G., Bosotti, R., Perego, R., Rusconi, L., Toma, S., Zamai, M., Acuto, O. and Isacchi, A.: Activation of Zap-70 tyrosine kinase due to a structural rearrangement induced by tyrosine phosphorylation and/or ITAM binding. *Biochemistry* 39: 2784-2791 (2000)

131. Voisard R., Viola, S., Kaspar, V., Weber, C. M., von, M. L., Baur, R., Gastrock-Balitsch, I. and Hombach, V.: Effects of mycophenolate mofetil on key pattern of coronary restenosis: a cascade of in vitro and ex vivo models. *BMC.Cardiovasc.Disord.* 5: 9 (2005)
132. Wucherpfennig K. W. and Sethi, D.: T cell receptor recognition of self and foreign antigens in the induction of autoimmunity. *Semin.Immunol.* 23: 84-91 (2011)
133. Zenner G., Dirk zur, H. J., Burn, P. and Mustelin, T.: Towards unraveling the complexity of T cell signal transduction. *Bioessays* 17: 967-975 (1995)
134. Zeyda M., Kirsch, B. M., Geyeregger, R., Stuhlmeier, K. M., Zlabinger, G. J., Horl, W. H., Saemann, M. D. and Stulnig, T. M.: Inhibition of human dendritic cell maturation and function by the novel immunosuppressant FK778. *Transplantation* 80: 1105-1111 (2005)
135. Zhou F.: Molecular mechanisms of IFN-gamma to up-regulate MHC class I antigen processing and presentation. *Int.Rev.Immunol.* 28: 239-260 (2009)
136. Ziegler S. F., Ramsdell, F. and Alderson, M. R.: The activation antigen CD69. *Stem Cells* 12: 456-465 (1994)
137. Zmonarski S. C., Boratynska, M., Madziarska, K., Klinger, M., Kusztel, M., Patrzalek, D. and Szyber, P.: Mycophenolate mofetil severely depresses antibody response to CMV infection in early posttransplant period. *Transplant.Proc.* 35: 2205-2206 (2003)
138. Zuniga-Pflucker J. C. and Lenardo, M. J.: Regulation of thymocyte development from immature progenitors. *Curr.Opin.Immunol.* 8: 215-224 (1996)

Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt

- Prof. Dr. med. T. Mertens und den Mitarbeitern und ehemaligen Mitarbeitern der Abteilung Virologie der Universität Ulm,
- meinem Betreuer Lutz, der mich nie aufgegeben hat,
- Daniela, ohne die die Arbeit nicht möglich gewesen wäre,
- allen Blutspendern, Medikamentengebern und weiteren Unterstützern,
- und natürlich meinem Mann und meiner Familie.

Lebenslauf

Der Lebenslauf wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt.