

Institut für Virologie der Universität Ulm
Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. med. Thomas Mertens

**Einfluss von Cyclosporin A und Mycophenolsäure
auf die Interferon- γ -Produktion von TH1- Zellen
bei Patienten unter Immunsuppression**

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

vorgelegt von
Denise Dangelmaier
geb. in Heidenheim an der Brenz
2013

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Thomas Wirth

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Thomas Mertens

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Frieder Keller

Tag der Promotion: 16.01.2015

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS **I**

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS **III**

1. EINLEITUNG **1**

1.1 IMMUNSUPPRESSIVA **1**

1.1.1 CYCLOSPORIN A **5**

1.1.2 MYCOPHENOLSÄURE **10**

1.2 IMMUNOLOGISCHE GRUNDLAGEN **18**

1.2.1 T - LYMPHOZYTEN **18**

1.2.2 ZYTOKINE UND AKTIVIERUNGSMARKER **20**

1.2.3 DIE UNTERSUCHUNG DER FRÜHEN T- ZELL-AKTIVIERUNG **24**

1.3 CYTOMEGALIEVIRUS **27**

1.4 DIE PRIMÄRE IGA – NEPHROPATHIE **30**

1.5 THERAPEUTISCHES DRUG MONITORING **38**

1.5.1 THERAPIEMONITORING VON CYCLOSPORIN A **39**

1.5.2 THERAPIEMONITORING DER MYCOPHENOLSÄURE **43**

1.6 ZIELE DER ARBEIT **45**

2. MATERIAL UND METHODIK **46**

2.1 MATERIALIEN **46**

2.1.1 GERÄTE **46**

2.1.2 ANALYSEGERÄTE **46**

2.1.3 ANALYSESOFTWARE **46**

2.1.4 VERBRAUCHSMATERIALIEN **47**

2.1.5 PHARMAKA **47**

2.1.6 MONOKLONALE ANTIKÖRPER **47**

2.1.7 ANTIGEN-STIMULI **48**

2.1.8 PUFFER, LÖSUNGEN UND KULTURMEDIENTEN **48**

2.1.9 FACS-LÖSUNGEN **49**

2.2 METHODEN **50**

2.2.1 DIE FRÜHE LYMPHOZYTENAKTIVIERUNG **50**

2.2.1.1 EARLY ACTIVATION ASSAY **50**

2.2.1.2 ZELLPRÄPARATION IN VORBEREITUNG AUF DIE DURCHFLUSSZYTOMETRIE **52**

2.2.2	PHARMAKODYNAMIK VON CSA UND MMF IN VITRO	55
2.2.2.1	VERDÜNNUNGSREIHE CYCLOSPORIN A	55
2.2.2.2	VERDÜNNUNGSREIHE MYCOPHENOLAT MOFETIL	56
2.2.3	EX VIVO UNTERSUCHUNGEN ZUR PHARMAKODYNAMIK DER MYCOPHENOLSÄURE	57
2.2.3.1	PATIENTEN, STUDIENDESIGN U. THERAPIESCHEMATA DER PK/PD STUDIE	57
2.2.3.2	DIE FRÜHE LYMPHOZYTENAKTIVIERUNG EX VIVO UNTER EINFLUSS VON MPA	60
2.2.4	MEHRKANALDURCHFLUSSZYTOMETRIE	61
2.2.4.1	FACS-ANALYSE DER IN VITRO VORUNTERSUCHUNGEN	65
2.2.4.2	DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE EVALUATION DER IN VITRO UNTERSUCHUNGEN	67
2.2.4.3	FACS-ANALYSE DER EX VIVO UNTERSUCHUNGEN	68
2.2.4.4	DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE EVALUATION DER EX VIVO UNTERSUCHUNGEN	70
2.2.5	ERGÄNZENDE UNTERSUCHUNGEN ZU PK/PD VON MPA	71
2.2.6	BESTIMMUNG DER IC50 DER IMMUNSUPPRESSIVA	72
2.2.7	STATISTISCHE AUSWERTUNG	73
2.2.7.1	GRAPHISCHE DARSTELLUNG DER ERGEBNISSE	73
2.2.7.2	WILCOXON-TEST (NICHTPARAMETRISCHER-TEST)	73
3. ERGEBNISSE		74
3.1 ERGEBNISSE DER IN VITRO UNTERSUCHUNGEN		74
3.1.1	EINFLUSS DES CALCINEURIN-INHIBITORS CYCLOSPORIN A AUF DIE FRÜHE T-ZELL-AKTIVIERUNG IN VITRO	74
3.1.2	EINFLUSS DES DNA-SYNTHESEHEMMERS MYCOPHENOLAT MOFETIL AUF DIE FRÜHE T-ZELL-AKTIVIERUNG IN VITRO	78
3.2 ERGEBNISSE DER EX VIVO UNTERSUCHUNGEN		81
3.2.1	EXEMPLARISCHE DARSTELLUNG CMV – SEROPOSITIVER PATIENTEN	82
3.2.2	CMV - POSITIVES PATIENTENKOLLEKTIV (PATIENTEN 1,5 U.7)	85
3.2.3	CMV - NEGATIVES PATIENTENKOLLEKTIV (PATIENTEN 2,3 U. 6)	90
3.2.4	ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE	95
4. DISKUSSION		97
5. ZUSAMMENFASSUNG		103
6. LITERATURVERZEICHNIS		104
DANKSAGUNG		119
LEBENS LAUF		120

Abkürzungsverzeichnis

ACE	Angiotensin converting enzyme
AcMPAG	Acylglucuronid der Mycophenolsäure
AIM	Activation inducer molecule
AP-1	Activator protein 1
APC	Allophycocyanin
AT1	Angiotensin 1
ATGm	Antithymozytenglobulin
AUC	Area under the curve
AZA	Azathioprin
BFA	Brefeldin A
CFC	Chlorofluorocarbon
CMV	Cytomegalievirus
CNI	Calcineurin-Inhibitor
CO	Kohlenmonoxid
CsA	Cyclosporin A
CTLA4	Cytotoxic T-lymphocyte antigen 4
DHODH	Dihydroorotat-Dehydrogenase
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EA	Early Activation (Frühe Lymphozytenaktivierung)
EC-MPS	Enteric coated-mycophenolate sodium (magensaftresistentes Natrium-Mycophenolat)
EMIT	Enzyme multiplied immunoassay technique
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FITC	Fluorescein-5-isothiocyanat
FSC	Forward scatter
FTY-720	Fingolimod
GDP	Guanosindiphosphat
GIT	Gastrointestinaltrakt
GM-CSF	Granulocyte macrophage-colony stimulating factor
GMP	Guanosinmonophosphat

GTP	Guanosintriphosphat
hep.	heparinisiert
HFF	Humane Vorhautfibroblasten
HGPR	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase
HLA-DR	Human leukocyte antigen-DR (humanes Leukozytenantigen-DR)
HPLC	High performance liquid chromatography (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule 1 (Interzelluläres Adhäsionsmolekül-1)
IFN-γ	Interferon-gamma
IgAN	IgA-Nephropathie
IL-2	Interleukin-2
IMPDH	Inosin 5'-Monophosphat-Dehydrogenase
LAK-Zellen	Lymphokin-aktivierte-Killer-Zellen
LFA-1	Lymphocyte function-associated antigen 1
mAb	Monoclonal antibody (Monoklonaler Antikörper)
MHC	Major Histocompatibility Complex (Haupthistokompatibilitätskomplex)
MMF	Mycophenolat Mofetil
MPA	Mycophenolic acid (Mycophenolsäure)
MPAG	Mycophenolsäure-Glucuronid
MPS	Mycophenolsäure
mRNA	Messenger RNA (Boten-RNA)
MRP2	Multidrug resistance-associated protein 2
NFAT	Nuclear factor of activated T-cells
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
Nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
OKT3	Monoklonaler Antikörper gegen CD3-Rezeptor (Muromonab-CD3)
PBMCs	Peripheral blood mononuclear cells (Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes)
PBS	Phosphate buffered saline

PD	Pharmakodynamik
PE	Phycoerythrin
PFA	Perfluoralkoxylalkan
PHA	Phytohaemagglutinin
PK	Pharmakokinetik
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RNA	Ribonukleinsäure
Rpm	Revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
SEB	Staphylokokken Enterotoxin B
SRL	Sirolimus
SSC	Side scatter
Tab	Tabelle
TCGF	T-cell growth factor
TCR	T-cell-receptor (T-Zell-Rezeptor)
TDM	Therapeutic drug monitoring (Therapeutisches Drug Monitoring)
TGF-β1	Transforming growth factor beta1
TH 1	Typ 1-T-Helferzelle
TH 2	Typ 2-T-Helferzelle
TNF-α	Tumornekrosefaktor-alpha
XMP	Xanthinmonophosphat

1. Einleitung

1.1 Immunsuppressiva

Die Substanzklassen der Immunsuppressiva mit ihren komplexen Wirkmechanismen und vielfältigen Anwendungsmöglichkeiten eröffnen ganz unterschiedlichen Disziplinen der Medizin neue Möglichkeiten der Behandlung. Die Anfänge der Immunsuppression lassen sich bis ins Jahr 1914 zurückdatieren. Damals wie heute begründet eine möglichst optimale Balance zwischen adäquater Immunsuppression und minimaler Toxizität das Fundament des Therapieerfolges [15]. Laut Hong und Kahan repräsentieren sechs Paradigmen die Entwicklung immunsuppressiver Pharmaka auf dem Gebiet der Transplantationsmedizin [75]. Diese ermöglichen eine Klassifikation der Immunsuppressiva, die sich vorrangig an deren Wirkmechanismus orientiert.

Entsprechend dieser Paradigmen wird eine Gruppe etablierter Substanzen zusammengefasst, die in erster Linie in den Mechanismus der Zellproliferation eingreift, weshalb diese auch unter der Bezeichnung Proliferationshemmer bekannt sind. Zu deren bekanntesten Vertretern zählen Azathioprin, Cyclophosphamid und Mycophenolat Mofetil (MMF) [75].

Das Zytokin-Paradigma bezieht sich auf Wirkstoffe die Lymphozytenreifungsprozesse wie z.B. die Synthesehemmung durch die Calcineurin-Inhibitoren Cyclosporin A und Tacrolimus, die Hemmung der Bindung an Oberflächenrezeptoren (anti-CD25 mAbs) oder die Inhibition der Signaltransduktion der Zytokinstimulation (Sirolimus), beeinflussen [75].

Darüberhinaus existieren Konzepte der Depletion (z.B. antilymphozytäre Antikörper, Thymoglobulin, monoklonale OKT3) oder der Modulation des sogenannten Ischämie-Reperfusionsschaden (z.B. der Inhibitor des Lymphozyten-Homings FTY-720) [75].

Die Kostimulationstheorie beschreibt den Wirkmechanismus von Vertretern (CTLA4-Immunglobulin, anti-B7 oder anti-CD40 mAbs), die durch Interaktion mit antigenpräsentierenden Zellen deren Signaltransduktion hemmen.

Im Fokus des sechsten Paradigma steht die Transplantat-Toleranz, als Wirkung von Substanzen die autoimmune Erkennungsprozesse durch antigen-reaktive Zellen verändern, Anergy induzieren (kostimulatorische Inhibitoren) oder eine funktionelle Inaktivität bzw. Zerstörung von antigen-reaktiven Zellen auslösen (z.B. Gentherapie) [75].

Die Wirkung immunsuppressiver Behandlungsschemata kann prinzipiell über unterschiedliche Mechanismen erzielt werden. Neben der Suppression der Anzahl von Effektorzellen (z.B. Lymphozyten) stellen auch der Eingriff in den Lymphozytenstoffwechsel sowie die Hemmung ihrer Signaltransduktionswege Möglichkeiten einer Modulation der immunologischen Kompetenz dar. Aus dieser Eigenschaft der Immunsuppressiva resultieren letztlich drei Effekte. Zum einen die beabsichtigte therapeutische Wirkung z.B. in Form der Vermeidung einer Abstoßungsreaktion, andererseits müssen aber auch unerwünschte Folgen der Immundefizienz, wie Infektionen oder maligne Erkrankungen und nicht zuletzt nicht-immunologisch bedingte toxische Effekte gegenüber anderen Organsystemen, berücksichtigt werden [66].

Mittlerweile beinhalten immunsuppressive Behandlungsprotokolle sehr unterschiedliche Substanzkombinationen, wobei sich in den letzten Jahren unter anderem auf dem Gebiet der Nierentransplantation eine Trendwende zu neuen Therapiestrategien, mit reduziertem Einsatz von Glucocorticoiden und Calcineurin-Inhibitoren, abzeichnet. Die Herausforderung besteht in einer evidenzbasierten Herangehensweise an diese fast schon verwirrende Auswahl von Therapieprotokollen [66]. Zur besseren Übersicht können moderne Immunsuppressiva entsprechend ihrer strukturellen Eigenschaften zwei großen Gruppen zugeordnet werden, wobei zwischen kleinmolekularen Substanzen und proteinbasierten Pharmaka differenziert wird [124]. Zu den Vertretern der kleinmolekularen Substanzen zählen unter anderem Calcineurin-Inhibitoren (CsA, Tacrolimus), Antimetabolite/DNA-Synthesehemmer (MMF, Azathioprin) sowie die Corticosteroide.

Im Mittelpunkt des Interesses dieser Arbeit stehen der etablierte Vertreter der Calcineurin-Inhibitoren Cyclosporin A und der Proliferationshemmer Mycophenolsäure, zwei Repräsentanten der Gruppe der kleinmolekularen Immunsuppressiva. Kleinmolekulare Immunsuppressiva wirken intrazellulär, während die proteinbasierten Substanzen (mono- und polyklonale Antikörper) ihre Wirkung primär über extrazelluläre Interaktionsmechanismen mit der Zielzelle entfalten [124]. Die aktuell etablierten immunsuppressiven Basistherapiekonzepte bestehen vorrangig aus Kombinationen kleinmolekularer Pharmaka, wohingegen der Einsatzbereich der unterschiedlichen Antikörperpräparate hauptsächlich auf dem Gebiet der Induktionstherapie oder in der Behandlung akuter Abstoßungsreaktionen liegt. Heutzutage besteht die optimale Behandlungsstrategie aus einer Kombination von synergistisch wirkenden Substanzen, um so die maximale Effektivität und Praktikabilität, bei möglichst geringer Toxizität einer gleichzeitig kosteneffizienten Therapie des individuellen Patienten, zu erreichen [75].

Tab. 1: Übersicht über kleinmolekulare Immunsuppressiva, deren Wirkspektrum und Nebenwirkungen.

Substanzklasse	Wirkstoffe	Wirkmechanismus	Spezifische Nebenwirkungen (Beispiele)
Calcineurin-Inhibitoren	Cyclosporin A, Tacrolimus	Hemmung der T-Zell-Aktivierung und Proliferation	nephrotoxisch, neurotoxisch, Hypertonie, Hirsutismus, Gingivahyperplasie, Hyperlipidämie, hämolytisch-urämisches Syndrom
DNA-Synthesehemmer	Mycophenolsäure (MPA), Mycophenolat Mofetil (MMF), Cyclophosphamid, Azathioprin	Proliferationshemmung von T- und B-Zellen	gastrointestinale Beschwerden, Leukopenie, Anämie, Knochenmarkstoxizität, Alopezie, Hypertonie
Pyrimidinsynthesehemmer	Leflunomid	Hemmung der Lymphozytenproliferation durch Dihydroorotat-Dehydrogenase (DHODH)-Inhibition, Hemmung der Leukozytenmigration	gastrointestinale Beschwerden, Hepatotoxizität, Leuko-/Thrombopenie, Anämie, Hypertonie
mTor-Inhibitoren	Sirolimus, Everolimus	Hemmung der T-Zell-Proliferation durch Inhibition der Interleukin-2 (IL-2) Signaltransduktion, Hemmung der Antikörperproduktion (Sirolimus)	Thrombozytopenie, Hyperlipidämie, orale Ulzera, Wundheilungsstörungen, Arthralgie, gastrointestinale Beschwerden
Migrationshemmer	FTY-720 (Fingolimod)	Hemmung der T-Zell-Migration, Steigerung des Homings von Lymphozyten	Bradykardie, Lymphopenie
Corticosteroide	Prednison, Prednisolon, Methylprednisolon	Hemmung der T-Zell-Aktivierung u. T-Zell-Proliferation, Transkriptionshemmung von Zytokinen (z.B. Tumornekrosefaktor-alpha, Interleukin-1) Induktion der Apoptose von Leukozyten u. Lymphozyten, Hemmung der Differenzierung von Monozyt zu Makrophage, Hemmung der Phagozytosefähigkeit von Makrophagen	Hypertonie, Magen-/Darmulzera, Osteoporose, Myopathie, Hyperlipidämie, diabetogene Wirkung, Muskelatrophie, erhöhte Thromboseneigung, Katarakt, Glaukom, Dysphorie, Wundheilungsstörung, Cushing-Syndrom

1.1.1 Cyclosporin A

Die Einführung des Calcineurin-Inhibitors Cyclosporin A (CsA) leitete eine neue Ära der Immunsuppression ein [7], und revolutionierte gleichzeitig die Entwicklung der Transplantationsmedizin. Der Wirkstoff ermöglichte erstmalig eine effiziente immunsuppressive Behandlung bei gleichzeitig signifikant verringerten Transplantatabstoßungsreaktionen [173].

Die Substanz Cyclosporin war 1969 aus norwegischen Schlauchpilzen namens „*Tolypocladium inflatum*“ (Gams) der Gattung *Fungi imperfecti* und „*Cylindrocarpon lucidum*“ (Booth) gewonnen worden [84]. Sie stellt ein aus elf Aminosäuren bestehendes zyklisches Peptid dar. Die Entdeckung der Bedeutung als Immunsuppressivum folgte im Jahr 1972 [179]. Damals war die Eigenschaft der Hemmung der T-Zell-Proliferation bei Mäusen von Jean Borel beschrieben worden [23]. Allison und Calne demonstrierten im weiteren Verlauf die immunsuppressive Wirkung beim Menschen. Die offizielle Markteinführung in den USA unter dem Namen Sandimmun® erfolgte im Jahr 1983. CsA verbesserte die Morbidität und Mortalität nach Transplantation [47]. Die Synergie aus zuverlässiger Immunsuppression und ständiger Optimierung chirurgischer Verfahren fungierte als Wegbereiter der Weiterentwicklung der Transplantationsmedizin zu einem Standardverfahren [89, 174].

Der Einsatz der in hohem Maße lipophilen Substanz CsA wird durch deren problematische Absorption und den engen therapeutischen Bereich erschwert, weshalb eine alternative Darreichungsform entwickelt wurde. Diese Mikroemulsion, genannt Neoral®, zeichnet sich durch eine schnellere und vollständigere Absorption sowie eine höhere Bioverfügbarkeit, und nicht zuletzt durch dosis-linearere Spiegel aus [102, 188]. Die beiden Formulierungen sind nicht bioäquivalent [82, 161].

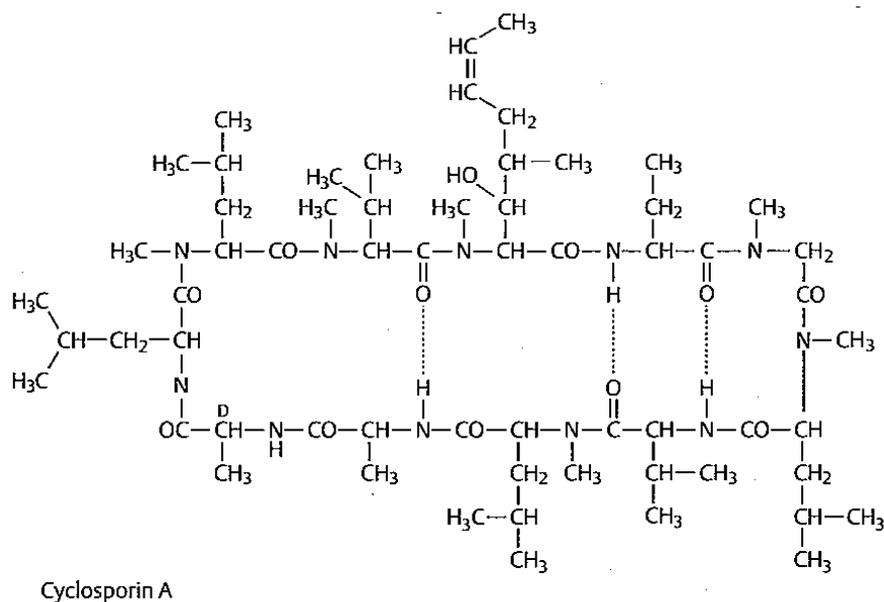


Abb. 1: Strukturformel Cyclosporin A (CsA) Quelle: [108].

CsA zählt heute zu den Standardimmunsuppressiva etablierter Therapieprotokolle nach solider Organtransplantation (Nieren-, Lebertransplantation, Herz- oder Herz- u. Lungentransplantation), und kommt zur Abstoßungsprophylaxe nach Knochenmarkstransplantation zum Einsatz. Darüber hinaus werden Autoimmunerkrankungen wie die rheumatoide Arthritis sowie steroidresistente Formen der Psoriasis mit CsA behandelt. Als weitere Indikationen für den Einsatz des Immunsuppressivums gelten schwere Formen der endogenen Uveitis, z.B. eine Behçet-Uveitis mit Retinabeteiligung, und steroidresistente nephrotische Syndrome glomerulärer Genese [109].

Im Rahmen moderner Behandlungsregime findet CsA mittlerweile Anwendung in Kombination mit Vertretern anderer Klassen von Immunsuppressiva, wie Sirolimus (SRL) oder Mycophenolat Mofetil (MMF). Obwohl CsA die immunsuppressive Therapie im Bereich der Transplantationsmedizin revolutionierte, bezieht sich der Erfolg vor allem auf kurzfristige Effekte dieser Substanz. Laut multizentrisch erhobener Daten resultierte über einen Zeitraum von 8 bis 10 Jahren nach Transplantation keine Verlängerung der durchschnittlichen Lebenszeit von Nierentransplantierten, was größtenteils auf Langzeitfolgen der toxischen Eigenschaften zurückgeführt werden muss [54].

Wirkmechanismus

Die Wirkung von Calcineurin-Inhibitoren wird durch eine Aktivierungshemmung von T-Lymphozyten, über den Zwischenschritt der Hemmung der Transkription von Zytokin-Genen, vermittelt [167]. Durch eine Komplexbildung von CsA mit den intrazellulären Proteinen Cyclophilin und Calmodulin wird der daraus entstehende Calcineurin-Calmodulin-Komplex in seiner Funktion gehemmt [105]. Dieser Mechanismus führt zu einer Blockierung der Transkription wichtiger Gene der Immunfunktion, die für die Expression von z.B. IL-2, IL-3, IL-4, GM-CSF, TNF- α oder IFN- γ verantwortlich sind [170].

Die Proteinphosphatase Calcineurin nimmt eine zentrale Rolle bei der Steuerung der Signaltransduktion über den T-Zell-Rezeptor ein. Ihre Funktion ist Kalzium-abhängig und basiert auf der Kontrolle des Transfers von Transkriptionsfaktoren, den sogenannten „nuclear factor of activated T-cells“ (NFAT), an ihren Bestimmungsort - den Zellkern [79, 170]. In nicht proliferierenden Zellen sind diese Faktoren im Zytoplasma von Zellen des Immunsystems, kardiovaskulären Zellen sowie Nervenzellen lokalisiert. Während der Kalzium-abhängigen Signaltransduktion werden diese Faktoren normalerweise durch Calcineurin, über den Mechanismus der Dephosphorylierung, demaskiert. Daraus resultiert ein schneller Transfer in den Zellkern sowie die Induktion der Transkription von Zytokin-Genen, die an der Steuerung von Proliferationsvorgängen von T-Zellen beteiligt sind [183]. Die Wirkung von CsA löst über die Inhibition der Phosphatase Calcineurin folglich eine Hemmung der zuvor beschriebenen Transkription von Zytokin-Genen aus, und führt zu einer verminderten IL-2 und Interleukin-Rezeptor Freisetzung. Dieser Schritt verursacht eine Blockierung des Überganges aktivierter Lymphozyten von der G0 zur G1 Phase des Zellzykluses [157]. Das erzeugte Defizit an IL-2 bewirkt, dass T-Lymphozyten nicht aktiviert werden können, und bereits aktivierte T-Zellen nicht proliferieren. Neben der Proliferationshemmung von T-Zellen umfasst das Wirkspektrum dieses Immunsuppressivums auch Effekte bezüglich anderer Zielzellmechanismen, wie die Inhibition der Zytokinexpression von T-Zellen. Diese führt wiederum zur Proliferationshemmung von B-Lymphozyten. Darüber hinaus wird die Oberflächenantigen-vermittelte Proliferation von B-Zellen gehemmt.

Auch die Apoptose wird durch CsA in unterschiedlicher Art und Weise, abhängig von der jeweiligen Zielzelle, beeinflusst. Während CsA die Antigen-induzierte Apoptose von T-Lymphozyten inhibiert, ist die Substanz bei B-Lymphozyten in der Lage, deren Apoptose in Folge einer B-Zell-Aktivierung auszulösen [109].

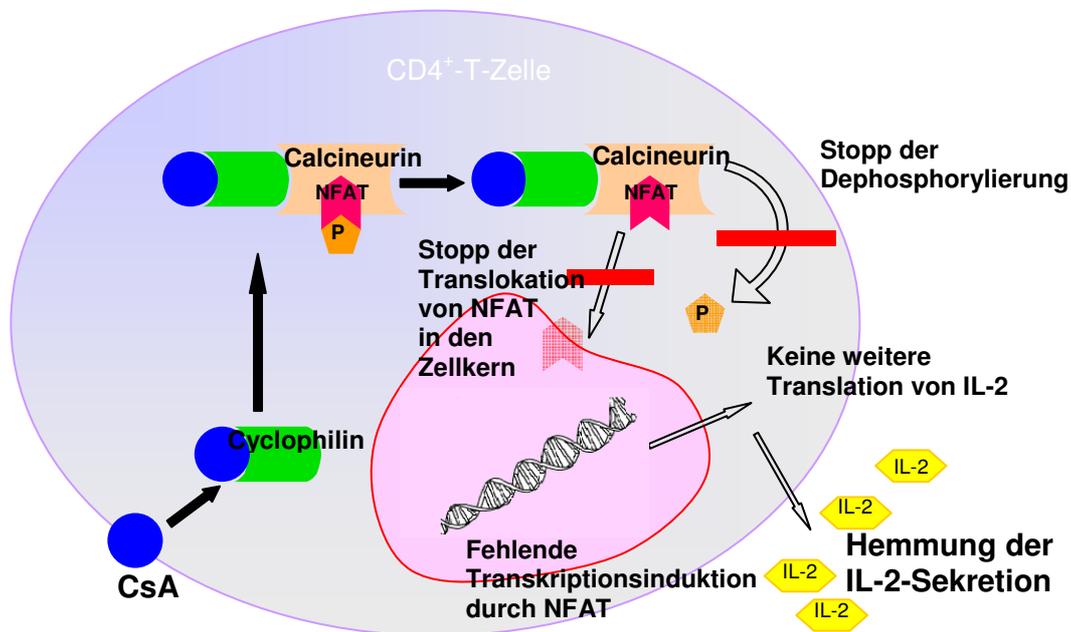


Abb. 2: Schematische Darstellung des Wirkmechanismus von Cyclosporin A (CsA) mit intrazellulären Angriffspunkten (angelehnt an [98]). P: Phosphat-Gruppe. NFAT: Nuclear factor of activated T-cells. IL-2: Interleukin-2.

Metabolismus

Der Metabolisierung von CsA erfolgt hauptsächlich in der Leber über das Cytochrom-P-450 3A4-Enzymsystem. Neben der hepatischen Metabolisierung wird das Pharmakon durch P-Glykoprotein in der Darmmukosa verstoffwechselt [47, 153]. Die Substanz wird primär biliär eliminiert. Nur 3 Prozent werden in Form von Metaboliten renal ausgeschieden [47].

Die Halbwertszeit von CsA beträgt zirka 8 Stunden [153] und zeigt große Schwankungen, zwischen 6,3 Stunden bei gesunden Probanden und 20,4 Stunden bei Patienten mit schweren Lebererkrankungen [98].

Die sehr variable inter- und intraindividuelle Bioverfügbarkeit liegt für die Darreichungsform Sandimmun® zwischen 1 Prozent und 89 Prozent [47]. Für die Mikroemulsion Neoral® wird diese mit 30-60 Prozent angegeben [98]. Auch die Darreichungsform Neoral® weist eine noch beachtliche Variabilität ihrer Absorption auf [83, 153].

Unerwünschte Arzneimittelnebenwirkungen und Interaktionen

Das dosis-abhängige Nebenwirkungsspektrum von CsA ist charakterisiert durch Nephrotoxizität, arterielle Hypertonie oder neurotoxische Effekte. Als etablierter Bestandteil nephrologischer Behandlungskonzepte liegt gleichzeitig eine der gefürchtesten Nebenwirkungen des Immunsuppressivums in dessen Potential der Nephrotoxizität. Diese am häufigsten Dosis-limitierende Nebenwirkung führt bei bis zu 15 Prozent der Transplantierten (Niere, Leber oder Herz) zu einer chronischen Niereninsuffizienz. Obwohl der nephrotoxische Schädigungsmechanismus noch nicht abschliessend geklärt ist, werden eine direkte vasokonstriktive Wirkung von CsA auf die renale Perfusion sowie Veränderungen endogener vasokonstriktiver und vasodilatativer Mechanismen als ursächliche Faktoren postuliert [47].

Als weitere Dosis-assoziierte Nebenwirkungen wurden Leberfunktionsstörungen (insbesondere Cholestase), Hyperkaliämie, Hyperurikämie, Hyperlipidämie, Hirsutismus, Gingivahyperplasie, Glucoseintoleranz und gastrointestinale Symptome beschrieben [47, 66].

Auch über das Auftreten hämolytisch-urämischer Syndrome oder die Inzidenz eines Posttransplantations-Diabetes wurde berichtet [66].

Das Nebenwirkungsspektrum umfasst ebenso grundsätzlich problematische Aspekte der Immunsuppression, wie eine gesteigerte Infektanfälligkeit und ein erhöhtes Risiko der Entwicklung von Neoplasien [190].

Die Wechselwirkungen mit entsprechender Komedikation umfassen eine Bandbreite ursächlicher Mechanismen. Die Hauptproblematik liegt in der Metabolisierung über das Cytochrom-P450 3A4-Isoenzym der Leber, einem Stoffwechselweg den sich CsA mit diversen anderen Pharmaka teilt. Während die Kombination mit einigen Substanzen (z.B. Erythromycin, Ketokonazole, Phenytoin, Phenobarbital) eine Spiegelveränderung von CsA über die kompetitive Hemmung oder Induktion von Leberenzymen hervorruft, interagieren andere Substanzen über Stoffwechselwege wie die Absorption oder Bindung von P-Glykoprotein. Darüberhinaus verstärken bestimmte Wirkstoffe, wie z.B. Aminoglykoside, die CsA- eigene Nephrotoxizität [47].

1.1.2 Mycophenolsäure

Die Mycophenolsäure (MPA/MPS) in ihren Darreichungsformen Mycophenolat Mofetil (MMF) und magensaftresistentes Natrium-Mycophenolat (EC-MPS) gilt auf dem Gebiet der Transplantationsmedizin als immunsuppressiver Antimetabolit der Wahl [172]. Ursprünglich war die Substanz als Produkt Penicillin-bildender Schimmelpilze durch Gosio im ausgehenden 19. Jahrhundert aus Maispflanzen isoliert, und 1913 von Alsberg und Black in gereinigter Form gewonnen worden. Die Mycophenolsäure hatte zunächst in den vierziger Jahren aufgrund ihrer antibakteriellen und fungiziden Wirkung Aufsehen erregt [61]. Über eine antineoplastische Eigenschaft war erst 1968 berichtet worden [61, 191]. Im darauffolgenden Jahr hatten die Japaner Mitsui und Suzuki die immunsuppressiven Effekte von Mycophenolat beschrieben [120]. Franklin identifizierte schliesslich 1969 die zentrale Wirkung der Hemmung der Inosin 5'-Monophosphat-Dehydrogenase (IMPDH), eines an der Purinbiosynthese beteiligten Schlüsselenzyms [51].

Die Markteinführung als Immunsuppressivum erfolgte erst zwanzig Jahre später. MMF erwies sich als potenter Wirkstoff in der Prophylaxe und Behandlung von Abstossungsreaktionen auf dem Gebiet der Nierentransplantation, mit dem zusätzlichen Vorteil eines günstigen Nebenwirkungsprofils [1, 134]. Drei Jahre später erhielt das Pharmakon auch die Zulassung zur Abstoßungsprophylaxe nach Herztransplantation [61]. Seit seiner Einführung ist Mycophenolat Mofetil weltweit zu einem Meilenstein der immunsuppressiven Therapie geworden, und wird heutzutage vorrangig als Bestandteil von Erhaltungstherapieregimen nach soliden Organtransplantationen [42], sowie in der Behandlung autoimmuner Erkrankungen, eingesetzt [55]. Vorrangig findet der Wirkstoff in Kombination mit CsA und Steroiden in der Transplantationsmedizin Anwendung, und wird in fixen Dosen verabreicht [15].

Mycophenolat Mofetil (MMF) stellt ein Prodrug der Mycophenolsäure, eines Gärungsproduktes verschiedener Pilzarten der Gattung *Penicillium*, dar. Die Mycophenolsäure selbst ist ein aktiver Metabolit, der aus dem 2,4-Morpholinoethylester Mycophenolat Mofetil (MMF), in vivo durch Hydrolyse über Plasmaesterasen, erzeugt wird [61].

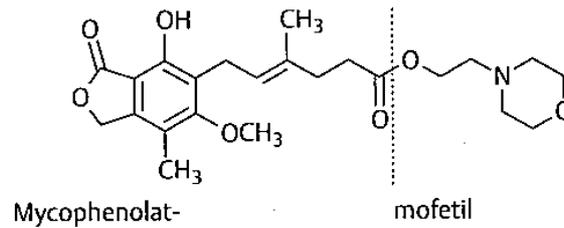


Abb. 3: Strukturformel Mycophenolat (MPA) und Mycophenolat Mofetil (MMF) Quelle: [108].

Die Entwicklung der magensaftresistenten Formulierung EC-MPS unter dem Handelsnamen Myfortic® erfolgte mit der Intention eine verbesserte Variante hinsichtlich der gastrointestinalen Verträglichkeit zu schaffen, indem der aktive Metabolit erst in der alkalischeren Umgebung des Dünndarmes freigesetzt wird [26]. Über die distalere Freisetzung sollte zudem eine bessere Absorption erreicht werden [19]. EC-MPS stellt in seiner chemischen Eigenschaft das Mononatriumsalz der Mycophenolsäure dar [26]. Die beiden Formulierungen gelten als nicht bioäquivalent [178], und zeichnen sich durch unterschiedliche Charakteristika ihrer Pharmakokinetik aus. Das in einzelnen Studien beobachtete bessere klinische Outcome unter EC-MPS ist in erster Linie auf die bessere gastrointestinale Verträglichkeit der magensaftresistenten Form zurückzuführen, die eine Dosisreduktion bzw. Behandlungsabbrüche weniger oft erforderlich machte. Die optimierte Verträglichkeit von EC-MPS könnte zukünftig immunsuppressive Behandlungsstrategien auf diesem Gebiet wesentlich verbessern, und neue Horizonte der Therapie, durch CNI-sparende Therapieprotokolle oder intensivierte EC-MPS Dosis-Regime bei Hochrisikopatienten, eröffnen [35].

Nach neueren Erkenntnissen verfügt MMF über nephroprotektive Eigenschaften, wodurch es im Hinblick auf transplantierte Patienten mit eingeschränkter Nierenfunktion, z.B. in Folge einer Langzeitbehandlung mit Cyclosporin A, zunehmend an Bedeutung als Option in der Erhaltungstherapie gewinnt [155]. Im Rahmen mehrerer multizentrischer Studien wurde die Überlegenheit von Mycophenolat Mofetil gegenüber Azathioprin in der Prophylaxe von Abstossungsreaktionen bei Nierentransplantaten beschrieben [1, 2, 65, 169]. Die

Indikation zur primären Behandlung mit MMF stellt sich unter anderem bei transplantierten Patienten, in deren Fall sich der Einsatz von Calcineurin-Inhibitoren wie Cyclosporin A auf Grund von Kontraindikationen, wie drohender medikamentöser Interaktionen oder unter Berücksichtigung bestehender Komorbiditäten, verbietet [61].

Wirkmechanismus

Die Wirkung der Mycophenolsäure basiert auf einer selektiven und nichtkompetitiven Hemmung der sogenannten Inosin 5'-Monophosphat-Dehydrogenase (IMPDH), einem Schlüsselenzym der de novo Purinbiosynthese [6, 25, 63]. Die de novo Purinsynthese wiederum nimmt eine zentrale Rolle bezüglich des Metabolismus, der Differenzierung und Replikation von Lymphozyten ein. Die IMPDH wird von T- und B-Lymphozyten gebildet und während der Phase der Zellaktivierung gesteigert exprimiert [141].

Es existieren zwei bekannte Isoformen der IMPDH, Typ I und Typ II. Während Typ I vornehmlich von aktivierten Lymphozyten exprimiert wird, findet man Typ II bei allen Zellarten. Unter Berücksichtigung der Wirkpotenz beider Isoformen bewirkt die Mycophenolsäure eine 5- bis 10-fach stärkere Hemmung der IMPDH-Typ II aktivierter Lymphozyten [7, 52, 101].

Der Wirkmechanismus untergliedert sich, wie im Folgenden aufgeführt, in mehrere Teilschritte. Die NAD⁺ abhängige Dehydrogenase transferiert IMP (Inosinmonophosphat) zu XMP (Xanthinmonophosphat). In Folge der Hemmung des Enzyms IMPDH erfolgt eine Depletion von dGTP im Rahmen des de novo Purinstoffwechsels. Dies kann im Falle aktivierter bzw. proliferierender Lymphozyten nicht durch den salvage pathway kompensiert werden, und führt somit zur DNA-Synthese-Hemmung und Inhibition der Proliferation von Lymphozyten [6, 61]. Nicht proliferierende Lymphozyten hingegen sind dazu in der Lage ihren metabolischen Bedarf über den salvage pathway allein zu decken [48].

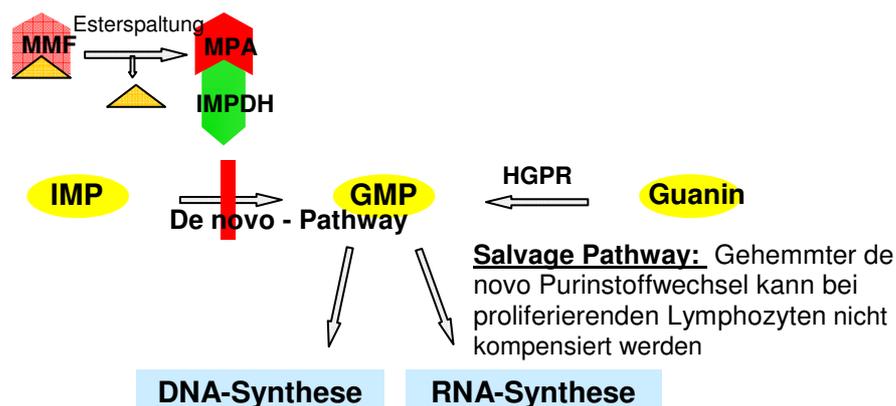


Abb. 4: Schematische Darstellung des Wirkmechanismus von Mycophenolat Mofetil (MMF).

MPA: Mycophenolsäure. IMPDH: Inosin 5'-Monophosphat-Dehydrogenase. IMP: Inosinmonophosphat. GMP: Guanosinmonophosphat. HGPR: Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase.

Als Antwort auf mitogenische oder allospezifische Stimulation hemmt MPA die Proliferation von B-, und T-Zellen [6, 59, 61], und zeichnet sich in dieser Funktion vor allem durch den Vorteil der Selektivität seiner Wirkung auf Lymphozyten aus [61]. Diese Wirksamkeit resultiert aus zwei Charakteristika proliferierender Lymphozyten, zum einen aus der Abhängigkeit des Mechanismus von der de novo Purinsynthese, und zum anderen aus der bevorzugten Expression der Isoform Typ II der IMPDH durch diese Zellen [6].

Darüberhinaus verhindert MPA den Abbau des cyclin-abhängigen Kinase Inhibitors $p27^{kip1}$ [34, 141]. Somit interagiert MPA spezifisch mit cytokin-abhängigen Signalkaskaden, die aktivierte T-Lymphozyten am Übergang von der frühen zur mittleren G1-Phase des Zellzyklus blockieren [7]. Im Gegensatz zum Wirkmechanismus der Calcineurin-Inhibitoren hemmt MPA auf Zytokinebene weder die IL-2 Produktion noch die Expression von IL-2 Rezeptoren. Die Proliferationshemmung erfolgt am Übergang der G1- zur S-Phase des Zellzyklus [77], frühe Stadien der Lymphozytenaktivierung, wie die Zytokinproduktion, werden durch MPA nicht beeinflusst [77, 169, 186].

Die GTP-Depletion hat neben der Inhibition der Nukleinsäuresynthese auch eine Beeinträchtigung der Aktivität von G-Proteinen und deren Funktion bezüglich der Signaltransduktion zur Folge. Dies betrifft die Hemmung der Bildung von GDP-Mannose- und GDP-Fucose-Zwischenstufen, und verhindert konsekutiv deren Einbau in Glykoproteine [61], was wiederum eine verringerte Glykosylierung von

Adhäsionsmolekülen bewirkt [25, 57, 193]. Auch eine insgesamt verminderte Expression von Adhäsionsmolekülen, einschließlich der des intrazellulären Adhäsionsmoleküls-1 (ICAM-1) sowie des Lymphozyten-Antigens-1 (LFA-1) konnte im Rahmen einiger Untersuchungen unter Einfluss von MPA beobachtet werden [46, 175]. Die daraus resultierende Migrationshemmung erklärt die verringerte Kapazität von Makrophagen und Lymphozyten in entzündlich veränderte Gewebe einzuwandern [6, 162]. Unter Einfluss von MPA bilden menschliche Makrophagen als Ausdruck der antiinflammatorischen Wirkkomponente liposomale Hydrolasen, Liposome und den IL-1 Rezeptorantagonist IL-1ra [92].

Eine Eigenschaft die die Substanz insbesondere für die Behandlung chronischer Glomerulonephritiden prädestiniert, besteht in der Hemmung der Produktion extrazellulärer Matrix-Bestandteile durch Mesangiumszellen, sowie in einer verminderten Produktion von Fibronektin und Kollagen Typ 1 [46]. Die Kombination aus antiproliferativer Wirkung auf Mesangiumszellen [70] und Expressionshemmung von Adhäsionsmolekülen durch Lymphozyten sowie Endothelzellen [116] unterdrückt die Invasion von Makrophagen und Entzündungszellen im Rahmen der Entwicklung von Glomerulonephritiden [175].

Laut Nakamura et al. ist MPA auch in der Lage die Apoptose aktivierter T-Lymphozyten auszulösen [129], um potentiell autoreaktive Zellen zu zerstören.

Im Vergleich zu anderen Immunsuppressiva ist die Mycophenolsäure ein sehr potenter Inhibitor der Antikörperproduktion durch B-Zellen [92, 134].

Aufgrund der antiproliferativen Eigenschaften wird der Einsatz von MPA auch auf dem Gebiet der Prophylaxe koronarer Re-Stenosierungsprozesse [184] und als antineoplastische Substanz diskutiert [186]. Darüber hinaus wurde der Substanz eine additive Wirkung in Kombination mit antiviralen Pharmaka zugesprochen [186]. Zusammenfassend verfügt die Mycophenolsäure über ein breit gefächertes Wirkspektrum, das neben der antiproliferativen Hauptkomponente auch inhibitorische Effekte auf den Mechanismus des Monozyten-Rekrutments, die Differenzierung dendritischer Zellen, die Antigenpräsentation, die Expression kostimulatorischer Moleküle sowie die NO-Produktion und Zytokinexpression umfasst [7].

Metabolismus

Mycophenolat Mofetil (MMF), die inaktive Vorstufe von MPA und der magensaft-resistenten Form EC-MPS, wird über den Gastrointestinaltrakt aufgenommen und präsystemisch hydrolysiert, wodurch eine Bioverfügbarkeit von MPA von über 90 Prozent resultiert [10, 28, 94]. MPA wird in der Leber, dem Magen-Darmtrakt und der Niere durch die Uridin Diphosphat-Glucuronsyl Transferasen (UGTs) metabolisiert. Die vollständige Umwandlung von MMF in den aktiven Metaboliten MPA erfolgt im Bereich der Mucosa des Dünndarmes und während der Leberpassage [172].

In der Leber wird MPA durch die Uridin Diphosphat-Glucuronsyl Transferase in einen Hauptmetabolit, das sogenannte 7-O-MPA-Glucuronid (MPAG), das eine 20- bis 100-fach höhere Plasmakonzentration als MPA aufweist, verstoffwechselt [172]. MPAG ist nur ein schwacher IMPDH Inhibitor und pharmakologisch inaktiv [61]. Zusätzlich entstehen während der Metabolisierung in deutlich geringerem Ausmass mindestens drei weitere Metabolite, als aktiver Metabolit ein Acylglucuronid (AcMPAG) und darüberhinaus ein 7-O-Glucosid [28, 94].

Bis zu 87 Prozent von MPA werden als MPAG renal eliminiert, und weitere 6 Prozent über den Darm ausgeschieden [52, 61]. Der durch das „multidrug-resistance protein 2“ (MRP-2) über die Galle eliminierte Anteil von MPAG wird durch Bakterien der Darmflora zu MPA deglucuronidiert und im Dickdarm rückresorbiert [172]. Dieser Mechanismus des enterohepatischen Kreislaufes bewirkt einen erneuten Anstieg der MPA-Plasmakonzentration 6 bis 12 Stunden sowie 24 Stunden nach Einnahme von Mycophenolat [52, 164]. Der enterohepatische Kreislauf von MPA und MPAG kann zwischen 40 und 60 Prozent zur AUC MPA beitragen [28, 172].

Die beiden Formulierungen zeigen eine lineare Pharmakokinetik, bei MMF wird der Spitzenspiegel normalerweise 1-2 Stunden nach Einnahme erreicht. Die mittlere Halbwertszeit von MPA beträgt zwischen 9 und 17 Stunden [172]. Entsprechend der Literaturangaben konnte für MMF eine Bioverfügbarkeit von über 90 Prozent beobachtet werden [10, 28, 94]. Gemäß der Herstellerangaben beträgt die absolute Bioverfügbarkeit von MPA, bei stabilen Nierentransplantierten nach oraler Gabe von EC-MPS, zirka 72 Prozent [172].

Beinahe 99 Prozent von MPA und zirka 82 Prozent von MPAG liegen proteingebunden vor [28]. In Vollblut sind in vivo über 99 Prozent von MPA im Plasma an Albumin gebunden. Diese Eigenschaft prädestiniert Plasma oder Serum als Medien der Wahl zur Analyse der MPA-Konzentration [61, 135]. Laut Nowak et al. verfügt nur der freie, nicht proteingebundene Anteil von MPA über das Potential zur Hemmung der IMPDH in vitro. Folglich basiert die immunsuppressive Wirkung in erster Linie auf dem freien Anteil von MPA [9].

Unerwünschte Arzneimittelnebenwirkungen und Interaktionen

Der Wirkstoff zeichnet sich unter Berücksichtigung der Charakteristika anderer etablierter Immunsuppressiva durch eine gute Verträglichkeit aus [33]. Gastrointestinale, hämatologische und infektiöse Nebenwirkungen werden vorrangig mit dem Einsatz von MPA assoziiert [172]. Grundsätzlich sind die unerwünschten Arzneimittelnebenwirkungen der Mycophenolsäure dosisabhängig [52], und zeigen sich nach Dosisreduktion reversibel [56]. Am häufigsten treten bei bis zu 40 Prozent der Patienten gastrointestinale Beschwerden wie Diarrhö, Übelkeit und Erbrechen auf [52, 66, 74, 168].

Auch die gastrointestinale Toxizität von MPA scheint dosisabhängig. Die Ätiologie der gastrointestinalen Nebenwirkungen ist noch nicht vollständig geklärt [16], sie ist jedoch am ehesten auf die antiproliferative Wirkung von MPA auf Enterozyten zurückzuführen [186]. Hinsichtlich dieser Problematik sollte die magensaftresistente Form EC-MPS die Verträglichkeit der Substanz optimieren. Obwohl EC-MPS in Einzelfällen eine bessere Verträglichkeit zeigte, liess sich insgesamt im Rahmen mehrerer Studien kein signifikanter Unterschied bezüglich der gastrointestinalen Toxizität beider Darreichungsformen nachweisen [10, 36, 176]. Da jedoch zumindest bei einigen Patienten eine bessere Verträglichkeit beobachtet werden konnte, könnte dadurch eine Dosisreduktion vermieden und das klinische Outcome verbessert werden [64].

Neben den gastrointestinalen Beschwerden stellen die Entwicklung einer arteriellen Hypertonie, Blutbildveränderungen wie Anämie und Leukopenie, sowie ein gesteigertes Infektionsrisiko bis hin zur Sepsis, unerwünschte Folgen einer Therapie mit MPA dar [52, 61, 66]. Der Aspekt der Myelotoxizität ist im Falle dieses Immunsuppressivums noch nicht hinreichend geklärt, da MPA seinem Wirkmechanismus entsprechend und der Selektivität der Hemmung der de novo

Nukleinsäuresynthese folgend, in erster Linie auf proliferierende Lymphozyten wirkt [61]. Im Vergleich zu einem weiteren Vertreter dieser Wirkstoffklasse – Azathioprin – wurden deutlich seltener Fälle von Knochenmarkstoxizität, Leberschäden und Mutagenität unter MPA beschrieben [92].

Der kombinierte Einsatz mit anderen Immunsuppressiva birgt das Potential von Interaktionen und beeinflusst die Pharmakokinetik von MPA. Die häufig eingesetzte Kombination von MMF mit CsA kann z.B. zu einem verminderten MPA-Spiegel, bei gleichzeitigem Anstieg der MPAG-Plasmakonzentration, führen [9]. Mögliche Interaktionen mit nicht immunsuppressiver Komedikation müssen bei simultaner Anwendung von MPA in Kombination mit Phosphatbindern, Anionenaustauschharzen (Cholestyramin), Metallionen, Rifampicin, Antazida, Virostatika (Ganciclovir, Aciclovir), oder bei Kombinationen mit Antibiotika wie z.B. Norfloxacin oder Metronidazol, berücksichtigt werden [172]. Aus einer kombinierten Anwendung mit diesen Pharmaka kann insbesondere eine Beeinflussung der MPA-Absorption, des enterohepatischen Kreislaufes und folglich der Plasmakonzentration von MPA resultieren [28, 172].

1.2 Immunologische Grundlagen

1.2.1 T - Lymphozyten

Als Teil des menschlichen Immunsystems repräsentieren T-Lymphozyten auf zellulärer Ebene eine der wichtigsten Komponenten der antigenabhängigen, adaptiven Abwehr. In dieser Funktion üben sie komplexe Abwehrmechanismen des menschlichen Organismus gegen exogene Krankheitserreger und pathologische Autoimmunprozesse aus. Sie leiten sich von pluripotenten Stammzellen des Knochenmarks ab, ihre Bezeichnung geht jedoch auf ihren Reifungsort, den Thymus, zurück [125]. Als Effektorzellen der immunologischen Antwort spielen T-Lymphozyten sowohl in der Vermittlung der zellulären als auch der humoralen Immunität eine zentrale Rolle. Sie übernehmen unter anderem die Aufgabe der Erkennung von Tumorzellen oder virusinfizierter Zellen [121].

Die Detektion veränderter Zellen erfolgt über einen in der Zytoplasmembran verankerten sogenannten T-Zell-Rezeptor (TCR: „T-cell-receptor“). Der T-Zell-Rezeptor stellt ein aus zwei Polypeptidketten (α/β -Kette oder γ/δ -Kette) bestehendes transmembranöses Heterodimer dar [121]. Die Mehrzahl dieser Rezeptoren ist jeweils aus einer α - und β -Kette aufgebaut, während ein kleiner Anteil, der sich vornehmlich aus CD4⁺-T-Zellen zusammensetzt, eine γ/δ Kombination trägt. Die Funktion dieser T-Zell-Subpopulation ist noch nicht hinreichend geklärt [71]. Der T-Zell-Rezeptor erkennt bereits prozessierte Antigene in Verbindung mit dem passenden Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC: „Major Histocompatibility Complex“), diese Eigenschaft wird auch als MHC-Restriktion bezeichnet [43]. Die Besonderheit des T-Zell-Rezeptors liegt in seiner Eigenschaft keiner somatischen Mutation zu unterliegen, so dass während seiner Aktivierung, Differenzierung oder Entwicklung anders als bei Antikörpern kein Klassenwechsel stattfindet [126]. Die Vielfalt der T-Zell-Rezeptoren resultiert aus einer während der Differenzierung stattfindenden unterschiedlichen Kombination von bis zu 100 V-Genabschnitten, mit wenigen D-, J- und C-Segmenten, durch Mechanismen wie die somatische Rekombination [121]. Zusätzlich bilden T-Lymphozyten auf ihrer Oberfläche CD3-Moleküle aus, die mit dem T-Zell-Rezeptor

assoziiert sind. Dieser TcR/CD3-Komplex erkennt Antigene, die durch MHC-Moleküle den Zielzellen präsentiert werden, und initiiert die Aktivierung von T-Zellen.

Neben dem TcR/CD3-Komplex werden die T-Zellen durch ihre Oberflächenproteine CD4 oder CD8 näher charakterisiert, und darüber in zwei Hauptgruppen, die CD4+- und CD8+-T-Zellen, unterteilt. Die CD4+-Zellen, auf die hier näher eingegangen werden soll, werden auch T-Helferzellen genannt. Die Helferzellen übernehmen als spezialisierte Untergruppe die primäre Effektorfunktion der zellulären Abwehr. In diesem Rahmen üben sie vier zentrale Aufgaben aus. Sie helfen antigen-stimulierten B-Lymphozyten zu proliferieren und sich zu antikörper-produzierenden Zellen zu entwickeln, sie erkennen fremde, spezifisch MHC-Klasse II-assoziierte Antigenkomplexe auf B-Zellen, Makrophagen, Monozyten und anderen antigenpräsentierenden Zellen, und sie unterstützen Effektor-T-Zellen bei der zellulär-vermittelten Immunität.

Ihre Aufgaben nehmen CD4+-T-Zellen nach Aktivierung wiederum in Form zweier Untergruppen ihrer Zelllinie wahr, bezüglich derer über die jeweilig unterschiedliche Zytokinexpression TH1- und TH2-Zellen unterschieden werden. Die Antwort der TH1-Zellen auf bestimmte Pathogene basiert auf einer Aktivierung zytotoxischer T-Lymphozyten und/oder der Auslösung einer verzögerten Hypersensitivitäts-Reaktion [158]. TH1-Zellen zeichnen sich durch die Produktion inflammatorischer Zytokine wie IL-2, IFN- γ , IFN- β und Leukotrien A aus, während die Subpopulation der TH2-Zellen durch die Expression der Zytokine IL-3, -4, -5, -6, -10 und IL-13 charakterisiert wird [148, 158]. Die Untergruppe der TH1-Zellen ist hauptsächlich an der Elimination intrazellulärer Pathogene durch Steuerung der zellulären Immunität beteiligt, wohingegen TH2-Zellen dazu beitragen, dass B-Lymphozyten bestimmte Antikörperklassen produzieren (z.B. IgA und IgE) und dadurch extrazelluläre Pathogene beseitigt werden. Im Gegensatz zu TH2-Zellen üben TH1-Zellen eine duale Funktion aus. Zum einen kontrollieren sie bestimmte intrazelluläre bakterielle Erreger indem sie entsprechende Antigene auf der Oberfläche von Makrophagen erkennen, andererseits besteht ihre Funktion als sogenannte „T-Helferzellen“ darin, die Produktion von Antikörpern über kostimulatorische Signale bzw. Interaktion mit B-Zellen hervorzurufen. TH2-Zellen sind dahingegen ausschliesslich dazu bestimmt, die Antikörperproduktion durch

naive B-Zellen zu aktivieren [127]. Die beiden Subpopulationen beeinflussen sich in ihrer Wirkung gegenseitig, so sind z.B. TH2-Zellen in der Lage durch TH1-Zellen hervorgerufene inflammatorische Prozesse zu hemmen [158]. Eine dritte Untergruppe CD4+-T-Zellen, genannt regulatorische T-Zellen (früher „Suppressor-T-Zellen“), dient der Kontrolle und Unterdrückung autoreaktiver CD4+- und CD8+-T-Zellen, und ist an der Wahrung der Selbsttoleranz des Organismus beteiligt [114].

1.2.2 Zytokine und Aktivierungsmarker

Der Mechanismus der T-Zell-Aktivierung beruht nicht nur auf der Interaktion zwischen MHC-gebundenem Peptid, T-Zell-Rezeptor und CD4+- oder CD8+-T-Zellen, vielmehr sind darüberhinaus noch weitere Kostimulatoren involviert, die den Aktivierungsprozess von T-Lymphozyten komplettieren [128]. Eine zentrale Rolle in diesem Prozess spielt eine Gruppe von „Signalstoffen“, die sogenannten Zytokine. Zytokine sind chemische Botenstoffe, die von körpereigenen Zellen gebildet werden. Sie werden von verschiedenen Zellen, vorrangig von antigenspezifischen CD4+-T-Zellen und Makrophagen sezerniert, und beeinflussen sich in ihrer Wirkung und Expression gegenseitig. Es handelt sich um lösliche Proteine, die den Ablauf der Immunreaktion in Form einer Induktion von entzündlichen und immunologischen Prozessen steuern. Entsprechend ihrer strukturellen Eigenschaften lassen sich zwei Hauptgruppen von Zytokinen unterscheiden, die Hämatopoetin-Familie, welche Wachstumshormone und viele Interleukine umfasst, und die TNF-Familie. Beide Gruppen spielen sowohl für die angeborene, als auch für die erworbene Immunität eine wichtige Rolle.

Als Regulatoren des Wachstums und der Differenzierung von Lymphozyten bewirken sie die Aktivierungsphase der spezifischen Immunantwort. Die regulatorische Funktion der T-Lymphozyten erfolgt über die Freisetzung verschiedenster Zytokine, mit aktivierender oder auch hemmender Wirkung. Jede T-Zelle verfügt über ein charakteristisches (Zytokin-) Muster, und kann darüber unterschiedliche Effekte auslösen. Zytokine sind die wichtigsten Effektormoleküle zytotoxischer T-Zellen [128]. Ihre Wirkung wird über Rezeptoren vermittelt, deren

Expression auch durch die Zytokine selbst reguliert wird. Die Reaktion einer Zelle auf die Ausschüttung von Zytokinen hängt wiederum davon ab, ob sie über die entsprechenden Rezeptoren verfügt. Zytokine sind im Stande auf die sie produzierende Zelle (autokrin), auf benachbarte Zellen (parakrin), oder via Blutweg auf weiter entfernte Zellen (endokrin) einzuwirken [128]. Die Bindung von Zytokinen an bestimmte Rezeptoren führt zu Wachstums- und Differenzierungssignalen.

Diese Arbeit befasst sich mit zwei proinflammatorischen Zytokinen, Interleukin-2 (IL-2) und Interferon-gamma (IFN- γ). Die Auswahl dieser Zytokine erklärt sich durch ihre Funktion als Repräsentanten der frühen Lymphozytenaktivierung. Aus der Gruppe der Aktivierungsmarker wurde CD69 ausgewählt, und in seiner Eigenschaft als Marker der sehr frühen T-Zell-Aktivierung betrachtet.

Interferon-gamma (IFN- γ)

Die Interferone werden anhand ihrer biochemischen und serologischen Eigenschaften in zwei Gruppen unterteilt. Die Gruppe Typ-I beinhaltet IFN- α und IFN- β . Das als Immuninterferon bezeichnete IFN- γ ist ein Glykoprotein und zählt zur Gruppe Typ-II. Ihre Wirkung wird durch die Interaktion mit speziellen Interferon-Rezeptoren, die von beinahe allen Zelltypen exprimiert werden, vermittelt. Entsprechend der oben genannten Untergruppen werden auch hier Typ-I und Typ-II Rezeptoren unterschieden. Die Signaltransduktion erfolgt über den Phosphoinositolweg durch die Aktivierung einer Proteinkinase. Nach Antigenkontakt wird IFN- γ hauptsächlich von aktivierten T-Helferzellen und NK-Zellen produziert [93].

Interferon- γ zeichnet sich durch eine rezeptorvermittelte antiproliferative sowie antivirale Wirkung aus. Die antiviralen Effekte beruhen hauptsächlich auf einer Hemmung der Proteinbiosynthese. Als Hauptzytokin CD8+-Effektor-T-Zellen ist es in der Lage neben einer Hemmung der Virusreplikation, Viren aus infizierten Zellen zu entfernen ohne die jeweilige Zelle abzutöten. IFN- γ wird auch von TH1-Zellen exprimiert und fungiert dann als wichtigstes Makrophagen-aktivierendes Zytokin. Darüberhinaus hemmt IFN- γ die Proliferation von B- und T-Zellen. In seiner Funktion als Immunmodulator bewirkt es eine Steigerung der MHC Klasse I und II Expression, wodurch eine Verbesserung der Antigenpräsentation ausgelöst

wird. Das Zytokin fördert die Differenzierung von TH1-Zellen, wohingegen es auf die Bildung von TH2-Zellen inhibitorische Effekte ausübt. Ausserdem steigert es die zytolytische Aktivität von NK-Zellen und aktiviert Phagozyten [93].

Interferone interagieren mit anderen Zytokinen, so wird z.B. durch den Einfluss von IL-2 die IFN- γ -Produktion initiiert. Umgekehrt besteht eine synergistische Wirkung von IFN- γ auf die IL-2-induzierte Immunglobulin-Produktion, im Sinne einer Steigerung des Immunglobulinklassenwechsels zum IgG2, was wiederum eine Verstärkung der Phagozytose zur Folge hat. Die Rolle eines Antagonisten nimmt IFN- γ gegenüber IL-4 ein, indem es die Inhibition der IL-4 vermittelten IgG1-Produktion sowie des Isotyp-„Switching“ zu IgE bewirkt. Die IL-4 induzierte B-Zell-Aktivierung sowie Expression eines FC-Rezeptortyps werden ebenfalls gehemmt. In entzündlich veränderten Geweben induziert IFN- γ bei vaskulären Endothelzellen eine Expression von Adhäsionsmolekülen, daraus resultiert eine Migration von Entzündungszellen in das betroffene Gewebe. Durch die derartige inhibitorische und stimulative gegenseitige Beeinflussung der Mediatoren wird die Realisierung einer gezielten Immunantwort ermöglicht [93].

Interleukin-2 (IL-2)

Der auch unter der Bezeichnung „T-cell growth factor“ (TCGF) bekannte Vertreter der Zytokine nimmt eine Schlüsselrolle in der Steuerung der Proliferation und Differenzierung von T-Zellen ein. In erster Linie von aktivierten naiven T-Zellen gebildet, reguliert es als autokriner Wachstumsfaktor deren zentrale Differenzierungsschritte. Die Expression von IL-2, nach antigenspezifischer Stimulation, erfolgt sowohl durch CD4⁺-T-Zellen, als auch in geringerem Ausmaß durch CD8⁺-T-Zellen [128]. Die Wirkung des Zytokins auf T-Zellen wird über den IL-2-Rezeptor vermittelt. Dieser besteht aus mindestens drei Untereinheiten, den sogenannten alpha-, beta- und gamma-Ketten [119].

In seiner Funktion als parakriner Wachstumsfaktor beeinflusst das Zytokin durch seine Wirkung zusätzlich Zellen seiner Umgebung, es stimuliert das Wachstum und die zytotoxischen Eigenschaften von NK-Zellen [97], und trägt dadurch zur Entstehung von Lymphokin-aktivierten-Killer-Zellen (LAK-Zellen) bei [22]. Desweiteren initiiert IL-2 die Synthese weiterer Vertreter der Gruppe der Zytokine, beispielsweise von Interferon- γ , durch Einleitung der Transkription dieses Faktors. Ein zusätzlicher Aspekt des Wirkspektrums von IL-2 betrifft die Beeinflussung von

B-Zellen im Sinne eines Wachstumsfaktors, indem es zu einer Steigerung der Antikörperproduktion führt [22].

Die Synthese dieses Interleukins erreicht ihren Höhepunkt bereits vier Stunden nach erfolgter Aktivierung und hält nur über einen kurzen Zeitraum (mehrere Stunden nach Aktivierung) an [112]. Die produzierte Menge an IL-2 bestimmt das Ausmaß der nachfolgenden Immunantwort, und repräsentiert somit einen quantitativen Marker der Zielzellantwort.

Der Aktivierungsmarker CD69

Als eine der ersten Reaktionen auf eine Antigenstimulation exprimieren T- und B-Zellen sowie natürliche Killerzellen den Aktivierungsmarker CD69 [32, 97]. Der Marker ist ein homodimeres phosphoryliertes Oberflächenprotein [107]. Entsprechend seiner Funktion und des Zeitpunktes seiner Expression ist CD69 auch unter den Synonymen „activation inducer molecule“ (AIM) [32], „early activation antigen“ (EA-1) [130], „Leu-23“ [97] oder „MLR-3 Antigen“ bekannt [152]. Es wird angenommen, dass die Ausschüttung von CD69 eine zentrale Rolle im Rahmen der Aktivierung der T-Zellen spielt [177]. Charakteristischerweise wird CD69 von antigen- oder mitogen-stimulierten Lymphozyten exprimiert, während dieser Marker auf der Plasmamembran von ruhenden PBMCs nicht nachweisbar ist [112]. Der Zeitpunkt der maximalen Expression von CD69 wird 8 Stunden nach Stimulation erreicht. Die Expressionskinetik folgt dem Muster eines schnellen und kurzfristigen Anstieges, mit einem linearen Verlauf innerhalb der ersten 6 Stunden [111], gefolgt von einer ebenso raschen Abnahme der Expression [97, 107, 111].

1.2.3 Die Untersuchung der frühen T- Zell-Aktivierung

Unter Berücksichtigung des Aktivierungszustandes und ihrer Zellmorphologie lassen sich T-Lymphozyten in naive oder aktivierte T-Zellen, sowie in aktivierte T-Effektor- und Gedächtniszellen („Memory Cells“) unterteilen. Das Verfahren der im Weiteren gezeigten Untersuchungen konzentriert sich auf die Phase der frühen Aktivierung CD4+-Zellen (TH1-Zellen). Die Methode verfolgt die Bestimmung der immunsuppressiven Aktivität durch die Quantifizierung der Frequenz CD4+-Zellen, über die Expression von CD69 und intrazellulären Zytokinen, mithilfe der durchflusszytometrischen Analyse. Diese Form der Lymphozytenfunktionsuntersuchung bietet die Möglichkeit die biologische Wirkung eines Pharmakons ex vivo zu erfassen, und durch pharmakokinetische Daten zeitgleich entnommener Proben zu ergänzen. Dadurch soll ein möglichst umfassendes Bild der Immunsuppression generiert werden. Im Vergleich zu biochemischen Drug Monitoring Verfahren können funktionelle Ergebnisse über die pharmakodynamische Wirkung des Immunsuppressivums erhoben werden.

Somit besteht die Intention dieses Ansatzes in einer zuverlässigeren Einschätzung des individuellen Ansprechens auf verschiedene Pharmaka. Dies repräsentiert einen wichtigen Schritt auf dem Weg zu einer immunsuppressiven Therapie, in deren Rahmen Auswahl und Dosierung der Medikamente optimiert und auf das Individuum abgestimmt werden können.

Da die durchflusszytometrische Evaluation der frühen T-Zell-Aktivierung eine multiparametrische Untersuchung erlaubt, lassen sich verschiedene Lymphozytensubsets (z.B. CD4+/-CD8+-T-Zellen) und einzelne spezifische T-Zellen gleichzeitig anhand einer Probe untersuchen. Folglich stellt diese Methode eine wenig zeitaufwendige Analyse antigenspezifischer T-Zell-Antworten dar.

Während durch eine Antigenstimulation über den T-Zell-Rezeptor allein nur Effektor- oder Gedächtniszellen aktiviert werden können, benötigt die Aktivierung naiver T-Zellen bestimmte kostimulatorische Signale. Für diese Untersuchungen diente als Kostimulans eines der wichtigsten Moleküle zur Aktivierung von naiven T-Zellen - das Glykoprotein CD28. Dieses fördert die IL-2 Sekretion nach Aktivierung und verhindert gleichzeitig eine Apoptose der T-Zelle während der Aktivierungsphase [73].

Im Rahmen der Versuchsordnung des Early Activation Assay wurde zusätzlich, wie unter 2.2.1.1 beschrieben, eine Antigenstimulation der T-Lymphozyten durchgeführt. Hierfür kamen das zelluläre Antigen HFF (HFF-Negativkontrolle), das Superantigen Staphylokokken Enterotoxin B (SEB), sowie CMV-Antigen zum Einsatz. SEB als Vertreter bakterieller Superantigene wird in seiner Wirkung durch eine Bindung an die β -Kette des T-Zell-Rezeptors charakterisiert, die entfernt von der komplementaritätsbestimmenden- und von der peptidbindenden Region des MHC-II-Moleküls erfolgt. Somit ruft SEB eine T-Zell-Rezeptor unabhängige Aktivierung hervor. Die weite Verbreitung solcher Bindungssequenzen ermöglicht die Stimulation ganzer T-Zell-Subsets. Diese Eigenschaft prädestiniert SEB zum Einsatz als sogenannte „Positivkontrolle“ für Lymphozytenfunktionsuntersuchungen. Im Gegensatz zu SEB wurde durch CMV-Antigen die T-Zell-Rezeptor-abhängige Lymphozytenaktivierung ausgelöst. Der Einsatz dieses Antigens als stimulierendes Agens zur Durchführung der frühen Lymphozytenaktivierung erklärt sich zudem durch die hohe Frequenz CMV spezifischer Gedächtniszellen bei CMV-Seropositiven (ca. 1 Prozent aller CD4+-T-Zellen). Dadurch eignet sich die Erfassung CMV-reaktiver Zellen zur Untersuchung des Einflusses von Medikamentenspiegeln auf die quantitative T-Zell-Funktion sehr gut.

Die Expression von CD69 als früher Aktivierungsmarker zeigt ihren Höhepunkt nach 8 Stunden. Auch das Maximum der Produktion von IL-2 und IFN- γ wird zeitnah, wenige Stunden nach Aktivierung, erreicht [112]. Während klassische Lymphozytenproliferations-Assays, wie zum z.B. der H^3 -Thymidin Proliferationstest, eine Langzeitkultivierung der Zellen erfordern und nur späte Stadien der Aktivierung erfassen [15], wurde der im Rahmen dieser Arbeit angewandte Lymphozytenfunktionstest (Early Activation Assay) innerhalb von 5 Stunden an Vollblut-Proben durchgeführt.

Das Medium der Wahl für die gängigen pharmakodynamischen Monitoring-Verfahren auf dem Gebiet der Immunsuppressiva ist laut Gummert et al. Vollblut. Dies basiert auf der Erkenntnis, dass Untersuchungen an Zellkulturen oder isolierten Lymphozyten die Wirkung der Immunsuppressiva in vivo nicht vollständig und realitätsgetreu abbilden [62], da sich Zellkulturen von

menschlichen Zellen grundsätzlich unterscheiden, und die Isolation von Zellreihen einen Verlust bestimmter Zellpopulationen und Zellinteraktionen zur Folge haben kann [41]. Zusammenfassend prädestiniert sich die Methode der frühen T-Zell-Aktivierung als Monitoring-Verfahren, durch die Eigenschaft einer schnellen Kinetik und zeitlich begrenzten Expression der Aktivierungsmarker (CD69) und Zytokine (IFN- γ , IL-2), wodurch eine direkte Erfassung der Zielzellantwort auf einen experimentellen Stimulus ermöglicht wird [112].

Lymphozytenfunktionsuntersuchungen

Quantifizierung und Erfassung der Zielzellaktivität (Pharmakodynamik) von TH1-Zellen

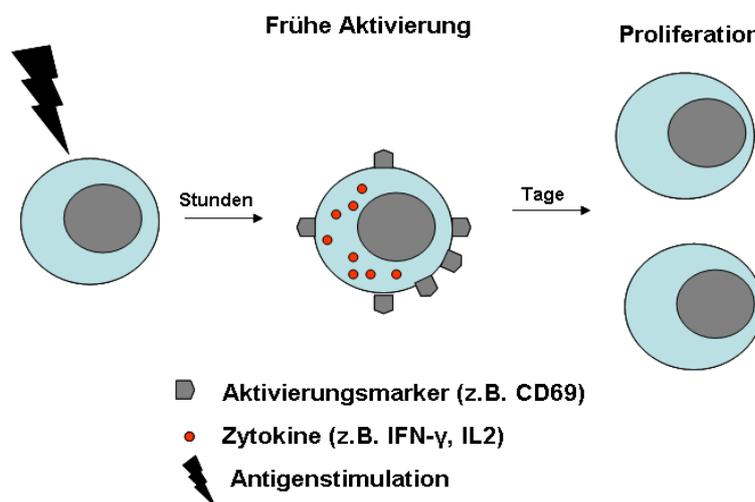


Abb. 5: Schema Funktionsuntersuchungen von Lymphozyten.

TH1-Zellen: Typ 1-T-Helferzellen. IFN- γ : Interferon-gamma. IL2: Interleukin-2.

1.3 Cytomegalievirus

Vor mehr als 90 Jahren hatte der amerikanische Pathologe Dr. Ernest William Goodpasture, entsprechend des histopathologischen Korrelates dieser Virusinfektion, den Begriff „cytomegal“ geprägt [68]. Seine Bezeichnung erhielt das ubiquitär vorkommende Herpesvirus auf Grund der Eigenschaft eine auffallende Vergrößerung der infizierten Zielzellen hervorzurufen, welche mikroskopisch als sogenannte Riesenzellen mit nukleären, eulenaugenartigen Einschlusskörperchen imponieren. Diese bereits im Zusammenhang mit unterschiedlichen Erkrankungen insbesondere bei Kindern entdeckten histopathologischen Veränderungen, wurden von Goodpasture erstmalig als Folge einer Virusinfektion interpretiert [68].

Als häufigster viraler Erreger von Embryo- und Fetopathien durch prä- oder perinatale Infektion erlangte es seine ursprüngliche klinische Bedeutung [122]. Es zählt zur Unterfamilie der Betaherpesvirinae und wird durch ein enges Wirtsspektrum und einen langsamen Replikationszyklus charakterisiert [24, 185]. Heutzutage ist das humanpathogene doppelsträngige DNA-Virus unter den synonymen Bezeichnungen „Humanes Cytomegalievirus“ (HCMV/CMV) oder „Humanes-Herpes-Virus 5“ (HHV 5) bekannt. In Abhängigkeit von Alter und sozioökonomischem Status beträgt die Durchseuchungsrate in Deutschland 40 - 90 Prozent [122].

CMV ist einer der wichtigsten opportunistischen Erreger bei Transplantatempfängern unter Immunsuppression, und als solcher ursächlich für die Entwicklung schwerer CMV-assoziiierter-Erkrankungen mit hoher Letalität [187]. Bei HIV-Patienten und Knochenmarkstransplantierten gilt die interstitielle Cytomegalieviruspneumonie als häufige Todesursache [122]. Die kongenitale Cytomegalievirusinfektion stellt die weltweit häufigste angeborene Virusinfektion dar [68]. Außerdem kommt diesem Virus als Auslöser sekundärer Folgerkrankungen, wie akuten oder chronischen Abstoßungsreaktionen, kardialen Komplikationen, Diabetes und der Entwicklung lymphoproliferativer Erkrankungen, Bedeutung zu [86]. CMV gilt als ein wesentlicher prognostischer Faktor der Transplantatüberlebensdauer [137].

Eine Primärinfektion durch HCMV erzeugt die Bildung von IgM- und IgG-Antikörpern sowie die Induktion zytotoxischer T-Zellen. Während die Antikörper dem Schutz vor einer Neuinfektion und Neutralisation extrazellulärer freier Virionen dienen, kommt der zellulären Immunantwort die Bedeutung der Eliminierung virusinfizierter Zellen zu. Beide Mechanismen sind jedoch nicht in der Lage die Reaktivierung einer latenten Infektion vollständig zu verhindern [122].

Die Primärinfektion verläuft bei Gesunden meist asymptomatisch und führt bei Immunkompetenten nur in seltenen Fällen zu einem Mononukleose-ähnlichen Krankheitsbild. Vielmehr stellt dieses Virus eine allgegenwärtige Gefahr für immunsupprimierte Patienten dar. Entsprechend der Viruslokalisierung zeigen Betroffene neben Fieber und unspezifischen Allgemeinsymptomen als klinische Manifestation Erkrankungen wie Pneumonien, Nephritiden, Enterokolitiden, Hepatitiden, Chorioretinitiden oder gelegentlich auch das Bild einer Enzephalitis [122, 137]. Im Gegensatz zu früher führt eine CMV-Infektion bei Nierentransplantierten mittlerweile eher zu schleichenden, später nach Transplantation einsetzenden, häufig fieberfreien Verläufen mit milderer Allgemeinsymptomatik [137].

Eine weitere wichtige Rolle spielt das Cytomegalievirus, wie oben bereits erwähnt, bei Primärinfektionen von Neugeborenen und Feten. Neben der Übertragung durch Körpersekrete und Blutprodukte stellt die transplazentare Infektion einen weiteren wichtigen Übertragungsweg dar [122]. Die postnatale Erkrankung bleibt im Gegensatz zur Infektion bei Immundefizienten auf Organmanifestationen beschränkt, da die produktiven und cytopathogenen Mechanismen der viralen Genexpression der immunologischen Kontrolle des immunkompetenten Individuums unterliegen, und durch diese begrenzt werden [68]. Eine postnatale Infektion kann zu neurologischen Spätschäden wie geistiger Retardierung, Verkalkungen im Gehirn, Blind- oder Taubheit führen. Pränatale Infektionen verursachen in bis zu zehn Prozent der Fälle die sogenannte „cytomegale Einschlusskörperchenkrankheit“, die Entwicklungsstörungen, Thrombozytopenien, Hepatosplenomegalie und häufig einen letalen Verlauf zur Folge haben kann [122].

Verschiedene Testverfahren zum Nachweis einer CMV-Infektion kommen je nach Indikation zum Einsatz. Die Diagnosestellung der Primärinfektion basiert üblicherweise auf dem serologischen Nachweis von IgM-Antikörpern durch ELISA [122]. Als bewährte Methode zur Bestimmung der Viruslast im Sinne eines quantitativen Nachweisverfahrens gelten PCR-Verfahren an Vollblut oder im Plasma [187]. Während früher Virusisolation und Zellkultur als „Goldstandard“ des CMV-Nachweises galten, sind heute Verfahren wie der Nachweis einer pp65 Antigenämie über Immunfluoreszenz und PCR-Verfahren, insbesondere zur Überwachung einer akuten Infektion bei Risikopatienten, etabliert [185, 187].

Aufgrund seiner Eigenschaft sich der Immunantwort durch multiple Mechanismen zu entziehen, scheint hinsichtlich des Verständnisses der Pathologie von CMV und der Entwicklung entsprechender Therapiestrategien, die Balance zwischen Immunkontrolle und Immunevasion eine zentrale Rolle zu spielen [68]. Zur Behandlung einer HCMV-Infektion stehen als Mittel der ersten Wahl antivirale Substanzen zur Verfügung. Entsprechend der vielfältigen Erscheinungsbilder einer derartigen Virusinfektion existieren unterschiedliche Behandlungsansätze.

Eine prophylaktische Therapie erhalten z.B. herz- oder lungentransplantierte Patienten, mit dem höchsten Risiko eine CMV-assoziierte Erkrankung zu entwickeln. Nach Knochenmarkstransplantation erfolgt eine präemptive Behandlung asymptomatischer Patienten bei Nachweis einer Virämie [156]. Bei AIDS Patienten oder Organtransplantierten stellt sich die Indikation zur antiviralen Therapie zum Zeitpunkt des Auftretens klinischer Symptome. Im Falle einer Virämie nach soliden Organtransplantationen, z.B. im Rahmen einer Reaktivierung, werden diese Substanzen in Kombination mit Hyperimmunglobulinpräparaten verabreicht. Einige Untersuchungen proklamieren eine intrauterine Hyperimmunglobulintherapie als vielversprechende therapeutische Option bei Primärinfektionen in der Frühschwangerschaft oder bei Verdacht auf eine perinatale Infektion [122]. Durch die antivirale Behandlung pränatal infizierter Kinder nach der Geburt konnte eine Prognoseverbesserung bezüglich des Hörverlustes erreicht werden [156]. Ein Impfstoff gegen HCMV existiert bislang nicht [68].

Im Rahmen der antiviralen Therapie kommen Substanzen wie Ganciclovir, Foscarnet, Cidofovir und Fomiviren zum Einsatz. Gemeinsam ist diesen Präparaten die Eigenschaft sehr nebenwirkungsreich zu sein. Eine weitere dominierende Problematik stellt die zunehmende Resistenzentwicklung seitens des HCMV gegenüber den gängigen antiviralen Substanzen dar [156]. Um dieser Tendenz entgegenzuwirken sind verbesserte Verfahren der Routinediagnostik mit dem Ziel des schnelleren und sensitiveren Nachweises einer Therapieresistenz erforderlich. Neuere Pharmaka wie der UL97 Kinaseinhibitor Maribavir, Leflunomide oder das Antimalariamittel Artesunate sind Gegenstand einiger Untersuchungen und gelten, nicht zuletzt in Anbetracht ihrer guten Verträglichkeit, als zukünftige Therapieoptionen um das Problem der Resistenzentwicklung zu beherrschen. Unter Beachtung dieser Aspekte liegt die Zukunft der Behandlung von CMV in einer antiviralen Kombination aus Substanzen unterschiedlicher Wirkmechanismen [156].

1.4 Die primäre IgA – Nephropathie

Die weltweit häufigste Form einer primären Glomerulonephritis [37, 44] wurde erstmalig 1966 von Berger und Hinglais beschrieben [20]. Benannt nach ihrem Erstbeschreiber ist die Erkrankung auch unter der Bezeichnung „Morbus Berger“ bekannt. Charakterisiert wird die IgA-Nephropathie (IgAN) durch das Bild einer isolierten idiopathischen Nephropathie, entsprechend ihrer pathomorphologischen Veränderungen im Mesangium der Niere, im Sinne einer mesangioproliferativen Glomerulonephritis. Sie gehört zum Formenkreis der Autoimmunerkrankungen, gekennzeichnet durch eine inadäquate Immunantwort gefolgt von fortschreitenden Entzündungsprozessen, deren gemeinsame Endstrecke letztlich die Nierenfibrose darstellt [37].

Grundsätzlich tritt die Erkrankung in allen Altersklassen auf. Die häufigste Inzidenz findet sich jedoch in der zweiten und dritten Lebensdekade [40, 78]. Je nach Herkunft sind Männer zwei bis sechsmal häufiger betroffen als Frauen, davon stellen Kaukasier und Asiaten einen grossen Anteil, während die Inzidenz bei Afro-Amerikanern in den USA oder Südafrika wesentlich geringer ist [44, 80]. Die IgAN

tritt meist sporadisch auf, darüber hinaus wurden auch prädisponierende immunogenetische Faktoren beschrieben. In zirka 10 Prozent der Fälle ist eine familiäre Häufung zu beobachten [76]. Die familiäre Form der Erkrankung ist komplex, es wird angenommen, dass diese durch ein Zusammenspiel aus genetischen Markern und Umweltfaktoren ausgelöst wird [44]. Bei Patienten mit primärer Glomerulonephritis ist die IgAN die häufigste Ursache einer terminalen Niereninsuffizienz [44, 113]. In Europa bilden an IgAN erkrankte Patienten einen Anteil von 7 bis 20 Prozent in Transplantationsprogrammen und Langzeitdialyse-Verfahren [103].

Ätiologie und Pathogenese

Die IgAN ist als Immunkomplex-vermittelte Glomerulonephritis definiert, die immunhistologisch durch IgA-Ablagerungen in Kombination mit verschiedenen histopathologischen Schäden, ohne Auftreten von systemischen Erscheinungen, charakterisiert wird. Neben der IgAN gehört die Purpura Schönlein-Henoch als weiterer IgA-assoziiertes Vertreter zur Gruppe der primären Glomerulonephritiden. Beide Erkrankungen können als Varianten desselben Pathomechanismus angesehen werden. Dieser basiert auf diffusen Ablagerungen von IgA in den Glomerula, teilweise in Kombination mit IgG und IgM. Zusätzlich ergibt sich immunhistologisch häufig der Nachweis des Komplementfaktors C3 [44].

Zwei Isotypen des menschlichen IgA-Moleküls sind bekannt, es wird zwischen IgA1 und IgA2 unterschieden. Beide Untergruppen werden von Plasmazellen des Respirationstraktes und des Gastrointestinaltraktes gebildet, wobei in Knochenmark, Lymphknoten und Milz hauptsächlich IgA1 entsteht [117]. Die glomerulären IgA-Ablagerungen im Falle der IgAN gehören ausschliesslich dem Subtyp IgA1 an [106].

Obwohl die Ätiologie der IgAN noch nicht vollständig geklärt ist existieren zahlreiche Erklärungsmodelle [44]. Diesen gemeinsam ist die Idee einer humoralen Immunreaktion in Form mesangialer Ablagerungen von IgA1 und C3, sowie sekundärer Entzündungsprozesse, die zu einem sukzessiven Fortschreiten der Nierenschädigung führen [53]. Ein Erklärungsansatz besteht in der Assoziation der IgAN mit Erkrankungen des oberen Respirationstraktes als Folge einer Hyperaktivität des mukosalen Immunsystems [17]. Als weitere Ursache wird die

bei einigen Patienten beobachtete vermehrte Produktion von IgA im Knochenmark als Ausgangspunkt der pathologischen Veränderungen angenommen [53, 99]. Da das quantitative Vorkommen des Moleküls an sich jedoch die Entstehung der Erkrankung nicht hinreichend erklärt, scheint vor allem die Abnormalität des IgA-Moleküls selbst eine wichtige Rolle in der Pathogenese zu spielen [5, 118]. Diese Sonderform von IgA wird durch einen Defekt der Galaktosylierung von IgA1 erzeugt. Ein charakteristisches Merkmal des IgA1 Moleküls ist das Vorkommen vieler O-Glykosylierungen im Bereich der Bindungsregion [44]. Darüber hinaus wird postuliert, dass mesangiale Zellen über einen spezifischen Rezeptor für dieses „abnormal“ glykosylierte IgA1 verfügen, und somit die Grundlage für entsprechende Ablagerungen geschaffen wird. Ausserdem zeigten Studien bei IgAN Patienten eine verminderte Aktivität der β 1, 3-Galactosyltransferase in Lymphozyten, welche wiederum ursächlich für die defekte Galactosylierung des IgA1 sein könnte [4]. Der Grund der verminderten Enzymaktivität ist bislang nicht geklärt [44]. Darüberhinaus zeigt sich bei Erkrankten die hepatische Eliminierung des IgA1 vermindert [147].

Haben diese Ablagerungen einmal stattgefunden, stellt sich im weiteren Verlauf eine glomeruläre Entzündungsreaktion ein. Die Expression von Interleukin 6 (IL-6) als ein beispielhafter Vertreter löst folglich die Proliferation von Mesangiumzellen und die Synthese von Makromolekülen der extrazellulären Matrix aus [150]. In diesem Zusammenhang bewirkt auch ein weiterer Promotor des Schädigungsmechanismus, der „transforming growth factor β 1“ (TGF- β 1), in seiner Eigenschaft als Zytokin die Entwicklung der Glomerulosklerose, interstitiellen Fibrose und tubulären Atrophie [60, 192]. Die meisten Therapiestrategien der IgAN setzen an diesen nicht-immunologisch vermittelten Mechanismen des renalen Schädigungsmechanismus an [44].

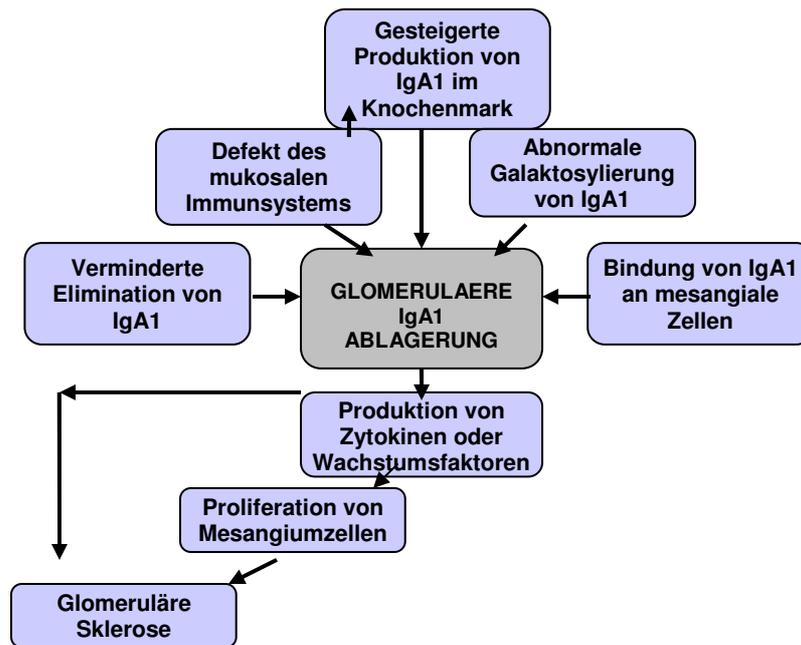


Abb. 6: Schema möglicher Pathomechanismen der glomerulären IgA1 Ablagerung und Progression der Nierenschädigung bei IgA-Nephropathie (angelehnt an [44]).

Charakteristische Befunde die mithilfe des Lichtmikroskopes identifiziert werden können zeigen am häufigsten eine fokale oder diffuse Ausdehnung der mesangialen Region, sowohl in Form von Zellen als auch durch Matrix. Diese können ebenso bei Erkrankungen wie z.B. der diabetischen Nephropathie in Erscheinung treten. Aufgrund der Unspezifität des lichtmikroskopischen Befundes sind zusätzliche Verfahren, wie die Immunfluoreszenz, essentiell für die Diagnosestellung [44].

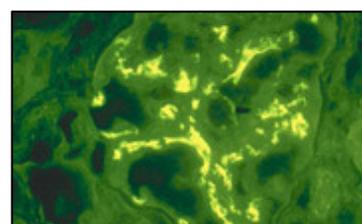


Abb. 7a (links) u. 7b (rechts): Mikroskopischer Nachweis charakteristischer morphologischer Veränderungen der IgA-Nephropathie.

7a: Lichtmikroskopische Darstellung der zunehmenden Expansion der mesangialen Region mit Matrix und Zellen.

7b: Immunfluoreszenzmikroskopie der typischen IgA-Ablagerungen im Bereich der mesangialen Region der Glomeruli.

Die wenigen Fälle einer schnell-progredienten Verlaufsform gehen immunhistologisch mit extrakapillärer Proliferation und/oder segmentalen nekrotischen Läsionen im Bereich der Kapillarschlingen einher [39]. Die definitive Diagnosestellung einer IgAN kann somit nur durch eine Nierenbiopsie mit anschließender immunhistologischer Aufarbeitung erfolgen.

Symptome, Verlauf und Prognose

Nur wenige klinische Symptome können als charakteristisch für diese Erkrankung angesehen werden, meist präsentieren sich die Betroffenen in frühen Krankheitsstadien asymptomatisch. Die Diagnosestellung gestaltet sich daher häufig nicht einfach und erfolgt in vielen Fällen zu spät. Meist werden die Patienten durch eine schmerzlose Makrohämaturie, häufig in Kombination mit einer Proteinurie auffällig [44]. Nicht selten konnte eine zeitliche Assoziation zu Infektionen des Hals-, Nasen-/Rachenraumes [18] oder Gastroenteritiden beobachtet werden. Bei bis zu 20 Prozent der Patienten besteht bei Diagnosestellung bereits eine schwere Azotämie [44], und bis zu weitere 20 Prozent erleiden einen progredienten Nierenfunktionsverlust innerhalb von 10 bis 20 Jahren [38, 144]. Vor allem ältere IgAN-Patienten sind meist lange asymptomatisch bzw. oligosymptomatisch, zeigen jedoch ein abnormales Urinsediment und eine Proteinurie [44].

Hinsichtlich der Prognose dieser Erkrankung ist diese so variabel wie die jeweilige Verlaufsform. Die Inzidenz einer fortschreitenden renalen Insuffizienz muss bei 15 bis 40 Prozent der Erkrankten angenommen werden [40, 44, 53, 78, 88, 133]. In bis zu 23 Prozent der Fälle gelingt es unter Behandlung eine komplette Remission zu erreichen [40, 44, 78, 133]. Nach Transplantation tritt die Erkrankung mit einer Wahrscheinlichkeit von 20 bis 60 Prozent innerhalb von fünf Jahren wieder im Transplantat auf [44]. Die sogenannte progrediente Verlaufsform der IgAN stellt keine histologische Diagnose dar, sondern leitet sich vielmehr von der sich kontinuierlich verschlechternden Nierenfunktion ab.

Während der letzten Dekade wurde die Suche nach prognostischen Faktoren zur frühzeitigen Erkennung einer progressiven Verlaufsform Gegenstand zahlreicher Studien weltweit. Diesbezüglich konnten mehrere Risikofaktoren ermittelt werden, zu diesen zählen: Arterielle Hypertonie, tubuläre oder glomeruläre Sklerose,

erhöhtes Serumkreatinin, männliches Geschlecht, Alter über 50 Jahre, eine persistierende mikroskopische Hämaturie und/oder eine Proteinurie von mehr als 1 Gramm in 24 Stunden, und nicht zuletzt eine bereits nachweisbare Nierenschädigung bei Diagnosestellung [38, 142, 144]. Im Gegensatz dazu wurde das Auftreten einer Makrohämaturie zum Zeitpunkt der Diagnosestellung prognostisch positiv bewertet [12, 53, 143]. Wurde ein Serumkreatininwert von 3 mg/dl im Verlauf erstmal überschritten, verhält sich die IgAN meist progredient, weshalb der Begriff „point of no return“ geprägt wurde [154]. In Zusammenschau erklären die klinischen und histologischen Risikofaktoren weniger als 30 Prozent der Variabilität des Nierenfunktionsverlustes im Verlauf der Erkrankung. Über diese Faktoren hinaus stellt die IgAN eine Folge des Zusammenspiels bislang unbekannter genetischer Faktoren und Umweltbedingungen (z.B. Infektionen) dar [39].

Therapie

Bis heute existiert keine kausale Therapie der IgAN. Nachdem immunmodulatorische Therapieansätze bis jetzt zu keiner Heilung führten, beinhalten Behandlungsstrategien vor allem die symptomatische Kontrolle der Risikofaktoren in Form einer optimalen Blutdruckeinstellung sowie der Verringerung der Proteinurie über die Angiotensin-Hemmung [110]. Supportive Therapiemaßnahmen nehmen einen zentralen Stellenwert ein. Bei Patienten mit nur geringfügig auffälligem Urinbefund, ohne klinische Symptomatik bzw. vorrangig ohne simultanen Bluthochdruck, wird keine spezifische Therapie empfohlen. Diese sollten einer engmaschigen Überwachung zugeführt werden [44]. Für die progressive Verlaufsform gibt es bislang kein einheitliches allgemein anerkanntes Therapieschema [146].

Die primäre Behandlung aller IgAN-Patienten besteht in der Therapie der arteriellen Hypertonie. ACE-Hemmer bzw. AT1-Antagonisten kommen einerseits zur Behandlung des Bluthochdruckes zum Einsatz, andererseits sollen sie aber auch die Proteinurie reduzieren [151].

Steroide spielen seit mehr als 20 Jahren eine wichtige Rolle. Diese finden sowohl in Form einer hochdosierter Pulstherapie als auch als Erhaltungstherapie in reduzierter Dosierung Anwendung. Wie von Pozzi et al. gezeigt wurde, führte die Gabe von Methylprednisolon-Pulsen in Kombination mit Prednisolon oral zu

signifikant besseren Verläufen [139, 140]. Andere Studien bestätigten diese Ergebnisse, jedoch konnte kein nephroprotektiver bzw. direkt nierenfunktionserhaltender Effekt festgestellt werden [95, 166]. Wirksamkeit und idealer Zeitpunkt des Einsatzes von Steroiden in der Therapie der nicht progressiven Form der IgAN bleiben weiterhin kontrovers diskutiert. Eine Empfehlung von Barratt und Feehally aus dem Jahr 2005 lautete Steroide nur bei einer persistierenden Proteinurie von mehr als 1 Gramm in 24 Stunden, bei bereits optimaler Blutdruckkontrolle (125/75 mmHg) und maximaler RAAS-Blockade, einzusetzen [12]. Im Falle der progressiven oder regredienten Verlaufsform der IgAN hat sich die Behandlung mit Steroiden bereits etabliert [139, 140].

Die Anwendung der auch unter dem Namen Fischöl bekannten nephroprotektiven Substanzen Docosahexaensäure und Eicosapentaensäure erklärt sich durch deren antioxidative Effekte und die Eigenschaft dieser Fettsäuren Entzündungsreaktionen sowie den Prozess der Glomerulosklerose zu verringern.

Kausale Therapieansätze beinhalten den Einsatz immunsuppressiver Substanzen. Die Indikationsstellung zur Anwendung verschiedener Immunsuppressiva in Kombination mit oder als Sequenztherapie zu Corticosteroiden, z.B. in Form einer Cyclophosphamid-Pulstherapie als Induktionsbehandlung oder Mycophenolat Mofetil in der Erhaltungstherapie, finden in der Behandlung der progressiven Form der IgAN immer häufiger Anwendung [58]. Hinsichtlich derartiger Verlaufsformen oder im Rahmen einer Erhaltungstherapie gilt es, die zuvor genannten Therapiekonzepte zu erweitern. Der Einsatz von CsA als etablierte Substanz im Rahmen einer Erhaltungstherapie ist in Anbetracht der charakteristischen Nephrotoxizität problematisch und daher nicht geeignet [95]. Durch eine mehrmonatige Induktionstherapie mit Cyclophosphamid-Pulsen konnten gute Ergebnisse erzielt werden [11, 145]. Der Wirkstoff Mycophenolat Mofetil nimmt aufgrund seiner Effektivität in Kombination mit einer geringen Toxizität eine zunehmend bedeutendere Rolle in der Langzeittherapie nach Nierentransplantation ein [144]. Auch im Rahmen der progressiven Verlaufsform oder einer regredienten IgAN konnten unter einer Sequenztherapie mit MMF, z. B. nach initialer Induktionstherapie mit Cyclophosphamid, positive Verläufe mit Protektion der Nierenfunktion beobachtet werden [33, 134, 144]. Entsprechend der neuesten Erkenntnisse kann der Einsatz von MPA die Umsetzung Steroid- bzw.

CNI-Inhibitor-sparender Therapieschemata ermöglichen, um ein verbessertes langfristiges klinisches Outcome zu erreichen. Zudem wird MMF als vielversprechend eingestuft, die Rekurrenz der IgAN im Transplantat zu verhindern [138].

Weitere Behandlungsansätze bestehen in der Gabe intravenöser Immunglobuline [146, 149], einer Plasmapherese oder einer additiven Tonsillektomie [18]. Im Stadium der terminalen Niereninsuffizienz stellt die Transplantation, bei den meist noch jungen Patienten, die Therapie der Wahl dar.

1.5 Therapeutisches Drug Monitoring

Der Einsatz neuer analytischer Techniken ermöglicht es seit den frühen 1960er Jahren geringe Medikamentenkonzentrationen unter medikamentöser Therapie in biologischen Medien zu erfassen [123]. Diese Errungenschaften brachten über Jahrzehnte der Weiterentwicklung die heute bekannten Methoden des Therapeutischen Drug Monitoring (TDM) hervor. Der Begriff beschreibt die Messung von Konzentrationen entsprechender Pharmaka oder deren Metabolite in biologischen Proben, mit dem Ziel einer Vorhersage der Antwort des Organismus auf den betreffenden Wirkstoff [189]. Einen zentralen und bis heute führenden Aspekt des TDM bildet die Kontrolle der pharmakokinetischen Variabilität einer Substanz, um diese zu reduzieren, indem die Konzentration des Pharmakons direkt im Organismus und nicht ausschließlich über die Dosierung überwacht wird [123].

Die Methodik des Therapeutischen Drug Monitoring umfasst eine Vielzahl von Verfahren. Bislang erfolgt der größte Teil klinischer Routinekontrollen durch Blutspiegelbestimmungen von Wirkstoffen, und basiert somit auf der Erfassung der Pharmakokinetik entsprechender Substanzen [15]. Etablierte Methoden arbeiten meist auf der Grundlage reproduzierbarer Analysen von Medikamentenkonzentrationen im Plasma, die mithilfe von z.B. HPLC oder EMIT Assays erfasst werden. Jedoch wird die Effizienz dieser Verfahren durch mehrere problematische Gesichtspunkte limitiert. Die Pharmakokinetik einer Substanz korreliert häufig nicht mit den Auswirkungen auf die Zielzelle bzw. dem klinischen Outcome. Der enge therapeutische Bereich vieler Immunsuppressiva sowie die ständig drohende Gefahr klinisch relevanter Interaktionen machen den Einsatz eines therapeutischen Monitorings, je nach Substanz, zu einer unverzichtbaren Kontrollinstanz immunsuppressiver Therapiekonzepte. Einen Wendepunkt auf dem Gebiet des Therapeutischen Drug Monitoring markierte die Entwicklung des pharmakokinetischen Monitorings von Cyclosporin A. Die Behandlungserfolge die durch diese Verfahren erzielt werden konnten, beeinflussten auch die Re-Evaluation des Monitorings weiterer immunsuppressiver Substanzen [74].

Während stetig neue Ansätze des therapeutischen Monitorings diskutiert werden, gewinnen zunehmend pharmakodynamische Methoden an Bedeutung. Trotz des steigenden Interesses an pharmakodynamischen Ansätzen konnten diese bislang nicht dauerhaft in den klinischen Alltag integriert werden [153]. Ein derartiges Verfahren des therapeutischen Monitorings als vorrangig „biologisch“ aussagekräftige Methode, stellt die quantitative Erfassung der Ziellzellfunktion von Immunzellen dar [15, 81, 132, 136]. Als vielversprechender pharmakodynamischer Ansatz wird unter anderem die Messung der Expression und Hemmung von Oberflächenmarkern, und die Erfassung der T-Zell-Funktion über die Zytokinproduktion diskutiert [13, 62].

1.5.1 Therapiemonitoring von Cyclosporin A

Als Standardimmunsuppressivum auf dem Gebiet der Nierentransplantation und darüberhinaus vielfältig eingesetzter Wirkstoff, spielt der Calcineurin-Inhibitor Cyclosporin A eine dominierende Rolle. Trotz der langjährigen Anwendung im Rahmen immunsuppressiver Therapieprotokolle blieben Behandlungsschemata mit maximaler Effizienz, bei möglichst hoher Sicherheit und geringer Toxizität, weiterhin eine Herausforderung und Gegenstand kontroverser Debatten [153]. Aus dieser Problematik resultierten weltweit Bemühungen zur Weiterentwicklung des Therapeutischen Drug Monitoring dieses Immunsuppressivums. Seit Etablierung von CsA in den achtziger Jahren rückte das therapeutische Monitoring auf dem Gebiet der Immunsuppressiva in den Fokus des Interesses. Bis zu diesem Zeitpunkt waren im Rahmen herkömmlicher Behandlungsregime keine derartigen Therapieüberwachungsmassnahmen durchgeführt worden [159]. Nicht die akute Abstoßungsreaktion stellte damals das häufigste Problem dar, sondern vielmehr erschwerten die dosisabhängige Nephrotoxizität und das Auftreten eines akuten Nierenversagens, nach Nieren- oder Herztransplantation, eine effektive Immunsuppression unter CsA [29].

Die pharmakokinetischen Eigenschaften dieses Immunsuppressivums begründen unter anderem die Komplexität eines adäquaten Monitorings. Die Pharmakokinetik von CsA lässt sich in mehrere Phasen unterteilen. Nach Einnahme einer initialen Dosis kommt es zunächst zur sogenannten Absorptionsphase, in deren Verlauf die CsA-Konzentration im Blut einen Spitzenspiegel (C_{max}) erreicht. C_{max} tritt meist zwei bis drei Stunden nach Einnahme auf, und entspricht dem Zeitpunkt der maximalen Calcineurin-Inhibition [67, 153]. Pharmakokinetische Studien haben gezeigt, dass die ersten 4 Stunden nach Einnahme, die sogenannte Absorptionsphase, das Intervall mit der höchsten interindividuellen Variabilität von CsA-Spiegel und Bioverfügbarkeit repräsentieren [83, 123, 153]. Anschließend folgt die Eliminationsphase, während der der Medikamentenspiegel aufgrund der Metabolisierung der Substanz fällt. Dieser Spiegelabfall resultiert in einem sogenannten Talspiegel (C_0), der als „Basis-Wert“ oder „predose-Wert“ unmittelbar vor der nächsten Dosis bzw. 12 Stunden nach der letzten Einnahme bestimmt wird [153].

Die Notwendigkeit eines therapeutischen Monitorings erklärt sich somit auch durch die Eigenschaften des Pharmakons selbst. Die Anwendung der stark lipophilen Substanz wird hauptsächlich durch zwei wesentliche Faktoren erschwert. Zum einen spielt vor allem die inkomplette und unberechenbare Absorption eine wichtige Rolle, welche zu der hohen intra- und interindividuellen Variabilität der Pharmakokinetik beiträgt [188]. Andererseits kompliziert ein enger therapeutischer Bereich den Einsatz dieses Immunsuppressivums [161]. Ein weiterer problematischer Aspekt der geringen Bioverfügbarkeit resultiert teilweise aus der Abhängigkeit der Absorption von CsA durch Gallensäuren und andere Emulgatoren [153].

Weit über die Anfänge des therapeutischen Monitorings von CsA hinaus wurden vorrangig Talspiegel (C_0) des Wirkstoffes bestimmt. Zahlreiche Studien zur Pharmakokinetik der Substanz hatten jedoch für die Bestimmung der AUC (AUC_{0-12}) eine bessere Korrelation zum klinischen Effekt gezeigt. Insgesamt korrelierte die Inzidenz akuter Abstoßungsreaktionen signifikanter mit der AUC als mit Talspiegeln (C_0) von CsA [104]. Obwohl die Erfassung der AUC_{0-12} als valider pharmakokinetischer Parameter galt, konnte sich diese Methode in Anbetracht der aufwendigen Bestimmung in der klinischen Routine nicht durchsetzen [170].

Entsprechend der Datenlage wurde die Talspiegelbestimmung zwar im Vergleich zu AUC und C_{\max} als weniger geeigneter Prädiktor der Inzidenz akuter Abstossungsreaktionen des einzelnen Patienten eingestuft [87], in der klinischen Praxis erwies sich die Erfassung dieses Parameters jedoch als praktikabler und effizienter [153].

Die Ära der Entwicklung von Neoral® führte im Rahmen des therapeutischen Monitorings zu der Erkenntnis, dass die CsA - Exposition während der ersten vier Stunden (AUC_{0-4}) mit der AUC_{0-12} korrelierte. Diese Methode der C_4 -Spiegel-Bestimmung fand nach Einführung in die Transplantationsmedizin im Jahr 1990 durch Johnston et al. vor allem in den USA und Kanada weite Verbreitung [82, 161]. Desweiteren wurde eine sehr gute Übereinstimmung zwischen C_2 -Spiegel und der AUC_{0-12} beobachtet [90], [153]. Im Rahmen pharmakodynamischer Untersuchungen konnte zudem eine Abhängigkeit von C_2 -Spiegel und maximaler Calcineurin-Inhibition, sowie eine Korrelation mit dem maximalen Abfall der zirkulierenden IL-2 exprimierenden CD4+-T-Zellen festgestellt werden [67]. Auf Grund der sehr guten Korrelation des C_2 -Wertes mit der AUC_{0-4} , und dem Vorteil der Erfassung nur eines einzigen Messzeitpunktes, gilt diese Methode als äusserst valide, praktikabel und zudem kosteneffizient [91, 153]. In einigen Zentren wird das C_2 -Monitoring zur Überwachung der Inzidenz akuter Abstossungsreaktionen unter Neoral® eingesetzt, außerdem verspricht diese Methode, im Vergleich zu Talspiegelbestimmungen (C_0), einen zusätzlichen Informationsgewinn hinsichtlich einer möglichen Überdosierung [131]. Das C_2 -Monitoring ersetzte zunehmend die Bestimmung von Talspiegeln (C_0), obwohl bislang keine große randomisierte Studie mit Nachweis eines verbesserten klinischen Outcomes durch die Bestimmung von C_2 gegenüber C_0 existiert [72, 153].

Zwei führende analytische Verfahren zur Spiegelbestimmung von CsA waren zu Beginn etabliert. Neben dem H^3 -RIAD Testverfahren von Sandoz [45], fand auch die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) Anwendung [161]. Die Methode der HPLC ist spezifisch für die Stammsubstanz Cyclosporin, frei von Interaktionen mit deren Metaboliten, und zeichnet sich durch eine hohe Sensitivität (< 50 ng/ml) aus [161, 171]. Durch die Möglichkeit der Kombination mit der Massenspektrometrie galt die HPLC lange als „Goldstandard“ unter den

Analyseverfahren. Diese Methodik erwies sich jedoch in der Vergangenheit häufig als störanfällig [123]. Aufgrund technischer Probleme wird die HPLC für diese Indikation daher kaum noch verwendet [153]. Heutzutage werden meist Immunoassays eingesetzt [123].

In den letzten Jahren entwickelte sich der Trend zu pharmakodynamischen Monitoring-Ansätzen, um durch Quantifizierung der Wirkung auf die Zielzellfunktion Mechanismen zu erfassen, die zum Beispiel direkt mit Transplantatabstoßungsreaktionen assoziiert sind. In Anbetracht der fehlenden Aussagekraft des pharmakokinetisch orientierten Monitorings über den biologischen Effekt des Immunsuppressivums [85, 170], soll diese Strategie den Informationsgewinn bezüglich des Status der Immunsuppression steigern. Mit dieser Intention wurden diverse Immunoassays entwickelt, welche sich in allgemeine und spezifische Testverfahren unterscheiden lassen.

Zu den allgemeinen pharmakodynamischen Ansätzen zählt die Bestimmung des löslichen CD30 Proteins (sCD30). Als weiteres sogenanntes allgemeines Verfahren gilt die Erfassung der Freisetzung von Adenosin Triphosphat (ATP) durch PHA (Phytohaemagglutinin)-stimulierte CD4⁺-T-Zellen [170].

Im Rahmen der spezifischen pharmakodynamischen Methoden kommen Verfahren zur Bestimmung der Calcineurin-Phosphatase-Aktivität [67], die Messung von T-Zell-Zytokinen wie IL-2 durch ELISA und Durchflusszytometrie [14, 50], sowie die Bestimmung der Zytokin mRNA-Expression zum Einsatz [69].

Für die meisten dieser pharmakodynamischen Verfahren wird als Medium der Wahl Vollblut, versehen mit dem Antikoagulant Natrium-EDTA, empfohlen [47, 115, 153, 159, 161, 163, 170]. Entsprechend neuerer Erkenntnisse kann bei bestimmten Patientengruppen, z.B. im Bereich der Pädiatrie, auch Kapillarblut als Analysemedium zum therapeutischen CsA-Monitoring eingesetzt werden [123]. Gegenstand aktueller Untersuchungen pharmakodynamischer Monitoring-Verfahren stellen vorrangig durchflusszytometrisch- oder Radio-Nukleotid-basierte Lymphozytenproliferations-Messungen stimulierter Vollblutproben oder PBMCs dar [15, 170]. Daneben werden auch T-Zell-Aktivierungsmarker im Bezug auf ihre prognostische Implikatorfunktion, im Rahmen pharmakodynamischer Ansätze, näher betrachtet [50].

1.5.2 Therapiemonitoring der Mycophenolsäure

Die Haupteinsatzbereiche der Mycophenolsäure liegen in der Prophylaxe und Behandlung von Abstoßungsreaktionen nach Organtransplantation und in der Therapie autoimmuner Erkrankungen, wie z.B. der Lupus-Nephritis oder der IgA-Nephropathie [56, 144]. Im Rahmen dieser Behandlungskonzepte werden für gewöhnlich fixe Dosisregime der Darreichungsformen MMF oder EC-MPS verabreicht [8]. Die Meinungen zur Notwendigkeit eines therapeutischen Monitorings im Falle von MPA sind ambivalent. Während einige Zentren für die meisten Patienten keinen Vorteil durch diese Verfahren sehen [28], befürworten andere Autoren, unter Berücksichtigung der ausgeprägten pharmakokinetischen Variabilität dieser Substanz, eine derartige Strategie der Therapieüberwachung [165]. Mit fortschreitender Etablierung der Mycophenolsäure wurde die Notwendigkeit eines effektiven Therapie-Monitorings zunehmend evident. Gleichzeitig zeigten Studien, dass die Bestimmung von MPA-Plasmaspiegeln durch HPLC oder EMIT Assays, obwohl im Vergleich zu anderen Immunsuppressiva wie Cyclosporin A und Tacrolimus nicht routinemässig praktiziert, als Indikator einer akuten Abstoßungsreaktion nach Nieren- oder Herztransplantation eingesetzt werden kann [160]. Bislang besteht jedoch kein allgemein anerkannter Konsens über den therapeutischen Bereich der Mycophenolsäure [27] und die optimale Methodik zur Erfassung des Parameters, der am Besten mit dem Auftreten von Nebenwirkungen korreliert [172].

Die Eigenschaft dass die Vorstufe MMF bereits sehr früh im Stoffwechsel komplett zu MPA metabolisiert wird, begründet die Beobachtung, dass im Rahmen von Monitoring-Verfahren nur MPA- und nicht MMF-Plasmaspiegel bestimmt werden können. Neben der reinen Spiegelbestimmung wird zur Beurteilung der adäquaten Medikamentenexposition die Erfassung der AUC_{0-12} , oder zumindest die Bestimmung einer sogenannten „Mini AUC_{0-2} “, diskutiert [64]. Durch diese pharmakokinetischen Monitoring-Verfahren wird jedoch die Problematik der großen interindividuellen Variabilität dieser Substanz nicht adäquat erfasst [56], was wiederum die fehlende Aussagekraft dieser Methoden über die biologische Wirkung des Immunsuppressivums auf die jeweilige Zielzellaktivität erklärt [186].

Zur Optimierung der Dosierung befürworten einige Zentren, wie z.B. Glander et al. der Charité´ Berlin, die ergänzende Bestimmung pharmakodynamischer Parameter zur Individualisierung der Therapieüberwachung von MMF bzw. MPA [56]. Die IMPDH Aktivität als Surrogatmarker der MPA-induzierten Immunsuppression gilt als einer der effektivsten pharmakodynamischen Parameter [55]. Die Testverfahren zur IMPDH-Analyse können in radiometrische und nicht-radiometrische Methoden unterteilt werden. Zunächst fand vor allem die radiometrische Methode Anwendung. Diese erfasst die $^3\text{H}_2\text{O}$ Freisetzung von IMP während der enzymkatalysierten Konversion zu XMP [55, 96]. Mittlerweile wird dieser pharmakodynamische Ansatz hauptsächlich durch ein modifiziertes nicht-radioaktives Verfahren zur Bestimmung der Aktivität des Schlüsselenzyms IMPDH, über die Methode der HPLC, verfolgt [55]. Der Assay basiert auf einer Inkubation von lysierten Vollblut-Zellen oder mononukleären Zellen mit Inosin 5'-Monophosphat (IMP) und Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (NAD). Die dadurch erzeugte Bildung von Xanthosin 5'-Monophosphat (XMP), als Ausdruck der IMPDH Aktivität, wird durch die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie gemessen [3]. Das Testverfahren kann prinzipiell sowohl in Vollblut als auch unter Einsatz von PBMCs angewendet werden [55].

Die IMPDH Aktivität ist vornehmlich in Erythrozyten lokalisiert, der Anteil der IMPDH Aktivität mononukleärer Zellen beträgt im Vergleich zur Aktivität in Vollblut unter 10 Prozent [3]. Es konnte gezeigt werden, dass die IMPDH Aktivität von aus MPA-haltigem Vollblut isolierten Lymphozyten nicht gehemmt wird. MPA scheint durch die Isolierung von Zellen verloren zu gehen, und dadurch zur Wiederaufnahme der Enzymaktivität der IMPDH während des Isolierungsschrittes zu führen [3, 55]. Um die Wirkung der Mycophenolsäure auf mononukleäre Zellen in vivo möglichst realitätsgetreu zu erfassen, eignet sich ein „Erythrozyten- und Thrombozyten-freier-Vollblutansatz“, der durch Resuspension von isolierten mononukleären Zellen mit Plasma hergestellt wird [3].

Auch im Rahmen der Diskussion um ein therapeutisches Monitoring der Mycophenolsäure gewinnen pharmakodynamische Verfahren, neben der in einzelnen Zentren praktizierten Bestimmung pharmakokinetischer Parameter wie Talspiegel und AUC, immer mehr an Bedeutung.

1. 6 Ziele der Arbeit

Im Mittelpunkt des ersten Teiles dieser Arbeit standen *in vitro* Untersuchungen zur Pharmakodynamik von Cyclosporin A und Mycophenolat Mofetil. Dadurch sollten die Zielzellfunktion und die Wirkung des jeweiligen Immunsuppressivums funktionell charakterisiert werden. Durch Anwendung der Methode des Early Activation Assay in Kombination mit der Mehrkanaldurchflusszytometrie wurde die Modulation der frühen Lymphozytenaktivierung von TH1-Zellen, durch die Immunsuppressiva CsA und MMF, bei Gesunden analysiert. Unter dem jeweiligen Einfluss der Immunsuppressiva sollte auf diesem Wege die unterschiedliche Expression der Oberflächenproteine (IFN- γ , IL-2, CD69) der frühen Lymphozytenaktivierung gezeigt werden.

Die frühe Lymphozytenaktivierung als Marker der Pharmakodynamik von MPA und CsA wurde im zweiten Teil vergleichend betrachtet, und ihre Bedeutung für das therapeutische Monitoring diskutiert. Unter diesen Gesichtspunkten wurde die Wirkung einer immunsuppressiven Behandlung mit Mycophenolsäure auf die frühe Lymphozytenaktivierung *ex vivo*, bei Patienten mit progressiver IgA-Nephropathie, untersucht. Die Untersuchungen erfolgten im Rahmen einer randomisierten cross-over Studie (PK/PD Studie) in Kooperation mit der Nephrologie.

Diese Arbeit repräsentiert einen Schritt zur Evaluation der Bedeutung von Lymphozytenfunktionsuntersuchungen für die Überwachung und Optimierung einer Therapie mit Immunsuppressiva wie Cyclosporin A oder Mycophenolsäure. Die Untersuchung der Pharmakodynamik der Immunsuppressiva und Evaluation des pharmakodynamischen Ansatzes der frühen Lymphozytenaktivierung zeigt das Potential eines neuen diagnostischen Routineverfahrens, für eine individualisierte und optimierte Therapiesteuerung immunsupprimierter Patienten.

2. Material und Methodik

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte

Sterile Arbeitsbänke	Heraeus, Hanau
CO ₂ - Begasungsbrutschrank	Heraeus, Hanau
Pipettiergerät	Labsystems, Helsinki, (Finnland)
Vortex	Bachofer, Reutlingen
Zentrifuge Allegra™ 6th	Beckman Coulter, Kalifornien (USA)
Tischzentrifugen	Eppendorf, Hamburg
Gefrierschränke (-80 °C, -20 °C)	Heraeus, Hanau
Wasserbad 37 °C	Heraeus, Hanau

2.1.2 Analysegeräte

Durchflusszytometer FACSCalibur	Becton & Dickinson, Heidelberg
Computer	Apple Macintosh, Kalifornien (USA)

2.1.3 Analysesoftware

FACS- Analyse-Software, CellQuest Pro	Becton & Dickinson, Heidelberg
MS Excel	Microsoft, Redmond (USA)
MS Word	Microsoft, Redmond (USA)

OriginPro 8	OriginLab Corporation, Northampton, Massachusetts (USA)
-------------	---

2.1.4 Verbrauchsmaterialien

Polypropylen-Reaktionsgefäße (blue cap), 15 ml u. 50 ml	Falcon; BD, Heidelberg
FACS- Polystyren- Rundbodenreaktionsgefäße Reaktionsgefäße 1.5 ml und 2 ml	Falcon; BD, Heidelberg Eppendorf, Hamburg
Plastik-Einmalpipetten, Glaspipetten	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen 10 µl, 200 µl, 1000 µl	Eppendorf, Hamburg

2.1.5 Pharmaka

Mycophenolat Mofetil (MMF: CellCept®)	Hoffmann LaRoche, Basel (Schweiz)
Natrium-Mycophenolat (EC-MPS: Myfortic®)	Novartis, Basel (Schweiz)
Cyclosporin A (CsA: Sandimmun®)	Novartis, Basel (Schweiz)
Heparin (Liquemin®)	Hoffmann LaRoche, Basel (Schweiz)

2.1.6 Monoklonale Antikörper

Anti-CD 28 Arbeitslösung: 20 µl des Antikörpers verdünnt mit 180 µl PBS	Becton & Dickinson, Heidelberg
Anti- Hu-IFN-γ FITC/ CD69 PE/ CD4 PerCP-Cy5.5	Becton & Dickinson, Heidelberg
Anti-Hu-IL2 FITC/CD69 PE/CD4 PerCP-Cy5.5	Becton & Dickinson, Heidelberg

2.1.7 Antigen-Stimuli

SEB-Superantigen (1 µg/ml)	Sigma, Taufkirchen
SEB-Stammlösung (50x) 0,5 mg/ml in PBS	Sigma, Taufkirchen
SEB-Arbeitslösung (1 µg/ml):	
10 µl der Stammlösung verdünnt mit	
500 µl PBS	
HFF-Antigen	Herstellung durch Glycin- Extraktion (Erläuterung unter Abschnitt 2.2.1.1)
HCMV-Antigen AD 169	Herstellung durch Glycin- Extraktion (siehe Abschnitt 2.2.1.1)

2.1.8 Puffer, Lösungen und Kulturmedien

Fetales Kälberserum (FCS)	Gibco, New York (USA)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Serva GmbH, Heidelberg
Brefeldin A (BFA)	Sigma, Taufkirchen
Stammlösung (10x) mg/ml, Portionen a 20 µl	
Arbeitslösung (1x) 0,5 µg/µl in 180 µl PBS	
1% Paraformaldehyd (PFA)	Sigma, Taufkirchen
Stammlösung PFA 4% in PBS	
20 µM EDTA	Sigma, Taufkirchen
PBS 0,01 nM (phosphate-buffered saline) pH 7,4	Sigma, Taufkirchen
5 mM MgCl ₂	
9 mM CaCl ₂	
136 mM NaCl	
2,6 mM KCl	
8 mM Na ₂ HPO ₄	
1,5 mM KH ₂ PO ₄	
RPMI-Medium 1640	Gibco, New York (USA)

Kryomedium für Zellen:

PBS 80%

Sigma, Taufkirchen

FCS 10%

Gibco, New York (USA)

DMSO 10%

Serva GmbH, Heidelberg

MEM-Medium (Minimum essential Medium)

Gibco, New York (USA)

Zellkulturmedium für HFF-Zellen:

MEM-Medium (Minimum essential Medium)

Gibco, New York (USA)

Medium komplettiert mit:

10% FCS

Gibco, New York (USA)

1% 100 IU/ml Penicillin

Seromed, Wien (Österreich)

0.1 mg/ml Streptomycinsulfat

Seromed, Wien (Österreich)

1% 2 mM L-Glutamin

Seromed, Wien (Österreich)

1% nicht-essentielle Aminosäuren

Seromed, Wien (Österreich)

2.1.9 FACS-Lösungen

FACS-Medium (Puffer):

Becton & Dickinson,
Heidelberg

90% steriles PBS 0,01nM

Sigma, Taufkirchen

2% FCS

Gibco, New York (USA)

0.05% Natriumacid (Na N₃)

Sigma, Taufkirchen

FACS-Lysing-Solution

Becton & Dickinson,
Heidelberg

FACS-Permeabilizing-Solution

Becton & Dickinson,
Heidelberg

FACS-Blocking

10%ige humane IgG-Lösung

Polyglobulin; Bayer,
Leverkusen

komplettiert mit FACS- Puffer

Becton & Dickinson,
Heidelberg

2.2 Methoden

2.2.1 Die frühe Lymphozytenaktivierung

Die Methode des Early Activation Assay wurde, sowohl für die in vitro als auch im Rahmen der ex vivo Untersuchungen, an heparinisiertem Vollblut durchgeführt. Die Gewinnung der Proben erfolgte unmittelbar vor Durchführung des Versuchsprotokolls, durch peripher-venöse Blutentnahme aus der Ellenbeuge. Für eine Versuchsreihe wurden jeweils 20 ml venösen Blutes benötigt. Die Abnahme der Vollblut-Proben erfolgte in 20 ml Spritzen pro Proband, als Antikoagulanz wurde Natrium-Heparin verwendet.

Die Vollblut-Proben der in vitro Versuchsreihen stammten von gesunden Spendern, für die ex vivo Untersuchungen wurden die Proben des Patientenkollektivs der PK/PD-Studie „*Vergleich Pharmakokinetik und Pharmakodynamik von MPA unter EC-MPS versus MMF bei Patienten mit progressiver IgA-Nephritis*“ [36], freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Eine genaue Beschreibung der PK/PD Studie folgt unter Kapitel 2.2.3.1.

2.2.1.1 Early Activation Assay

Als Basis der Arbeitsansätze wurden je Proband insgesamt 1350 µl heparinisiertes Vollblut benötigt. Zur Vorbereitung des Arbeitsschrittes der Antigen-Stimulation wurde das Vollblut zunächst auf drei Polypropylen-Reaktionsgefäße (15 ml blue cap, Falcon) verteilt, und jedes der Reaktionsgefäße mit 450 µl Vollblut befüllt. Vor Stimulation wurden die Reaktionsgefäße A (HFF) und B (CMV) jeweils mit 5 µl des Antikörpers anti-CD28, als Kostimulus, versehen. Im nächsten Arbeitsschritt folgte die Zugabe der Antigene. Die Antigenstimulation zur Aktivierung der T-Zellen erfolgte im Rahmen dieser Arbeit durch die Antigene HFF, CMV und SEB. Probe A wurde mit 50 µl des zellulären Antigens HFF-Antigen inkubiert, diese diente als „Negativkontrolle“. Arbeitsansatz B wurde entsprechend mit 50 µl CMV-Antigen stimuliert, und Probe C wurde als „Positivkontrolle“ 50 µl SEB zugesetzt.

Das Staphylokokken Enterotoxin B, auch SEB genannt (1 µg/ml; Sigma, Taufkirchen), fungierte als sogenanntes „Superantigen“. Mithilfe von SEB lässt sich eine T-Zell-Rezeptor-unabhängige Aktivierung der Zellen generieren, während unter Einfluss von CMV-Antigen die T-Zell-Rezeptor-abhängige (spezifische) Stimulation CD4⁺-T-Zellen, zusammen mit der Antigen Prozessierung durch Antigen-präsentierende Zellen, hervorgerufen wird.

Die Antigene CMV und HFF waren zuvor durch Glycin-Extraktion von AD 169-infizierten und nicht-infizierten menschlichen Vorhautfibroblasten (Methode nach Waner 1977) gewonnen worden. Hierfür wurden die Zellkulturen in 0,15 M Glycin-PBS-Puffer gewaschen, und konsekutiv in 0,5 M Glycin-PBS-Puffer resuspendiert. Nach insgesamt dreimaligem Einfrieren und Auftauen wurden die Antigen-Proben aliquotiert, bei -80 °C gelagert, und jeweils vor Gebrauch direkt aufgetaut.

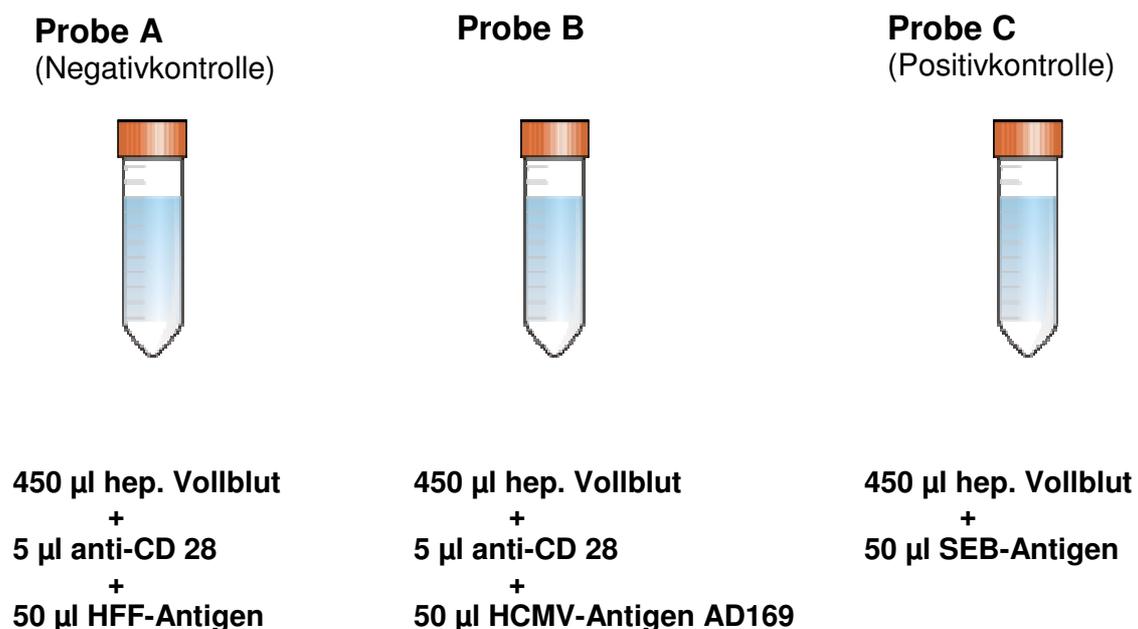


Abb. 8: Arbeitsansätze Early Activation Assay: Antigenstimulation. HFF: Humanes Vorhautfibroblasten-Antigen, HCMV: Humanes Cytomegalievirus-Antigen AD 169, SEB: Staphylokokken Enterotoxin B-Antigen, Kostimulus: Antikörper anti-CD 28, hep.: heparinisiert.

Nach Zugabe der Antigen-Stimuli und vortexen der Proben wurden diese für zwei Stunden bei 37 °C und 5% CO im Brutschrank inkubiert. Danach wurde jede Probe mit 10 µl BFA (Sigma, Taufkirchen) versehen und nach vorsichtigem vortexen schloss sich eine weitere Inkubationsphase von 4 Stunden, im Brutschrank bei 37 °C und 5% CO, an. Es folgte der Zusatz von 50 µl 20 µM EDTA-Lösung (Endkonzentration 2 µM), dieser Arbeitsschritt führte, nach ausgiebigem vortexen

und 15-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur, zum Stoppen der T-Zell-Aktivierungsphase.

Nach Beendigung der Aktivierung folgte die Fixierung der Zellen durch 2 ml FACS-Lysing-Solution (Becton & Dickinson, Heidelberg) pro Ansatz. Dann wurden die Proben gevortext und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschliessend wurde erneut für 5 Minuten (1600 rpm, gebremst) zentrifugiert, danach der Überstand dekantiert, und die Proben wiederum für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Der nächste Arbeitsschritt bestand in der Präparation der Zellen für die Durchflusszytometrie (unter Abschnitt 2.2.1.2 erläutert). Im Falle einer nicht sofort durchgeführten FACS-Analyse wurden die Proben, nach Resuspension in 1 ml Einfriermedium (80% PBS, 10% FCS, 10% DMSO), auf jeweils zwei Eppendorf-Gefäße pro Ansatz verteilt, und zur Lagerung bei -80 °C für mehrere Monate haltbar gemacht.

2.2.1.2 Zellpräparation in Vorbereitung auf die Durchflusszytometrie

Die Weiterverarbeitung erfolgte nach Wiederauftauen der fixierten und prästimulierten Zellen im Wasserbad bei 37 °C und Überführen in FACS-Reaktionsgefäße. Daraufhin wurden die Proben mit 2 ml FACS-Medium (Becton & Dickinson, Heidelberg) zur Separierung der Erythrozyten gewaschen, und bei 1600 rpm 5 Minuten zentrifugiert (gebremst). Anschließend wurde der Überstand abgenommen. Durch Zugabe von 500 µl FACS-Permeabilizing Solution (Becton & Dickinson, Heidelberg) wurden die Zellwände permeabilisiert und die Proben nach erneutem vortexen für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es schloss sich ein weiterer Waschvorgang an.

Als nächster Arbeitsschritt folgte die Markierung der Zellen mithilfe einer Antikörperkombination (CD4-CD69-γ-IFN; Becton und Dickinson, Heidelberg). Hierfür wurden die Zellen mit an monoklonale Antikörpern gebundene Fluorochrome gefärbt. Dies ermöglichte die Unterscheidung der verschiedenen T-Zell-Subsets. Desweiteren erlaubte die Färbung mit oben genannter

Antikörperkombination eine Charakterisierung der Zellen anhand ihrer Oberflächenmarkerexpression, wodurch die Quantifizierung des Aktivierungsstatus möglich wurde. Jede Probe wurde mit 8 μ l der Antikörperlösung (CD4-CD69- γ -IFN) und 0,2 μ l CD8 APC (Caltag, USA), sowie 42 μ l anti- IgG-Blocking-Puffer versehen. Der Einsatz des IgG-Blocking-Puffers sollte eine unspezifische Bindung der Antikörper verhindern.

Die Auswahl der Antikörper-gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffe erfolgte unter Berücksichtigung der Kombinierbarkeit ihrer Emissionsmaxima. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Farbstoffe Fluoreszeinisothiozyanat (FITC = grün), Phycoerythrin (PE = rot) und Allophycocyanin (APC) verwendet. FITC und PE werden beide bei einer Wellenlänge von 488 nm von einem Argon-Laser zur Emission von Lichtimpulsen angeregt. Der Emissionsbereich für die durch PE erzeugte Rotfluoreszenz befindet sich zwischen 570 und 600 nm, während die Grünfluoreszenz von FITC zwischen 500 und 570 nm liegt. Die unterschiedlichen Emissionsmaxima der Fluoreszenzen (FITC 520 nm, PE 576 nm, APC 660 nm) mit ihren verschiedenen Wellenlängenbereichen bewirken, dass im Rahmen der Mehrkanal-Durchflusszytometrie mehrere Farbstoffe gleichzeitig gemessen werden können (z.B. Zweifarbenimmunfluoreszenz). Dies ermöglicht eine Unterscheidung verschiedener T-Zell-Subsets sowie die simultane Untersuchung der Expression mehrerer Oberflächenantigene.

Nach Zusatz der Antikörper und anschließendem vortexen der Arbeitsansätze schloss sich eine weitere Inkubationsphase, von 30 Minuten in Dunkelheit bei Raumtemperatur, an. Danach folgte ein erneuter Waschvorgang, und die Proben wurden für 5 Minuten zentrifugiert (1600 rpm, gebremst). Im nächsten Arbeitsschritt wurden die Zellpellets jeweils in 200 μ l 1% PFA in PBS resuspendiert, und bis zur Analyse bei 4°C gelagert. Die folgende Abbildung 9 fasst in einer schematischen Übersicht die einzelnen Arbeitsschritte des Early Activation Assay, mit anschließender FACS-Analyse, zusammen. Auf das Verfahren der Mehrkanaldurchflusszytometrie (FACS-Analyse) wird unter Kapitel 2.2.4 näher eingegangen.

	Antigenstimulation durch Staphylokokken Enterotoxin B (SEB)-Antigen, Cytomegalievirus (CMV)-Antigen		Zytokine: z.B. Interferon-gamma (IFN- γ)
	Aktivierungsmarker (z.B. CD69)		Fluoreszenz-markierte Antikörper

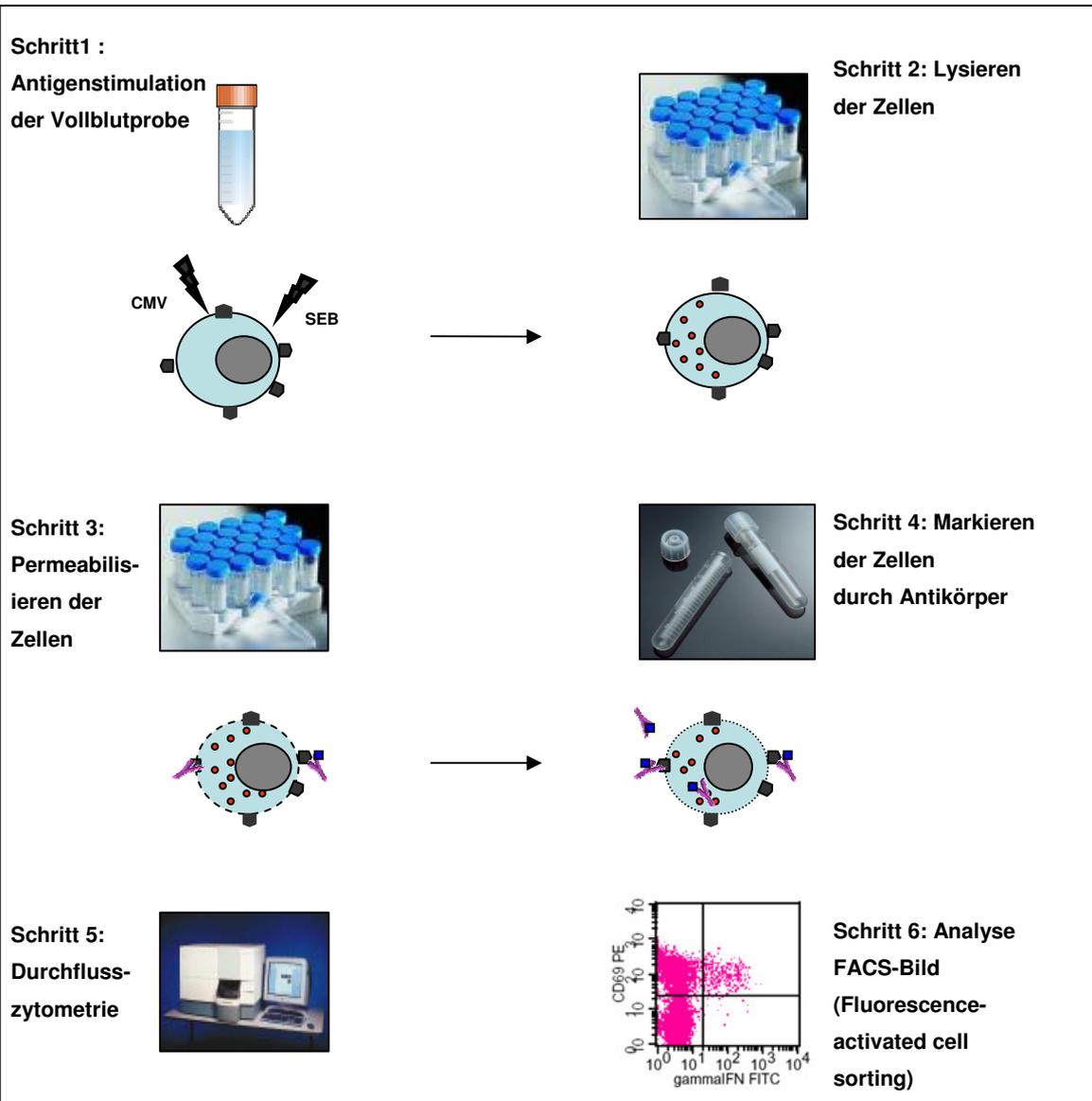


Abb. 9: Schematische Übersicht der einzelnen Arbeitsschritte des Early Activation Assay.

2.2.2 Pharmakodynamik von CsA und MMF in vitro

Modulation der frühen T-Zell-Aktivierung in vitro unter Einfluss der Immunsuppressiva CsA und MMF

Die Arbeitsansätze mit in vitro Zugabe der Verdünnungsreihen von MMF und CsA wurden auf der Basis heparinisierten Vollblut-Proben gesunder Probanden erstellt. Ausgehend von den in Tabelle 2 gezeigten Medikamentenstammlösungen wurden, entsprechend der im Rahmen von Vorversuchen ermittelten optimalen Konzentrationen der Immunsuppressiva, sieben Verdünnungsstufen für jedes Medikament titriert.

Tab. 2: Übersicht der Konzentrationen der Medikamentenstammlösungen von Cyclosporin A (CsA) u. Mycophenolat Mofetil (MMF).

Medikament	CsA	MMF
Konzentration der Stammlösung	25 mg/ml	50 mg/ml

2.2.2.1 Verdünnungsreihe Cyclosporin A

Ausgehend von einer CsA-Stammlösung der Konzentration 25 mg/ml wurden 7 Verdünnungsstufen, in einem Konzentrationsbereich zwischen 1 mg/ml bis 1 ng/ml, titriert. Die Arbeitsansätze wurden durch einmalige Zugabe der Medikamentenlösung zu Vollblut und konsekutiver Titration der weiteren Verdünnungsstufen, in Schritten zu je einer Zehnerpotenz in abnehmender Reihenfolge, erstellt.

In Vorbereitung auf die Durchführung des Early Activation Assay wurden zur Antigenstimulation jeweils 3 Arbeitsansätze (1 Ansatz pro Antigen-Stimulus: HFF, CMV, SEB) pro Proband und Verdünnungsstufe hergestellt. Jede der in Tabelle 3 genannten Verdünnungsstufen wurde mit 50 µl des jeweiligen Antigens (HFF, CMV und SEB) stimuliert. Im Anschluss daran folgten die weiteren Arbeitsschritte

nach dem unter Abschnitt 2.2.1.1 aufgeführten Protokoll des Early Activation Assay.

Tab. 3: Zielkonzentrationen der Verdünnungsreihe von Cyclosporin A (CsA) für die in vitro Voruntersuchungen.

Arbeitsansätze CsA	1	2	3	4	5	6	7
Konzentration CsA	1 mg/ml	100 µg/ml	10 µg/ml	1 µg/ml	100 ng/ml	10 ng/ml	1 ng/ml

2.2.2.2 Verdünnungsreihe Mycophenolat Mofetil

Auch der für MMF zur Pharmakodynamik näher untersuchte Bereich der Medikamentenonzentration umfasste Verdünnungsstufen zwischen 1 mg/ml und 1 ng/ml. Eine Verdünnungsreihe aus insgesamt 7 Titrationsstufen wurde, wie bereits im vorhergehenden Abschnitt bei CsA, ebenso für MMF hergestellt. Unter Einsatz einer Stammlösung von MMF der Konzentration 50 mg/ml wurde durch Mischung mit Vollblut die höchste Ziellkonzentration von 1 mg/ml generiert, die weiteren Verdünnungsstufen erhielt man durch Titrationschritte zu je einer Zehnerpotenz in absteigender Reihenfolge. Wie zuvor unter Abschnitt 2.2.1.1 beschrieben, wurden im Hinblick auf die Antigenstimulation je Verdünnungsstufe 3 Arbeitsansätze mit den entsprechenden Antigenen (HFF, CMV und SEB) erstellt. Das weitere Prozedere der Zellpräparation folgte dem Protokoll des Early Activation Assay.

Tab. 4: Zielkonzentrationen der Mycophenolat Mofetil (MMF) Verdünnungsreihe für die in vitro Untersuchungen.

Arbeitsansätze MMF	1	2	3	4	5	6	7
Konzentration MMF	1 mg/ml	100 µg/ml	10 µg/ml	1 µg/ml	100 ng/ml	10 ng/ml	1 ng/ml

2.2.3 Ex vivo Untersuchungen zur Pharmakodynamik der Mycophenolsäure

2.2.3.1 Patienten, Studiendesign u. Therapieschemata der PK/PD Studie

Patienten

Für die PK/PD Studie wurden aus dem Patientenkollektiv der Nephrologischen Ambulanz der Universitätsklinik Ulm, Klinik für Innere Medizin I, insgesamt zehn Patienten - neun Männer und eine Frau (alle Kaukasier), rekrutiert. Die zehn Patienten mit progredienter IgA-Nephropathie standen unter Langzeitbetreuung (seit mindestens 12 Monaten) dieses Zentrums. Bei drei der zehn rekrutierten Patienten wurde während des Untersuchungszeitraumes aufgrund von Unverträglichkeit von MMF eine Dosisreduktion auf 250 mg täglich erforderlich. Die alternative Darreichungsform EC-MPS konnte bei allen Patienten über den gesamten Beobachtungszeitraum in voller Dosierung von zweimal täglich 360 mg verabreicht werden. Zum Zeitpunkt der Initialisierung der Studie standen diese sieben Patienten unter einer Erhaltungstherapie mit Mycophenolat Mofetil in Kombination mit 10 mg Prednisolon täglich. Zuvor hatten sie eine Induktionstherapie mit Cyclophosphamid erhalten.

Studiendesign und Therapieschemata

Die PK/PD Studie stellte eine prospektive, randomisierte, cross-over frühe Phase II Pilotstudie dar. Im Fokus dieser Studie stand die Untersuchung evidenter Unterschiede bezüglich der Pharmakokinetik und Pharmakodynamik der Mycophenolsäure, in ihren Darreichungsformen magensaftresistentes Mycophenolat („enteric coated - mycophenolate sodium“: EC-MPS) und Mycophenolat Mofetil (MMF). Der Behandlungszeitraum umfasste entsprechend des Studienprotokolls insgesamt 2 Medikationsphasen von jeweils 2-wöchiger Dauer. Es wurden 14 Messungen zu jeweils 8 Abnahmezeitpunkten pro Patient durchgeführt, dies entsprach insgesamt 112 Proben für das ausgewertete Patientenkollektiv von insgesamt 7 Patienten. Am Ende einer jeden

Medikationsphase wurden die Probanden einmal über 24 Stunden in einem unabhängigen pharmazeutischen Forschungsinstitut (Pharos GmbH, Ulm) aufgenommen. Im Rahmen dieser Aufenthalte erfolgte die Probengewinnung zur Erfassung der pharmakokinetischen und pharmakodynamischen Parameter von EC-MPS und MMF. Die Daten wurden aus insgesamt 8 Proben pro Patient und Untersuchungstag bestimmt, die zu den Zeitpunkten 0 (=vor) sowie ½, 1, 2, 4, 6, 8 und 12 Stunden nach oraler Einnahme, von entweder MMF oder EC-MPS, abgenommen wurden. Zu den jeweiligen Abnahmezeitpunkten wurden zusätzlich entsprechende Spiegelbestimmungen von MPA durchgeführt. Weiterführende Informationen zur PK/PD Studie können der Veröffentlichung „*Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Mycophenolic acid after enteric-coated Mycophenolate versus Mycophenolate Mofetil in patients with progressive IgA Nephritis*“, Journal of Clinical Pharmacology, 2007; 47:850-859; [36], entnommen werden.

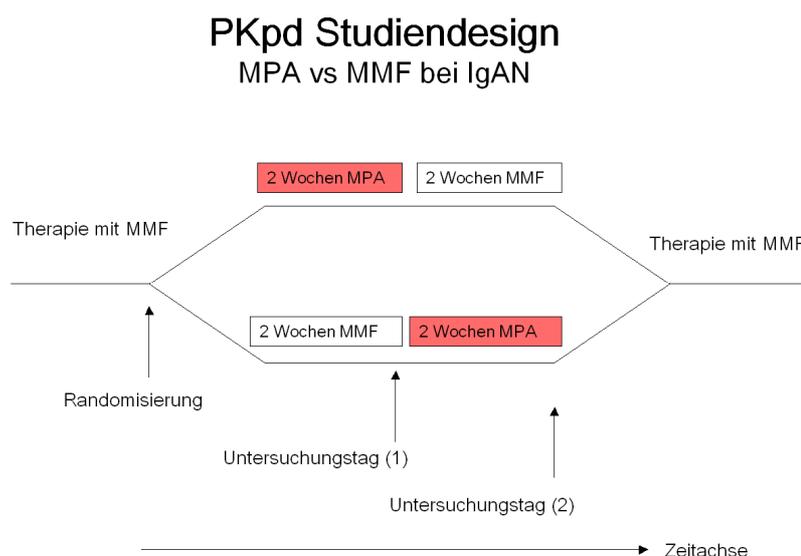


Abb. 10: Schematische Darstellung des Studiendesigns.

MPA: Mycophenolat. MMF: Mycophenolat Mofetil. IgAN: IgA-Nephropathie. (Quelle: Studienplan Pharmakokinetik/Pharmakodynamik (PK/PD) Studie „*Vergleich Pharmakokinetik und Pharmakodynamik von MPA unter EC-MPS versus MMF bei Patienten mit progressiver IgA-Nephritis*“ Universitätsklinikum Ulm, Abteilung Innere Medizin I, Sektion Nephrologie, 2004).

Die Untersuchungen erfolgten anhand zweier Medikationsphasen von jeweils zweiwöchiger Dauer. Während des Beobachtungszeitraumes erhielten die Probanden randomisiert, im cross-over Modus, täglich entweder 2 x 500 mg MMF (CellCept®) oder 2 x 360 mg EC-MPS (Myfortic®) per os für jeweils 2 Wochen.

Die Immunsuppressiva mussten mindestens über einen Zeitraum von zwei Wochen vor Beginn der Untersuchungen eingenommen worden sein, um das Erreichen eines „steady state“ zu gewährleisten. Die Festlegung der Reihenfolge der Gabe der jeweiligen Medikamentendarreichungsform (EC-MPS oder MMF) während der beiden Beobachtungszeiträume erfolgte nach dem Zufallsprinzip. Nach Abschluss der Studien-Medikationsphasen wurde die Therapie mit MMF (CellCept®) fortgesetzt. Im Rahmen der Erhaltungstherapie umfasste das Medikationsregim eines jeden Patienten zusätzlich zu EC-MPS/MMF 5 mg Prednisolon täglich, obligate Begleitmedikation waren ein ACE-Hemmer oder ein AT1-Blocker. Die zusätzliche fakultative Einnahme von Fischöl wurde, aufgrund zu erwartender Interaktionen mit MMF/MPA, während des Untersuchungszeitraumes pausiert.

Tab. 5: Cytomegalievirus (CMV)-Serologie der Patienten der Pharmakokinetik/Pharmakodynamik (PK/PD) Studie : „*Vergleich Pharmakokinetik und Pharmakodynamik von MPA unter EC-MPS versus MMF bei Patienten mit progressiver IgA-Nephritis*“ des Universitätsklinikum Ulm, Abteilung Innere Medizin I - Sektion Nephrologie.

Patient	1	2	3	4	5	6	7
CMV-Serologie	positiv	negativ	negativ	positiv	positiv	negativ	positiv

2.2.3.2 Die frühe Lymphozytenaktivierung ex vivo unter Einfluss von MPA

Versuchsordnung

Die Präparation der Proben für die ex vivo Untersuchungen der Patienten erfolgte in Anlehnung an das unter Abschnitt 2.2.1.1 genannte Verfahren des Early Activation Assay, und wurde je Patient und Abnahmezeitpunkt um einen zusätzlichen Arbeitsansatz, mit in vitro Zugabe von CsA der Konzentration 1 µg/ml, erweitert. Zur Beurteilung der frühen T-Zell-Aktivierung unter Einfluss einer immunsuppressiven Therapie mit Mycophenolsäure (EC-MPS/MMF) wurden somit je Patient 4 Arbeitsansätze erstellt. Der 4. Arbeitsansatz mit CsA (Probe D) diente der vergleichenden Beurteilung der Modulation der frühen T-Zell-Aktivierung durch die beiden Vertreter unterschiedlicher Klassen von Immunsuppressiva, Mycophenolsäure und Cyclosporin A.

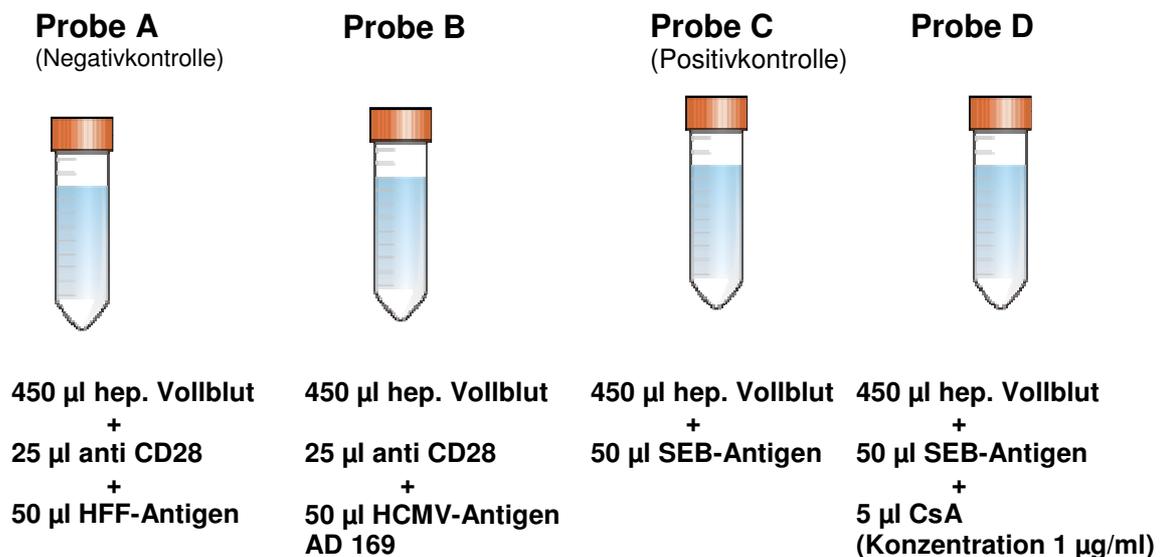


Abb. 11: Early Activation Assay. Probenpräparation zur Untersuchung der frühen T-Zell-Aktivierung ex vivo. 4 Arbeitsansätze je Patient; hep.: heparinisiert. Antigenstimulation durch Cytomegalievirus-Antigen (CMV: Probe B) u. Staphylokokken Enterotoxin B-Antigen (SEB: Proben C u. D). Negativkontrolle mit Zusatz von Humanem Vorhautfibroblasten-Antigen (HFF: Probe A). Kostimulus: Antikörper anti CD28 (Proben A u. B). Cyclosporin A (CsA) in vitro als Kontrollmedikament (Probe D).

2.2.4 Mehrkanaldurchflusszytometrie

Mithilfe des Verfahrens der Mehrkanaldurchflusszytometrie wurde im Rahmen dieser Arbeit, nach erfolgter Lymphozytenaktivierung durch Antigenstimulation, die Frequenz reaktiver TH1-Zellen als Indikator der Aktivität CD4+-T-Zellen, bestimmt. Diese Methode erlaubt eine zeitnahe Charakterisierung und Quantifizierung von Einzelzellen oder auch größeren Zellpopulationen, durch die Registrierung zellspezifischer Streulicht - und Fluoreszenzeigenschaften nach Laseranregung. Die Bezeichnung FACS steht für „Fluorescence-activated cell sorting“. Die im Folgenden gezeigten durchflusszytometrischen Untersuchungen erfolgten unter Einsatz eines FACScan Gerätes der Firma Becton & Dickinson, Heidelberg.

Das Prinzip der Messungen beruht auf der kumulativen Erfassung von Fluoreszenzintensität und Zellmorphologie von Suspensionszellen. Durch dieses Verfahren lassen sich somit Informationen über Granularität und Größe der gemessenen Zellen gewinnen. Der Einsatz von Fluoreszenzfarbstoff-markierten monoklonalen Antikörpern ermöglicht die zusätzliche Detektion der Expression von Oberflächen- und auch intrazellulären Molekülen auf Einzelzellebene. Der Vorteil dieser Methode liegt in der Isolierung von Zellpopulationen hoher Reinheitsgrade.

Nach Lösung der stimulierten und fluoreszenzmarkierten Zellen in FACS-Puffer werden diese in einem Flüssigkeitsstrom nacheinander an einem Laserstrahl vorbeigeleitet. Durch eine Erhöhung der Flussgeschwindigkeit werden die Zellen fokussiert und anschließend von einem Messlaser mit einer spezifischen Wellenlänge von 488 nm angeregt. Durch die Anregung über das Laserlicht werden Elektronen des an der Zelle gebundenen Fluorochroms auf ein höheres Energieniveau gehoben. Unter Emission der zuvor gewonnenen Energie, in Form von Photonen, gelangen die Elektronen wieder auf das ursprüngliche Niveau zurück. Die entstehende Lichtbeugung und -streuung, sowie die emittierte Fluoreszenz werden von Detektoren (Messzellen) aufgenommen und anschließend verrechnet. Zunächst wird im Bereich der Messeinheit 1 die Absorption des Lasers detektiert (FSC = Forward scatter), hieraus ergibt sich der Zelldurchmesser. Je stärker die Abschwächung des Lasers (Absorption), desto

größer ist der Durchmesser der jeweiligen Zelle, oder je kleiner und dichter die Zellen sind, desto weniger Streuung bewirken sie. Als Maß für die Größe der Zellen gilt somit die Lichtstreuung in Vorwärtsrichtung (FSC = 180°-Forward scatter). Über die Lichtstreuung im 90° Winkel (SSC = Side scatter) wird in Messzelle 2 die Granularität erfasst. Abschließend erfolgt durch einen weiteren Detektor, Messzelle 3, die Aufnahme der vom aktivierten Fluoreszenzfarbstoff ausgehenden Lichtmenge, wodurch die Färbung der Zelle durch den jeweiligen Farbstoff gemessen wird.

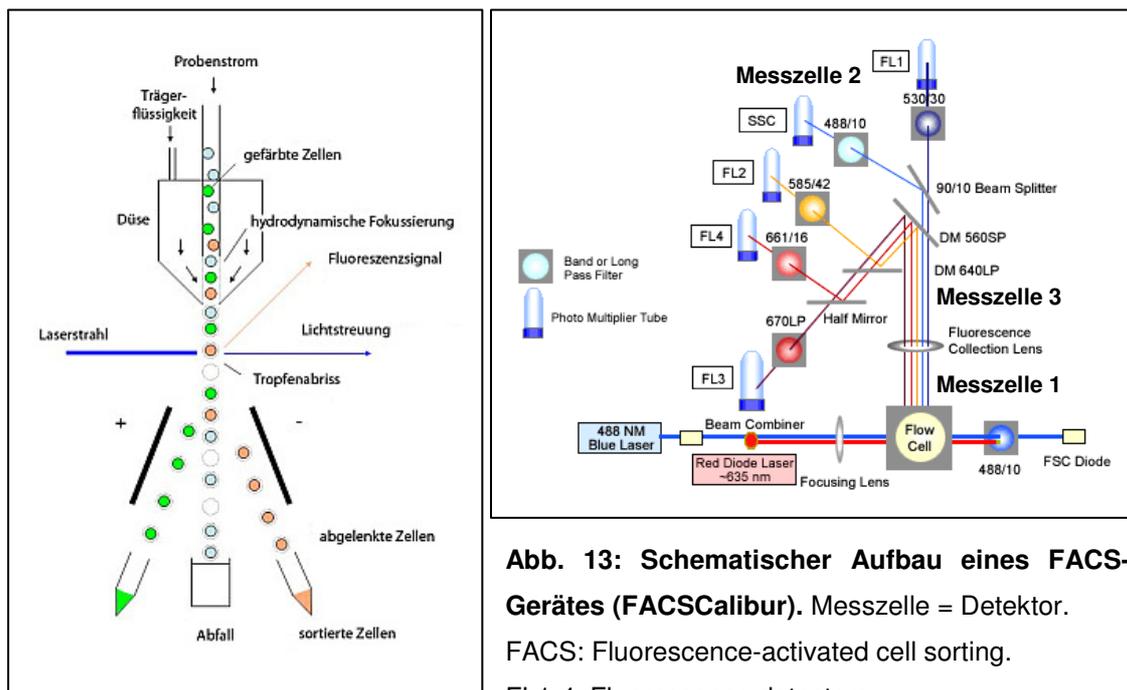


Abb. 12: Schematische Darstellung des Prinzips der Durchflusszytometrie.

Abb. 13: Schematischer Aufbau eines FACS-Gerätes (FACSCalibur). Messzelle = Detektor.

FACS: Fluorescence-activated cell sorting.

FL1-4: Fluorescence detectors.

SSC: Side scatter. FSC: Forward scatter.

Optical filters: DM 560SP, DM 640LP, 670LP.

Durch die vorhergehende Präparation der Zellen mit Fluoreszenzfarbstoffmarkierten Antikörpern lassen sich einzelne T-Zell-Subsets identifizieren, diese können anhand der Expression von Oberflächenproteinen als separate Untergruppen genauer klassifiziert werden. Aufgrund der spezifischen Eigenschaften des emittierten Lichtes (hervorgerufen durch die unterschiedliche Bindung der Antikörper) ist es somit möglich, einzelne Zellen nach zuvor festgelegten Kriterien, z.B. Oberflächenmarkerexpression, abzulenken und aufzufangen. Die an die Antikörper gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffe werden von einem Argon-Laser zur Emission von Lichtimpulsen angeregt. Die unterschiedlichen Emissionsmaxima der Fluoreszenzen (z.B. FITC 520 nm, PE 576 nm, APC 660 nm) mit ihren verschiedenen Wellenlängenbereichen bewirken,

dass über die Detektoren zwei Farbstoffe gleichzeitig gemessen werden können (Zweifarbennimmunfluoreszenz). Auch die Messung einer Dreifarbenfluoreszenz ist möglich, mit Rücksicht auf die überlappenden Emissionsbereiche der Fluoreszenzen, müssen in diesem Fall die Detektoren für die drei Fluoreszenzen gegeneinander kompensiert werden.

Die Lichtimpulse gelangen von der optischen Einheit zu einem elektronischen System, genannt Photomultiplier. Dieser übermittelt sie zur Datenauswertung an den Computer. Anschließend werden die erfassten Messdaten am Computer mithilfe einer entsprechenden Analysesoftware dargestellt.

Auswertung der Durchflusszytometrie

Die Auswertung der Messdaten durch ein FACSCalibur Gerät erfolgte mit der Analysesoftware „Cell Quest Pro“ von Becton & Dickinson. Die erfassten Daten wurden mit „Microsoft Excel“ evaluiert, und die gewonnenen Ergebnisse abschließend in Diagrammen, unter Anwendung des Programmes „OriginPro 8“ (OriginLab Corporation), abgebildet.

Für die Auswertung mithilfe der Quadrantendarstellung wurde die Fluoreszenzintensität der verschiedenen Fluoreszenz-markierten Antikörper, in separaten Quadranten, gegeneinander aufgetragen. Somit konnten Zellen erfasst werden, die negativ, einfach positiv oder doppelt positiv für die zu untersuchenden Eigenschaften – hier die Expression von Zytokinen und Aktivierungsmarkern (IFN- γ , IL-2 oder CD69), waren. Die daraus resultierenden Färbemuster der verschiedenen Zellpopulationen wurden in Zusammenschau mit den Daten über Größe (SSC) und Granularität (FSC) ausgewertet. Im Rahmen der hier vorliegenden Untersuchungen wählten wir für alle Messungen die spezifischen Einstellungen (setting) 400 FSC- Height und 200 SSC- Height. Die Selektion nach Größe und Granularität ermöglichte eine Unterscheidung der verschiedenen Leukozytensubpopulationen (Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten). Im Rahmen dieser Untersuchungen wurden nur die vitalen Lymphozyten berücksichtigt. Auch die statistische Auswertung, als sogenannte „Quadrantenstatistik“, basierte auf der Analyse der prozentualen Anteile der unterschiedlichen Fluoreszenzsignale der jeweiligen Quadranten.

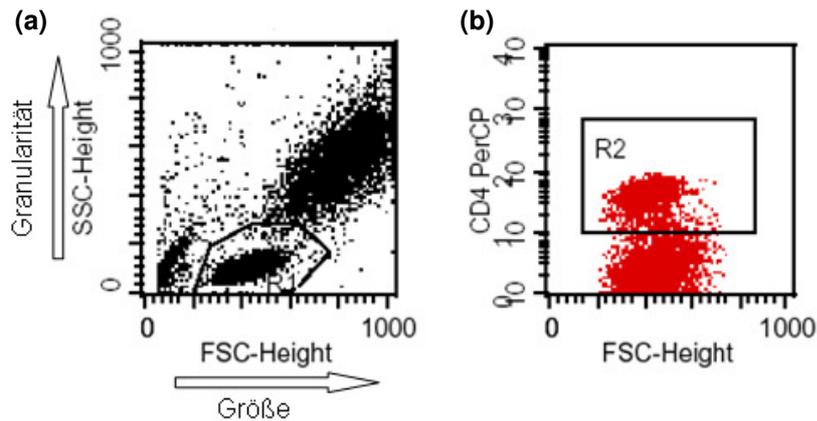


Abb. 14a (links) u. 14b (rechts): Beispiel einer durchflusszytometrischen Analyse in Form einer „dot plot“ Darstellung .

Abb. 14a: Auswahl des Messfensters (R = Region), R1 = Lymphozytenpopulation. Einstellungen FSC (Forward scatter)-Height und SSC (Side scatter)-Height zur Festlegung der Selektionskriterien Größe und Granularität der Zellen.

Abb. 14b: Definition Messfenster: R2 = CD4+-T-Zellen.

Die Abbildungen 14a und 14b zeigen als Ausschnitt einer FACS-Analyse die Darstellung der über die Durchflusszytometrie gewonnenen Daten mithilfe eines Punktwolkenhistogramms („dot plot“). Die Messpunkte wurden als sogenannte „Events“ erfasst und zweidimensional dargestellt. Je Probe wurden zehntausend Events ausgewertet. Die nach Größe (FSC) und Granularität (SSC) selektierten Zellpopulationen wurden in einzelnen Messfenstern, auch als „Regions“ (R1/R2) bezeichnet, zusammengefasst. Die Verwendung fluoreszenz-markierter Antikörper ermöglichte die Identifikation der einzelnen T-Zell-Subsets, z.B. zur Unterscheidung von CD4+ -oder CD8+-T-Zellen.

Definition der Messfenster (Regions):

R1: Lymphozytenpopulation

R2: Subpopulation CD4+-T-Zellen

Nach zusätzlicher Markierung gegen die Oberflächenproteine CD69, Interferon- γ und IL-2 (Anti- Hu-IFN- γ FITC, CD69 PE, CD4 PerCP-Cy5.5 und Anti-Hu-IL2 FITC/CD69 PE/CD4 PerCP-Cy5.5; Becton & Dickinson) durch konjugierte Fluorochrome an monoklonalen Antikörpern war es möglich, die Zellen bezüglich ihres Aktivierungsstatus zu quantifizieren. Somit erfolgte durch die Antikörperfärbung die Detektion der aktivierten T-Zell-Subsets (CD4⁺-T-Zellen) über die Erfassung ihrer Zytokin- und Aktivierungsmarkerexpression (IFN- γ , IL-2, CD69).

2.2.4.1 FACS-Analyse der in vitro Voruntersuchungen

Die Abbildungen der FACS-Analyse lassen sich in 4 Quadranten untergliedern:

Unterer linker Quadrant : T-Zell-Subpopulation (CD4⁺-Zellen)

Oberer linker Quadrant : Zellen mit Expression von CD69

Oberer rechter Quadrant : Zellen mit Expression von CD69 u. IFN- γ /CD69 u. IL-2

Unterer rechter Quadrant: Zellen mit Expression von IFN- γ u. IL-2

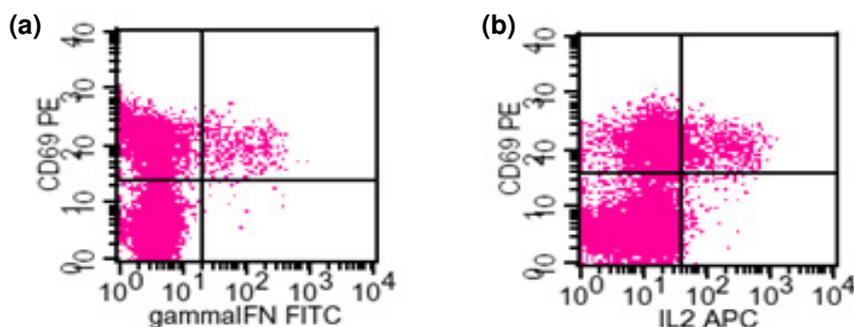


Abb. 15a (links) u. 15b (rechts): Gliederung eines durchflusszytometrischen Histogrammes nach dem Quadrantenprinzip. Darstellung anhand des Beispiels einer Staphylokokken Enterotoxin B (SEB)-Antigen-stimulierten Probe eines Gesunden. Einteilung der Abbildungen in jeweils vier Quadranten. Messung des Aktivierungsmarkers CD69 u. der Zytokine Interferon-gamma (IFN- γ), Interleukin-2 (IL-2).

Abb. 15a: Messung der Markerkombination CD69 IFN- γ im rechten oberen Quadranten.

Abb. 15b: Messung der Markerkombination CD69 IL-2 im rechten oberen Quadranten.

Die 3 Quadranten „rechter oberer Quadrant“, „rechter unterer Quadrant“ und „linker unterer Quadrant“ sind den T-Zell-Subsets CD4⁺-T-Zellen zugeordnet, die jeweils einen der Marker (CD 69, IFN- γ oder IL-2) exprimieren, wohingegen der

„linke obere Quadrant“ die T-Zell-Subpopulationen CD4⁺-T-Zellen erfasst, die durch zwei Marker gleichzeitig charakterisiert wird (z.B. CD 69⁺/IFN- γ ⁺ oder CD 69⁺/IL2⁺). Die Zellen werden durch das Quadrantenprinzip anhand ihrer Marker- und Zytokinexpression selektiert, und konsekutiv in negative, einfach positive und doppelt positive T-Zell-Subsets bezüglich dieser Merkmale eingeteilt und quantitativ gemessen. Die folgende Abbildung 16 zeigt in der Übersicht eine Darstellung der durchflusszytometrischen Auswertung der frühen T-Zell-Aktivierung, am Beispiel der Proben eines gesunden Probanden, nach Stimulation durch drei verschiedene Antigene.

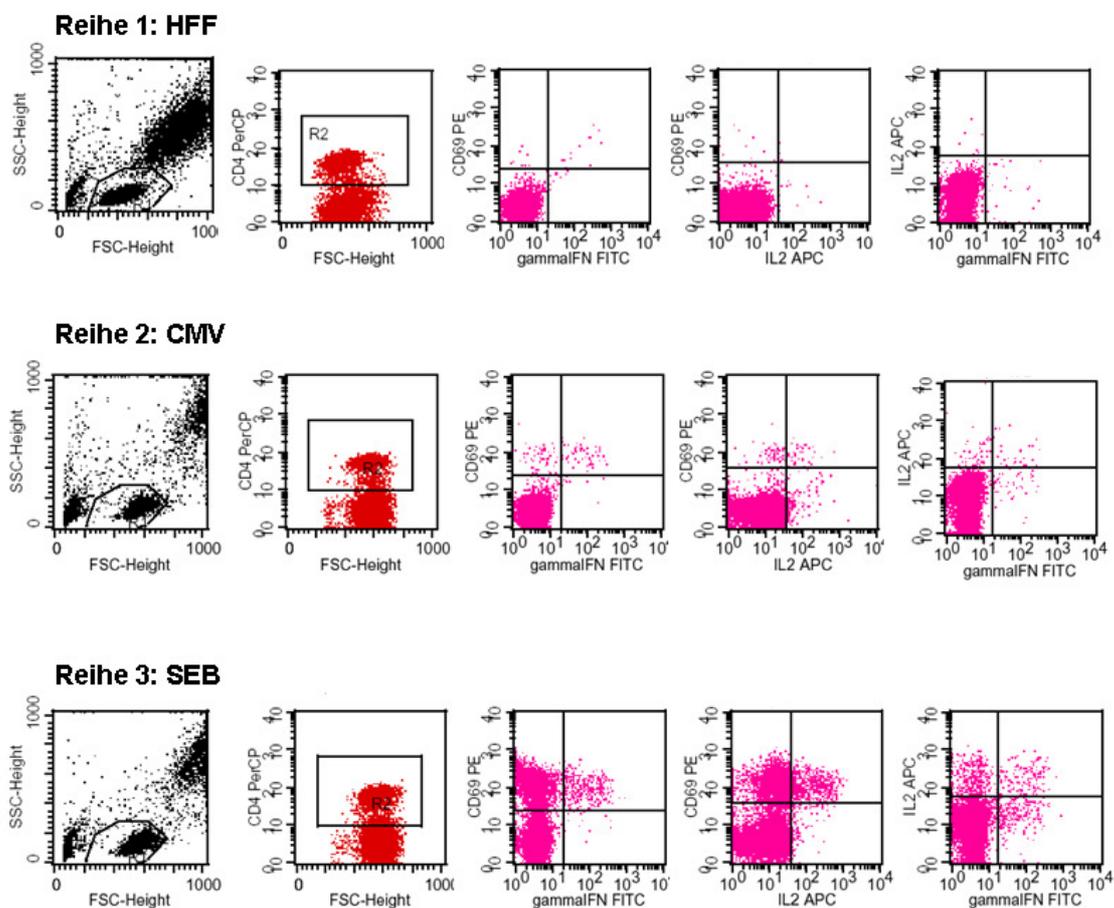


Abb. 16: Übersicht der durchflusszytometrischen Analyse der frühen Lymphozytenaktivierung nach Stimulation durch verschiedene Antigene am Beispiel eines gesunden Probanden. Es wurde jeweils die Expression der Marker CD69, Interferon-gamma (IFN- γ) und/oder Interleukin-2 (IL-2) durch CD4⁺-Zellen erfasst.

Reihe 1: Nicht-stimulierte Probe unter Zusatz von Humanem Fibroblasten-Antigen (HFF).

Reihe 2: Stimulation der Zellen mit Cytomegalievirus (CMV)-Antigen.

Reihe 3: Staphylokokken Enterotoxin B (SEB)-Antigen-stimulierte Probe.

2.2.4.2 Durchflusszytometrische Evaluation der in vitro Untersuchungen

Zur quantitativen Messung der frühen T-Zell-Aktivierung wurden die funktionell relevanten Zellpopulationen, repräsentiert durch den Anteil der CD69+- und der CD69+/IFN- γ + - CD4-positiven-Zellen, erfasst. Der durch das Durchflusszytometer erstellten Datentabelle wurden die prozentualen Messwerte für die Evaluation entnommen. Die spezifische Antwort der Zellen auf den jeweiligen Stimulus resultierte aus den einzelnen Nettowerten für jeden Marker. Diese berechneten sich aus den Mittelwerten der Messwerte nach Stimulation abzüglich der unstimulierten Kontrolle. Als 100% - Referenzwert wurde die SEB-stimulierte Probe ohne Medikamentenzusatz definiert.

Die Gesamtanalyse setzte sich aus den relativen Nettowerten der einzelnen untersuchten Proben eines Probanden zusammen. Die Verwendung der relativen Nettowerte ermöglichte die Kumulation aller Untersuchungen. Anhand der folgenden Formel wurden die jeweiligen Endergebnisdaten berechnet. Diese Ausführungen und die nachfolgende Formel beziehen sich auf die Auswertung der Messergebnisse der in vitro Untersuchungen. In Bezug auf die Ergebnisse der ex vivo Untersuchungen dieser Arbeit erfolgte die Auswertung in einer etwas abgewandelten Form, die im Weiteren noch unter Abschnitt 2.2.4.4 erläutert wird. Die Endergebnisse aus den Messwerten berechneten sich nach folgender Formel, wobei der Leerwert jeweils einer Probe ohne Medikamentenzusatz entspricht:

$$\frac{\text{(Stimulierte (CMV oder SEB) Probe X – Negativkontrolle (HFF-Wert) Probe X)}}{\text{(Leerwert stimulierte Probe X – Negativkontrolle (HFF-Wert) des Leerwertes)}} = \text{Anteil der reaktiven TH1-Zellen an der Gesamtpopulation CD4+- Zellen (\%)}$$

2.2.4.3 FACS-Analyse der ex vivo Untersuchungen

Die Analyse der Patienten-Proben im Rahmen der ex vivo Untersuchungen erfolgte ebenso mithilfe der Mehrkanal-Durchflusszytometrie. In diesem Fall wurde ein Messfenster R3 im Vorfeld bestimmt, das jeweils den Anteil reaktiver TH1-Zellen an der gemessenen Population CD4+-Zellen erfasste, die die gesuchten Marker in Kombination (CD69 und IFN- γ) exprimierten. Im Gegensatz zu den in vitro Untersuchungen wurde in diesem Fall bewusst nur die Markerkombination CD69 IFN- γ , als Repräsentant der frühen T-Zell-Aktivierung, gewählt.

Durch die folgende Abbildung 17 eines Übersichtsausschnittes der FACS-Analyse einer Patienten-Probe wird die Gliederung der Histogramme zur Auswertung der ex vivo Untersuchungen veranschaulicht. Die Reihen 1-3 zeigen die Stimulation der Patienten-Probe mit drei unterschiedlichen Antigenen (HFF, CMV oder SEB). Die beiden Histogramme a und b jeder Reihe beinhalten jeweils die Geräteeinstellung mit Bestimmung von SSC- und FSC-Height, sowie die Definition der Messfenster R1 und R2. Die Histogramme c und d zeigen die durchflusszytometrische Messung für Abnahmezeitpunkt 1 und 2 am Beispiel dieses Patienten. Die durch die drei Messfenster (Regions) erfassten T-Zell-Subsets untergliedern sich wie folgt:

Definition der Messfenster (Regions):

R1= Lymphozytenpopulation

R2= Subpopulation CD4+-Zellen

R3= Subpopulation der reaktiven TH1-Zellen als Anteil der CD4+-Zellen, die die Marker CD 69 und IFN- γ (in Kombination) exprimieren

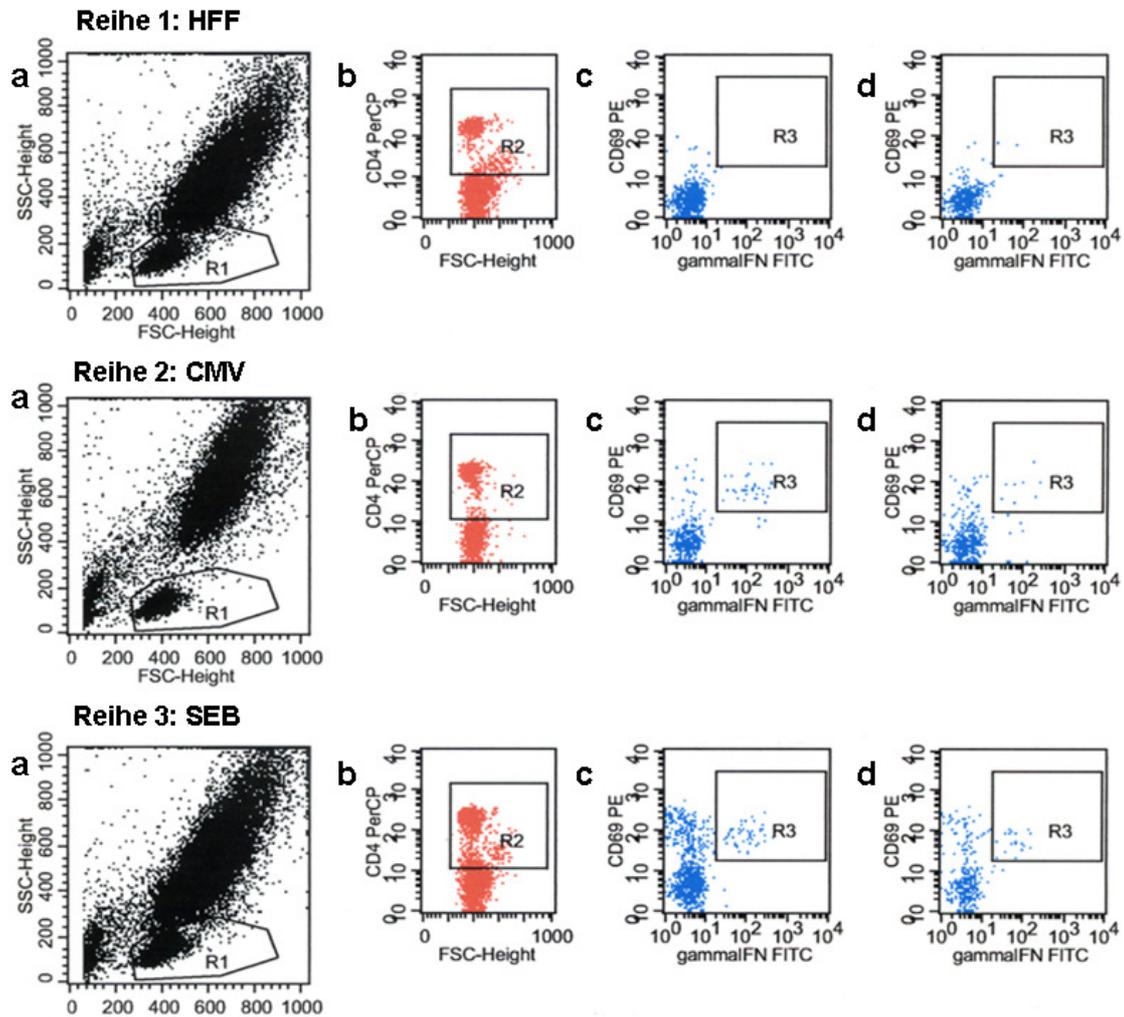


Abb. 17: Übersicht eines Ausschnittes der durchflusszytometrischen (FACS) Analyse der frühen Lymphozytenaktivierung eines Patienten nach Stimulation durch verschiedene Antigene. Die Abbildungen a u. b zeigen jeweils die Einstellungen der Messfenster (R = Regions: R1 u. R2). R3 in den Abbildungen c u. d beinhaltet das an zwei separaten Untersuchungszeitpunkten (c u. d) gemessene T-Zell-Subset, das die gesuchte Markerkombination CD69 Interferon-gamma (CD69 IFN- γ) exprimiert.

Reihe 1: Nicht-stimulierte Probe unter Zusatz von Humanem Vorhautfibroblasten-Antigen (HFF-Negativkontrolle).

Reihe 2: Stimulation der Zellen mit Cytomegalievirus (CMV)-Antigen. Messung der Expression der Markerkombination CD69 IFN- γ durch den Anteil der reaktiven Typ 1-T-Helferzellen (TH1-Zellen).

Reihe 3: Staphylokokken Enterotoxin B (SEB)-Antigen-stimulierte Probe als Positivkontrolle. Messung der Expression der Markerkombination CD69 IFN- γ durch den Anteil der reaktiven TH1-Zellen.

2.2.4.4 Durchflusszytometrische Evaluation der ex vivo Untersuchungen

Für die ex vivo Untersuchungen wurden ausschließlich die Aktivierungsmarker CD69 und IFN- γ untersucht. Diese Markerkombination wurde jeweils zu acht Messzeitpunkten für CMV, SEB und SEB_{CsA} (Subpopulation der CsA-behandelten SEB-reaktiven Zellen) separat bestimmt. Zur Evaluation wurde den Datentabellen der Histogramme jeweils der Wert R3 % Gated (siehe Markierung Abbildungen 18a u. b) des Messfensters R3 zum entsprechenden Messzeitpunkt (1-8) entnommen. Der gesuchte Anteil der reaktiven TH1-Zellen in Prozent wurde, mithilfe der im nächsten Abschnitt gezeigten Formel, ermittelt.

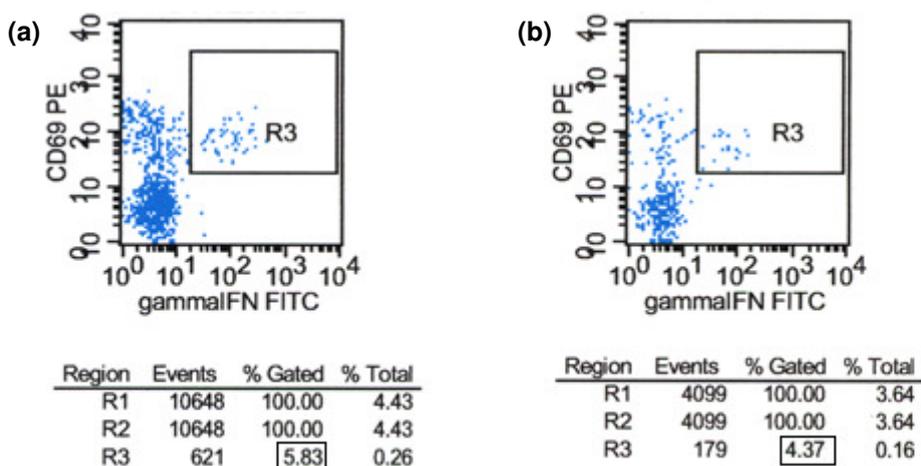


Abb. 18a (links) u. 18b (rechts): Ausschnitt einer durchflusszytometrischen (FACS) Analyse der frühen Lymphozytenaktivierung einer Staphylokokken Enterotoxin B (SEB)-Antigen-stimulierten Patienten-Probe unter Therapie mit Mycophenolsäure. Beispiel-Histogramme zu den Abnahmezeitpunkten 1 (links: 0h) u. 2 (rechts: 0,5 h), h entspricht Zeitintervall (Stunden) nach Einnahme der Studienmedikation. Die untersuchte Markerkombination CD69 Interferon-gamma (CD69 IFN- γ) wurde in Messfenster R3 erfasst. Die relevanten Messdaten der gesuchten T-Zell-Subpopulation sind durch einen Rahmen markiert.

Die im Rahmen der Diagramme unter Abschnitt 3.2 gezeigten Ergebnisdaten der ex vivo Untersuchungen an Patienten-Proben der PK/PD-Studie wurden nach folgender Formel berechnet:

Stimulierte Probe (CMV, SEB, SEB_{CSA}) – **Nichtstimulierte Probe** (HFF-Wert)

=

Anteil der reaktiven TH1-Zellen (CMV- oder SEB-) **in %**

(bezogen auf die Gesamtpopulation der gemessenen CD4+-Zellen)

2.2.5 Ergänzende Untersuchungen zu PK/PD von MPA

Bestimmung von MPA-, MPAG-Plasmaspiegel u. IMPDH Aktivität

Die MPA- und MPA-Glucuronid (MPAG)-Konzentrationen im Blut der Patienten der cross-over Studie wurden in der Abteilung für Klinische Chemie des Universitätsklinikums Ulm, mithilfe eines EMIT Assays, bestimmt. Hierfür wurden die zu den 8 Untersuchungszeitpunkten je Untersuchungstag gewonnenen heparinisierten Vollblut-Proben der Patienten zunächst 20 Minuten zentrifugiert (4000 g), im Anschluss wurde der Plasmaanteil separiert, und bei -20°C bis zur Analyse eingefroren. Die Erfassung der Plasmaspiegel von MPA und MPAG erfolgte durch das Verfahren der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie - HPLC („High Performance Liquid Chromatography“). Der untere Grenzwert der Messungen für Mycophenolat (MPA) betrug 0,2 µg/ml und für das Glucuronid (MPAG) 0,5 µg/ml.

Die Bestimmung der IMPDH Aktivität aus lysierten PBMCs der Patienten-Proben erfolgte über die Methode der HPLC, und wurde mit freundlicher Unterstützung durch das Nephrologische Labor der Charité-Universitätsmedizin Berlin durchgeführt.

2.2.6 Bestimmung der IC50 der Immunsuppressiva

Die in der Pharmakologie etablierte Bezeichnung der IC50 als mittlere inhibitorische Konzentration gibt die Konzentration eines Pharmakons wieder, die in vitro zu einer halbmaximalen Hemmung führt. Die IC50 beschreibt somit die Wirkstärke eines Antagonisten. Im Hinblick auf die Enzymkinetik wird die Medikamentenkonzentration bestimmt, unter der die Enzymaktivität auf die Hälfte reduziert wird.

Die IC50 der Immunsuppressiva CsA und MMF wurde anhand oben genannter in vitro Untersuchungen (siehe unter 2.2.2 Abschnitte 2.2.2.1 u. 2.2.2.2) ermittelt. Die Bestimmung erfolgte anhand des Kurvenverlaufs der im nächsten Kapitel unter 3.1.1 und 3.1.2 gezeigten Diagramme. Hierfür wurde der dem 50%-Wert der Ordinate zugeordnete Datenpunkt der logarithmisch skalierten Abszisse, durch Erstellen einer Geraden, abgelesen. Unter Berücksichtigung des jeweiligen Antigenstimulus (CMV oder SEB) sollte die IC50 für die Markerkombinationen CD 69 IFN- γ , CD 69 IL-2 und IL-2 IFN- γ , getrennt für jedes Pharmakon (CsA/MMF), bestimmt werden.

2.2.7 Statistische Auswertung

2.2.7.1 Graphische Darstellung der Ergebnisse

Die Darstellung der Ergebnisse erfolgte in Form verschiedener Diagramm-Arten, wie Linien-, Punkt- und Kurven-Diagramme.

2.2.7.2 Wilcoxon-Test (nichtparametrischer-Test)

Im Rahmen der statistischen Auswertung der Daten zu den Patienten der PK/PD Studie wurde der Wilcoxon-Test angewandt. Der Wilcoxon-Test stellt eine multiple Rangvarianzanalyse dar. Als analoger Rangtest resultiert durch ihn der Vergleich zweier verbundener Variablen, ohne einer Normalverteilung zu bedürfen. Der Vorteil liegt in der kombinierten Bestimmung von Richtung und Höhe der Differenzen gepaarter Stichproben.

Durch Zufallszahlen wurden im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen $n = 7$ Patienten mit progredienter IgAN randomisiert der Sequenz MMF=>EC-MPS oder EC-MPS=>MMF zugeordnet. Die pharmakokinetischen und klinischen Daten wurden durch den Wilcoxon-Test verglichen und auf statistische Signifikanz überprüft. Mit Hilfe der Randomisierung sollten grobe Einflüsse durch Wechselwirkungen aufgezeigt werden. P wurde bei einseitiger Fragestellung < 0.05 als Signifikanzgrenze für festgestellte Unterschiede gewählt, im Falle offener Fragen erfolgte bei gleichem Signifikanz-Niveau von $P < 0.05$ ein zweiseitiger Test. Somit ermöglichte der Wilcoxon-Test eine Aussage darüber, zwischen welchen gemittelten Messwerten ein signifikanter Unterschied besteht. Bei nicht signifikanten Unterschieden bezüglich der klinischen Parameter war dies im Sinne der Hypothese schon ein aussagekräftiges Ergebnis, da zumindest in der Dosis und Pharmakokinetik Unterschiede zwischen EC-MPS und MMF angenommen werden mussten. Zur Stützung dieser Aussage wurde ein gepaartes Studiendesign ausgewählt.

3. Ergebnisse

3.1 Ergebnisse der in vitro Untersuchungen

3.1.1 Einfluss des Calcineurin-Inhibitors Cyclosporin A auf die frühe T-Zell-Aktivierung in vitro

Das folgende Diagramm zeigt die Mittelwerte der Ergebnisse die durch drei unabhängige Versuchsreihen, nach Stimulation der frühen T-Zell-Aktivierung durch SEB-Antigen, bestätigt wurden.

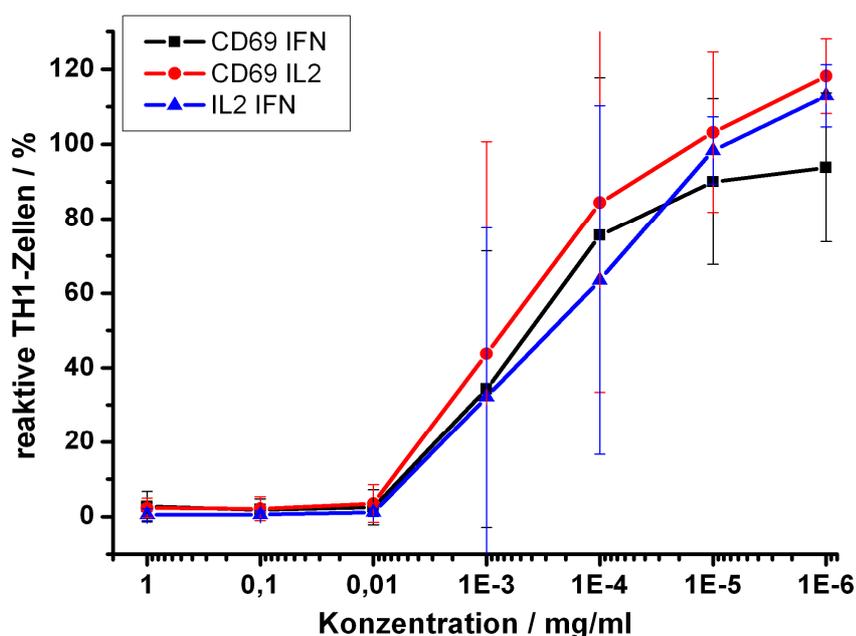


Abb. 19: Modulation der frühen Lymphozytenaktivierung CD4+-T-Zellen bei Gesunden in vitro, in Abhängigkeit der Medikamentenkonzentration von Cyclosporin A (CsA). Antigenstimulation der T-Zell-Aktivierung durch Staphylokokken Enterotoxin B (SEB)-Antigen. Darstellung der Mittelwerte der Ergebnisse mit Standardabweichung u. Fehlerbalken. Anzahl der Versuchsreihen n = 3. Abbildung der Ergebnisse getrennt nach untersuchter Kombination aus Aktivierungsmarker (CD69) und/oder Zytokinen (Interleukin-2: IL2, Interferon-gamma: IFN).

Unter Einfluss von Cyclosporin A kam es in einem Konzentrationsbereich zwischen 1 mg/ml und 10 µg/ml CsA zu einer vollständigen Hemmung der Expression des Aktivierungsmarkers CD69 sowie der Zytokine Interferon-γ und IL-2. Die Kontrollprobe ohne Medikamentenzusatz zeigte, nach identischer Stimulation der Zellen, eine Expression aller drei Markerkombinationen von 100 Prozent. Die Phase der kompletten Inhibition der frühen T-Zell-Aktivierung konnte im Rahmen der jeweiligen drei Einzeluntersuchungen, für den Konzentrationsbereich von CsA zwischen 1 mg/ml und 10 µg/ml, reproduziert werden. Die durch CsA erzeugte Hemmung der Lymphozytenaktivierung in vitro stellte sich somit konzentrationsabhängig dar.

Die $IC_{50_{CsASEB}}$ der drei Markerkombinationen wurde jeweils im Nanogramm-Bereich, zwischen 270 ng/ml für IL-2 IFN-γ, 420 ng/ml für CD69 IFN-γ und 720 ng/ml für CD69 IL-2, ermittelt. Für die Kombination aus zwei Zytokinen (IL-2 IFN-γ) war entsprechend der IC_{50} der stärkste hemmende Effekt durch CsA zu beobachten.

Der Calcineurin-Inhibitor Cyclosporin A zeigt damit eine konzentrationsabhängige hemmende Wirkung auf die Expression früher Aktivierungsmarker und Zytokine von TH1-Zellen.

Die folgende Abbildung zeigt die Mittelwerte der Ergebnisse zweier Versuchsreihen, nach Stimulation der frühen T-Zell-Aktivierung durch CMV-Antigen.

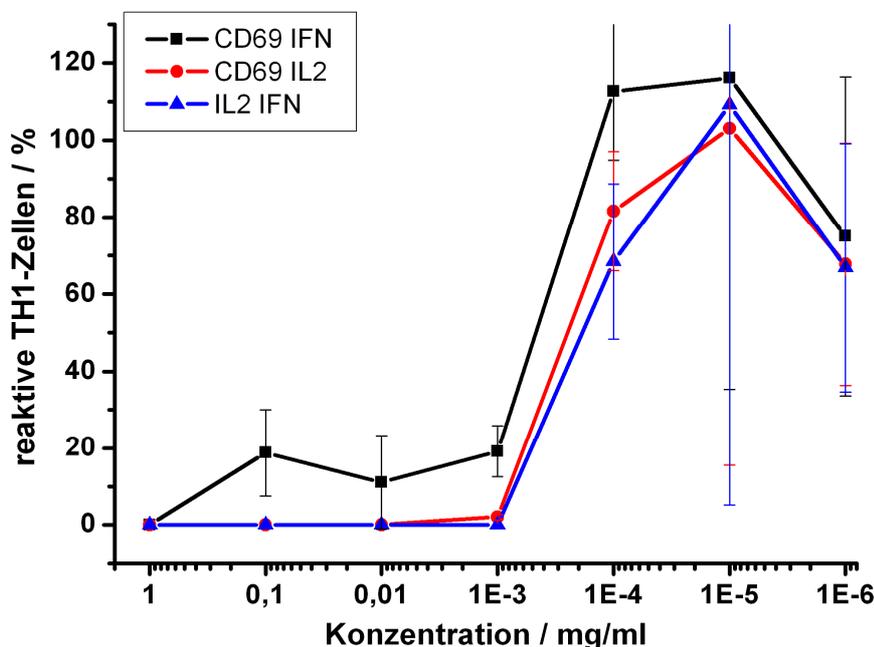


Abb. 20: Modulation der frühen Lymphozytenaktivierung CD4⁺-T-Zellen bei Gesunden in vitro, in Abhängigkeit der Medikamentenkonzentration von Cyclosporin A (CsA). Antigenstimulation der T-Zell-Aktivierung durch Cytomegalievirus (CMV)-Antigen. Darstellung der Mittelwerte der Ergebnisse mit Standardabweichung u. Fehlerbalken. Anzahl der Versuchsreihen n = 2. Abbildung der Ergebnisse getrennt nach untersuchter Kombination aus Aktivierungsmarker (CD69) und/oder Zytokinen (Interleukin-2: IL2, Interferon-gamma: IFN).

In Analogie zu SEB kam es nach spezifischer Stimulation der frühen T-Zell-Aktivierung mit CMV-Antigen, unter Einfluss von CsA, zu einer dosisabhängigen vollständigen Expressionshemmung von IL-2 IFN- γ und CD69 IL-2 im Bereich der Konzentrationsstufen zwischen 1 mg/ml und 1 μ g/ml. Die Expression der Markerkombination CD69 IFN- γ zeigte sich nur im Bereich der höchsten hier untersuchten Titrationsstufe von 1 mg/ml CsA komplett gehemmt. Der weitere Kurvenverlauf liess ein insgesamt höheres Aktivitätsniveau der TH1-Zellen dieser Markerkombination, im Vergleich zu den anderen erfassten Markerkombinationen, beobachten. Der inhibitorische Effekt von CsA wurde, unter Berücksichtigung der vorhergehend gezeigten Untersuchungen, nicht durch die Wahl des jeweiligen stimulierenden Antigens - SEB oder CMV - beeinflusst.

Die $IC_{50_{CsACMV}}$ lag für die drei Markerkombinationen jeweils im Nanogramm-Bereich, zwischen 190 ng/ml und 490 ng/ml ($IC_{50_{CsACMV}}$ IL-2 IFN- γ : 190 ng/ml, $IC_{50_{CsACMV}}$ CD69 IL-2: 260 ng/ml, $IC_{50_{CsACMV}}$ CD69 IFN- γ : 490 ng/ml). Auch im Rahmen dieser Untersuchungen wirkte CsA am stärksten inhibitorisch auf die Markerkombination bestehend aus den beiden Zytokinen IL-2 und IFN- γ , für diese Kombination wurde die niedrigste IC_{50} bestimmt.

Der konzentrationsabhängige inhibitorische Effekt von CsA auf die Marker der frühen T-Zell-Aktivierung konnte im Rahmen dieser Untersuchung bestätigt werden.

3.1.2 Einfluss des DNA-Synthesehemmers Mycophenolat Mofetil auf die frühe T-Zell-Aktivierung in vitro

Das folgende Diagramm zeigt die Ergebnisse der in vitro Untersuchungen zweier Untersuchungsreihen, nach Stimulation mit SEB-Antigen.

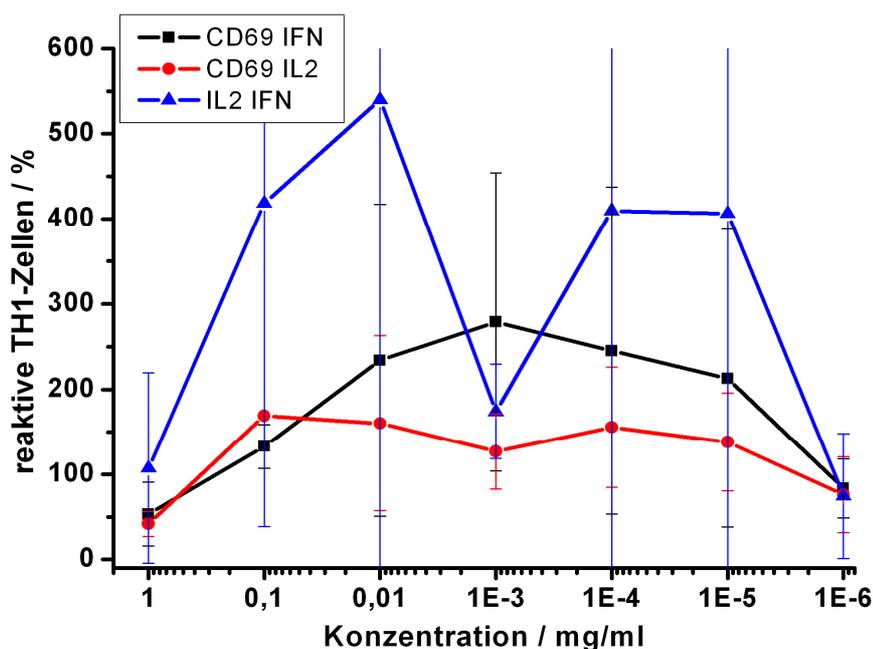


Abb. 21: Modulation der frühen Lymphozytenaktivierung CD4+-T-Zellen bei Gesunden in vitro, in Abhängigkeit der Medikamentenkonzentration von Mycophenolat Mofetil (MMF). Antigenstimulation der T-Zell-Aktivierung durch Staphylokokken Enterotoxin B (SEB)-Antigen. Darstellung der Mittelwerte der Ergebnisse mit Standardabweichung u. Fehlerbalken. Anzahl der Versuchsreihen n = 2. Abbildung der Ergebnisse getrennt nach untersuchter Kombination aus Aktivierungsmarker (CD69) und/oder Zytokinen (Interleukin-2: IL2, Interferon-gamma: IFN).

Die durch SEB-Antigen stimulierten Zellen zeigten unter Zugabe von MMF bezüglich der Subpopulation der SEB-reaktiven TH1-Zellen, die den Aktivierungsmarker CD69 und/oder die Zytokine IFN- γ bzw. IL-2 exprimierten, keine signifikante Hemmung ihrer Aktivität. Die maximale Inhibition (I_{max}) lag für alle drei Markerkombinationen im Bereich toxischer Konzentrationen von MMF (≥ 1 mg/ml). Nach Unterschreiten des toxischen Bereiches von 1 mg/ml fiel die spezifische Aktivität der reaktiven TH1-Zellen, für alle hier untersuchten Medikamentenkonzentrationen von MMF, nicht signifikant unter 100 Prozent. Die Kurvenverläufe im Bereich des Vielfachen des Referenzwertes ließen keine

Bestimmung der $IC_{50_{MMFSEB}}$ für die untersuchten Markerkombinationen zu. Im Bereich der hier gezeigten niedrigsten Titrationsstufe von 1 ng/ml MMF konnte für die erfassten TH1-Zellen aller drei Markerkombinationen eine Aktivität über 100 Prozent beobachtet werden. Anhand dieser Voruntersuchungen liess sich bereits keine konzentrationsabhängige Wirkung von MMF auf die frühe T-Zell-Aktivierung nachweisen.

Die folgende Abbildung zeigt die Mittelwerte der Ergebnisse zweier unabhängiger Versuchsreihen, nach Stimulation mit CMV-Antigen.

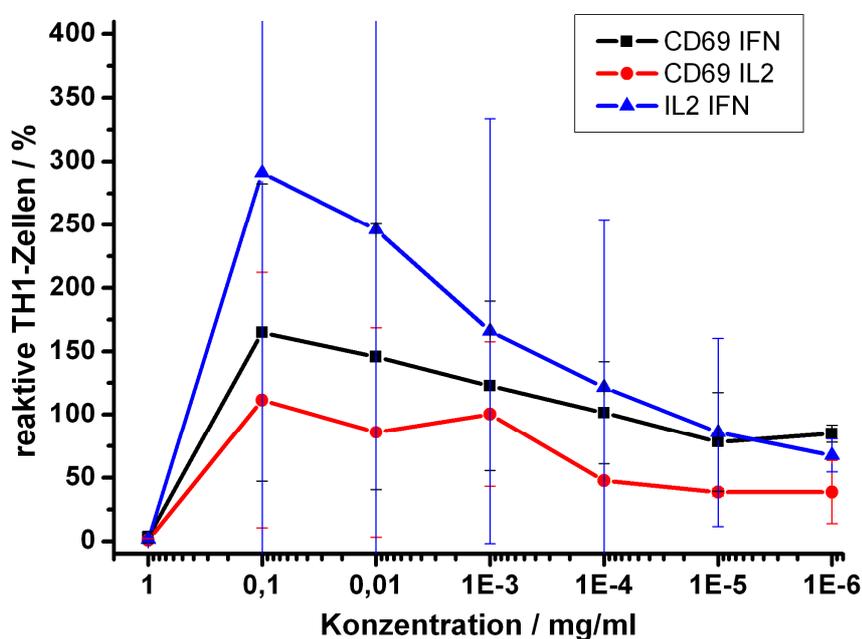


Abb. 22: Modulation der frühen Lymphozytenaktivierung CD4+-T-Zellen bei Gesunden in vitro, in Abhängigkeit der Medikamentenkonzentration von Mycophenolat Mofetil (MMF). Antigenstimulation der T-Zell-Aktivierung durch Cytomegalievirus (CMV)-Antigen. Darstellung der Mittelwerte der Ergebnisse mit Standardabweichung u. Fehlerbalken. Anzahl der Versuchsreihen $n = 2$. Abbildung der Ergebnisse getrennt nach untersuchter Kombination aus Aktivierungsmarker (CD69) und/oder Zytokinen (Interleukin-2: IL2, Interferon-gamma: IFN).

Auch nach spezifischer Stimulation mit CMV-Antigen führte MMF nicht zur Hemmung früher Aktivierungsmarker (CD69, IFN- γ und IL-2). Nur im Bereich toxischer Konzentrationen von 1mg/ml MMF liess sich eine vollständige Inhibition aller drei Markerkombinationen beobachten. Dies entsprach im Rahmen dieser Versuchsreihe auch der Konzentration der maximalen Hemmung (I_{max}). Nach Unterschreiten toxischer Konzentrationen < 1 mg/ml MMF kam es zunächst sogar

zu einer gesteigerten Expression der TH1-Zellaktivität auf Werte über 100 Prozent. Damit verfügt MMF, im Vergleich zu dem Calcineurin-Inhibitor CsA, über keine hemmende Wirkung auf die frühe Aktivierungsphase von TH1-Zellen und deren Markerexpression.

3.2 Ergebnisse der ex vivo Untersuchungen

Die unter diesem Abschnitt gezeigten Diagramme beinhalten die Ergebnisdaten zur Modulation der frühen Lymphozytenaktivierung ex vivo, unter einer Therapie mit Mycophenolsäure, bei Patienten mit IgA-Nephropathie. Die Ergebnisse basieren auf durchflusszytometrischen Analysen des „Early Activation Assay“ von Vollblut-Proben des Patientenkollektivs der PK/PD Studie. Insgesamt gingen in die Auswertung die Daten von 7 Patienten aus 112 Messereignissen ($n = 112$) ein. Die Probengewinnung erfolgte an zwei voneinander unabhängigen Untersuchungstagen. Jeder Untersuchungstag umfasste jeweils acht definierte Untersuchungszeitpunkte pro Patient. Die Untersuchungszeitpunkte beziehen sich auf die Zeiteinheit Stunden nach Einnahme der Studienmedikation (1 = 0; 2 = 0,5; 3 = 1; 4 = 2; 5 = 4; 6 = 6; 7 = 8; 8 = 12 Stunden).

3.2.1 Exemplarische Darstellung CMV – seropositiver Patienten

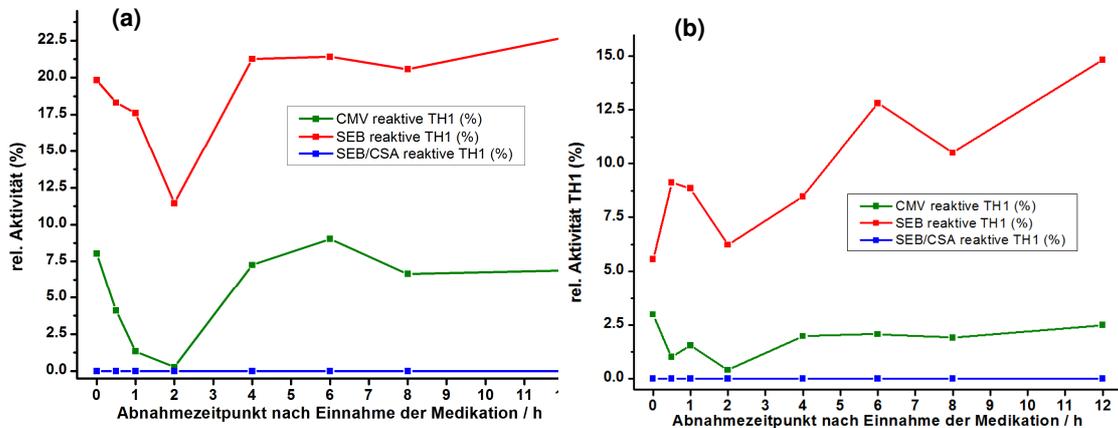


Abb. 23a u. 23b: Patient 4; Cytomegalievirus (CMV)-seropositiv: Frühe T-Zell-Aktivierung unter Einfluss von Mycophenolat Mofetil (MMF)/magensaftresistentem Natrium-Mycophenolat (EC-MPS) ex vivo, gemessen als Reaktivität antigenstimulierter Typ1-T-Helferzellen (TH1-Zellen) zu 8 Untersuchungszeitpunkten (h), dargestellt anhand des CMV-reaktiven TH1-Zell-Subsets (grün) u. des Staphylokokken Enterotoxin B (SEB)-reaktiven TH1-Zell-Subsets (rot). Vergleichsmedikament Cyclosporin A (CsA) in vitro (blau). Abb. 23a: Tag 1 (MMF); Abb. 23b: Tag 2 (EC-MPS).

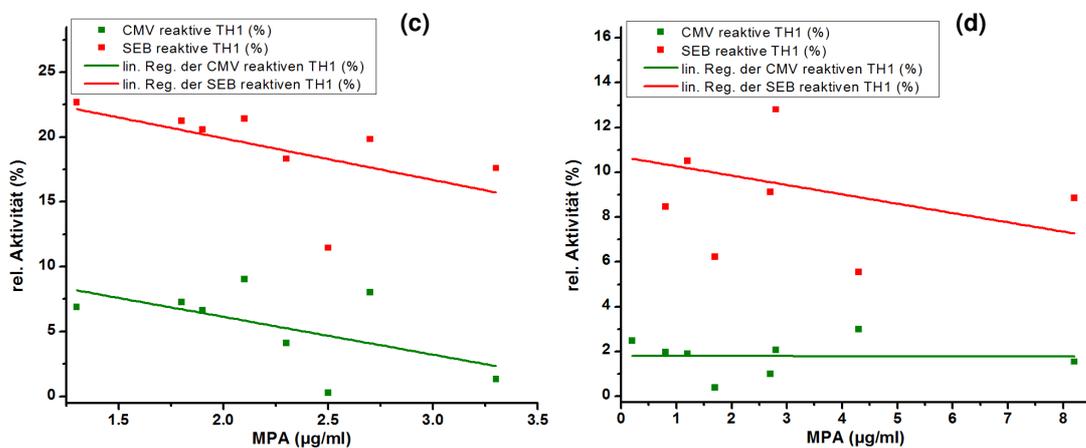


Abb. 23c u. 23d: Patient 4; Cytomegalievirus (CMV)-seropositiv: Lineare Regressionsanalysen der Parameter frühe TH1-Zell-Aktivität (Ordinate: relative Aktivität in %) und Mycophenolsäure (MPA)-Plasmaspiegel (Abszisse: in µg/ml). Separate Darstellung nach Antigenstimulus u. Untersuchungstag. rot = Staphylokokken Enterotoxin B (SEB)-reaktives TH1-Zell-Subset, grün = CMV-reaktives TH1-Zell-Subset. Abb. 23c: Tag 1 Mycophenolat Mofetil (MMF); Abb. 23d: Tag 2 magensaftresistentes Natrium-Mycophenolat (EC-MPS).

Auch ex vivo konnten weder MMF noch EC-MPS die Aktivierung von TH1-Zellen hemmen. Anhand der Abbildungen 23a und 23b wird zudem die unterschiedliche Wirkpotenz der beiden verwendeten Antigenstimuli gezeigt. In seiner Eigenschaft als Superantigen verfügt SEB, im Vergleich zu CMV-Antigen, über eine deutlich stärkere Stimulationspotenz bezüglich der reaktiven TH1-Zell-Subsets.

Die Reaktivität der untersuchten SEB- oder CMV-reaktiven TH1-Zell-Subpopulationen korrelierte nicht mit den zeitlich bestimmten MPA-Plasmaspiegeln. Dies konnte unabhängig von der Darreichungsform der Mycophenolsäure (EC-MPS oder MMF) und vom eingesetzten Antigenstimulus, für beide Untersuchungstage, bestätigt werden.

IMPDH Aktivität und MPA-Plasmaspiegel

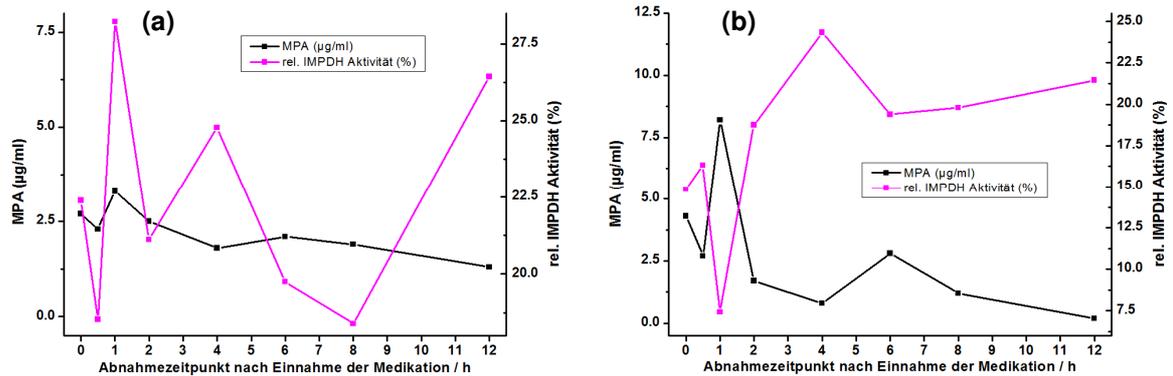


Abb. 24a u. 24b: Patient 4; Cytomegalievirus (CMV)-seropositiv: Darstellung des pharmakodynamischen Parameters Inosin 5'-Monophosphat-Dehydrogenase (IMPDH) Aktivität (magenta Kurven: relative Aktivität in %) in Abhängigkeit des Mycophenolsäure (MPA)-Plasmaspiegels (schwarze Kurven: µg/ml) zu 8 Untersuchungszeitpunkten (h). Abb. 24a: Untersuchungstag 1 Mycophenolat Mofetil (MMF); Abb. 24b: Untersuchungstag 2 magensaftresistentes Natrium-Mycophenolat (EC-MPS).

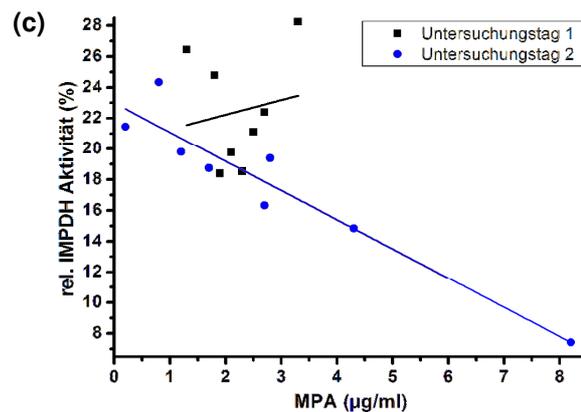


Abb. 24c: Patient 4; Cytomegalievirus (CMV)-seropositiv: Lineare Regressionsanalyse der Parameter Inosin 5'-Monophosphat-Dehydrogenase (IMPDH) Aktivität (Ordinate: relative Aktivität in %) u. Mycophenolsäure (MPA)-Plasmaspiegel (Abszisse: µg/ml) zu 8 Untersuchungszeitpunkten. Getrennte Darstellung nach Untersuchungstag; Tag 1 Mycophenolat Mofetil (MMF) = schwarz, Tag 2 magensaftresistentes Natrium-Mycophenolat (EC-MPS) = blau.

Als funktionelle Kontrolluntersuchung für die Aktivität von MPA wurde die IMPDH Aktivität mituntersucht, bei der eine funktionell typische Korrelation der quantitativen Werte nachgewiesen werden konnte. Die beiden Parameter zeigten ein inverses Verhalten zueinander, eine Abnahme des MPA-Plasmaspiegels liess eine Zunahme der IMPDH Aktivität beobachten. Dies erklärt sich durch die Wirkung von MPA über die Hemmung des Zielenzym IMPDH.

3.2.2 CMV - positives Patientenkollektiv (Patienten 1,5 u.7)

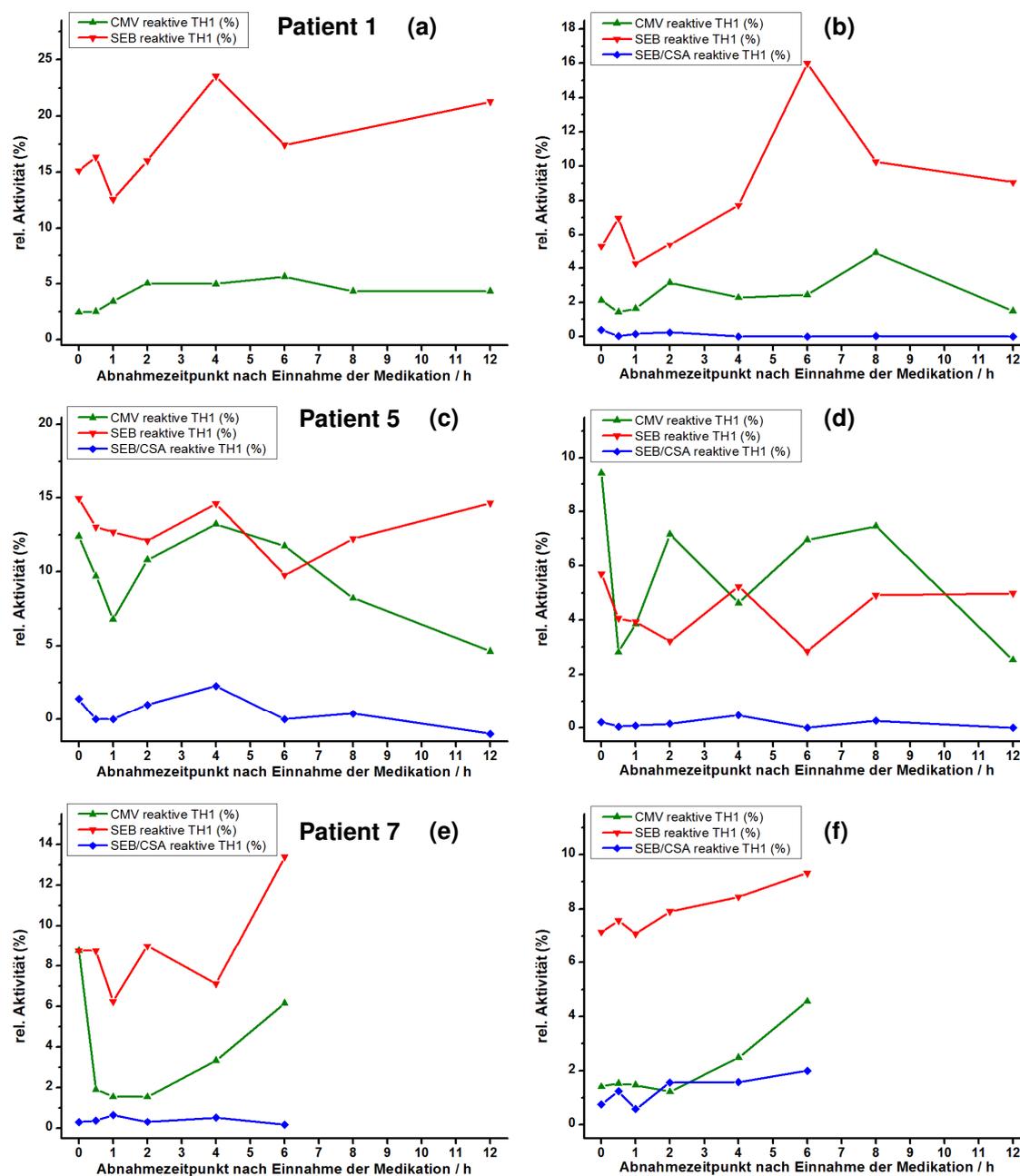


Abb. 25a-f: Patienten 1,5 u. 7; Cytomegalievirus (CMV)-seropositiv: Frühe T-Zell-Aktivierung unter Einfluss von Mycophenolat Mofetil (MMF)/magensaftresistentem Natrium-Mycophenolat (EC-MPS) ex vivo, gemessen als Reaktivität antigenstimulierter Typ1-T-Helferzellen (TH1-Zellen) an 8 Untersuchungszeitpunkten (h), dargestellt anhand des CMV-reaktiven TH1-Zell-Subsets (grün) u. des Staphylokokken Enterotoxin B (SEB)-reaktiven TH1-Zell-Subsets (rot). Vergleichsmedikament Cyclosporin A (CsA) in vitro (blau). **Pat. 1** a: Tag 1 (MMF), b: Tag 2 (EC-MPS). **Pat. 5** c: Tag 1 (EC-MPS), d: Tag 2 (MMF). **Pat. 7** e: Tag 1 (EC-MPS), f: Tag 2 (MMF).

Die Daten der CMV-seropositiven Patienten zeigen sehr individuelle Profile der TH1-Aktivierungsmarker, aber keine Modulation der frühen Lymphozytenaktivierung durch die Mycophenolsäure. Die spezifische Aktivität der stimulierten TH1-Zellen wurde durch den MPA-Plasmaspiegel, unabhängig vom eingesetzten Antigenstimulus (SEB oder CMV), nicht beeinflusst. Aufgrund einer bakteriellen Kontamination waren bei Patient 7 die Untersuchungszeitpunkte 7 und 8 nicht auswertbar. Bezüglich der erfassten Untersuchungszeitpunkte 1 bis 6 konnte auch bei diesen Proben keine Modulation der frühen Lymphozytenaktivierung durch MPA festgestellt werden. Bei allen CMV-positiven Patienten liess sich die spezifische Aktivierung mit CMV Antigen weder durch EC-MPS noch durch MMF inhibieren.

Nach in vitro Zugabe von CsA zu identisch präparierten Patienten-Proben SEB-stimulierter TH1-Zellen konnte dagegen eine vollständige Hemmung der TH1-Zell-Aktivität (blaue Kurven) beobachtet werden.

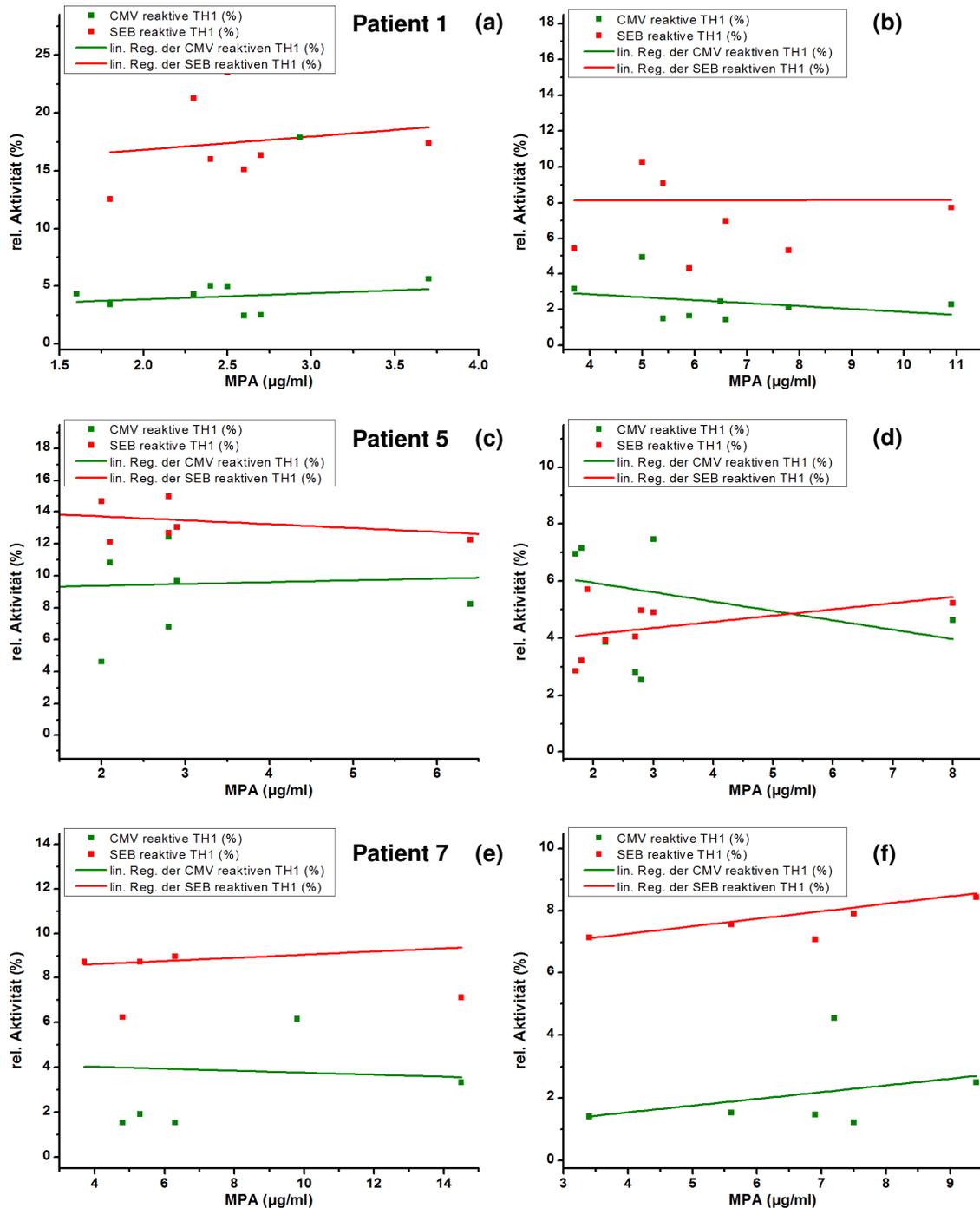


Abb. 26a-f: Patienten 1, 5 u. 7; Cytomegalievirus (CMV)-seropositiv: Lineare Regressionsanalysen der Parameter TH1-Zell-Aktivität (Ordinate: relative Aktivität in %) u. Mycophenolsäure (MPA)-Plasmaspiegel (Abszisse: in µg/ml). Separate Darstellung nach Antigenstimulus u. Untersuchungstag. Rot: Staphylokokken Enterotoxin B (SEB)-reaktives TH1-Zell-Subset, grün: CMV-reaktives TH1-Zell-Subset. **Pat. 1** a: Tag 1 (Mycophenolat Mofetil - MMF), b: Tag 2 (magensaftresistentes Natrium-Mycophenolat - EC-MPS). **Pat. 5** c: Tag 1 (EC-MPS), d: Tag 2 (MMF). **Pat. 7** e: Tag 1 (EC-MPS), f: Tag 2 (MMF).

Gemäß der linearen Regressionsanalysen (Abbildung 26a-f) war keine Korrelation zwischen der spezifischen TH1-Zell-Aktivität und dem zeitgleich bestimmten MPA-Plasmaspiegel nachweisbar. Dies bestätigte sich auch nach spezifischer Stimulation bei CMV-seropositiven Patienten.

IMPDH Aktivität und MPA-Plasmaspiegel

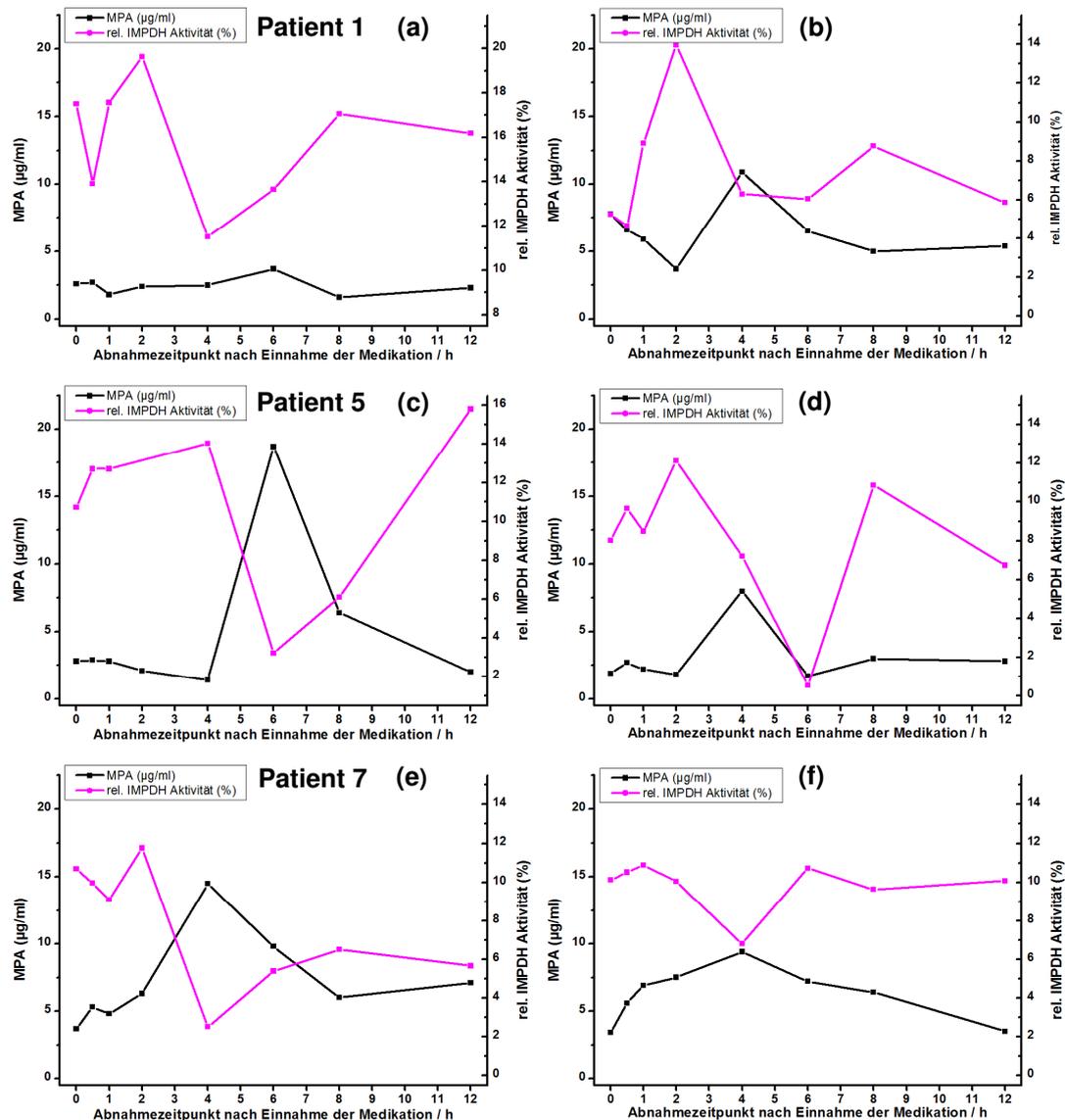


Abb. 27a-f: Patienten 1,5 u 7; Cytomegalievirus (CMV)-seropositiv: Darstellung des pharmakodynamischen Parameters Inosin 5'-Monophosphat-Dehydrogenase (IMPDH) Aktivität (magenta Kurven: relative Aktivität in %) in Abhängigkeit des Mycophenolsäure (MPA)-Plasmaspiegels (schwarze Kurven: in µg/ml) zu 8 Untersuchungszeitpunkten (h). Linke Spalte Untersuchungstag 1 (a, c, e), rechte Spalte Untersuchungstag 2 (b, d, f). **Pat. 1** a: Tag 1 (Mycophenolat Mofetil - MMF), b: Tag 2 (magensaftresistentes Natrium-Mycophenolat - EC-MPS). **Pat. 5** c: Tag 1 (EC-MPS), d: Tag 2 (MMF). **Pat. 7** e: Tag 1 (EC-MPS), f: Tag 2 (MMF).

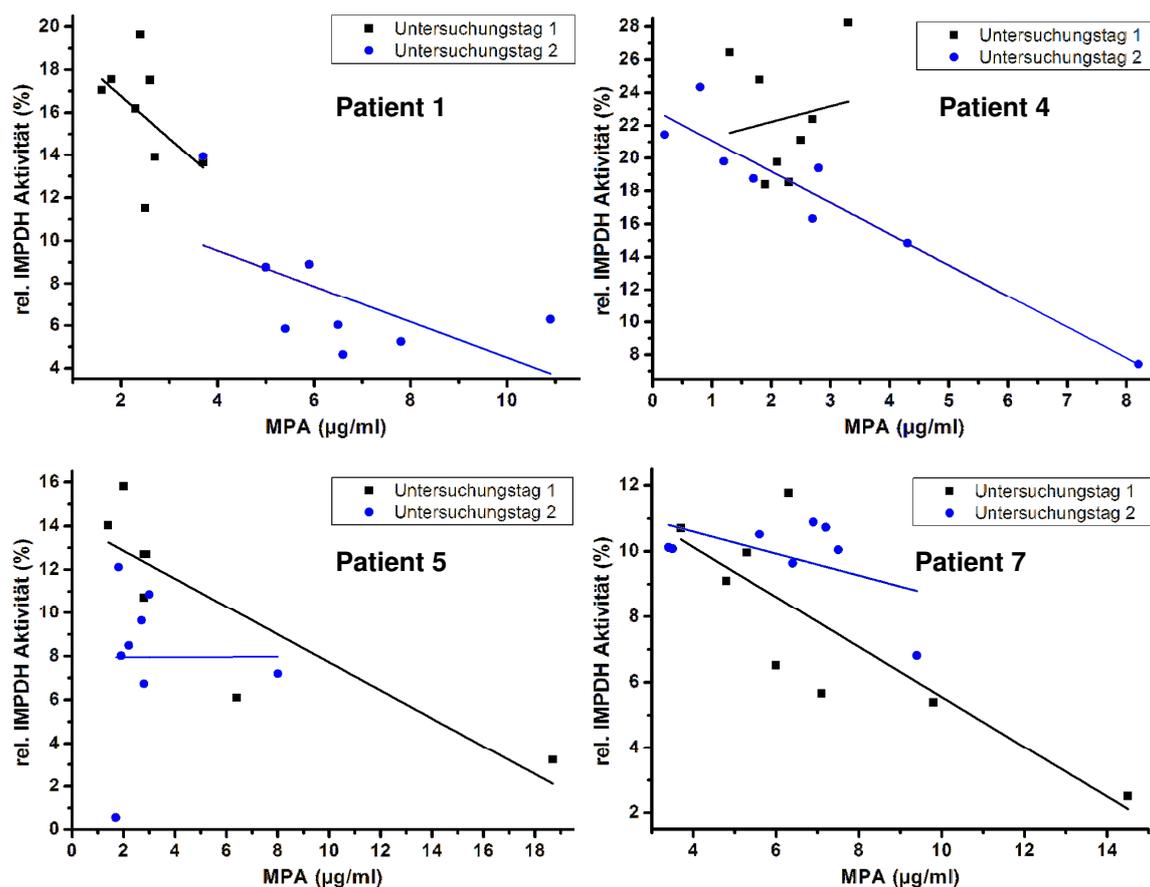


Abb. 28: Patienten 1, 4, 5 u. 7; Cytomegalievirus (CMV)-seropositiv: Ergebnissübersicht der linearen Regressionsanalysen der Parameter Mycophenolsäure (MPA)-Plasmaspiegel (Abszisse: $\mu\text{g/ml}$) u. Inosin 5'-Monophosphat-Dehydrogenase (IMPDH) Aktivität (Ordinate: relative Aktivität in %) an 8 Untersuchungszeitpunkten. Getrennte Darstellung nach Untersuchungstag; Tag 1 = schwarz, Tag 2 = blau.

Die ergänzende Bestimmung des pharmakodynamischen Parameters IMPDH Aktivität in Abhängigkeit des MPA-Plasmaspiegels ergab für das CMV-positive Patientenkollektiv den Nachweis einer Korrelation der beiden quantitativen Werte.

3.2.3 CMV - negatives Patientenkollektiv (Patienten 2,3 u. 6)

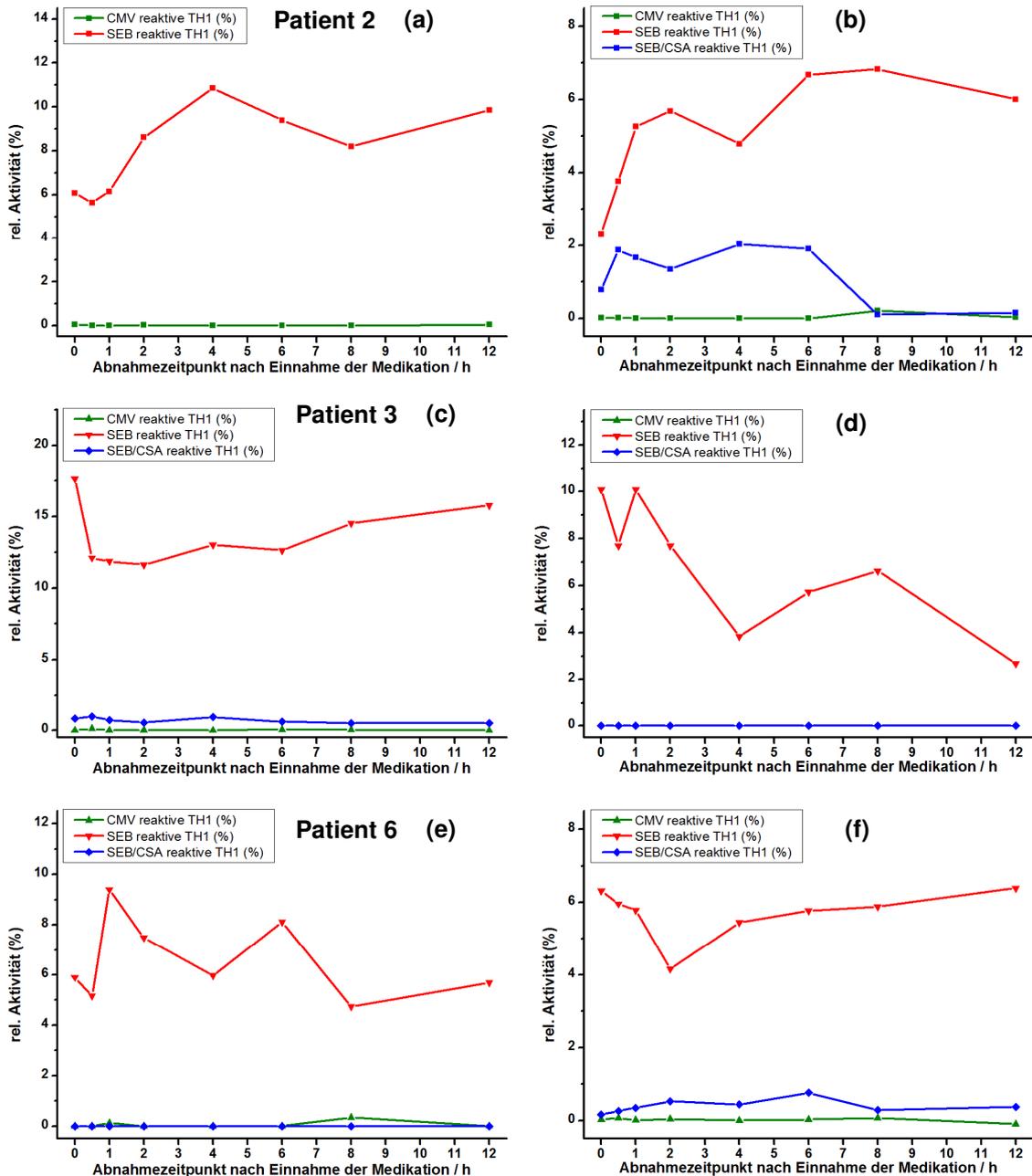


Abb. 29a-f: Patienten 2, 3 u. 6; Cytomegalievirus (CMV)-seronegativ: Frühe T-Zell-Aktivierung unter Einfluss von Mycophenolat Mofetil (MMF)/magensaftresistentem Natrium-Mycophenolat (EC-MPS) ex vivo, gemessen als Reaktivität antigenstimulierter Typ 1-T-Helferzellen (TH1-Zellen) an 8 Untersuchungszeitpunkten (h), dargestellt anhand des CMV-reaktiven TH1-Zell-Subsets (grün) u. des Staphylokokken Enterotoxin B (SEB)-reaktiven TH1-Zell-Subsets (rot). Vergleichsmedikament Cyclosporin A (CsA) in vitro (blau). **Pat. 2** a: Tag 1 (EC-MPS), b: Tag 2 (MMF). **Pat. 3** c: Tag 1 (EC-MPS), d: Tag 2 (MMF). **Pat. 6** e: Tag 1 (MMF), f: Tag 2 (EC-MPS).

Auch bei CMV-seronegativen Patienten konnte unter immunsuppressiver Therapie mit EC-MPS oder MMF keine Modulation der frühen T-Zell-Aktivierung, in Form einer Hemmung der Expression entsprechender Marker und Zytokine, erreicht werden. Aufgrund fehlender Memory T-Zellen für CMV waren bei diesem Kollektiv in keiner der untersuchten Proben CMV-reaktive Zellen nachweisbar, unabhängig von der Behandlung mit immunsuppressiven Substanzen.

Die auf der folgenden Seite in Abbildung 30a-f gezeigten linearen Regressionsanalysen bestätigten die vorhergehenden Ergebnisse des fehlenden Einflusses der Mycophenolsäure auf die frühe TH1-Zell-Aktivierung und die Expression entsprechender Marker.

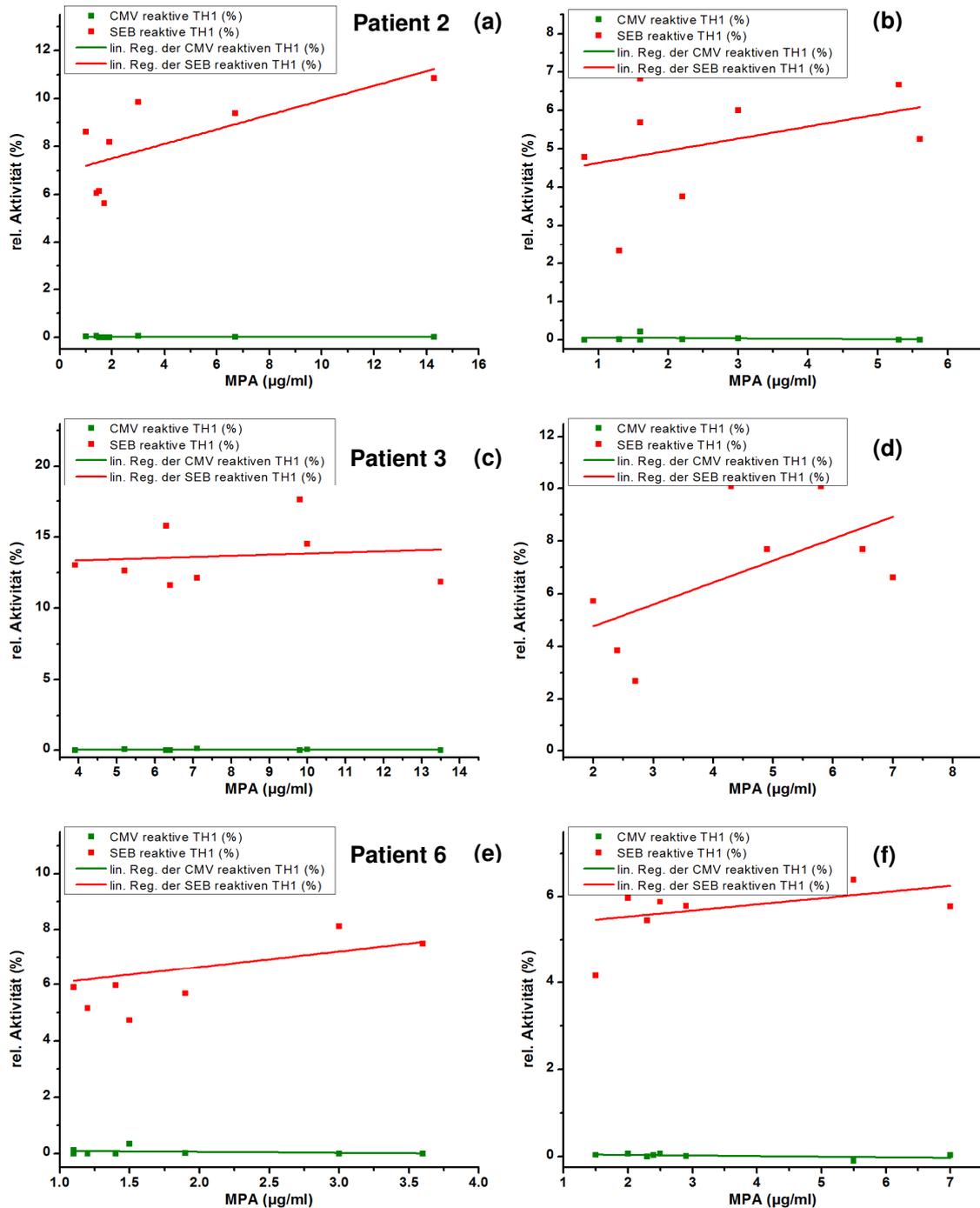


Abb. 30a-f: Patienten 2,3 u. 6; Cytomegalievirus (CMV)-seronegativ: Lineare Regressionanalysen der Parameter TH1-Zell-Aktivität (Ordinate: rel. Aktivität in %) in Abhängigkeit des Mycophenolsäure (MPA)-Plasmaspiegels (Abszisse: µg/ml). Separate Darstellung nach Antigenstimulus u. Untersuchungstag. Rot: Staphylokokken Enterotoxin B (SEB)-reaktives TH1-Zell-Subset, grün: CMV-reaktives TH1-Zell-Subset. **Pat. 2** a: Tag 1 (magensaftresistentes Natrium-Mycophenolat - EC-MPS), b: Tag 2 (Mycophenolat Mofetil - MMF). **Pat. 3** c: Tag 1 (EC-MPS), d: Tag 2 (MMF). **Pat. 6** e: Tag 1 (MMF), f: Tag 2 (EC-MPS).

IMPDH Aktivität und MPA-Plasmaspiegel

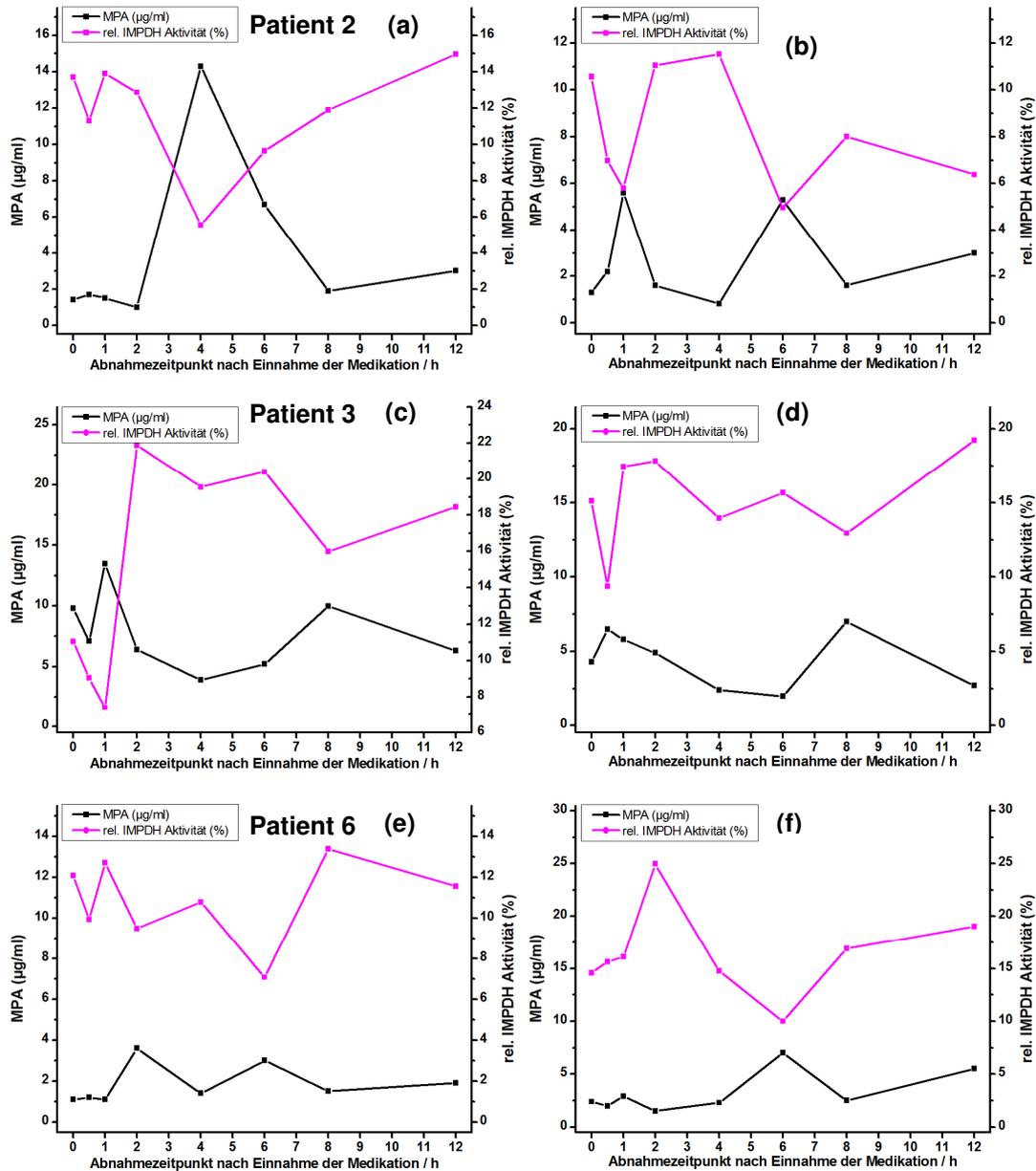


Abb. 31a-f: Patienten 2,3 u. 6; Cytomegalievirus (CMV)-seronegativ: Darstellung des pharmakodynamischen Parameters Inosin 5'-Monophosphat-Dehydrogenase (IMPDH) Aktivität (magenta Kurven: relative Aktivität in %) in Abhängigkeit des Mycophenolsäure (MPA)-Plasmaspiegels (schwarze Kurven: µg/ml) zu 8 Untersuchungszeitpunkten. Linke Spalte Untersuchungstag 1 (a, c, e), rechte Spalte Untersuchungstag 2 (b, d, f). **Pat. 2** a: Tag 1 (magensaftresistentes Natrium-Mycophenolat - EC-MPS), b: Tag 2 (Mycophenolat Mofetil - MMF). **Pat. 3** c: Tag 1 (EC-MPS), d: Tag 2 (MMF). **Pat. 6** e: Tag 1 (MMF), f: Tag 2 (EC-MPS).

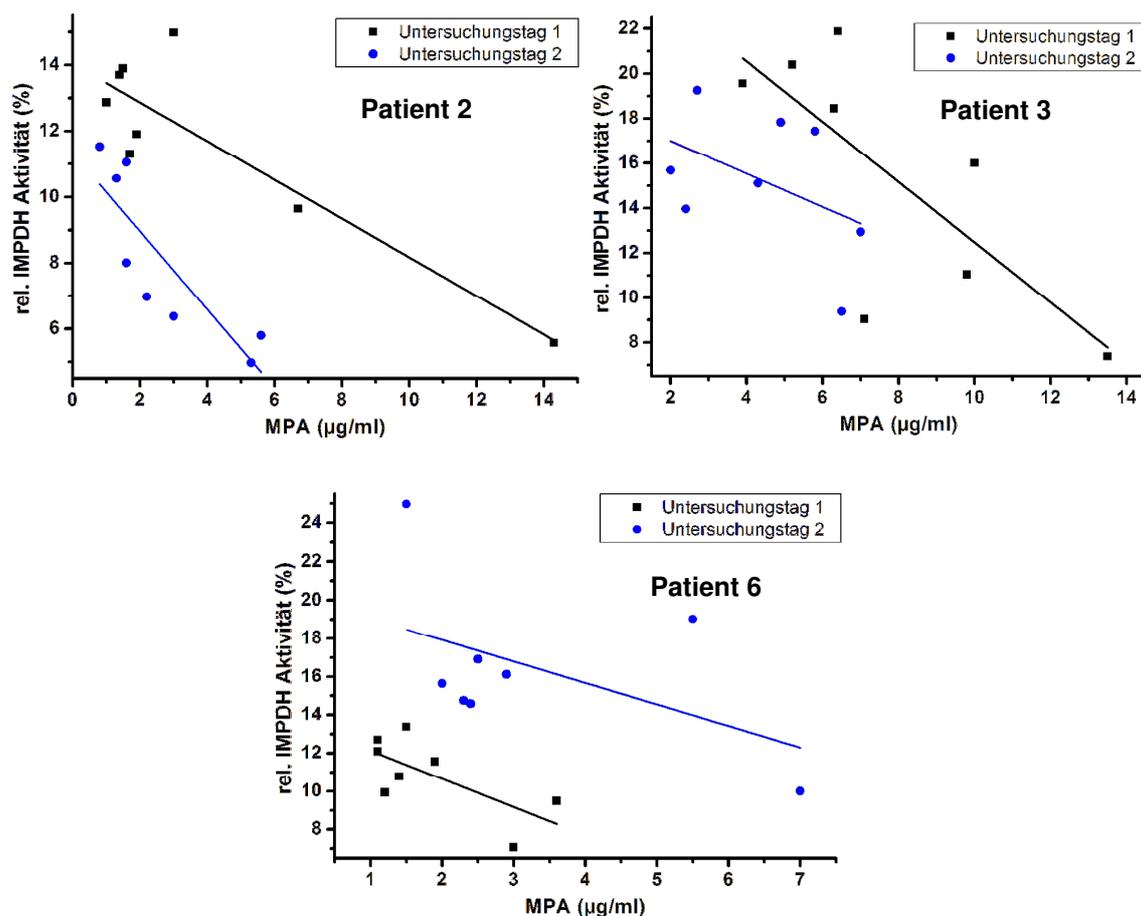


Abb. 32: Patienten 2,3 u. 6; Cytomegalievirus (CMV)-seronegativ: Ergebnisübersicht der linearen Regressionsanalysen der Parameter Mycophenolsäure (MPA)-Plasmaspiegel (Abszisse: µg/ml) u. Inosin 5'-Monophosphat-Dehydrogenase (IMPDH) Aktivität (Ordinate: relative Aktivität in %) zu 8 Untersuchungszeitpunkten an zwei separaten Untersuchungstagen. Getrennte Darstellung nach Untersuchungstag; Untersuchungstag 1 = schwarz, Untersuchungstag 2 = blau.

Die konzentrationsabhängige Hemmung der IMPDH unter Therapie mit EC-MPS oder MMF wurde als Kontrolluntersuchung ergänzend betrachtet. Auch für die CMV-negativen Patienten konnte eine lineare Korrelation dieser beiden Parameter nachgewiesen werden.

3.2.4 Zusammenfassung der Ergebnisse

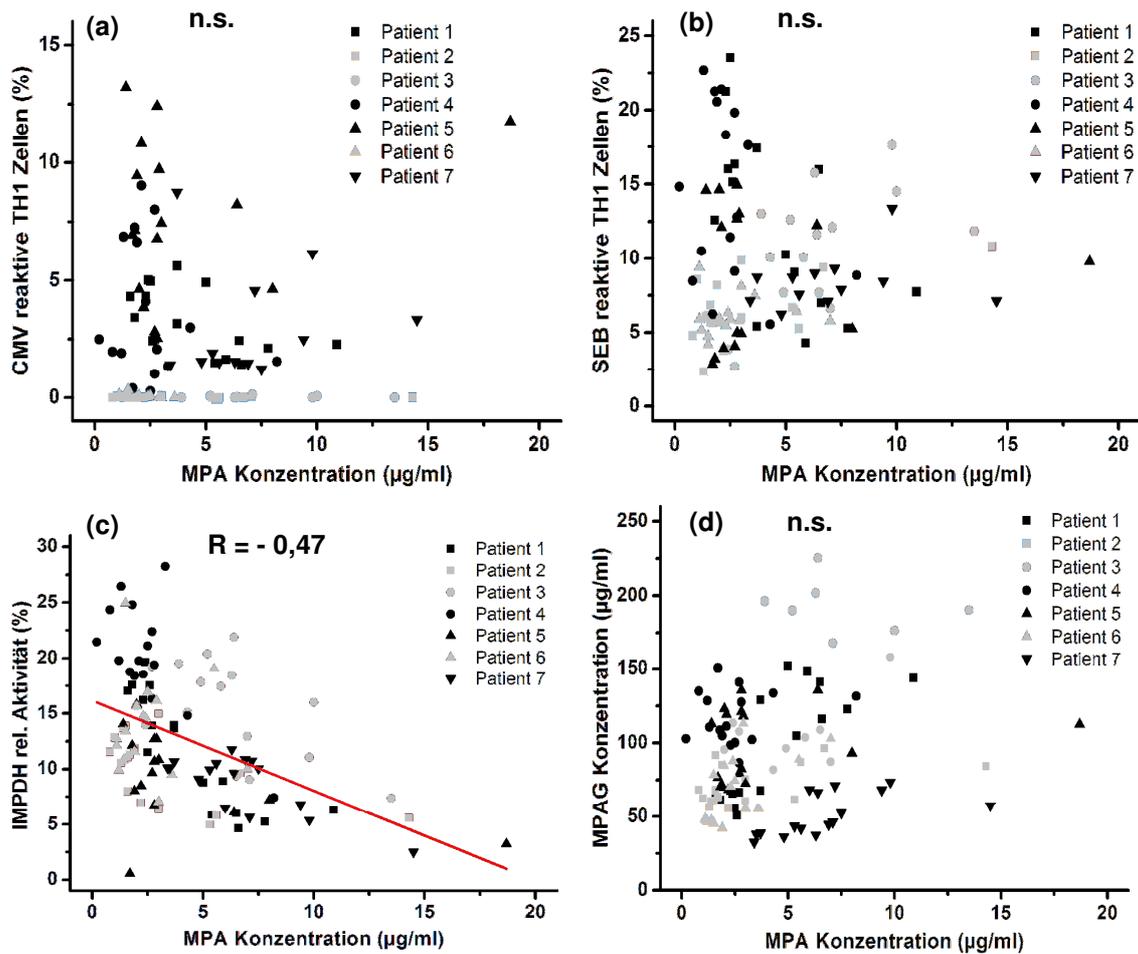


Abb. 33a-d: Kummulative Darstellung der Ergebnisse zur Pharmakodynamik u. Pharmakokinetik der Mycophenolsäure (MPA) *ex vivo*, anhand der Daten des Patientenkollektivs der Pharmakokinetik/Pharmakodynamik (PK/PD) Studie: „Vergleich Pharmakokinetik und Pharmakodynamik von MPA unter EC-MPS versus MMF bei Patienten mit progressiver IgA-Nephritis“ Universitätsklinikum Ulm, Abteilung Innere Medizin I, Sektion Nephrologie. Signifikanz ermittelt durch lineare Korrelation der Datenpaare: R = Korrelationskoeffizient, n.s. = nicht signifikant.

Abb. 33a: Einfluss von MPA *ex vivo* auf die frühe T-Zell-Aktivierung: Spezifische Aktivität der Cytomegalievirus (CMV)-reaktiven TH1-Zellen (Ordinate: in %), in Abhängigkeit des MPA-Plasmaspiegels (Abszisse: µg/ml).

Abb. 33b: Spezifische Aktivität der Staphylokokken Enterotoxin B (SEB)-reaktiven TH1-Zellen (Ordinate: in %), in Abhängigkeit des MPA-Plasmaspiegels (Abszisse: µg/ml).

Abb. 33c: Darstellung der relativen Inosin 5'-Monophosphat-Dehydrogenase (IMPDH) Aktivität (Ordinate: rel. Aktivität in %) bezogen auf den MPA-Plasmaspiegel (Abszisse: µg/ml), entsprechend der linearen Regressionsanalyse ermittelter Korrelationskoeffizient für dieses Datenpaar R = -0,47.

Abb. 33d: Zusammenhang zwischen Mycophenolsäure-Glucuronid (MPAG: Ordinate: µg/ml) u. MPA-Plasmaspiegel (Abszisse: µg/ml).

Die kumulative Analyse der Ergebnisse zur Pharmakodynamik von MPA zeigt die erhobenen Daten der frühen T-Zell-Aktivierung (Abb. 33a u. 33b) und IMPDH Aktivität (Abb. 33c), ergänzend wird der pharmakokinetische Parameter MPAG (Abb. 33d) dargestellt.

Für die Lymphozytenfunktionsuntersuchung der frühen T-Zell-Aktivierung konnte keine Korrelation mit den gemessenen MPA-Plasmaspiegeln nachgewiesen werden.

Auch bezüglich des pharmakokinetischen Parameters MPAG, des Glucuronids der Mycophenolsäure, liess sich in Abhängigkeit des jeweilig bestimmten MPA-Plasmaspiegels keine signifikante lineare Korrelation ableiten. Dieser Marker zeigte weder einen Zusammenhang zum Plasmaspiegel von MPA noch zu Enzymaktivitäten der TH1-Zellen.

Im Gegensatz zu den zuvor genannten Parametern konnte für die IMPDH Aktivität eine signifikante Hemmung in Abhängigkeit des MPA-Spiegels, passend zur funktionell typischen Korrelation der beiden quantitativen Werte, nachgewiesen werden. Die ausführlichen Ergebnisse hierzu sind dem Abstract „*T-cell proliferation and early TH1-cell activation is modulated differently by mycophenolic acid*“ [186] zu entnehmen.

4. Diskussion

Im Fokus dieser Arbeit stand die Untersuchung der Wirkung unterschiedlicher Immunsuppressiva auf frühe Schritte der Lymphozytenaktivierung. Hierzu wurde ein durchflusszytometrischer Assay etabliert, mit dem die Expression von Aktivierungsmarkern an der Zelloberfläche (CD69) und von proinflammatorischen Zytokinen (IFN- γ) quantitativ analysiert werden kann. Mithilfe dieses funktionellen Tests wurde der Einfluß von Mycophenolat auf frühe Effektorfunktionen der TH1-Lymphozytenaktivität *in vitro* untersucht. Die Charakterisierung der Pharmakodynamik von Immunsuppressiva mit Blick auf die Lymphozytenfunktion ist *per se* wichtig, um die Wirksamkeit dieser Substanzen zu verstehen und rational einzusetzen.

Darüber hinaus wurde auch die TH1-Lymphozytenaktivität von Mycophenolat behandelten Patienten-Proben untersucht. Die möglichst exakte Beurteilung des individuellen Grades der Immunsuppression stellt eine essentielle Notwendigkeit immunsuppressiver Therapiestrategien, sowohl auf dem Gebiet der Transplantationsmedizin als auch in der Behandlung autoimmuner Erkrankungen, dar. Gleichzeitig erlangt das Therapeutische Drug Monitoring der Immunsuppressiva, als Teil einer zunehmend „individualisierten Medizin“, immer mehr an Bedeutung.

Etablierte Untersuchungstechniken basieren auf Analysen überwiegend pharmakokinetischer Parameter, vorrangig in Form von Medikamentenspiegel-Bestimmungen. All diesen konzentrationsgesteuerten Verfahren ist die Eigenschaft der unzureichenden Korrelation von Medikamentenspiegel und individuellem pharmakodynamischem Effekt gemein [42]. Zudem unterliegt die Pharmakokinetik der Einzelsubstanzen, unter anderem im Rahmen kombinierter immunsuppressiver Behandlungskonzepte nach Organtransplantation, dem Einfluss immunsuppressiver und anderer Komedikation [30, 42]. Diese Problematik findet durch die bislang verbreiteten Monitoring-Methoden keine adäquate Berücksichtigung. Im Zentrum des Interesses stehen neue Verfahren mit dem Potential der Therapiesteuerung [42].

Die Grundlage dieser Arbeit bildet ein pharmakodynamischer Ansatz zur Erfassung der Modulation der Zytokin- und Aktivierungsmarkereexpression durch Immunsuppressiva, anhand der Untersuchung der Vertreter IFN- γ , IL-2 und CD69. Die Wahl der untersuchten Zytokine und Marker begründet sich im angewendeten Verfahren der frühen T-Zell-Aktivierung. Die unterschiedlichen Halbwertszeiten der Zytokine sowie die Veränderung ihrer Expression durch verschiedenste Einflüsse müssen bei derartigen Analysen berücksichtigt werden [49]. Im Fall des Aktivierungsmarkers CD69 wird dessen Funktion im Rahmen dieser Methode durch den Zeitpunkt seiner Expression im Zellzyklus erklärt. Die Ausschüttung von CD69 markiert einen der ersten, sehr frühen Mechanismen im Prozess der T-Zell-Aktivierung. Während das Expressionsmaximum von CD69 bereits 8 Stunden nach Stimulation erreicht wird, treten andere Aktivierungsmarker, wie z.B. CD25 („IL-2 Rezeptor“), CD71 („Transferrin-Rezeptor“) oder HLA-DR, erst zu wesentlich späteren Zeitpunkten des Aktivierungsprozesses in Erscheinung [112]. Ein weiterer Vorteil liegt in der ähnlichen Kinetik der Expression von CD69 für alle T-Zellen, die innerhalb der ersten 6 Stunden einen linearen Verlauf zeigt. Die Eigenschaft einer schnellen Kinetik und zeitlich begrenzten Expression des Aktivierungsmarkers ermöglicht somit eine direkte Erfassung der Zellantwort auf einen experimentellen Stimulus [112].

Im Vergleich zu anderen Verfahren wie der ^3H -Thymidin-Inkorporation, durch die sich die maximale DNA-Produktion erst 72 bis 150 Stunden nach Zugabe des Stimulus bestimmen lässt, zeichnet sich der Early Activation Assay durch seine hohe Zeiteffizienz aus. Die Methode kann innerhalb von 5 Stunden anhand einer Vollblut-Probe durchgeführt werden. Desweiteren sind Analysen später exprimierter Marker oder Zytokine häufig anfälliger für Artefakte. Das Auftreten von Artefakten wird im Rahmen des Early Activation Assay insbesondere durch die *in vitro* Aktivierung des Verfahrens minimiert [112]. Die Messung von CD69 erfordert weder Nährmedien noch lange Inkubationszeiten. Die gezeigten Untersuchungen wurden jeweils an Vollblut-Proben durchgeführt. Im Gegensatz zu Verfahren die PBMCs einsetzen, erzeugen Vollblut-basierte Methoden eine möglichst realitätsgetreue Abbildung der Blutzusammensetzung, und benötigen zudem geringere Probenmengen [13, 21].

Das hier untersuchte Verfahren des Early Activation Assay ermöglichte eine quantitative Beurteilung der Zytokinexpression der frühen T-Zell-Aktivierung, als Indikator der immunsuppressiven Wirkung von CsA, *in vitro* und *ex vivo*. Folglich kann anhand dieses pharmakodynamischen Ansatzes das therapeutische Monitoring von Calcineurin-Inhibitoren wie CsA durch eine Quantifizierung des immunsuppressiven Effektes auf die Zielzellfunktion zeitnah ergänzt, und somit die Validität des pharmakokinetischen CsA-Monitorings hinsichtlich einer exakteren therapeutischen Implikation komplettiert werden.

Gerade für die Mycophenolsäure gilt es, pharmakodynamische Monitoring-Verfahren weiterzuentwickeln, um deren Einsatz besser zu definieren und eine individualisierte Therapiesteuerung zu verwirklichen. Hauptsächlich im Bereich der Transplantationsmedizin kommt dieses Immunsuppressivum in fixen Dosisregimen mittlerweile weitverbreitet zum Einsatz [100]. Die strategische Bedeutung eines therapeutischen Monitorings von MPA wird auch durch klinische Beobachtungen im Rahmen von Studien nach Nierentransplantation gestützt. Diese haben ein signifikant höheres Transplantatabstoßungsrisiko bei geringer MPA-Exposition und mehr nebenwirkungsassoziierte Therapieabbrüche bei hohen MPA-Spiegeln gezeigt [64, 180]. Die Notwendigkeit eines funktionellen Monitorings ergibt sich aus der ausgeprägten intra- und interindividuellen Variabilität dieser Substanz, die eine bis zu zehnfach variable MPA-Exposition, mit 50-100 prozentigen Spiegelanstiegen 3 bis 6 Monate nach Transplantation, bewirken kann [28]. Während in der initialen Phase nach Transplantation hohe MPA-Spiegel und eine nahezu doppelt so hohe AUC beschrieben wurden, führte eine Verbesserung der Nierenfunktion im weiteren Verlauf zu einer Reduktion des freien Anteiles von MPA und zu einer Stabilisierung des MPA-Spiegels, gemessen anhand der AUC des freien Anteils von MPA [56].

Gemäss der Ergebnisse der *in vitro* Untersuchungen von Nowak und Shaw ist nur die freie Fraktion von MPA in der Lage die Hemmung des Schlüsselenzyms IMPDH zu bewirken [135], weshalb diese von zentraler Bedeutung für den therapeutischen Effekt ist. Die AUC der freien Fraktion von MPA wurde als exakterer Indikator der Inzidenz Therapie-assoziiertes Nebenwirkungen nach Transplantation diskutiert [31]. Die Rolle der Bestimmung der freien MPA-Fraktion

bleibt vor allem nach Leber- oder Nierentransplantation noch zu klären. Bei diesen Patienten verändert sich der freie Anteil von MPA durch die Beeinflussung von Plasmaproteinbindung und Albuminspiegel nach Transplantation oder im Rahmen einer chronischen Niereninsuffizienz, was wiederum unterschiedliche Auswirkungen auf den Gesamt-Plasmaspiegel der Substanz zur Folge haben kann [182].

Weitere pharmakokinetische Parameter die hinsichtlich ihrer Bedeutung als Monitoring-Instrumente evaluiert wurden sind verschiedene Metabolite von MPA, deren Einsatz sich jedoch im Rahmen des therapeutischen Monitorings als problematisch erwies. Die Bestimmung des Glucuronids MPAG im Plasma fand in Anbetracht seiner Eigenschaft als inaktiver Metabolit mit verlängerter Halbwertszeit keine Verbreitung als anerkannter Monitoring-Parameter, und eignet sich nicht zum Einsatz für diese Zwecke [181]. Daneben wurde der Metabolit AcMPAG mit der Inzidenz von Nebenwirkungen assoziiert. Dieser kann jedoch durch die gängige Analyseverfahren der HPLC nicht erfasst werden [9].

Durch die hier gezeigten Untersuchungen konnte sowohl in vitro als auch an Patienten-Proben erstmals demonstriert werden, dass MMF ausschließlich als Proliferationshemmer immunsuppressiv wirkt, und frühe Effektorfunktionen wie z.B. die Expression von Aktivierungsmarkern und proinflammatorischen Zytokinen nicht gehemmt werden. Nach Betrachtung der Pharmakodynamik der Mycophenolsäure im Hinblick auf die Evaluation des pharmakodynamischen Therapiemonitoring-Verfahrens der frühen Lymphozytenaktivierung eignet sich diese Lymphozytenfunktionsuntersuchung nicht als Monitoring-Methode von Mycophenolat, und verdeutlicht gleichzeitig die Limitationen dieses Immunsuppressivums in der Monotherapie. Da die Effektorfunktionen von Lymphozyten mit ihrer Produktion proinflammatorischer Zytokine durch Mycophenolat nicht gehemmt werden, ist die Wirksamkeit in der Akuttherapie begrenzt, wohingegen die Langzeiteffekte durch die spezifische Proliferationshemmung von Lymphozyten therapeutisch genutzt werden können.

Während das Verfahren eine quantitative Beurteilung der Zytokinexpression der frühen T-Zell-Aktivierung, als Indikator der Wirkung von Immunsuppressiva mit frühem Wirkprofil auf die Lymphozytenaktivierung (z.B. CsA) erlaubt, wie für die Kontrollsubstanz CsA in jeder Versuchsreihe gezeigt werden konnte, ist eine Untersuchung der frühen Effektorfunktionen im Falle der Mycophenolsäure nicht zielführend zur Beurteilung des immunsuppressiven Effektes. Als Lymphozytenfunktionsuntersuchungen für MMF oder MPA sind deshalb nur Proliferationstests, nicht aber Zytokin-basierte Verfahren geeignet.

In Anbetracht der Problematik dass der MPA-Spiegel sowie dessen spezifische Auswirkungen auf die Zielzellfunktion unter immunsuppressiver Kombinationstherapie, durch mögliche interaktionsbedingte-Veränderungen von Pharmakodynamik und Pharmakokinetik, nicht hinreichend beurteilt werden können, wurde hier bewusst ein Patientenkollektiv unter Monotherapie mit MPA gewählt. Anhand der Untersuchungen konnte allerdings gezeigt werden, dass die Hauptwirkmechanismen von MPA durch das untersuchte Monitoring-Verfahren nicht erfasst werden, da die immunsuppressive Potenz von MPA hauptsächlich auf dessen antiproliferativem Effekt auf T- und B-Zellen beruht [141]. Die Aktivität der erfassten TH1-Zell-Subsets mit ihrer Zytokinexpression korrelierte nicht mit den zeitgleich gemessenen MPA-Plasmaspiegeln. Folglich unterliegt der im Rahmen des Early Activation Assay repräsentierte Abschnitt des Zellzykluses keinem Einfluss durch diesen Wirkstoff.

Unter Berücksichtigung der Ergebnisse einer Arbeit zur Wirkung von MPA auf die Proliferation und frühe Aktivierung von T-Zellen [186], bestätigte die vergleichende Betrachtung der Lymphozytenfunktionsuntersuchungen einen signifikanten Unterschied im Wirkspektrum dieses Immunsuppressivums auf verschiedene Prozesse des Zellzykluses von TH1-Zellen. Während MPA pharmakodynamische Mechanismen wie die T-Zellproliferation oder die IMPDH Aktivität inhibierte, und diese Parameter mit dem MPA-Spiegel korrelierten [186], erfuhr die frühe T-Zell-Aktivierung keine Hemmung. Unter den in diesem Kontext evaluierten Lymphozytenfunktionsuntersuchungen zur Wirkung von MPA konnte für die Proliferationshemmung SEB-stimulierter CD4+- und CD8+-T-Zellen eine enge Korrelation mit dem MPA-Plasmaspiegel beobachtet werden [186].

Die unterschiedlichen Auswirkungen von MPA auf frühe Lymphozytenaktivierung und Proliferation implizieren in therapeutischer Hinsicht, dass der Einsatz dieses Immunsuppressivums im Rahmen einer Erhaltungstherapie, nach erfolgter zytoreduktiver Initialbehandlung oder als Teil einer Kombinationstherapie, wirksamer sein könnte [186].

Ein effektives therapeutisches Monitoring der Immunsuppressiva erfordert die Auswahl des für die jeweilige Substanz am besten geeigneten Monitoring-Verfahrens, um in Anbetracht der Vielzahl von Methoden aus der Fülle an Daten essentielle Informationen zu fokussieren, und eine dezidierte therapeutische Implikation zu erhalten. Auch wenn das Verfahren der frühen T-Zell-Aktivierung bezüglich des therapeutischen Monitorings der Mycophenolsäure nicht geeignet ist, könnte dieser pharmakodynamische Ansatz der Analyse der Zielzellfunktion in Zukunft bezüglich anderer Vertreter der Immunsuppressiva, wie CsA, als Teil der Methodik neue Einblicke in die Effektivität der Immunsuppressiva geben, und dadurch die Grundlage eines optimierten und individualisierten Therapeutischen Drug Monitorings schaffen.

5. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein durchflusszytometrischer Test zur funktionellen Untersuchung von Typ1-T-Helferzellen (TH1-Zellen) etabliert. Die Untersuchungen der frühen Lymphozytenaktivierung *in vitro* sowie bei Mycophenolat Mofetil (MMF) und magensaftresistentem Natrium-Mycophenolat (EC-MPS) behandelten Patienten zeigen, dass die Mycophenolsäure die Expression von Aktivierungsmarkern (CD69) und die Zytokinproduktion (Interferon-gamma: IFN- γ), als wesentliche Effektorfunktionen von Lymphozyten, nicht hemmt. Durch die ausschließliche Wirkung als Proliferationshemmer unterscheidet sich MPA substantiell von anderen immunsuppressiven Substanzgruppen, die sehr viel früher in die zellulären Aktivierungspfade eingreifen und damit in der Lage sind, sowohl die Effektorfunktionen als auch die Proliferation zu hemmen. Für das funktionelle Therapeutische Drug Monitoring der Mycophenolsäure sind die frühen Zytokin-basierten Aktivierungstests folglich nicht geeignet, da MPA als ausschließlicher Proliferationsinhibitor diese frühen Aktivierungsschritte von T-Lymphozyten nicht beeinflusst. Diese Untersuchung verfügt damit auch über eine Implikation hinsichtlich des therapeutischen Einsatzes der Mycophenolsäure im Rahmen immunsuppressiver Therapieregime. Danach ist dieses Immunsuppressivum weniger prädestiniert für eine Monotherapie, sondern bietet sich vielmehr zum Einsatz im Rahmen einer kombinierten Behandlung, z.B. als Teil einer Erhaltungstherapie, an.

In den Fokus des Therapeutischen Drug Monitoring rücken vermehrt Untersuchungen zur Erfassung biologischer Effekte. Aufgrund der vorliegenden pharmakodynamischen Untersuchung zur Mycophenolsäure und mit Blick auf die vielfältigen Angriffspunkte der verschiedenen Klassen von immunsuppressiven Substanzen konnte gezeigt werden, dass ein globales funktionelles Monitoring aller Immunsuppressiva nicht durch die Untersuchung früher Schritte der Lymphozytenaktivierung möglich ist. Die Untersuchung später Schritte der Lymphozytenaktivierung, z.B. durch Proliferationstests, ist möglicherweise sehr viel besser geeignet, klassenübergreifend die Aktivität von Immunsuppressiva sowohl in der Mono- als auch in der Kombinationstherapie zu testen. Dies sollte durch weiterführende Untersuchungen bestätigt werden.

6. Literaturverzeichnis

1. *Placebo-controlled study of mycophenolate mofetil combined with cyclosporin and corticosteroids for prevention of acute rejection. European Mycophenolate Mofetil Cooperative Study Group.* Lancet, 1995. **345**: p. 1321-5.
2. *A blinded, randomized clinical trial of mycophenolate mofetil for the prevention of acute rejection in cadaveric renal transplantation. The Tricontinental Mycophenolate Mofetil Renal Transplantation Study Group.* Transplantation, 1996. **61**: p. 1029-37.
3. Albrecht, W., M. Storck, E. Pfetsch, W. Martin, and D. Abendroth, *Development and application of a high-performance liquid chromatography-based assay for determination of the activity of inosine 5'-monophosphate dehydrogenase in whole blood and isolated mononuclear cells.* Therapeutic drug monitoring, 2000. **22**: p. 283-94.
4. Allen, A.C., P.S. Topham, S.J. Harper, and J. Feehally, *Leucocyte beta 1,3 galactosyltransferase activity in IgA nephropathy.* Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association, 1997. **12**: p. 701-6.
5. Allen, A.C., E.M. Bailey, P.E. Brenchley, K.S. Buck, J. Barratt, and J. Feehally, *Mesangial IgA1 in IgA nephropathy exhibits aberrant O-glycosylation: observations in three patients.* Kidney international, 2001. **60**: p. 969-73.
6. Allison, A.C., *Mechanisms of action of mycophenolate mofetil.* Lupus, 2005. **14 Suppl 1**: p. s2-8.
7. Allison, A.C. and E.M. Eugui, *Mechanisms of action of mycophenolate mofetil in preventing acute and chronic allograft rejection.* Transplantation, 2005. **80**: p. S181-90.
8. Appel, G.B., J. Radhakrishnan, and E.M. Ginzler, *Use of mycophenolate mofetil in autoimmune and renal diseases.* Transplantation, 2005. **80**: p. S265-71.
9. Arns, W., D.M. Cibrik, R.G. Walker, G. Mourad, K. Budde, E.A. Mueller, and F. Vincenti, *Therapeutic drug monitoring of mycophenolic acid in solid organ transplant patients treated with mycophenolate mofetil: review of the literature.* Transplantation, 2006. **82**: p. 1004-12.
10. Arns, W., S. Breuer, S. Choudhury, G. Taccard, J. Lee, V. Binder, J. Roettele, and R. Schmouder, *Enteric-coated mycophenolate sodium delivers bioequivalent MPA exposure compared with mycophenolate mofetil.* Clinical transplantation, 2005. **19**: p. 199-206.
11. Ballardie, F.W. and I.S. Roberts, *Controlled prospective trial of prednisolone and cytotoxics in progressive IgA nephropathy.* Journal of the American Society of Nephrology, 2002. **13**: p. 142-8.
12. Barratt, J. and J. Feehally, *IgA nephropathy.* Journal of the American Society of Nephrology, 2005. **16**: p. 2088-97.

13. Barten, M.J., J.F. Gummert, T. van Gelder, R. Shorthouse, and R.E. Morris, *Flow cytometric quantitation of calcium-dependent and -independent mitogen-stimulation of T cell functions in whole blood: inhibition by immunosuppressive drugs in vitro*. Journal of immunological methods, 2001. **253**: p. 95-112.
14. Barten, M.J., A. Tarnok, J. Garbade, H.B. Bittner, S. Dhein, F.W. Mohr, and J.F. Gummert, *Pharmacodynamics of T-cell function for monitoring immunosuppression*. Cell proliferation, 2007. **40**: p. 50-63.
15. Barten, M.J., S. Dhein, H. Chang, H.B. Bittner, A. Tarnok, A. Rahmel, F.W. Mohr, and J.F. Gummert, *Assessment of immunosuppressive drug interactions: inhibition of lymphocyte function in peripheral human blood*. Journal of immunological methods, 2003. **283**: p. 99-114.
16. Behrend, M., *Adverse gastrointestinal effects of mycophenolate mofetil: aetiology, incidence and management*. Drug safety : an international journal of medical toxicology and drug experience, 2001. **24**: p. 645-63.
17. Bene, M.C. and G.C. Faure, *Mesangial IgA in IgA nephropathy arises from the mucosa*. American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation, 1988. **12**: p. 406-9.
18. Bene, M.C., B. Hurault de Ligny, M. Kessler, B. Foliguet, and G.C. Faure, *Tonsils in IgA nephropathy*. Contributions to nephrology, 1993. **104**: p. 153-61.
19. Bennett, W.M., *Immunosuppression with mycophenolic acid: one size does not fit all*. Journal of the American Society of Nephrology, 2003. **14**: p. 2414-6.
20. Berger, J. and N. Hinglais, *[Inter-capillary deposits of IgA-IgG]*. Journal d'urologie et de nephrologie, 1968. **74**: p. 694-5.
21. Bloemena, E., M.T. Roos, J.L. Van Heijst, J.M. Vossen, and P.T. Schellekens, *Whole-blood lymphocyte cultures*. Journal of immunological methods, 1989. **122**: p. 161-7.
22. Bogen, S.A., I. Fogelman, and A.K. Abbas, *Analysis of IL-2, IL-4, and IFN-gamma-producing cells in situ during immune responses to protein antigens*. Journal of immunology, 1993. **150**: p. 4197-205.
23. Borel, J.F., C. Feurer, H.U. Gubler, and H. Stahelin, *Biological effects of cyclosporin A: a new antilymphocytic agent*. Agents and actions, 1976. **6**: p. 468-75.
24. Brennan, D.C., *Cytomegalovirus in renal transplantation*. Journal of the American Society of Nephrology : JASN, 2001. **12**: p. 848-55.
25. Briggs, W.A., M.J. Choi, and P.J. Scheel, Jr., *Successful mycophenolate mofetil treatment of glomerular disease*. American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation, 1998. **31**: p. 213-7.
26. Budde, K., P. Glander, F. Diekmann, J. Waiser, L. Fritsche, D. Dragun, and H.H. Neumayer, *Review of the immunosuppressant enteric-coated mycophenolate sodium*. Expert opinion on pharmacotherapy, 2004. **5**: p. 1333-45.
27. Budde, K., K.P. Braun, P. Glander, T. Bohler, P. Hambach, L. Fritsche, J. Waiser, I. Mai, and H.H. Neumayer, *Pharmacodynamic monitoring of*

- mycophenolate mofetil in stable renal allograft recipients*. Transplantation proceedings, 2002. **34**: p. 1748-50.
28. Bullingham, R.E., A.J. Nicholls, and B.R. Kamm, *Clinical pharmacokinetics of mycophenolate mofetil*. Clinical pharmacokinetics, 1998. **34**: p. 429-55.
 29. Calne, R.Y., K. Rolles, D.J. White, S. Thiru, D.B. Evans, P. McMaster, D.C. Dunn, G.N. Craddock, R.G. Henderson, S. Aziz, and P. Lewis, *Cyclosporin A initially as the only immunosuppressant in 34 recipients of cadaveric organs: 32 kidneys, 2 pancreases, and 2 livers*. Lancet, 1979. **2**: p. 1033-6.
 30. Cattaneo, D., S. Merlini, S. Zenoni, S. Baldelli, E. Gotti, G. Remuzzi, and N. Perico, *Influence of co-medication with sirolimus or cyclosporine on mycophenolic acid pharmacokinetics in kidney transplantation*. American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons, 2005. **5**: p. 2937-44.
 31. Cattaneo, D., F. Gaspari, S. Ferrari, N. Stucchi, L. Del Priore, N. Perico, E. Gotti, and G. Remuzzi, *Pharmacokinetics help optimizing mycophenolate mofetil dosing in kidney transplant patients*. Clinical transplantation, 2001. **15**: p. 402-9.
 32. Cebrian, M., E. Yague, M. Rincon, M. Lopez-Botet, M.O. de Landazuri, and F. Sanchez-Madrid, *Triggering of T cell proliferation through AIM, an activation inducer molecule expressed on activated human lymphocytes*. The Journal of experimental medicine, 1988. **168**: p. 1621-37.
 33. Chen, X., P. Chen, G. Cai, J. Wu, Y. Cui, Y. Zhang, S. Liu, and L. Tang, *[A randomized control trial of mycophenolate mofetil treatment in severe IgA nephropathy]*. Zhonghua yi xue za zhi, 2002. **82**: p. 796-801.
 34. Cohn, R.G., A. Mirkovich, B. Dunlap, P. Burton, S.H. Chiu, E. Eugui, and J.P. Caulfield, *Mycophenolic acid increases apoptosis, lysosomes and lipid droplets in human lymphoid and monocytic cell lines*. Transplantation, 1999. **68**: p. 411-8.
 35. Cooper, M., M. Salvadori, K. Budde, F. Oppenheimer, H. Sollinger, and M. Zeier, *Enteric-coated mycophenolate sodium immunosuppression in renal transplant patients: efficacy and dosing*. Transplantation reviews, 2012. **26**: p. 233-40.
 36. Czock, D., F.M. Rasche, A. Carius, P. Glander, K. Budde, S. Bauer, F. Keller, and L. von Muller, *Pharmacokinetics and pharmacodynamics of mycophenolic acid after enteric-coated mycophenolate versus mycophenolate mofetil in patients with progressive IgA nephritis*. Journal of clinical pharmacology, 2007. **47**: p. 850-9.
 37. D'Amico, G., *The commonest glomerulonephritis in the world: IgA nephropathy*. The Quarterly journal of medicine, 1987. **64**: p. 709-27.
 38. D'Amico, G., *Natural history of idiopathic IgA nephropathy: role of clinical and histological prognostic factors*. American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation, 2000. **36**: p. 227-37.
 39. D'Amico, G., *Natural history of idiopathic IgA nephropathy and factors predictive of disease outcome*. Seminars in nephrology, 2004. **24**: p. 179-96.

40. D'Amico, G., G. Colasanti, G. Barbiano di Belgioioso, G. Fellin, A. Ragni, F. Egidi, L. Radaelli, G. Fogazzi, C. Ponticelli, and L. Minetti, *Long-term follow-up of IgA mesangial nephropathy: clinico-histological study in 374 patients*. Seminars in nephrology, 1987. **7**: p. 355-8.
41. De Groote, D., Y. Gevaert, M. Lopez, R. Gathy, F. Fauchet, I. Dehart, M. Jadoul, D. Radoux, and P. Franchimont, *Novel method for the measurement of cytokine production by a one-stage procedure*. Journal of immunological methods, 1993. **163**: p. 259-67.
42. de Jonge, H., M. Naesens, and D.R. Kuypers, *New insights into the pharmacokinetics and pharmacodynamics of the calcineurin inhibitors and mycophenolic acid: possible consequences for therapeutic drug monitoring in solid organ transplantation*. Therapeutic drug monitoring, 2009. **31**: p. 416-35.
43. Doherty, P.C. and R.M. Zinkernagel, *T-cell-mediated immunopathology in viral infections*. Transplantation reviews, 1974. **19**: p. 89-120.
44. Donadio, J.V. and J.P. Grande, *IgA nephropathy*. The New England journal of medicine, 2002. **347**: p. 738-48.
45. Donatsch, P., E. Abisch, M. Homberger, R. Traber, M. Trapp, and R. Voges, *A radioimmunoassay to measure cyclosporin A in plasma and serum samples*. Journal of immunoassay, 1981. **2**: p. 19-32.
46. Dubus, I., B. Vendrely, I. Christophe, J.P. Labouyrie, Y. Delmas, J. Bonnet, and C. Combe, *Mycophenolic acid antagonizes the activation of cultured human mesangial cells*. Kidney international, 2002. **62**: p. 857-67.
47. Dunn, C.J., A.J. Wagstaff, C.M. Perry, G.L. Plosker, and K.L. Goa, *Cyclosporin: an updated review of the pharmacokinetic properties, clinical efficacy and tolerability of a microemulsion-based formulation (neoral)¹ in organ transplantation*. Drugs, 2001. **61**: p. 1957-2016.
48. Fairbanks, L.D., M. Bofill, K. Ruckemann, and H.A. Simmonds, *Importance of ribonucleotide availability to proliferating T-lymphocytes from healthy humans. Disproportionate expansion of pyrimidine pools and contrasting effects of de novo synthesis inhibitors*. The Journal of biological chemistry, 1995. **270**: p. 29682-9.
49. Fitzpatrick, D.R. and A. Kelso, *Independent regulation of cytokine genes in T cells: the paradox in the paradigm*. Transplantation, 1998. **65**: p. 1-5.
50. Flores, M.G., S. Zhang, A. Ha, B. Holm, B.A. Reitz, R.E. Morris, and D.C. Borie, *In vitro evaluation of the effects of candidate immunosuppressive drugs: flow cytometry and quantitative real-time PCR as two independent and correlated read-outs*. Journal of immunological methods, 2004. **289**: p. 123-35.
51. Franklin, T.J. and J.M. Cook, *The inhibition of nucleic acid synthesis by mycophenolic acid*. The Biochemical journal, 1969. **113**: p. 515-24.
52. Fulton, B. and A. Markham, *Mycophenolate mofetil. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and clinical efficacy in renal transplantation*. Drugs, 1996. **51**: p. 278-98.
53. Galla, J.H., *IgA nephropathy*. Kidney international, 1995. **47**: p. 377-87.
54. Garcia, V.D., J.C. Goldani, C.D. Garcia, G.P. Cantisani, A. Losekann, A. Messias, D.B. Mattos, S.P. Vitola, and J.J. Bianchini, *Cyclosporine as*

- treatment for corticosteroid-resistant rejection episodes in renal transplantation.* Transplantation proceedings, 1989. **21**: p. 1643-5.
55. Glander, P., P. Hambach, L. Liefeldt, and K. Budde, *Inosine 5'-monophosphate dehydrogenase activity as a biomarker in the field of transplantation.* Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry, 2012. **413**: p. 1391-7.
 56. Glander, P., P. Hambach, K.P. Braun, L. Fritsche, J. Waiser, I. Mai, H.H. Neumayer, and K. Budde, *Effect of mycophenolate mofetil on IMP dehydrogenase after the first dose and after long-term treatment in renal transplant recipients.* International journal of clinical pharmacology and therapeutics, 2003. **41**: p. 470-6.
 57. Glander, P., K.P. Braun, P. Hambach, S. Bauer, I. Mai, I. Roots, J. Waiser, L. Fritsche, H.H. Neumayer, and K. Budde, *Non-radioactive determination of inosine 5'-monophosphate dehydrogenase (IMPDH) in peripheral mononuclear cells.* Clinical biochemistry, 2001. **34**: p. 543-9.
 58. Glassock, R.J., *The treatment of IgA nephropathy: status at the end of the millenium.* Journal of nephrology, 1999. **12**: p. 288-96.
 59. Grailer, A., J. Nichols, D. Hullett, H.W. Sollinger, and W.J. Burlingham, *Inhibition of human B cell responses in vitro by RS-61443, cyclosporine A and DAB486 IL-2.* Transplantation proceedings, 1991. **23**: p. 314-5.
 60. Grande, J.P., *Role of transforming growth factor-beta in tissue injury and repair.* Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine, 1997. **214**: p. 27-40.
 61. Gummert, J.F., T. Ikonen, and R.E. Morris, *Newer immunosuppressive drugs: a review.* Journal of the American Society of Nephrology : JASN, 1999. **10**: p. 1366-80.
 62. Gummert, J.F., M.J. Barten, S.W. Sherwood, T. van Gelder, and R.E. Morris, *Pharmacodynamics of immunosuppression by mycophenolic acid: inhibition of both lymphocyte proliferation and activation correlates with pharmacokinetics.* The Journal of pharmacology and experimental therapeutics, 1999. **291**: p. 1100-12.
 63. Gummert, J.F., M.J. Barten, T. van Gelder, M.E. Billingham, and R.E. Morris, *Pharmacodynamics of mycophenolic acid in heart allograft recipients: correlation of lymphocyte proliferation and activation with pharmacokinetics and graft histology.* Transplantation, 2000. **70**: p. 1038-49.
 64. Hale, M.D., A.J. Nicholls, R.E. Bullingham, R. Hene, A. Hoitsma, J.P. Squifflet, W. Weimar, Y. Vanrenterghem, F.J. Van de Woude, and G.A. Verpooten, *The pharmacokinetic-pharmacodynamic relationship for mycophenolate mofetil in renal transplantation.* Clinical pharmacology and therapeutics, 1998. **64**: p. 672-83.
 65. Halloran, P., T. Mathew, S. Tomlanovich, C. Groth, L. Hooftman, and C. Barker, *Mycophenolate mofetil in renal allograft recipients: a pooled efficacy analysis of three randomized, double-blind, clinical studies in prevention of rejection.* The International Mycophenolate Mofetil Renal Transplant Study Groups. Transplantation, 1997. **63**: p. 39-47.

66. Halloran, P.F., *Immunosuppressive drugs for kidney transplantation*. The New England journal of medicine, 2004. **351**: p. 2715-29.
67. Halloran, P.F., L.M. Helms, L. Kung, and J. Noujaim, *The temporal profile of calcineurin inhibition by cyclosporine in vivo*. Transplantation, 1999. **68**: p. 1356-61.
68. Hamprecht, K. and G. Jahn, *[Human cytomegalovirus and congenital virus infection]*. Bundesgesundheitsblatt, Gesundheitsforschung, Gesundheitsschutz, 2007. **50**: p. 1379-92.
69. Hartel, C., N. Schumacher, L. Fricke, B. Ebel, H. Kirchner, and M. Muller-Steinhardt, *Sensitivity of whole-blood T lymphocytes in individual patients to tacrolimus (FK 506): impact of interleukin-2 mRNA expression as surrogate measure of immunosuppressive effect*. Clinical chemistry, 2004. **50**: p. 141-51.
70. Hauser, I.A., L. Renders, H.H. Radeke, R.B. Sterzel, and M. Goppelt-Struebe, *Mycophenolate mofetil inhibits rat and human mesangial cell proliferation by guanosine depletion*. Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association, 1999. **14**: p. 58-63.
71. Hayday, A.C., *[gamma][delta] cells: a right time and a right place for a conserved third way of protection*. Annual review of immunology, 2000. **18**: p. 975-1026.
72. Hermann, M., F. Enseleit, A.E. Fisler, A. Flammer, T.F. Luscher, G. Noll, and F. Ruschitzka, *Cyclosporine C0- versus C2-monitoring over three years in maintenance heart transplantation*. Swiss medical weekly, 2011. **141**: p. w13149.
73. Holdorf, A.D., O. Kanagawa, and A.S. Shaw, *CD28 and T cell co-stimulation*. Reviews in immunogenetics, 2000. **2**: p. 175-84.
74. Holt, D.W., *Therapeutic drug monitoring of immunosuppressive drugs in kidney transplantation*. Current opinion in nephrology and hypertension, 2002. **11**: p. 657-63.
75. Hong, J.C. and B.D. Kahan, *Immunosuppressive agents in organ transplantation: past, present, and future*. Seminars in nephrology, 2000. **20**: p. 108-25.
76. Hsu, S.I., S.B. Ramirez, M.P. Winn, J.V. Bonventre, and W.F. Owen, *Evidence for genetic factors in the development and progression of IgA nephropathy*. Kidney international, 2000. **57**: p. 1818-35.
77. Hutchinson, P., M. Jose, R.C. Atkins, and S.R. Holdsworth, *Ex vivo lymphocyte proliferative function is severely inhibited in renal transplant patients on mycophenolate mofetil treatment*. Transplant immunology, 2004. **13**: p. 55-61.
78. Ibels, L.S. and A.Z. Gyory, *IgA nephropathy: analysis of the natural history, important factors in the progression of renal disease, and a review of the literature*. Medicine, 1994. **73**: p. 79-102.
79. Jain, J., P.G. McCaffrey, Z. Miner, T.K. Kerppola, J.N. Lambert, G.L. Verdine, T. Curran, and A. Rao, *The T-cell transcription factor NFATp is a substrate for calcineurin and interacts with Fos and Jun*. Nature, 1993. **365**: p. 352-5.

80. Jennette, J.C., S.D. Wall, and A.S. Wilkman, *Low incidence of IgA nephropathy in blacks*. *Kidney international*, 1985. **28**: p. 944-50.
81. Johnston, A. and D.W. Holt, *Therapeutic drug monitoring of immunosuppressant drugs*. *British journal of clinical pharmacology*, 1999. **47**: p. 339-50.
82. Johnston, A., P.A. Keown, and D.W. Holt, *Simple bioequivalence criteria: are they relevant to critical dose drugs? Experience gained from cyclosporine*. *Therapeutic drug monitoring*, 1997. **19**: p. 375-81.
83. Johnston, A., O.J. David, and G.F. Cooney, *Pharmacokinetic validation of neoral absorption profiling*. *Transplantation proceedings*, 2000. **32**: p. 53S-56S.
84. Kahan, B.D., *Cyclosporine*. *The New England journal of medicine*, 1989. **321**: p. 1725-38.
85. Kahan, B.D., M. Welsh, L. Schoenberg, L.P. Rutzky, S.M. Katz, D.L. Urbauer, and C.T. Van Buren, *Variable oral absorption of cyclosporine. A biopharmaceutical risk factor for chronic renal allograft rejection*. *Transplantation*, 1996. **62**: p. 599-606.
86. Kalil, R.S., S.L. Hudson, and R.S. Gaston, *Determinants of cardiovascular mortality after renal transplantation: a role for cytomegalovirus?* *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, 2003. **3**: p. 79-81.
87. Kasiske, B.L., K. Heim-Duthoy, K.V. Rao, and W.M. Awni, *The relationship between cyclosporine pharmacokinetic parameters and subsequent acute rejection in renal transplant recipients*. *Transplantation*, 1988. **46**: p. 716-22.
88. Katafuchi, R., Y. Oh, K. Hori, T. Komota, T. Yanase, K. Ikeda, T. Omura, and S. Fujimi, *An important role of glomerular segmental lesions on progression of IgA nephropathy: a multivariate analysis*. *Clinical nephrology*, 1994. **41**: p. 191-8.
89. Kelly, W.D., R.C. Lillehei, J.B. Aust, R.L. Varco, A.S. Leonard, W.O. Griffin, C. Markland, R.C. Herdman, R.L. Vernier, A.F. Michael, and J. Levitt, *Kidney transplantation: experiences at the University of Minnesota Hospitals*. *Surgery*, 1967. **62**: p. 704-20.
90. Keown, P., D. Landsberg, P. Halloran, A. Shoker, D. Rush, J. Jeffery, D. Russell, C. Stiller, N. Muirhead, E. Cole, L. Paul, J. Zaltzman, R. Loertscher, P. Daloz, R. Dandavino, A. Boucher, P. Handa, J. Lawen, P. Belitsky, and P. Parfrey, *A randomized, prospective multicenter pharmacoepidemiologic study of cyclosporine microemulsion in stable renal graft recipients. Report of the Canadian Neoral Renal Transplantation Study Group*. *Transplantation*, 1996. **62**: p. 1744-52.
91. Keown, P.A., B. Kiberd, R. Balshaw, S. Khorasheh, C. Marra, P. Belitsky, and Z. Kalo, *An economic model of 2-hour post-dose ciclosporin monitoring in renal transplantation*. *PharmacoEconomics*, 2004. **22**: p. 621-32.
92. Kiberd, B. and A. MacDonald, *Mycophenolate and glomerular disease*. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation*, 1998. **31**: p. 364-5.

93. Kruse, A., P. Neustock, M. Reuter, and H. Kirchner, *T-cell surface molecule expression and interferon-gamma production in human cord blood*. Journal of interferon research, 1993. **13**: p. 221-5.
94. Kuypers, D.R., Y. Le Meur, M. Cantarovich, M.J. Tredger, S.E. Tett, D. Cattaneo, B. Tonshoff, D.W. Holt, J. Chapman, and T. Gelder, *Consensus report on therapeutic drug monitoring of mycophenolic acid in solid organ transplantation*. Clinical journal of the American Society of Nephrology, 2010. **5**: p. 341-58.
95. Lai, K.N., F.M. Lai, C.P. Ho, and K.W. Chan, *Corticosteroid therapy in IgA nephropathy with nephrotic syndrome: a long-term controlled trial*. Clinical nephrology, 1986. **26**: p. 174-80.
96. Langman, L.J., D.F. LeGatt, P.F. Halloran, and R.W. Yatscoff, *Pharmacodynamic assessment of mycophenolic acid-induced immunosuppression in renal transplant recipients*. Transplantation, 1996. **62**: p. 666-72.
97. Lanier, L.L., D.W. Buck, L. Rhodes, A. Ding, E. Evans, C. Barney, and J.H. Phillips, *Interleukin 2 activation of natural killer cells rapidly induces the expression and phosphorylation of the Leu-23 activation antigen*. The Journal of experimental medicine, 1988. **167**: p. 1572-85.
98. Lattrell, B., *Immunsuppression in der Transplantation*, in *Teil 2 Immunsuppressiva*. 2003: Novartis Pharma GmbH, Nürnberg. p. 1-107.
99. Layward, L., A.C. Allen, J.M. Hattersley, S.J. Harper, and J. Feehally, *Elevation of IgA in IgA nephropathy is localized in the serum and not saliva and is restricted to the IgA1 subclass*. Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association, 1993. **8**: p. 25-8.
100. Le Meur, Y., M. Buchler, A. Thierry, S. Caillard, F. Villemain, S. Lavaud, I. Etienne, P.F. Westeel, B. Hurault de Ligny, L. Rostaing, E. Thervet, J.C. Szlag, J.P. Rerolle, A. Rousseau, G. Touchard, and P. Marquet, *Individualized mycophenolate mofetil dosing based on drug exposure significantly improves patient outcomes after renal transplantation*. American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons, 2007. **7**: p. 2496-503.
101. Lee, H.J., K. Pawlak, B.T. Nguyen, R.K. Robins, and W. Sadee, *Biochemical differences among four inosinate dehydrogenase inhibitors, mycophenolic acid, ribavirin, tiazofurin, and selenazofurin, studied in mouse lymphoma cell culture*. Cancer research, 1985. **45**: p. 5512-20.
102. Levy, G., J. Rochon, D. Freeman, P.Y. Wong, L. Banks, C. Roach, K. Engel, and D. Grant, *Cyclosporine Neoral in liver transplant recipients*. Transplantation proceedings, 1994. **26**: p. 2949-52.
103. Levy, M. and J. Berger, *Worldwide perspective of IgA nephropathy*. American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation, 1988. **12**: p. 340-7.
104. Lindholm, A. and B.D. Kahan, *Influence of cyclosporine pharmacokinetics, trough concentrations, and AUC monitoring on outcome after kidney*

- transplantation*. Clinical pharmacology and therapeutics, 1993. **54**: p. 205-18.
105. Liu, J., J.D. Farmer, Jr., W.S. Lane, J. Friedman, I. Weissman, and S.L. Schreiber, *Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes*. Cell, 1991. **66**: p. 807-15.
106. Lomax-Smith, J.D., L.A. Zabrowarny, G.S. Howarth, A.E. Seymour, and A.J. Woodroffe, *The immunochemical characterization of mesangial IgA deposits*. The American journal of pathology, 1983. **113**: p. 359-64.
107. Lopez-Cabrera, M., A.G. Santis, E. Fernandez-Ruiz, R. Blacher, F. Esch, P. Sanchez-Mateos, and F. Sanchez-Madrid, *Molecular cloning, expression, and chromosomal localization of the human earliest lymphocyte activation antigen AIM/CD69, a new member of the C-type animal lectin superfamily of signal-transmitting receptors*. The Journal of experimental medicine, 1993. **178**: p. 537-47.
108. Lüllmann, H., K. Mohr, and M. Wehling, eds. *Pharmakologie und Toxikologie, Arzneimittel verstehen - Medikamente gezielt einsetzen*. 15. ed. 2003, Thieme.
109. Lüllmann, H., K. Mohr, and M. Wehling, eds. *Pharmakologie und Toxikologie, Arzneimittel verstehen - Medikamente gezielt einsetzen*. 15. ed. 2003, Thieme. Kap. 18.1, S. 487-88.
110. Maes, B.D., R. Oyen, K. Claes, P. Evenepoel, D. Kuypers, J. Vanwalleghem, B. Van Damme, and Y.F. Vanrenterghem, *Mycophenolate mofetil in IgA nephropathy: results of a 3-year prospective placebo-controlled randomized study*. Kidney international, 2004. **65**: p. 1842-9.
111. Maino, V.C., M.A. Suni, and J.J. Ruitenbergh, *Rapid flow cytometric method for measuring lymphocyte subset activation*. Cytometry, 1995. **20**: p. 127-33.
112. Maino, V.C., et al., *FAST IMMUNE ASSAY SYSTEM, A rapid and comprehensive system for assessing lymphocyte function by flow cytometry*: Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, California, USA.
113. Maisonneuve, P., L. Agodoa, R. Gellert, J.H. Stewart, G. Bucciatti, A.B. Lowenfels, R.A. Wolfe, E. Jones, A.P. Disney, D. Briggs, M. McCredie, and P. Boyle, *Distribution of primary renal diseases leading to end-stage renal failure in the United States, Europe, and Australia/New Zealand: results from an international comparative study*. American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation, 2000. **35**: p. 157-65.
114. Maloy, K.J. and F. Powrie, *Regulatory T cells in the control of immune pathology*. Nature immunology, 2001. **2**: p. 816-22.
115. McGuire, T.R., G.C. Yee, S. Emerson, D.J. Gmur, and J. Carlin, *Pharmacodynamic studies of cyclosporine in marrow transplant recipients. A comparison of three assay methods*. Transplantation, 1992. **53**: p. 1272-5.
116. Mele, T.S. and P.F. Halloran, *The use of mycophenolate mofetil in transplant recipients*. Immunopharmacology, 2000. **47**: p. 215-45.

117. Mestecky, J., M.W. Russell, S. Jackson, and T.A. Brown, *The human IgA system: a reassessment*. Clinical immunology and immunopathology, 1986. **40**: p. 105-14.
118. Mestecky, J., M. Tomana, P.A. Crowley-Nowick, Z. Moldoveanu, B.A. Julian, and S. Jackson, *Defective galactosylation and clearance of IgA1 molecules as a possible etiopathogenic factor in IgA nephropathy*. Contributions to nephrology, 1993. **104**: p. 172-82.
119. Minami, Y., T. Kono, T. Miyazaki, and T. Taniguchi, *The IL-2 receptor complex: its structure, function, and target genes*. Annual review of immunology, 1993. **11**: p. 245-68.
120. Mitsui, A. and S. Suzuki, *Immunosuppressive effect of mycophenolic acid*. The Journal of antibiotics, 1969. **22**: p. 358-63.
121. Modrow, S., D. Falke, H. Schatzl, and U. Truyen, *Molekulare Virologie*. 3 ed. 2009, Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag GmbH. Kap. 7, S. 61-68.
122. Modrow, S., D. Falke, H. Schatzl, and U. Truyen, *Molekulare Virologie*. 3 ed. 2009, Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag GmbH. Kap. 19, S. 590-93.
123. Mohammadpour, N., S. Elyasi, N. Vahdati, A.H. Mohammadpour, and J. Shamsara, *A review on therapeutic drug monitoring of immunosuppressant drugs*. Iranian journal of basic medical sciences, 2011. **14**: p. 485-98.
124. Muller, T.F., S.O. Grebe, B. Reckzeh, A. Borutta, K. Radsak, and H. Lange, *Short- and long-term effects of polyclonal antibodies*. Transplantation proceedings, 1999. **31**: p. 12S-15S.
125. Murphy, K.P., P. Travers, M. Walport, and C. Janeway, eds. *Janeway's immunobiology*. 7 ed. 2008, Garland Science. Kap. 1-5, S. 9-10.
126. Murphy, K.P., P. Travers, M. Walport, and C. Janeway, eds. *Janeway's immunobiology*. 7 ed. 2008, Garland Science. Kap. 4-18, S. 169-71.
127. Murphy, K.P., P. Travers, M. Walport, and C. Janeway, eds. *Janeway's immunobiology*. 7 ed. 2008, Garland Science. Kap. 1-19, S. 30-32.
128. Murphy, K.P., P. Travers, M. Walport, and C. Janeway, eds. *Janeway's immunobiology*. 7 ed. 2008, Garland Science. Kap. 8-24, S. 359-61.
129. Nakamura, M., N. Ogawa, A. Shalabi, W.R. Maley, D. Longo, and J.F. Burdick, *Positive effect on T-cell regulatory apoptosis by mycophenolate mofetil*. Clinical transplantation, 2001. **15 Suppl 6**: p. 36-40.
130. Nakamura, S., S.S. Sung, J.M. Bjorndahl, and S.M. Fu, *Human T cell activation. IV. T cell activation and proliferation via the early activation antigen EA 1*. The Journal of experimental medicine, 1989. **169**: p. 677-89.
131. Nashan, B., *Review of T-cell activation: impact of Janus kinase 3 inhibition*. Transplantation, 2003. **75**: p. 1783-5.
132. Nicholls, A.J., *Opportunities for therapeutic monitoring of mycophenolate mofetil dose in renal transplantation suggested by the pharmacokinetic/pharmacodynamic relationship for mycophenolic acid and suppression of rejection*. Clinical biochemistry, 1998. **31**: p. 329-33.

133. Nicholls, K.M., K.F. Fairley, J.P. Dowling, and P. Kincaid-Smith, *The clinical course of mesangial IgA associated nephropathy in adults*. The Quarterly journal of medicine, 1984. **53**: p. 227-50.
134. Nowack, R., R. Birck, and F.J. van der Woude, *Mycophenolate mofetil for systemic vasculitis and IgA nephropathy*. Lancet, 1997. **349**: p. 774.
135. Nowak, I. and L.M. Shaw, *Mycophenolic acid binding to human serum albumin: characterization and relation to pharmacodynamics*. Clinical chemistry, 1995. **41**: p. 1011-7.
136. Oellerich, M., V.W. Armstrong, E. Schutz, and L.M. Shaw, *Therapeutic drug monitoring of cyclosporine and tacrolimus. Update on Lake Louise Consensus Conference on cyclosporin and tacrolimus*. Clinical biochemistry, 1998. **31**: p. 309-16.
137. Pescovitz, M.D., *Review of the CMV in renal transplantation*. Saudi journal of kidney diseases and transplantation : an official publication of the Saudi Center for Organ Transplantation, Saudi Arabia, 2007. **18**: p. 505-11.
138. Ponticelli, C., L. Traversi, A. Feliciani, B.M. Cesana, G. Banfi, and A. Tarantino, *Kidney transplantation in patients with IgA mesangial glomerulonephritis*. Kidney international, 2001. **60**: p. 1948-54.
139. Pozzi, C., P.G. Bolasco, G.B. Fogazzi, S. Andrulli, P. Altieri, C. Ponticelli, and F. Locatelli, *Corticosteroids in IgA nephropathy: a randomised controlled trial*. Lancet, 1999. **353**: p. 883-7.
140. Pozzi, C., S. Andrulli, L. Del Vecchio, P. Melis, G.B. Fogazzi, P. Altieri, C. Ponticelli, and F. Locatelli, *Corticosteroid effectiveness in IgA nephropathy: long-term results of a randomized, controlled trial*. Journal of the American Society of Nephrology : JASN, 2004. **15**: p. 157-63.
141. Quemeneur, L., M. Flacher, L.M. Gerland, M. Ffrench, J.P. Revillard, and N. Bonnefoy-Berard, *Mycophenolic acid inhibits IL-2-dependent T cell proliferation, but not IL-2-dependent survival and sensitization to apoptosis*. Journal of immunology, 2002. **169**: p. 2747-55.
142. Radford, M.G., Jr., J.V. Donadio, Jr., E.J. Bergstralh, and J.P. Grande, *Predicting renal outcome in IgA nephropathy*. Journal of the American Society of Nephrology : JASN, 1997. **8**: p. 199-207.
143. Rasche, F.M., A. Schwarz, and F. Keller, *Tonsillectomy does not prevent a progressive course in IgA nephropathy*. Clinical nephrology, 1999. **51**: p. 147-52.
144. Rasche, F.M., F. Keller, L. von Muller, L.K. Sailer, W. Karges, and D. Czock, *Mycophenolic acid therapy after cyclophosphamide pulses in progressive IgA nephropathy*. Journal of nephrology, 2006. **19**: p. 465-72.
145. Rasche, F.M., C.H. Klotz, D. Czock, W. Karges, R. Muehe, P.M. Jehle, A. Mertz, and F. Keller, *Cyclophosphamide pulse therapy in advanced progressive IgA nephropathy*. Nephron. Clinical practice, 2003. **93**: p. c131-6.
146. Rasche, F.M., F. Keller, P.M. Lepper, C. Aymanns, W. Karges, L.C. Sailer, L. Muller, and D. Czock, *High-dose intravenous immunoglobulin pulse therapy in patients with progressive immunoglobulin A nephropathy: a long-term follow-up*. Clinical and experimental immunology, 2006. **146**: p. 47-53.

147. Roccatello, D., G. Picciotto, M. Torchio, R. Ropolo, M. Ferro, R. Franceschini, G. Quattrocchio, G. Cacace, R. Coppo, L.M. Sena, and et al., *Removal systems of immunoglobulin A and immunoglobulin A containing complexes in IgA nephropathy and cirrhosis patients. The role of asialoglycoprotein receptors*. Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology, 1993. **69**: p. 714-23.
148. Romagnani, S., *Th1/Th2 cells*. Inflammatory bowel diseases, 1999. **5**: p. 285-94.
149. Rostoker, G., D. Desvaux-Belghiti, Y. Pilatte, M. Petit-Phar, C. Philippon, L. Deforges, H. Terzidis, L. Inrator, C. Andre, S. Adnot, P. Bonin, P. Bierling, P. Remy, G. Lagrue, P. Lang, and B. Weil, *High-dose immunoglobulin therapy for severe IgA nephropathy and Henoch-Schonlein purpura*. Annals of internal medicine, 1994. **120**: p. 476-84.
150. Ruef, C., K. Budde, J. Lacy, W. Northemann, M. Baumann, R.B. Sterzel, and D.L. Coleman, *Interleukin 6 is an autocrine growth factor for mesangial cells*. Kidney international, 1990. **38**: p. 249-57.
151. Ruggenti, P., A. Perna, R. Benini, T. Bertani, C. Zoccali, Q. Maggiore, M. Salvadori, and G. Remuzzi, *In chronic nephropathies prolonged ACE inhibition can induce remission: dynamics of time-dependent changes in GFR. Investigators of the GISEN Group. Gruppo Italiano Studi Epidemiologici in Nefrologia*. Journal of the American Society of Nephrology, 1999. **10**: p. 997-1006.
152. Santis, A.G., M.R. Campanero, J.L. Alonso, A. Tugores, M.A. Alonso, E. Yague, J.P. Pivel, and F. Sanchez-Madrid, *Tumor necrosis factor-alpha production induced in T lymphocytes through the AIM/CD69 activation pathway*. European journal of immunology, 1992. **22**: p. 1253-9.
153. Schiff, J., E. Cole, and M. Cantarovich, *Therapeutic monitoring of calcineurin inhibitors for the nephrologist*. Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN, 2007. **2**: p. 374-84.
154. Scholl, U., U. Wastl, T. Risler, N. Braun, B. Grabensee, P. Heering, P. Schollmeyer, I. Zauner, G. Stein, R. Funfstuck, and F. Keller, *The "point of no return" and the rate of progression in the natural history of IgA nephritis*. Clinical nephrology, 1999. **52**: p. 285-92.
155. Schrama, Y.C., J.A. Joles, A. van Tol, P. Boer, H.A. Koomans, and R.J. Hene, *Conversion to mycophenolate mofetil in conjunction with stepwise withdrawal of cyclosporine in stable renal transplant recipients*. Transplantation, 2000. **69**: p. 376-83.
156. Schreiber, A., G. Harter, A. Schubert, D. Bunjes, T. Mertens, and D. Michel, *Antiviral treatment of cytomegalovirus infection and resistant strains*. Expert opinion on pharmacotherapy, 2009. **10**: p. 191-209.
157. Schreiber, S.L. and G.R. Crabtree, *The mechanism of action of cyclosporin A and FK506*. Immunology today, 1992. **13**: p. 136-42.
158. Segerer, S., P.J. Nelson, and D. Schlondorff, *Chemokines, chemokine receptors, and renal disease: from basic science to pathophysiologic and therapeutic studies*. Journal of the American Society of Nephrology : JASN, 2000. **11**: p. 152-76.
159. Shaw, L.M., *Cyclosporine monitoring*. Clinical chemistry, 1989. **35**: p. 5-6.

160. Shaw, L.M., M. Korecka, D. DeNofrio, and K.L. Brayman, *Pharmacokinetic, pharmacodynamic, and outcome investigations as the basis for mycophenolic acid therapeutic drug monitoring in renal and heart transplant patients*. Clinical biochemistry, 2001. **34**: p. 17-22.
161. Shaw, L.M., D.W. Holt, P. Keown, R. Venkataramanan, and R.W. Yatscoff, *Current opinions on therapeutic drug monitoring of immunosuppressive drugs*. Clinical therapeutics, 1999. **21**: p. 1632-52; discussion 1631.
162. Shaw, L.M., M. Korecka, R. Venkataramanan, L. Goldberg, R. Bloom, and K.L. Brayman, *Mycophenolic acid pharmacodynamics and pharmacokinetics provide a basis for rational monitoring strategies*. American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons, 2003. **3**: p. 534-42.
163. Shaw, L.M., R.W. Yatscoff, L.D. Bowers, D.J. Freeman, J.R. Jeffery, P.A. Keown, I.J. McGilveray, T.G. Rosano, and P.Y. Wong, *Canadian Consensus Meeting on cyclosporine monitoring: report of the consensus panel*. Clinical chemistry, 1990. **36**: p. 1841-6.
164. Shaw, L.M., H.W. Sollinger, P. Halloran, R.E. Morris, R.W. Yatscoff, J. Ransom, I. Tsina, P. Keown, D.W. Holt, R. Lieberman, and et al., *Mycophenolate mofetil: a report of the consensus panel*. Therapeutic drug monitoring, 1995. **17**: p. 690-9.
165. Shaw, L.M., A. Nicholls, M. Hale, V.W. Armstrong, M. Oellerich, R. Yatscoff, R.E. Morris, D.W. Holt, R. Venkataramanan, J. Haley, P. Halloran, R. Ettenger, P. Keown, and R.G. Morris, *Therapeutic monitoring of mycophenolic acid. A consensus panel report*. Clinical biochemistry, 1998. **31**: p. 317-22.
166. Shoji, T., I. Nakanishi, A. Suzuki, T. Hayashi, M. Togawa, N. Okada, E. Imai, M. Hori, and Y. Tsubakihara, *Early treatment with corticosteroids ameliorates proteinuria, proliferative lesions, and mesangial phenotypic modulation in adult diffuse proliferative IgA nephropathy*. American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation, 2000. **35**: p. 194-201.
167. Sigal, N.H. and F.J. Dumont, *Cyclosporin A, FK-506, and rapamycin: pharmacologic probes of lymphocyte signal transduction*. Annual review of immunology, 1992. **10**: p. 519-60.
168. Sollinger, H., *Enteric-coated mycophenolate sodium: therapeutic equivalence to mycophenolate mofetil in de novo renal transplant patients*. Transplantation proceedings, 2004. **36**: p. 517S-520S.
169. Sollinger, H.W., *Mycophenolate mofetil for the prevention of acute rejection in primary cadaveric renal allograft recipients. U.S. Renal Transplant Mycophenolate Mofetil Study Group*. Transplantation, 1995. **60**: p. 225-32.
170. Sommerer, C., T. Giese, S. Meuer, and M. Zeier, *New concepts to individualize calcineurin inhibitor therapy in renal allograft recipients*. Saudi journal of kidney diseases and transplantation : an official publication of the Saudi Center for Organ Transplantation, Saudi Arabia, 2010. **21**: p. 1030-7.

171. Sridhar, N., T.J. Schroeder, A.J. Pesce, and M.R. First, *Clinical correlations of cyclosporine HPLC and FPIA levels in renal transplant recipients*. Transplantation proceedings, 1990. **22**: p. 1257-9.
172. Staatz, C.E. and S.E. Tett, *Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of mycophenolate in solid organ transplant recipients*. Clinical pharmacokinetics, 2007. **46**: p. 13-58.
173. Starzl, T.E., *The ascension of clinical organ transplantation*. Transplantation proceedings, 1999. **31**: p. 43-5.
174. Starzl, T.E., *A tribute to Jean Borel: a transplanter's point of view*. Transplantation proceedings, 1999. **31**: p. 52S-53S.
175. Takeda, S., M. Takahashi, Y. Sado, K. Takeuchi, Y. Hakamata, H. Shimizu, T. Kaneko, H. Yamamoto, C. Ito, S. Ookawara, Y. Asano, E. Kusano, and E. Kobayashi, *Prevention of glomerular crescent formation in glomerulonephritis by mycophenolate mofetil in rats*. Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association, 2004. **19**: p. 2228-36.
176. Tedesco-Silva, H., M.C. Bastien, L. Choi, C. Felipe, J. Campestrini, F. Picard, and R. Schmouder, *Mycophenolic acid metabolite profile in renal transplant patients receiving enteric-coated mycophenolate sodium or mycophenolate mofetil*. Transplantation proceedings, 2005. **37**: p. 852-5.
177. Testi, R., J.H. Phillips, and L.L. Lanier, *Leu 23 induction as an early marker of functional CD3/T cell antigen receptor triggering. Requirement for receptor cross-linking, prolonged elevation of intracellular [Ca⁺⁺] and stimulation of protein kinase C*. Journal of immunology, 1989. **142**: p. 1854-60.
178. Tett, S.E., F. Saint-Marcoux, C.E. Staatz, M. Brunet, A.A. Vinks, M. Miura, P. Marquet, D.R. Kuypers, T. van Gelder, and D. Cattaneo, *Mycophenolate, clinical pharmacokinetics, formulations, and methods for assessing drug exposure*. Transplantation reviews, 2011. **25**: p. 47-57.
179. van Besouw, N.M., B.J. van der Mast, P. de Kuiper, P.J. Smak regoor, L.M. Vaessen, J.N. Ijzermans, T. van Gelder, and W. Weimar, *Down-regulated donor-specific T-cell reactivity during successful tapering of immunosuppression after kidney transplantation*. Clinical and experimental immunology, 2002. **128**: p. 388-93.
180. van Gelder, T., L.B. Hilbrands, Y. Vanrenterghem, W. Weimar, J.W. de Fijter, J.P. Squifflet, R.J. Hene, G.A. Verpooten, M.T. Navarro, M.D. Hale, and A.J. Nicholls, *A randomized double-blind, multicenter plasma concentration controlled study of the safety and efficacy of oral mycophenolate mofetil for the prevention of acute rejection after kidney transplantation*. Transplantation, 1999. **68**: p. 261-6.
181. van Gelder, T., Y. Le Meur, L.M. Shaw, M. Oellerich, D. DeNofrio, C. Holt, D.W. Holt, B. Kaplan, D. Kuypers, B. Meiser, B. Toenshoff, and R.D. Mamelok, *Therapeutic drug monitoring of mycophenolate mofetil in transplantation*. Therapeutic drug monitoring, 2006. **28**: p. 145-54.
182. Venkataramanan, R. and L.M. Shaw, *Therapeutic monitoring of mycophenolic acid in liver transplant patients*. Liver transplantation : official

- publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society, 2004. **10**: p. 503-5.
183. Venkatesh, N., Y. Feng, B. DeDecker, P. Yacono, D. Golan, T. Mitchison, and F. McKeon, *Chemical genetics to identify NFAT inhibitors: potential of targeting calcium mobilization in immunosuppression*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004. **101**: p. 8969-74.
184. Voisard, R., S. Viola, V. Kaspar, C.M. Weber, L. von Muller, R. Baur, I. Gastrock-Balitsch, and V. Hombach, *Effects of mycophenolate mofetil on key pattern of coronary restenosis: a cascade of in vitro and ex vivo models*. BMC cardiovascular disorders, 2005. **5**: p. 9.
185. von Müller, L., C. Schliep, M. Storck, W. Hampl, T. Schmid, D. Abendroth, and T. Mertens, *Severe graft rejection, increased immunosuppression, and active CMV infection in renal transplantation*. Journal of medical virology, 2006. **78**: p. 394-9.
186. von Müller, L., A. Schiller, D. Dangelmaier, A. Carius, P. Glander, S. Bauer, T. Mertens, F. Keller, D. Czock, and F.M. Rasche, *T-cell-proliferation and early Th1-cell activation is modulated differently by mycophenolic acid*. Transplantation, 2006. **82**: p. 998-998.
187. von Müller, L., W. Hampl, J. Hinz, H. Meisel, A. Reip, E. Engelmann, R. Heilbronn, B. Gartner, O. Kramer, H. Einsele, H. Hebart, T. Ljubicic, J. Loffler, and T. Mertens, *High variability between results of different in-house tests for cytomegalovirus (CMV) monitoring and a standardized quantitative plasma CMV PCR assay*. Journal of clinical microbiology, 2002. **40**: p. 2285-7.
188. Vonderscher, J. and A. Meinzer, *Rationale for the development of Sandimmune Neoral*. Transplantation proceedings, 1994. **26**: p. 2925-7.
189. Wallemacq, P.E. and K. Alexandre, *Evaluation of the new AxSYM cyclosporine assay: comparison with TDx monoclonal whole blood and Emit cyclosporine assays*. Clinical chemistry, 1999. **45**: p. 432-5.
190. White, D.J., *Cyclosporin A. Clinical pharmacology and therapeutic potential*. Drugs, 1982. **24**: p. 322-34.
191. Williams, R.H., D.H. Lively, D.C. DeLong, J.C. Cline, and M.J. Sweeny, *Mycophenolic acid: antiviral and antitumor properties*. The Journal of antibiotics, 1968. **21**: p. 463-4.
192. Yoshioka, K., T. Takemura, K. Murakami, M. Okada, S. Hino, H. Miyamoto, and S. Maki, *Transforming growth factor-beta protein and mRNA in glomeruli in normal and diseased human kidneys*. Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology, 1993. **68**: p. 154-63.
193. Zimmermann, A.G., J.J. Gu, J. Laliberte, and B.S. Mitchell, *Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase: regulation of expression and role in cellular proliferation and T lymphocyte activation*. Progress in nucleic acid research and molecular biology, 1998. **61**: p. 181-209.

Danksagung

Für die Ermöglichung dieser Arbeit und die angenehmen Rahmenbedingungen in der Abteilung für Virologie danke ich Herrn Prof. Dr. Thomas Mertens.

Mein Dank gilt in ganz besonderer Weise Herrn PD Dr. Lutz von Müller für seinen unermüdlichen Einsatz und seine hervorragende Betreuung. Durch seine fachliche Unterstützung und Motivation war es möglich die Arbeit zu vollenden. Er vermittelte mir interessante Einblicke in das experimentelle Arbeiten und erwies sich während der Zusammenarbeit als Freund, dessen Humor ich überaus schätze.

Auch möchte ich ganz herzlich Herrn PD Dr. Franz Maximilian Rasche für dessen Einsatz und Mithilfe im Rahmen des klinischen Teils dieser Arbeit danken. Es war eine Freude mit Ihm und Lutz von Müller in einem Team arbeiten zu dürfen.

Herrn Dr. Alexander Gigler danke ich für seine tatkräftige Unterstützung bei den graphischen Darstellungen und seine aussergewöhnliche Hilfsbereitschaft, mit der er einem stets mit Rat und Tat zur Seite stand.

Darüber hinaus gilt mein Dank meinen Eltern, die mir den Rücken freihielten und deren Unterstützung ich mir jederzeit gewiss sein konnte.

Nicht zuletzt profitierte diese Arbeit von der freundlichen Unterstützung einiger Mitarbeiter der Abteilung für Virologie, die sich jederzeit als hilfsbereite Ansprechpartner erwiesen haben. Auch die Chefsekretärin Frau Ingrid Bennet hatte immer ein offenes Ohr und erleichterte die Arbeit in Ihrer freundlichen Art ungemein.

Abschließend möchte ich mich bei allen Menschen bedanken, die während dieser Zeit soviel Geduld mit mir hatten und nicht müde wurden mich zu motivieren, diese Arbeit zu verwirklichen.

Lebenslauf

Der Inhalt dieser Seite wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt.

Der Inhalt dieser Seite wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt.