

AUS DER KLINIK FÜR NEPHROLOGIE
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT CHARITÉ -
UNIVERSITÄTSMEDIZIN BERLIN

Dissertation

Einfluss des Proteinkinase-C-Inhibitors Sotrastaurin auf humane T-Zellen

zur Erlangung des akademischen Grades Doctor medicinae (Dr.
med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité - Universitätsmedizin Berlin

von

Ulrike Agnes Weber
aus Berlin

Datum der Promotion: 9. September 2016

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	4
2	Abstract	5
3	Einleitung	7
3.1	Nierentransplantation	7
3.2	Immunsuppression	7
3.2.1	Glukokortikoide	8
3.2.2	Calcineurininhibitoren	8
3.2.3	Proliferationshemmer	9
3.2.4	mTOR-Inhibitoren	9
3.2.5	Lymphozytenantikörper	9
3.2.6	Kostimulationsblocker	10
3.2.7	Ungelöste Probleme der immunsuppressiven Therapie	10
3.3	Proteinkinase C als neues Zielmolekül in der immunsuppressiven Therapie	11
3.4	Ein neuer Wirkmechanismus - der Proteinkinase-C-Inhibitor Sotrastaurin	12
3.5	Auseinandersetzung des T-Zell-Systems mit Fremdartigen im Hinblick auf das Rejektionsgeschehen	14
3.5.1	T-Zellen	14
3.5.2	T-Zellaktivierung und die Folgen	16
3.6	Fragestellung der Dissertation	17
4	Materialien und Methoden	18
4.1	Herstellung des Kulturmediums	18
4.1.1	Isolierung mononukleärer Zellen mittels Dichtegradientenzentrifugation aus Vollblut	18
4.1.2	Bestimmung der Gesamtzellzahl mit der Neubauer-Zählkammer	19
4.1.3	Stimulation der mononukleären Zellen mit Con A	19
4.1.4	Stimulation der mononukleären Zellen mit PMA und Ionomycin unter Zugabe von Brefeldin A	19
4.1.5	In-vitro-Behandlung der mononukleären Zellen mit Sotrastaurin	20
4.1.6	Durchflusszytometrische Analyse der markierten Zellen	20
4.1.6.1	Prinzip der Durchflusszytometrie	20

4.1.6.2	Durchflusszytometrische Analyse	21
4.1.7	Statistische Analyse	21
4.2	Messung der Expression der Oberflächenmoleküle nach Stimulation mit Con A und Behandlung mit Sotrastaurin	21
4.3	Messung der intrazellulären Zytokinexpression nach Stimulation und Behandlung mit Sotrastaurin	23
4.4	Messung der Proliferation von T-Zellen nach mitogener Stimulation mit Con A	24
4.4.1	Gewinnung der Zellen und Markierung mit CFSE	24
4.4.2	Bestimmung der Proliferationsrate nach Stimulation und Behandlung mit Sotrastaurin	24
5	Ergebnisse	26
5.1	Wirkung von Sotrastaurin auf die Expression von Oberflächenmolekülen von T-Zellen nach mitogener Stimulation	26
5.1.1	Auswirkungen auf die Expression der aktivierenden Oberflächenmoleküle	27
5.1.1.1	CD69	27
5.1.1.2	CD71	28
5.1.1.3	CD25	29
5.1.1.4	CxCr3 Chemokin-Rezeptor	30
5.1.2	Auswirkungen auf die Expression der kostimulatorischen Oberflächenmoleküle	31
5.1.2.1	ICOS	31
5.1.2.2	CTLA-4	32
5.1.2.3	CD134 (Ox40)	33
5.1.2.4	PD-1	35
5.2	Wirkung von Sotrastaurin auf die intrazelluläre Zytokinexpression	36
5.2.1	Interleukin 2	38
5.2.2	Interferon γ	39
5.3	Wirkung von Sotrastaurin auf die Proliferation von T-Zellen	40
6	Diskussion	43
6.1	Oberflächenmoleküle	43
6.1.1	Oberflächenmoleküle, die die T-Zell-Aktivierung stimulieren bzw. inhibieren	43
6.1.2	Auswirkungen auf Aktivierungsmarker	45
6.1.3	Modulation der Th1-Antwort	47
6.1.4	Auswirkungen der Proteinkinase-C-Inhibition auf den Endpunkt Proliferation	49

6.2	Sotrastaurin und die Effekte auf andere Zellen des Immunsystems	51
6.2.1	Dendritische Zellen	51
6.2.2	Natürliche Killerzellen	52
6.3	Weiterführende Untersuchungen B-Zellen	53
6.4	Klinischer Ausblick - die Anwendung von Sotrastaurin	54
6.4.1	Transplantation	54
6.4.2	Autoimmunerkrankungen	55
6.4.3	Onkologie	55
7	Literaturverzeichnis	57
8	Eidesstattliche Versicherung	71
9	Lebenslauf	72
10	Publikationen	73
11	Danksagung	74

1 Zusammenfassung

Die Suche nach neuen immunsuppressiven Substanzen ist trotz aller Erfolge der Transplantationsmedizin eine drängende Notwendigkeit. Diese Medikamente sollen Rejektionen wirkungsvoll verhindern und zugleich über ein günstiges Nebenwirkungsprofil verfügen. Der neuartige Proteinkinase-C-Inhibitor Sotrastaurin erwies sich in den Voruntersuchungen *in vitro* und im Transplantationsmodell als vielversprechendes Immunsuppressivum. In Studien wurde die Effektivität des Wirkstoffes an *de novo* nierentransplantierten Patienten überprüft. Zum besseren Verständnis des Wirkmechanismus führten wir detaillierte *in vitro* Studien durch. Ziel war es, den Einfluss von Sotrastaurin auf den entscheidenden Schritt des Rejektionsgeschehens, die Aktivierung von T-Zellen, zu untersuchen. Die untersuchten Oberflächenmarker von T-Zellen übernehmen in der Signaltransduktionskette des Rejektionsprozesses wichtige Funktionen. Sie binden Zytokine, ermöglichen die Interaktion zwischen T-Zellen und Antigen-präsentierenden Zellen bzw. wirken kostimulierend. Zudem wurden die Auswirkungen von Sotrastaurin auf weitere bedeutsame Teilschritte der klonalen T-Zell-Expansion, wie die Produktion proinflammatorischer Zytokine und die Proliferation, exploriert.

In Anlehnung an die therapeutischen Konzentrationen im Blut von Nierentransplantierten erfolgte die Behandlung der mononukleären Zellen mit verschiedenen Dosierungen Sotrastaurin. Dies führte in der durchflusszytometrischen Analyse auf den aktivierten T-Zellen zu einer signifikanten Reduktion der Expression der kostimulatorischen und aktivierenden Oberflächenmoleküle ICOS, CTLA-4, CD71, CD25, Ox40, CXCR3 und PD-1. Die Expression des frühen Oberflächenmarkers CD69 wurde nicht beeinflusst. Weiterhin wurde nach Aktivierung und Behandlung mit Sotrastaurin die Produktion des für den Rejektionsprozess essentiellen Zytokins IL-2 sowie IFN γ von T-Zellen signifikant reduziert. Der Einfluss des Proteinkinase-C-Inhibitors auf den Endpunkt der T-Zell-Aktivierungskaskade, die T-Zell-Proliferation, wurde nach Aktivierung und zeitgleicher Behandlung mit Sotrastaurin evaluiert, indem die Proliferationsrate durchflusszytometrisch bestimmt wurde. Die T-Zell-Proliferation wurde signifikant und dosisabhängig inhibiert. Zusammenfassend inhibiert der neuartige Wirkstoff Sotrastaurin die T-Zell-Aktivierung, die Zytokinproduktion und die T-Zell-Proliferation *in vitro*. Eine Hemmung dieser Prozesse greift somit in die entscheidende Anfangsphase des Rejektionsprozesses ein.

2 Abstract

In spite of all successes in transplantation medicine the search for new immunosuppressive substances is a urgent need. These drugs have to prevent rejections effectively with minimum side effects. Sotrastaurin, a new Proteinkinase-C-Inhibitor showed to be a very effective immunosuppressive drug in vitro and in transplantation models. The effectivity of this drug was tested in de novo transplanted patients. To expand the understanding of the mechanism of action we evaluated Sotrastaurin in detailed in vitro studies with human T-cells. We especially analyzed the impact on T-cell-activation processes. According to therapeutic concentrations in kidney-transplanted patients mononuclear cells were treated with different dosages of Sotrastaurin. This resulted in a significant reduction of the surface marker expression of ICOS, CTLA-4, CD71, CD25, CXCR3, Ox40, CXCR3 und PD-1 on activated t-cells. The expression of the early t-cell-activation marker CD69 was not affected. Furthermore the treatment resulted in a significant reduction of the crucial cytokines IL-2 as well as IFN γ . The influence on proliferation, the endpoint of the t-cell-activation, showed to be significant and dose-dependent. The analyzed surface markers represent important signals within the rejection process. They bind cytokines, enable intercellular communication or act as costimuli. By impeding these activating processes the early phase of rejection is blocked. By inhibiting other important steps of the clonal t-cell-expansion, like the production of IL-2 or the expression of the subunit of the IL-2-receptor CD25, a reduction of t-cell-proliferation was observed in our studies. In summary, Sotrastaurin inhibits essential processes of transplant rejection like t-cell-activation, the production of cytokines and t-cell-proliferation.

Für meine Mutter

3 Einleitung

3.1 Nierentransplantation

Seit der ersten langfristig erfolgreichen Nierentransplantation 1954 hat sich die Nierentransplantation zu einem Therapiestandard in der Behandlung der terminalen Niereninsuffizienz entwickelt. [38] Die Einführung neuer Immunsuppressiva sowie deren optimierter Einsatz und Fortschritte auf dem Gebiet der Diagnostik z.B. Duplex-Sonographie, Gewebetypisierung und HLA-Antikörper haben diese Entwicklung erst möglich gemacht.

Durch die Behandlung des terminalen Nierenversagens mit einer Nierentransplantation lassen sich die Mortalitäts- und Morbiditätsraten im Vergleich zu Patienten, die auf ein Dialyseverfahren angewiesen sind, senken. [170] [128] Auch im Hinblick auf die Lebensqualität und die volkswirtschaftlichen Kosten, welche durch die Therapie des terminalen Nierenversagens entstehen, stellt eine Nierentransplantation die Methode der Wahl dar. In Deutschland wurden im Jahr 2013 knapp 2300 Nieren (mit Lebendspende) transplantiert. Demgegenüber stehen nahezu 8000 Menschen, die auf eine Spenderniere warten. [25]

In den Anfangsjahren der Transplantationsmedizin stand die Beherrschung der akuten Rejektion im Mittelpunkt der Bemühungen. Neuartige Immunsuppressiva und innovative medikamentöse Konzepte verbesserten das 1-Jahres-Transplantatüberleben auf aktuell nahezu 90%. Die Rate akuter Rejektionen wurde kontinuierlich gesenkt. [62] [16] Allein das Langzeitüberleben der Transplantate konnte nur geringfügig verbessert werden. [91] [60]

3.2 Immunsuppression

Die einzigen zur Verfügung stehenden Möglichkeiten zur Abschwächung der Abstoßungsreaktion waren in der Anfangszeit der Transplantationsmedizin die subletale Ganzkörperbestrahlung und die partielle Lymphadenektomie. [138]

Der kombinierte Einsatz von Azathioprin und Kortison in den sechziger Jahren ermöglichte die ersten längerfristigen Erfolge. Aber erst die Anwendung von Ciclosporin, einem Calcineurininhibitor (CNI) mit neuartigem Wirkmechanismus, und Steroid, brachte in den 80iger Jahren den Durchbruch in der langfristig erfolgreichen Suppression der Abstoßungsreaktion. [139] Seitdem wurde eine Vielzahl von Substanzen mit verschiedenen Wirkmechanismen für die Transplantationsmedizin entwickelt und erprobt. Man unterscheidet heute sechs Substanzklassen von Immunsuppressiva.

3.2.1 Glukokortikoide

Seit über 50 Jahren sind Glukokortikoide unverzichtbarer Bestandteil der immunsuppressiven Behandlung nach einer Organtransplantation. Sie ermöglichen eine hochwirksame unspezifische Suppression des Immunsystems und werden sowohl in der Erhaltungstherapie als auch in der Behandlung akuter Abstoßungen eingesetzt. [42] [1] Die Glukokortikoide regulieren über zytosolische Glukokortikoidrezeptoren, die von nahezu allen Körperzellen exprimiert werden, eine Vielzahl von Genen. [50] Aufgrund der unspezifischen Wirkung ist auch das Spektrum der Nebenwirkungen selbst bei niedrig dosierter Erhaltungstherapie vielfältig. Der Einsatz hat negative Auswirkungen auf den Knochenstoffwechsel und führt zu Muskelatrophie, Katarakten und opportunistischen Infektionen. Dermatologische Probleme treten häufig auf. Weitere Folgeerscheinungen sind Hypertonie, Hyperlipidämie und Diabetes mellitus. [1] [42] Daraus resultiert eine insgesamt höhere kardiovaskuläre Mortalität gegenüber steroidfreien Therapiekonzepten. [102] [11]

3.2.2 Calcineurininhibitoren

Die langfristigen Erfolge auf dem Gebiet der Transplantationsmedizin sind nicht denkbar ohne die Substanzklasse der Calcineurininhibitoren. Mit dieser Substanzgruppe war erstmals eine relativ spezifische Suppression der T-Zell-Aktivität möglich. Ciclosporin A und Tacrolimus sind Medikamente dieser Gruppe. Ciclosporin A binden an Cyclophilin A und Tacrolimus an das FKBP12. Die jeweils entstehenden Komplexe hemmen die Enzymaktivität von Calcineurin und blockieren so die für eine T-Zellaktivierung notwendige Dephosphorylierung von "Nuclear Factor of Activated T-cells" (NFAT). NFAT kann nicht in den Zellkern übertreten und dort die Transkription der messenger ribonucleic acid (RNA) von Interleukin-2 (IL-2) und anderen Zytokinen induzieren. [42] Die Nephrotoxizität der Calcineurininhibitoren stellt unter den bekannten Nebenwirkungen eine besondere therapeutische Herausforderung dar. [96] Exemplarisch ist das Versagen ursprünglich gesunder Nieren unter CNI-Therapie bei Empfängern von z.B. Herz- oder Lebertransplantaten. [101] Hypertonie und Diabetes mellitus sind weitere Nebenwirkungen dieser Substanzklasse. Insbesondere erhöht die Behandlung mit Tacrolimus die Wahrscheinlichkeit, einen Diabetes mellitus zu entwickeln. Neurotoxische Komplikationen wie z.B. Tremor treten ebenfalls häufig nach Anwendung von Tacrolimus auf. Spezifische Nebenwirkungen von Ciclosporin A sind Hyperlipidämie, Hirsutismus und Gingivahyperplasie. [12] [53] In prospektiven Studien konnte gezeigt werden, dass Tacrolimus potenter in der Prophylaxe von Rejektionen ist als Ciclosporin. Daher wird es häufig bei immunologischen Risikopatienten eingesetzt. [171] [45]

3.2.3 Proliferationshemmer

Proliferationshemmer inhibieren die de novo-Synthese von Purinnukleotiden und somit die DNA-Synthese. Im Gegensatz zu anderen Zellen sind Lymphozyten auf die de-novo-Synthese der Purine angewiesen. Zellteilung und -proliferation sind wichtige Aspekte der Immunantwort lymphoider Zellen nach Antigenstimulation. Azathioprin war der erste Vertreter dieser Substanzklasse und wird seit 1962 in der Transplantationsmedizin eingesetzt. [1] Mycophenolsäure inhibiert die Inosinmonophosphatdehydrogenase (IMPDH), ein Schlüsselenzym der de-novo-Purinsynthese. Bei der Mycophenolsäure (Mycophenolic Acid, MPA) stehen gastrointestinale Beschwerden und das Auftreten schwerer Zytomegalie (CMV)-Infektionen im Vordergrund. Im Vergleich zu Azathioprin weist die Mycophenolsäure eine geringere Knochenmarkstoxizität auf. [61] [116] In den aktuellen Richtlinien der KDIGO 2009 der National Kidney Association wird der Einsatz von MPA als Kombinationspartner in der Erhaltungstherapie präferiert. [58]

3.2.4 mTOR-Inhibitoren

Sirolimus und Everolimus binden an den mammalian-Target-of-Rapamycin(mTOR)-Komplex. Sie inhibieren so die IL-2-Rezeptor-vermittelte Signaltransduktion und damit die Proliferation der aktivierten T-Zellen. Everolimus unterscheidet sich von der Muttersubstanz Sirolimus vor allem hinsichtlich einer kürzeren Halbwertszeit. [42] Die wichtigsten Nebenwirkungen dieser Substanzklasse sind Hyperlipidämie, Blutbildveränderungen und Wundheilungsstörungen.

In der Initialphase nach Transplantation treten aufgrund der unspezifischen Proliferationshemmung auch mesenchymaler Zellen gehäuft Wundheilungsstörungen und Lymphozelen auf. Dosisabhängig können eine interstitielle Pneumonitis und die mitunter sehr schmerzhafte Stomatitis aphthosa auftreten. mTOR-Inhibitoren verstärken die Wirkung der Calcineurininhibitoren, aber leider auch deren Nebenwirkungen, insbesondere die Nephrotoxizität. Es werden verschiedene Ursachen für die Zunahme der Proteinurieinzidenz unter Therapie mit mTOR-Inhibitoren diskutiert. Letztendlich zwingt aber das Auftreten einer Proteinurie zum Absetzen des mTOR-Inhibitors. Bis zu 50% der Patienten können aufgrund der verschiedenen Nebenwirkungen des Medikamentes die Einnahme nicht fortsetzen. [95] [123] Zudem wurde in einer aktuellen Publikation ein erhöhtes Risiko für das Auftreten von donorspezifischen Antikörpern und einer humoralen Rejektion bei Einsatz einer Everolimus-basierten Immunsuppression beobachtet. [79]

3.2.5 Lymphozytenantikörper

Antilymphozytenglobulin (ALG) und Antithymozytenglobulin (ATG) sind polyklonale T-Zell-depletierende Antikörper. Sie werden aus den Seren von Tieren isoliert, die mit humanen Immunzellen immunisiert wurden. Die Anwendung von Lymphozytenantikörpern ist mit schweren Nebenwirkungen wie Neutropenien, Serumkrankheit und anaphylaktoiden Reaktionen assoziiert. Folglich werden sie nur noch in der Induktionstherapie bei Patienten mit hohem immunolo-

gischem Risiko bzw. bei steroidresistenten Abstoßungen eingesetzt. [42] [49] Muromonab-CD3 ist ein monoklonaler T-Zell-depletierender Antikörper, der sich gegen den CD3-Rezeptor-Komplex richtet. Die Bindung von Muromonab-CD3 an den CD3-Rezeptor führt zunächst zu einer kurzzeitigen Aktivierung der T-Zellen. Es resultiert eine massive Freisetzung von Zytokinen. Die damit verbundenen Nebenwirkungen und die Gefahr von anaphylaktischen Reaktionen führten dazu, dass heute auf den routinemäßigen Einsatz in der Transplantationsmedizin verzichtet wird. [49] [155] Basiliximab und Daclizumab sind nicht depletierende Antikörper, die sich gegen eine Untereinheit des IL-2-Rezeptors richten, der nur von aktivierten T-Zellen exprimiert wird. Durch Blockade dieser Rezeptoruntereinheit wird die Bindung des proinflammatorischen IL-2 verhindert und der Proliferationsreiz gehemmt. Mit dem Einsatz der IL-2-Rezeptor-Antikörper in der Induktionstherapie konnte die Zahl der Rejektionen in Kombination mit anderen Immunsuppressiva deutlich gesenkt werden. Beide Wirkstoffe sind gut verträglich. [97] [54] [159]

3.2.6 Kostimulationsblocker

Seit 2011 steht mit Belatacept ein neues Immunsuppressivum zur Verfügung. Belatacept, ein Fusionsprotein, blockiert selektiv die T-Zell-Kostimulation über den Rezeptor CD80/CD86 auf antigenpräsentierenden Zellen. So wird verhindert, dass die T-Zellaktivierung über das bedeutende kostimulatorische Molekül CD28 initiiert wird. [160] In den Phase-III Zulassungsstudien zeigte es die gleiche Effektivität wie Ciclosporin in Kombinationstherapie mit Mycophenolat, Steroiden und Basiliximab. Unter der Therapie mit Belatacept treten insbesondere bei Epstein-Barr-Virus (EBV)-negativen Empfängern gehäuft lymphoproliferative Erkrankungen nach Transplantation (Post-Transplant Lymphoproliferative Disorder, PTLD) auf. Daher ist die Gabe von Belatacept bei EBV-negativen Transplantatempfängern kontraindiziert. [161] [106]

3.2.7 Ungelöste Probleme der immunsuppressiven Therapie

Laut aktuellen Empfehlungen der internationalen Fachgesellschaften KDIGO und European Association of Urology sollten in der Initialtherapie nach Nierentransplantation Glukokortikoide, Proliferationshemmer und Calcineurininhibitoren eingesetzt werden. Der zusätzliche Einsatz von IL-2-Rezeptor-Antikörpern als Induktionstherapie reduziert die Rejektionsraten bzw. ermöglicht die Reduktion der Begleitimmunsuppression. Die initial eingesetzten Medikamente werden im weiteren Verlauf in reduzierter Dosis weitergeführt, um toxische Schäden zu minimieren. Rejektionen werden mit hochdosierten Steroiden, depletierenden Antikörpern, Plasmapherese und Immunglobulinen und ggfs. einer Umstellung des immunsuppressiven Regimes behandelt. [173] [72]

Die Anzahl der akuten frühen und auch späten Rejektionen konnte im letzten Jahrzehnt durch Verbesserungen auf dem Gebiet der Diagnostik, neuartige Immunsuppressiva und optimierte

Therapieregime signifikant verringert werden. Das 1-Jahresüberleben der Nierentransplantate verbesserte sich auf über 90%. [62] [60] Doch die erwartete Verbesserung des Langzeitüberlebens der Transplantate blieb weit hinter den Erwartungen zurück. Zwar konnten Hochrisikogruppen von den Neuerungen profitieren, doch verbesserte sich das Langzeitüberleben der Nierentransplantate in der Gruppe der Empfänger mit niedrigem Risiko, z.B. Empfänger von Lebendspenden, in den letzten beiden Jahrzehnten kaum. [91] Gegenüber der allgemeinen Bevölkerung ist die Morbiditäts- und Mortalitätsrate bei transplantierten Patienten deutlich erhöht. Kardiovaskuläre Erkrankungen sind die häufigste Todesursache von nierentransplantierten Patienten, dicht gefolgt von bösartigen Neuerkrankungen. Der Reduktion von kardiovaskulären Risikofaktoren wie beispielsweise Diabetes mellitus, Hypertonus und Störungen des Fettstoffwechsels kommt somit eine große Bedeutung zu. Auch opportunistische Infektionen stellen nach wie vor ein ernst zu nehmendes Risiko für nierentransplantierte Patienten dar. Zudem gefährden die medikamentös-toxischen Nebenwirkungen der heute verwendeten Immunsuppressiva, wie zum Beispiel gastrointestinale und hämatologische Probleme sowie die Nephrotoxizität, den Transplantationserfolg. [85] [142] [99] [103] Die hohen Morbiditäts- und Mortalitätsraten von nierentransplantierten Patienten sowie die ausbleibende Verbesserung des Langzeit-Transplantatüberlebens verdeutlichen die Notwendigkeit, neuartige Wirkstoffe zu entwickeln, die ein hohes Maß an Sicherheit hinsichtlich Rejektionen bieten und gleichzeitig ein günstiges Nebenwirkungsprofil aufweisen. Ziel ist es sowohl gut verträgliche Immunsuppressiva zu entwickeln, die einen wirksamen Schutz vor Rejektionen bieten, als auch oben beschriebenen Nebenwirkungen reduzieren und somit das Langzeit-Transplantatüberleben verbessern.

3.3 Proteinkinase C als neues Zielmolekül in der immunsuppressiven Therapie

Die Entdeckung der Proteinkinase C (PKC) im Jahre 1977 stellte einen Durchbruch auf dem Gebiet der Signaltransduktion dar. [147] Die PKC wird von einer Vielzahl Zelltypen exprimiert und ist an verschiedensten Prozessen der Zellregulation beteiligt. Durch Phosphorylierung von Serin- und Threoningruppen steuert die Proteinkinase C die Aktivierung einer Vielzahl von nachgeordneten Enzymen und Faktoren. Zur Familie der Proteinkinase C gehören mindestens 12 verschiedene Isoformen. Aufgrund ihrer Struktur und Form der Aktivierung werden sie in 3 Gruppen unterteilt: klassische/classical (cPKC), neue/novel (nPKC) und atypische/atypical PKC (aPKC). [120] Erst in den letzten Jahren ist es gelungen, die Funktionen der verschiedenen Isoformen der PKC *in vitro* und *in vivo* zu untersuchen. *In vivo* Versuche haben gezeigt, dass insbesondere PKC α , PKC β , und PKC θ besonders häufig in T-Lymphozyten vorkommen. [107] [81] [146]

Zur T-Zell-Aktivierung sind neben den Calcineurin-gesteuerten Prozessen auch Signale notwendig, die über die Proteinkinase C vermittelt werden. Beispielsweise ist die PKC θ an der Ak-

tivierung von “nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF- κ B)”, NFAT und “activator protein 1” (AP-1) *in vitro* beteiligt. Diese Transkriptionsfaktoren spielen eine entscheidende Rolle bei der T-Zell-Aktivierung. [146] [86] [94] An Knock-Out-Mäusen, bei denen PKC-Isoformen ausgeschaltet wurden, konnte die Bedeutung für die T-Zell-Aktivierung *in vivo* untersucht werden. PKC θ defiziente Mäuse zeigen eine stark verminderte IL-2-Produktion und T-Zell-Proliferation nach Antigenstimulation. Ein Mangel an PKC θ resultiert in einer verminderten Aktivierung von NFAT, wohingegen die Nf κ B-Aktivierung nur teilweise verringert wurde. [108] Eine PKC α -Defizienz bei Knock-Out-Mäusen beeinträchtigt die Reaktion der für die zelluläre Immunantwort charakteristischen T-Helferzellen des Typs 1 (TH1-Zellen). So ist beispielsweise auch die Produktion des typischen Zytokins Interferon γ (IFN γ) stark reduziert. [107] Schaltet man die Gene für die beiden PKC-Isoformen α und θ in Mäusen aus, so verlängert sich das Transplantatüberleben in Herztransplantationsmodellen gegenüber Wildtyp-Mäusen signifikant. Hingegen kommt es bei Knock-out-Mäuse mit PKC α oder PKC θ -Defizienz nur zu einer minimalen Verlängerung des Transplantatüberlebens gegenüber dem Wildtyp. [37] Bei PKC β -defizienten Mäusen ist die T-Zell-Aktivierungskaskade unbeeinträchtigt. Dafür ist die “lymphocyte function-associated antigen 1” (LFA-1) gesteuerte Bewegung durch die Mikrotubuli des Zytoskeletts der aktivierten T-Zellen gestört. [162] Die oben beschriebenen Auswirkungen eines Mangels der einzelnen Isoformen auf die Zellfunktion lassen für Inhibitoren der PKC auf Suppression der T-Zell-Aktivierung und damit auch des Rejektionsgeschehens nach Transplantation hoffen.

3.4 Ein neuer Wirkmechanismus - der Proteinkinase-C-Inhibitor Sotrastaurin

Unter den gegenwärtig gebräuchlichen Immunsuppressiva besitzen nur die Calcineurininhibitoren die Fähigkeit, die T-Zell-Aktivierung spezifisch zu hemmen. Allerdings ist der langfristige Einsatz dieser Substanzklasse mit schwerwiegenden Nebenwirkungen wie z.B. der Nephrotoxizität assoziiert. [42] Nachdem in umfangreichen Untersuchungen die Bedeutung der Proteinkinase C für die T-Zell-Aktivierung aufgedeckt wurde, lag die Entwicklung eines Wirkstoffes nahe, der diese Kinase inhibiert. Sotrastaurin (siehe Abbildung 3.1) ist ein neuartiger synthetischer Wirkstoff, der reversibel und selektiv die verschiedenen PKC-Isoformen hemmt. [27]

Diese Substanz inhibiert *in vitro* bereits im niedrigen nanomolaren Bereich die von T-Zellen exprimierten klassischen und neuen Isoformen der PKC, woraus eine Hemmung der frühen T-Zell-Aktivierung resultiert. Eine Inhibierung der atypischen Formen setzt hingegen erst ab Konzentrationen von einem 1 μmol ein. [27] [165]

Nach ersten vielversprechenden Versuchen *in vitro* erwies sich Sotrastaurin als sehr effektiv in der Prophylaxe der Abstoßung von Allotransplantaten in verschiedenen Transplantationsmodellen an Ratten und Primaten sowohl in der Monotherapie als auch in Kombination mit ande-

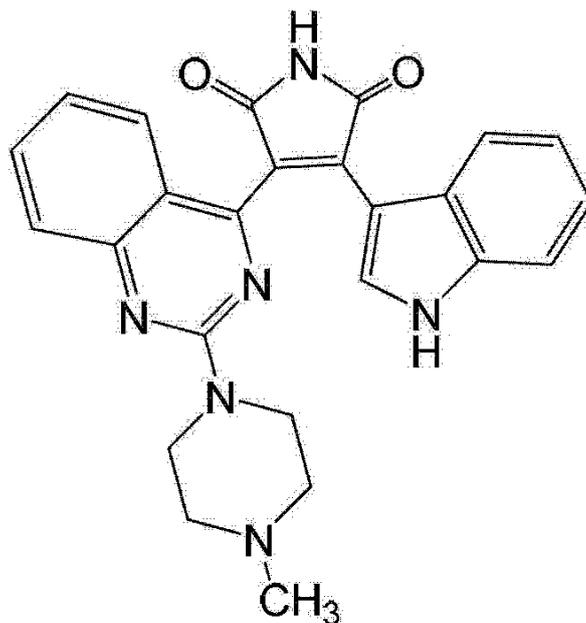


Abbildung 3.1: Strukturformel von Sotrastaurin

ren Immunsuppressiva. [164] [10] [10] [7] Sotrastaurin wird oral appliziert, schnell resorbiert und in der Leber überwiegend durch das 3A4 Isoenzym von Cytochrom P450 metabolisiert. [134] Nachdem in klinischen Phase-I-Studien an gesunden Probanden die Unbedenklichkeit des Wirkstoffes in der Einzelanwendung gezeigt werden konnte, [134] wurde die Verträglichkeit von Kombinationen mit anderen Immunsuppressiva an ebenfalls gesunden Probanden getestet. Es fand sich kein Hinweis auf klinisch relevante Nebenwirkungen der Kombinationstherapie. [64] [68] [67] [135] Anhand der Behandlung der Psoriasis, einer T-Zell-vermittelten überwiegend dermatologischen Autoimmunerkrankung, wurde in einer proof-of-concept-Studie die Hypothese der T-Zell-Inhibition durch Sotrastaurin am Menschen überprüft. Die Behandlung von an Psoriasis erkrankten Probanden mit Sotrastaurin war effektiv, so dass die klinische Wirksamkeit in weiteren Phase II Studien verifiziert wurde. [133]

Nach den vielversprechenden Ergebnissen der Voruntersuchungen wurden zwei Studien an de novo nierentransplantierten Patienten initiiert. In einer ersten dreiarmligen, randomisierten, multizentrischen Phase I/II-Studie über 12 Monate wurde die Wirkung von Sotrastaurin, in Kombination mit einer normalen oder einer reduzierten Dosis Tacrolimus und Steroiden mit dem Standardregime Tacrolimus, MPA und Steroiden verglichen. Drei Monate nach Transplantation wurde Tacrolimus im Sotrastaurin-Arm durch MPA ersetzt. Die Studie musste vorzeitig beendet werden, da der Ersatz von Tacrolimus durch MPA nach drei Monaten zu einer erhöhten Rejektionsrate führte. [13] In einer zweiten Studie wurde die Effektivität von Sotrastaurin, MPA und Steroiden mit dem Standardregime aus Tacrolimus, MPA und Steroiden verglichen. Signifikant erhöhte Rejektionsraten im CNI-freien Arm führten ebenfalls zum Abbruch der Studie. [30] Auch der Vergleich verschiedener Dosierungen Sotrastaurin in Kombination mit Everolimus,

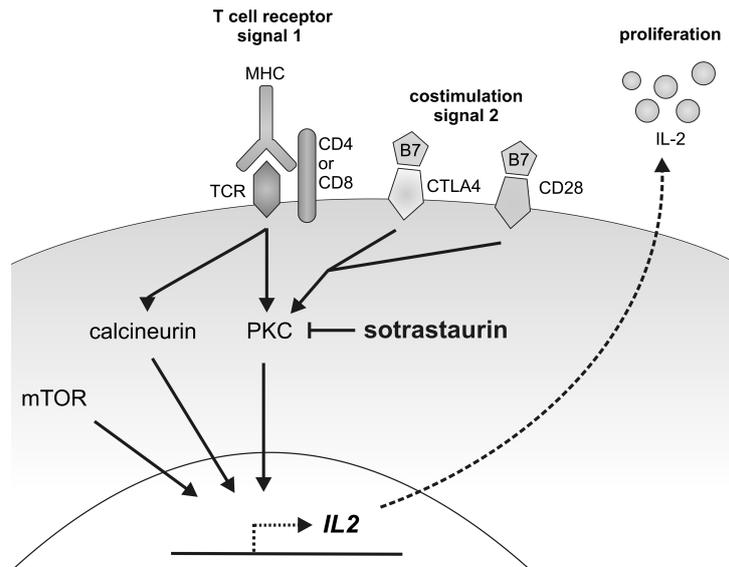


Abbildung 3.2: **Schematische Darstellung des Wirkmechanismus von Sotrastaurin.** Nach Aktivierung des T-Zell-Rezeptors und zusätzlicher Kostimulation via CD28 wird die Proteinkinase C aktiviert. Indem Sotrastaurin diese Proteinkinase inhibiert, wird die für die T-Zell-Proliferation essentielle IL-2-Produktion gehemmt. (Abbildung aus [89])

Steroiden mit Ciclosporin A, Everolimus, Steroid jeweils nach Induktionstherapie mit Basiliximab zeigte erhöhte Rejektionsraten in beiden Sotrastaurin-Armen. [149]

Die hochgesetzten Erwartungen, die T-Zell-Aktivierung bei de novo nierentransplantierten Patienten ähnlich effektiv zu hemmen wie die Calcineurininhibitoren, bei gleichzeitig günstigerem Nebenwirkungsprofil, scheinen sich nicht zu erfüllen. So zeigten die drei Studien, die ein CNI-freies Regime mit Sotrastaurin untersuchten, erhöhte zelluläre Rejektionsraten im Sotrastaurin-Arm. Daher ist es wichtig zu eruieren, ob Sotrastaurin MPA bei de novo nierentransplantierten Patienten ersetzen kann. Therapeutischen Alternativen zu MPA, insbesondere bei Auftreten von Nebenwirkungen wie Knochenmarkstoxizität, gastrointestinalen Problemen oder opportunistischen Infektionen, werden dringend benötigt.

3.5 Auseinandersetzung des T-Zell-Systems mit Fremdantigenen im Hinblick auf das Rejektionsgeschehen

3.5.1 T-Zellen

Die bisher veröffentlichten Studien analysieren pharmakokinetische und pharmakodynamische Eigenschaften von Sotrastaurin sowie erste Erfahrungen in der Transplantationsmedizin, doch

es fehlen detaillierte in vitro Daten über den Wirkmechanismus. [27] [164] [169] T-Zellen sind entscheidend an der Immunantwort im Rahmen des Rejektionsgeschehens und damit an der Beeinflussung der Langzeitfunktion des Transplantats beteiligt. Folglich sind Vermittler in den Signalkaskaden, die zur T-Zellaktivierung führen, wichtige Angriffspunkte immunsuppressiver Substanzen. Ziel dieser Arbeit ist es, die immunmodulatorischen Effekte von Sotrastaurin auf die Aktivierung humaner T-Zellen zu untersuchen. T-Zellen gehen aus den hämatopoetischen Stammzellen hervor. Ihre weitere Entwicklung und Reifung findet im Thymus statt. Die T-Zellen bilden die zelluläre Immunabwehr, welche sich gegen spezifische Pathogene oder Fremdartige richtet, und steuern auch die humorale Immunantwort mit Hilfe von Zytokinen. T-Zellen sind auf die Antigen-Präsentation in Verbindung mit dem MHC (Major histocompatibility complex) angewiesen. [8] [52] Man unterscheidet zwei Klassen von MHC-Molekülen, die von jeweils unterschiedlichen Zellen exprimiert werden. Fast alle kernhaltigen Zellen tragen MHC-Klasse-I-Moleküle auf ihrer Zelloberfläche. Diese präsentieren den T-Zellen vor allem zytosolische Peptide. Dagegen werden MHC-Klasse-II-Moleküle ausschließlich von Antigen-präsentierenden Zellen (APZ), wie z.B. Makrophagen, B-Zellen und Dendriten exprimiert. [52] Nach endozytotischer Aufnahme des extrazellulären Antigens durch die APZ werden diese den T-Zellen als Antigen/MHC-II-Komplex präsentiert. Auf der Zelloberfläche besitzen T-Zellen zum Erkennen der Antigene einen klonalen T-Zell-Rezeptor (TZR). In unmittelbarer Nähe des TZR befinden sich CD3-Moleküle, die kennzeichnend für T-Zellen sind. Diese sind für die Signaltransduktion, nicht aber für die Antigenerkennung von Bedeutung. Nach einer Nierentransplantation erfolgt die Antigenpräsentation auf direktem Wege durch APZ des Spenders oder auf indirektem Weg durch die APZ des Empfängers. [52]

Anhand der Expression der Oberflächenmoleküle CD4 und CD8 unterscheidet man zwei Subpopulationen von reifen T-Zellen, die CD4-positiven Helfer- und die CD8-positiven zytotoxischen T-Zellen. Werden die CD8-positiven-T-Zellen durch einen Antigen-MHC-I-Komplex aktiviert, sind sie in der Lage, zytotoxische Substanzen zu produzieren und die erkannten Zellen zu lysieren. CD4-positiv-T-Helferzellen erkennen Antigen, welches ihnen in Verbindung mit MHC-Klasse-II-Molekülen präsentiert wird. Nach erfolgter Antigenerkennung ist es Aufgabe der CD4+-T-Helfer-Zellen, die verschiedenen Zellen des Immunsystems zu steuern und so eine adäquate Immunantwort zu generieren. Wird nach einer Transplantation diese Immunantwort nicht ausreichend durch immunsuppressive Substanzen unterdrückt, führt sie zu einer Abstoßungsreaktion. [52]

Anhand der von ihnen produzierten Zytokine kann man die T-Helferzellen in zwei Gruppen einteilen. Zytokine sind Glykopeptide, welche die Proliferation und Differenzierung von Zellen regulieren. Die TH1-Zellen sind von besonderer Bedeutung für die zelluläre Immunantwort und produzieren typischerweise IFN- γ , Tumornekrosefaktor α (TNF α) und IL-2. IFN- γ wurde zunächst als rein proinflammatorisches Zytokin gesehen. Doch neuere Untersuchungen belegen die protektive Rolle von IFN- γ im Immungeschehen, z.B. in verschiedenen Autoimmunerkrankungsmodellen. [9] [129] Interleukin-2 spielt eine zentrale Rolle bei der Amplifizierung der

Immunantwort. Innerhalb weniger Stunden nach Aktivierung produzieren die TH1-Zellen IL-2. Gleichzeitig wird die noch fehlende α -Kette des IL-2-Rezeptors (CD25) exprimiert. So ist es der Zelle möglich, auch selbst auf das ausgeschüttete IL-2 zu reagieren und zu proliferieren. [52] Die Zytokine IL-3, IL-4, IL-5, und IL-13 sind typisch für die sogenannten TH2-Lymphozyten. Die wichtigste Funktion der TH2-Lymphozyten ist die Interaktion mit den B-Zellen und somit die Steuerung der humoralen Abwehr. Folglich sind T-Zellen auch an den Mechanismen des humoralen Rejektionsgeschehens nach einer Transplantation beteiligt. [52]

3.5.2 T-Zellaktivierung und die Folgen

Bindet sich der TZR/CD3-Komplex der naiven, also antigen-unerfahrenen T-Zelle an den Antigen-MHC-Komplex, so spricht man auch vom Signal 1 der T-Zell-Aktivierung. [52] Um aber eine naive T-Zelle zu Proliferation und Differenzierung anzuregen, ist die zusätzliche Bindung an ein kostimulatorisches Molekül notwendig (Signal 2). Folgt dieses zweite kostimulatorische Signal nicht, geht die Zelle in einen Zustand der Anergie über. Bezeichnend für diesen Zustand ist, dass die Zelle kein IL-2 produzieren kann. Nicht nur zu diesem Zeitpunkt ist es dieser Zelle unmöglich zu proliferieren und zu einer Effektorzelle zu differenzieren, sondern auch bei späteren Kontakten mit dem Antigen und adäquater Kostimulation bleibt diese Unfähigkeit bestehen. [52] CD28 war das erste kostimulatorische Molekül, welches entdeckt wurde. Weitere Mitglieder der CD28-Familie sind z.B. ICOS (Inducible Co-Stimulator), CTLA-4 (Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4, CD152) und PD-1 (Programmed Death-1). Während CD28 bereits auf naiven T-Zellen exprimiert wird, erfolgt die Expression von ICOS erst von aktivierten Effektor-T-Zellen. CD28 und ICOS sind kostimulatorische Moleküle im engeren Sinne. PD-1 und CTLA-4 dagegen haben überwiegend negative regulatorische Funktionen, d.h. sie inhibieren den Aktivierungsprozess der T-Zelle. [28] [132] [52] [132] Eine weitere Gruppe von kostimulatorischen Molekülen sind die Mitglieder der TNF-Rezeptor-Familie. Zu ihnen gehören u.a. Ox40 (CD134), 4-1BB und CD40L. [132] [28] [168]

Nach erfolgreicher Aktivierung einer naiven T-Zelle via Signal 1 und 2 reagiert diese mit der Expression sogenannter Aktivierungsmarker wie z.B. CD69, CD25, CD71 und CxCR3. [52] [132] CD69 ist ein sehr früher T-Zell-Aktivierungsmarker, dessen Bedeutung nach wie vor ungeklärt ist. [177] Das Transferrin-Rezeptor-Molekül CD71 reguliert die intrazelluläre Eisenkonzentration, die für schnell proliferierende Zellen sehr wichtig ist, und wird nach T-Zell-Aktivierung verstärkt exprimiert. [31] Der Chemokinrezeptor CxCR3 wird überwiegend auf aktivierten T-Zellen exprimiert und fungiert als Rezeptor für mehrere proinflammatorische Chemokine, deren Produktion wiederum durch $\text{IFN}\gamma$ reguliert wird. [63] Die Untereinheit des IL-2-Rezeptors CD25 wird erst nach Antigenaktivierung auf der Zellmembran der T-Zellen exprimiert und steigert die Affinität des IL-2-Rezeptors gegenüber IL-2 um ein Vielfaches. [167] [119] Diese hier nur kurz geschilderten Signalkaskaden können das ursprüngliche Signal, das die Zelle über den TZR erhält, potenzieren. [52] Die Expressionsregulation von Aktivierungsmarkern der T-Zelle

lässt somit Rückschlüsse auf den Aktivierungsgrad der T-Zelle und die Beeinflussung durch immunsuppressive Substanzen zu.

3.6 Fragestellung der Dissertation

Die Suppression der physiologischen Immunantwort auf fremdes Antigen ist von großer Bedeutung für die Transplantationsmedizin. Als Erfolgskonzept der bisher eingesetzten Immunsuppressiva hat sich die Inhibition der T-Zell-Aktivierung erwiesen. Ziel dieser Arbeit ist es, den Einfluss des neuartigen Proteinkinase-C-Inhibitors auf die Aktivierung humaner T-Lymphozyten, anhand von detaillierten in vitro Studien, zu untersuchen. Die T-Zellen wurden aus dem Blut von sechs gesunden Spendern gewonnen. Um die Antigen-Aktivierung der T-Zellen zu standardisieren und somit vergleichbar zu machen, wurden die artifiziellen T-Zell-Stimuli Concavalin A (Con A) bzw. Ionomycin und Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) verwendet. Durch die Beantwortung der folgenden Fragen sollen tiefere Einblicke in die Funktionsweise dieses neuartigen Immunsuppressivums gewonnen werden.

1. Wie wirkt sich die Behandlung mit Sotrastaurin auf die Expression kostimulatorischer (ICOS, PD-1, CTLA-4, Ox40) und aktivierender (CD69, CD25, CD71, CxCr3) Oberflächenmoleküle von T-Zellen nach Stimulation mit Con A aus?
2. Beeinflusst der Proteinkinase-C-Inhibitor die Produktion der für die T-Zell-Aktivierung bedeutsamen intrazellulären Zytokine IL-2 und IFN γ von T-Zellen nach Stimulation mit PMA und Ionomycin?
3. Wie wirkt sich die Anwendung von Sotrastaurin auf den Endpunkt der Aktivierungskaskade, die Proliferation von T-Zellen, nach mitogener Stimulation mit Con A aus?

Anhand der Auswahl von relevanten Markern für die Transplantatrejektion soll der Wirkmechanismus von Sotrastaurin auf T-Zellen näher beleuchtet werden.

4 Materialien und Methoden

Die Ethikkommission der Charité genehmigte die hier durchgeführten Untersuchungen. Die verwendeten T-Zellen wurden aus je 30 ml Blut von sechs gesunden Probanden gewonnen. Unter sterilen Bedingungen erfolgten die geschilderten Arbeitsschritte an einer Reinraumarbeitsbank (Holten Laminair, Alleröd, Dänemark).

4.1 Herstellung des Kulturmediums

Für die Herstellung der unterschiedlichen Zellkonzentration, die verschiedenen Waschschriffe und die Kultivierung der Zellen wurde ein Mediumgemisch hergestellt. 450 ml RPMI 1640 (Biochrome AG, Berlin, Deutschland) wurden mit 50 ml hitzeinaktiviertem fötalem Kälberserum (FCS- Fetal Calf Serum, Biochrome AG, Berlin, Deutschland) versetzt. Dieser Mischung wurden noch 5 ml Penicillin (5000 IU/ml Biochrome AG, Berlin, Deutschland), 5 ml Streptomycin (5000 ng/ml, Biochrome AG, Berlin, Deutschland) sowie 5 ml L-Glutamin (Endkonzentration 2 mM, Biochrome AG, Berlin, Deutschland) zugeführt.

4.1.1 Isolierung mononukleärer Zellen mittels

Dichtegradientenzentrifugation aus Vollblut

Unter sterilen Bedingungen wurden etwa 30 ml heparinisieretes (Vacutainer plus LithiumHeparin, BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland) peripheres venöses Blut von jeweils 6 gesunden Spendern 1:2 mit PBS (Dulbeccos PBS ohne Ca²⁺ und Mg²⁺, PAA laboratories GmbH, Pasching, Österreich) verdünnt. Ca. 20-25 ml des Gemisches wurden mit einer sterilen serologischen Pipette (AccuJet, Brand, Wertheim, Deutschland) vorsichtig über 15 ml Ficoll (GE, Uppsala, Schweden) in einem sterilen 50 ml PP-Gefäß (Falcon, BD, USA) geschichtet. Anschließend wurde das Gemisch bei 2400 RPM 40 Minuten zentrifugiert (Multifuge 2.0 3 SR, Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland).

Ficoll, ein langkettiges Polysaccharid, bewirkt die Verklumpung der Erythrozyten, die während der Dichtegradientenzentrifugation aufgrund der Partikelgröße ausfallen und zu Boden sinken. Die sich an der Phasengrenze befindlichen mononukleären Zellen (Lymphozyten, Granulozyten und Monozyten) wurden mit einer sterilen 7 ml Pasteur-Pipette (VWR International, Darmstadt, Deutschland) in ein 50 ml PP-Gefäß überführt, zweimal mit Kulturmedium gewaschen und nach jedem Waschschriffe bei 1200 RPM für 10 Minuten zentrifugiert. Nach Abschluss des

Waschvorganges wurde das Zellsediment in Kulturmedium resuspendiert.

4.1.2 Bestimmung der Gesamtzellzahl mit der Neubauer-Zählkammer

Die Gesamtzahl der isolierten Zellen wurde anhand der Zelldichte in der Neubauer-Zählkammer (Neubauer Improved, LaborOptik, Lancing, Großbritannien) errechnet. Dazu wurde ein Tropfen Zellsuspension in die Kammer gegeben und mit einem Deckgläschen abgedeckt. So befindet sich in der Kammer ein definiertes Volumen. Die Zellzahl kann in einem der großen Quadrate, bestehend aus 16 kleinen Quadranten, mit einem Mikroskop (Mikroskop Dm IL, invers, Phasenkontrast, Leica, München, Deutschland) bestimmt werden. Die ermittelte Zahl wird mit 10 000 multipliziert und man erhält so die ungefähre Zellzahl je Milliliter Zellsuspension. Pro 48ml heparinisiertem peripherem Blut lag die Zahl der gewonnenen Zellen durchschnittlich bei $2 * 10^7$ - $4 * 10^7$ PBMCs. Die Zellsuspension wurde erneut bei 1200 RPMI für 10 Minuten zentrifugiert. Das Zellpellet wurde dann mit einer entsprechenden Menge Kulturmedium versetzt, um eine Zellzahl von $1,5 * 10^6$ Zellen/mL zu erhalten.

4.1.3 Stimulation der mononukleären Zellen mit Con A

Zur standardisierten Stimulation der T-Zellen wurde Con A (Con A, Sigma, München, Deutschland) eingesetzt. Con A ist ein Lektin, welches sehr wahrscheinlich über die Bindung an Zuckerketten des TCR-CD3-Komplexes eine antigenspezifische Aktivierung von Lymphozyten initiiert. [59] Das Kulturmedium der zu stimulierenden Proben wurde jeweils mit $7,5 \mu\text{g/ml}$ Con A versetzt. Die Con A-Stocklösung mit einer Konzentration von 1 mg/ml wurde bei -20°C gelagert und jeweils kurz vor Beginn des Versuches aufgetaut. Die erforderliche Menge wurde dem Medium zugesetzt. Unstimulierte Proben wurden für jede Konzentration und jeden Spender mitgeführt, um einen Nullwert bezüglich des normalen Oberflächenmarker-Profiles zu erhalten.

4.1.4 Stimulation der mononukleären Zellen mit PMA und Ionomycin unter Zugabe von Brefeldin A

Um die Untersuchungsbedingungen zu standardisieren, wurde die Antigen-Stimulation der mononukleären Zellen mit Ionomycin (MP Biomedicals, Santa Ana, USA) und PMA (Sigma, St. Louis, USA) simuliert. So konnte der Einfluss von Sotrastaurin auf die Zytokinproduktion der aktivierten Zellen untersucht werden. Ionomycin erhöht die Membranpermeabilität und führt auf diesem Wege zu einem Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration. PMA ähnelt strukturell 1,2-Diacylglycerol, dessen Effektor die Proteinkinase C darstellt. Die Kombination von Ionomycin und PMA bewirkt eine direkte Lymphozytenaktivierung durch Freisetzung von Calcium und Aktivierung der Proteinkinase C. Man umgeht so die Notwendigkeit einer

Antigen-induzierten Lymphozytenaktivierung. [152] Die PMA-Stammlösung, 100 μ g PMA gelöst in 1000 μ l DMSO, wurde aliquotiert und bei -20°C gelagert. Eine Arbeitslösung wurde mit PBS hergestellt. Die Endkonzentration von PMA in der Kultur lag bei 10ng/ml. Zur Herstellung der Stammlösung Ionomycin wurden 500 μ g Ionomycin in 1000 μ l Ethanol gelöst. Anschließend wurde diese aliquotiert und ebenfalls bei -20°C gelagert. Mit PBS wurde die Arbeitslösung hergestellt. Die endgültige Konzentration von Ionomycin in der Kultur lag bei 1 μ g/ml. Zur intrazellulären Zytokinanreicherung wurde Brefeldin A (GolgiPlug, Becton Dickinson, San Diego, USA) zugegeben. Brefeldin A ist ein Stoffwechselprodukt des Pilzes *Penicillium brefeldianis*. Es hemmt den Proteintransport vom endoplasmatischen Retikulum zum Golgi-Apparat. [93] Auf diesem Wege reichern sich die produzierten Zytokine in der Zelle an. Entsprechend Herstellerprotokoll wurde 1 μ l GolgiPlug je ml Zellkultur hinzugefügt.

4.1.5 In-vitro-Behandlung der mononukleären Zellen mit Sotrastaurin

Sotrastaurin (zur Verfügung gestellt von Novartis, Basel, Schweiz) wurde unter sterilen Bedingungen in reinem DMSO gelöst (498,54 mg/L). Die Stocklösungsaliquote wurden bei -20°C gelagert. Für die Behandlung der Kulturen wurde aus einem aufgetauten Aliquot eine Verdünnungsreihe mit Kulturmedium pipettiert. Die vorbereiteten Zellen wurden mit folgenden Endkonzentrationen Sotrastaurin im Kulturmedium behandelt: 30 nM, 250 nM, bzw. 500 nM. Dies entspricht circa Konzentrationen von 15ng/ml, 125ng/ml und 250ng/ml. Diese wurden in Anlehnung an die Sotrastaurinkonzentrationen im Blut von Nierentransplantierten gewählt, die zwischen 300ng/ml und 1000ng/ml lagen. [30] Die Entscheidung für die Verwendung niedrigerer Konzentrationen fiel, da höhere Konzentrationen aufgrund der intensiven Orangefärbung von Sotrastaurin zu Verfälschungen der FACS-Analyse durch Überstrahlen der Fluoreszenzen führten. Nach Zugabe des Immunsuppressivums und guter Durchmischung der Zellkultur wurden die Zellen für 72h bei 37°C und einer halbfeuchten Atmosphäre mit 5% CO₂ im Brutschrank (Cell House 200, Heto Lab Equipment, Allerød, Dänemark) kultiviert. Um Effekte des Lösungsmittels DMSO auf die Versuchsreihe auszuschließen, wurde eine stimulierte und eine unstimulierte Probe mit der höchsten in der Versuchsanordnung vorkommenden Konzentration von DMSO als Nullwert mitgeführt.

4.1.6 Durchflusszytometrische Analyse der markierten Zellen

4.1.6.1 Prinzip der Durchflusszytometrie

Bei der Durchflusszytometrie handelt es sich um ein Messverfahren, bei dem die Eigenschaften einer Zelle mithilfe eines Laserstrahls untersucht werden. Die in Suspension befindlichen Zellen werden durch eine Kapillare geschickt und können diese nur einzeln passieren. Jede einzelne Zelle wird durch einen Laserstrahl abgetastet. Durch Photodetektoren wird die Lichtstreuung

und die Emission von Fluoreszenzstrahlung erfasst. Bei der Messung der Lichtstreuung wird die Richtung, in die der Lichtstrahl abgelenkt wird, gemessen. Das in Richtung des ursprünglichen Laserstrahls gemessene Vorwärtsstreulicht (forward scatter, FSC) lässt auf die Größe der Zelle schließen. Das Seitwärtsstreulicht (side scatter, SSC), das etwa im 90 Grad Winkel zum ursprünglichen Strahl gemessen wird, ist ein Maß für die Zellgranularität. Trifft der Laserstrahl auf einen fluoreszierenden Partikel (z.B. markierter Antikörper) in oder auf einer Zelle, so regt er diesen zur Emission von Licht an. Auf diese Weise lassen sich Zellen sehr gut charakterisieren und Zellpopulationen und ihre Eigenschaften weiter eingrenzen. Um unspezifische Fluoreszenz auszuschließen, werden unmarkierte Kontroll-Proben gemessen. Diese Signale werden elektronisch verstärkt und in digitale Signale umgewandelt. Ein Computer registriert diese und ordnet sie der einzelnen Zelle zu. Mithilfe des Programmes CellQuest von Becton Dickinson (San Jose, Kalifornien, USA) wurden die Daten ausgewertet und entweder als Histogramm oder als Dot-Plot dargestellt.

4.1.6.2 Durchflusszytometrische Analyse

Zur Durchführung der durchflusszytometrischen Analyse wurden die Zellen mit je 200 μl PBS resuspendiert. Die Analyse erfolgte durch ein 3-Farben Durchflusszytometer von der Firma Becton Dickinson. Es wurden 10000 Events je Probe untersucht. Die digitalisierten Daten wurden mit der Software Cell Quest aufgenommen und ausgewertet.

4.1.7 Statistische Analyse

Für jede Sotrastaurin-Konzentration bzw. die Lösungsmittelkontrolle wurden zwei stimulierte Proben und eine unstimulierte je Spender durchgeführt. Aus den Ergebnissen der zwei stimulierten Proben wurde, bei erfolgreicher Stimulation, der Mittelwert ermittelt. Die nur mit DMSO behandelten Kontrollen wurden gleich 1 gesetzt, was einem Ausgangswert von 100% entspricht. Die Werte der mit Sotrastaurin behandelten Proben wurden als relative Änderung bezogen auf die entsprechende Kontrolle berechnet. Die Werte wurden mit dem nonparametrischen Wilcoxon-Test mit Hilfe von SPSS analysiert. Ein p-Wert kleiner als 5% wurde als statistisch signifikant gewertet.

4.2 Messung der Expression der Oberflächenmoleküle nach Stimulation mit Con A und Behandlung mit Sotrastaurin

Nach Gewinnung der mononukleären Zellen mithilfe der Dichtegradientenzentrifugation wurden jeweils $1,5 \times 10^6$ Zellen/mL je PP-Röhrchen überführt. Das Kulturmedium wurde abzen-

trifugiert (1200 RPM/6min) und die zu stimulierenden Proben mit Con A-versetztem Medium (7,5 µg/ml) resuspendiert. Die Kontrollen wurden in Vollmedium resuspendiert. Anschließend wurden die Ansätze mit Sotrastaurin entsprechend der Verdünnungsreihe bzw. DMSO versetzt. Vorsichtig wurden die Kulturen durchmischt und dann 72h inkubiert.

Nach Ende der Inkubationszeit wurden die Proben zentrifugiert (1200RPM/6 min) und der Überstand abgesaugt. Nach dreimaligem Waschen mit PBS und Abzentrifugieren des Überstandes wurden die Oberflächenmoleküle der Zellen gefärbt. Nach Zugabe von CD3-Antikörper (PE- oder FITC-konjugiert), PBS mit 3% FCS und jeweils einem Antikörper gegen Oberflächenmoleküle (a-ICOS, a-CTLA-4, a-CD69, a-CD71, a-CD25, a-PD-1, a-Ox40, aCxCr3) wurden die Zellen entsprechend dem Herstellerprotokoll angefärbt und anschließend 30 min bei Raumtemperatur und Dunkelheit inkubiert.

- R-PE-konjugierter Maus-Antikörper gegen humanes CD183 (CxCr3), BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
- FITC-konjugierter Maus-Antikörper gegen humanes CD279 (PD-1), BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
- R-PE-conjugated mouse anti-human monoclonal antibody CD152 (CTLA-4), BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
- PE-konjugierter Maus-Antikörper gegen humanes CD3, Natutec, Frankfurt, Deutschland
- FITC-konjugierter Maus-Antikörper gegen humanes CD3, BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
- PE-konjugierter Maus-Antikörper gegen humanes CD69, BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
- FITC-konjugierter Maus-Antikörper gegen humanes CD134 (Ox40), BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
- PE-konjugierter Maus-Antikörper gegen humanes ICOS, BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
- FITC-konjugierter Maus-Antikörper gegen humanes CD25, BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
- PE-konjugierter Maus-Antikörper gegen humanes CD71, BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland

Nach Abschluss des Färbvorgangs wurden die Zellen erneut zentrifugiert (1200RPM/6 min), der Überstand abgesaugt und einmal mit PBS gewaschen. Das Zellpellett wird anschließend in PBS resuspendiert.

Jede Probe wird mit der zweifarbigen Durchflusszytometrie analysiert. Mit Hilfe des Vorwärts- und des Seitwärtsstreulichts wurden die CD3-positiven Zellen eingegrenzt. Anhand der Fluorochromsignale wird der Anteil der CD3-positiven Zellen bestimmt, der zusätzlich einen markierten Oberflächenantikörper trägt. In jeder Probe wurden 10000 Ereignisse untersucht. Das Ergebnis der unstimulierten Probe wird jeweils von der konkordanten stimulierten Probe abgezogen.

4.3 Messung der intrazellulären Zytokinexpression nach Stimulation und Behandlung mit Sotrastaurin

Die mononukleären Zellen aus dem Blut von sechs gesunden Spendern wurden mittels Dichtegradientenzentrifugation gewonnen. Für die Zellkultur wurden jeweils 2×10^6 Zellen in ein Polypropylenröhrchen überführt. Das Medium wurde abzentrifugiert (1200 RPM / 6 min). Die Zellen wurden dann mit dem endgültigen Kulturmedium (RPMI/ 10% FCS/ Glutamin/ Streptomycin/ Penicillin) resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen mit Ionomycin ($1\mu\text{g/ml}$) und PMA (10ng/ml) stimuliert. Zur intrazellulären Zytokinanreicherung wurde $1\mu\text{g}$ Brefeldin A je ml Zellkultur zugegeben. Die Zellen wurden mit 50nM, 250nM oder 500nM Sotrastaurin beziehungsweise, um Effekte des Lösungsmittels auszuschließen, nur mit DMSO inkubiert.

Die Zellen wurden nach 5 Stunden Inkubation bei 1200 RPM für fünf Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen. Danach wurden die Zellen noch dreimal mit Kulturmedium gewaschen. Das Zellpellett wurde mit $100\mu\text{l}$ Stain Buffer (BD Pharmingen, San Diego, USA) und $3\mu\text{l}$ PE-konjugiertem Maus-Antikörper gegen humanes CD3 (BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland) entsprechend Herstellerprotokoll versetzt und anschließend 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert.

Nach erfolgter Anfärbung der CD3-Oberflächenmoleküle wurden die Zellen mit 1 ml Stain Buffer BD Pharmingen (San Diego, USA) gemischt und erneut fünf Minuten bei 1200 RPM zentrifugiert, der Überstand abgesaugt. Die Fixierung und Permeabilisierung der Zellen erfolgten mit $250\mu\text{l}$ BD Cytotfix/Cytoperm-Lösung (San Diego, USA) für 20 Minuten bei -4°C im Dunkeln. Anschließend wurden die Zellen mit $250\mu\text{l}$ BD Perm/Wash-Lösung (San Diego, USA) gewaschen und anschließend zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in $100\mu\text{l}$ Perm/Wash-Lösung und $3\mu\text{l}$ FITC-konjugiertem Maus-Antikörper gegen IL2 bzw. $\text{IFN}\gamma$ (BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland) resuspendiert und bei Raumtemperatur wiederum im Dunkeln 30 Minuten inkubiert. Nach einem weiteren Waschschriff mit 1 ml Perm/Wash wurden die Zellen ein letztes Mal bei 1200 RPM zentrifugiert, der Überstand wurde abgenommen. Nach Zugabe von $300\mu\text{l}$ Stain Buffer waren die Zellen bereit für die durchflusszytometrische Analyse.

In der zweifarbigen Durchflusszytometrie wurden mit dem Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht die CD3-positiven Zellen bestimmt. Mit Hilfe der Fluorochromsignale wird wiederum der Anteil der CD3-positiven Zellen ermittelt, der zusätzlich einen markierten Zytokinantikörper trägt.

Es wurden in jeder Probe 10000 Ereignisse untersucht. Das Ergebnis der unstimulierten Probe wurde jeweils von der konkordanten stimulierten Probe abgezogen.

4.4 Messung der Proliferation von T-Zellen nach mitogener Stimulation mit Con A

4.4.1 Gewinnung der Zellen und Markierung mit CFSE

Die mononukleären Zellen wurden aus dem Blut von 6 gesunden Spendern mittels Dichtegradientenzentrifugation über Ficoll gewonnen. Nach dreimaligem Waschen wurden die Zellen in Kulturmedium RPMI 1640 mit 2 mM L-Glutamin (Biochrome AG, Berlin, Deutschland) und 1% Penicillin/Streptomycin (Biochrome AG, Berlin, Deutschland) gelöst, dem 10% FCS (Biochrome AG, Berlin, Deutschland) zugesetzt wurde. Die Zellen wurden in BD PrimariaTM24-well MultiwellTM plates für 1,5 Stunden inkubiert. Die adhärrierenden Zellen wurden für weiterführende Experimente genutzt. Die Zellen des Überstandes sind Gegenstand dieser Versuchsanordnung. Nach Abzentrifugation des Kulturmediums, wurden die Zellen mit 1 ml PBS resuspendiert. Dazu wurde 1 ml CFSE-5, 6-Carboxyfluorescein-Diacetat-Succinimidyl-Ester (CFSE)-Lösung (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) (Lagerung des 5mM Stocks bei -20°C, nach dem Auftauen 2 μ l Stock + 998 μ l PBS) gegeben.

Die Proliferationsrate von Lymphozyten kann gut nach Behandlung mit dem intrazellulären Farbstoff CFSE untersucht werden. CFSE ist in seiner ursprünglichen Form membranpermeabel und fluoresziert nicht. Erst nach Diffusion in die Zelle werden intrazellulär Azetatgruppen des Moleküls abgespalten. Die Substanz kann nun nicht mehr Membranen durchdringen und fluoresziert grün. Zudem bindet sich der Farbstoff an intrazelluläre Proteine mit langer Halbwertszeit wie z.B. denen des Zytoskeletts. Mit jeder Teilung der behandelten Zelle verteilt sich der vorhandene Farbstoff gleichmäßig auf die Tochterzellen. Dies führt zu einer sequentiellen Abnahme der Farbstoffmenge bei den folgenden Generationen. Bis zu 8 Generationen einer "Ursprungszelle" können auf diese Weise dargestellt werden, bis keine Unterscheidung zu ungefärbten Zellen mehr möglich ist. [83] Die mit CFSE behandelten Zellen wurden 3-4 Minuten bei Raumtemperatur im Dunklen inkubiert und gelegentlich geschüttelt. Im Anschluss wurde der Färbeprozess mit 5 ml Kulturmedium abgestoppt.

4.4.2 Bestimmung der Proliferationsrate nach Stimulation und Behandlung mit Sotrastaurin

Die so mit CFSE markierten Zellen wurden nach dreimaligem Waschen in ihrem endgültigen Medium (Vollmedium/10%FCS/50 μ M β -Mercaptoethanol (Stratagene, LaJolla, USA) resuspendiert. Die Zellzahl wurde mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Zellzahl wur-

de auf $2 - 3 * 10^6$ eingestellt. Bei den zu stimulierenden Proben wurde das endgültige Kulturmedium mit $7,5 \mu\text{g/ml}$ Con A versetzt. Die Zellen wurden entweder mit 5, 50, 250, 500 nM oder $5 \mu\text{M}$ Sotrastaurin beziehungsweise die Lösungsmittelkontrollen mit DMSO behandelt. Jeweils $2 - 3 * 10^5$ Zellen/ $100\mu\text{l}$ pro Well wurden je Konzentration auf eine 96-well-Platte gegeben und für 96 Stunden im Brutschrank inkubiert.

Nach 96 Stunden wurden die Zellen geerntet und mit PE-Cy5-konjugiertem Maus-Antikörper gegen humanes CD4 (BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland) entsprechend Herstellerprotokoll gekennzeichnet.

Die so markierten Zellen wurden im Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht in einer Graphik, dem sogenannten Dot-plot dargestellt. Die Lymphozytenpopulation wurde markiert und in einem weiteren Diagramm im Hinblick auf die Fluoreszenz 1 (CFSE) und Fluoreszenz 3 (PECy5) analysiert. Es wurden die Lymphozytenpopulationen ermittelt, die in beiden Fluoreszenzbereichen angeregt wurden, indem die CFSE-Intensität der mit Anti-CD4-markierten Zellen mittels Durchflusszytometrie gemessen wurde.

Die markierten Zellen wurden als erstes im Streulicht analysiert. Anhand der Streulichteigenschaften konnte die Lymphozytenpopulation erkannt und markiert (gated) werden. Die weiterführende Analyse der gateden Zellen im Hinblick auf die fluoreszierenden Eigenschaften erfolgte in einem zweiten Dot-Plot. Zellen, die sowohl auf der 3. Fluoreszenz (PECy5) als auch 1. Fluoreszenz (CFSE) angeregt waren, wurden wiederum markiert und in einem Histogramm dargestellt. Mit Hilfe der verschiedenen Abstufungen der CFSE-Intensität konnten die unterschiedlichen Generationen der CD4+ Zellen dargestellt werden. Die Proliferationsrate wurde ermittelt, indem der durchschnittliche Anteil an CD4+ Zellen bestimmt wurde, der in den Zellteilungszyklus eingetreten war, abzüglich der Werte der unstimulierten Proben.

5 Ergebnisse

5.1 Wirkung von Sotrastaurin auf die Expression von Oberflächenmolekülen von T-Zellen nach mitogener Stimulation

Nach Stimulation mit Con A und anschließender Inkubation der mononukleären Zellen von sechs gesunden Spendern mit verschiedenen Konzentrationen Sotrastaurin (30nM, 250nM, 500nM) beziehungsweise mit DMSO für 72 Stunden, wurde die Expression der kostimulatorischen Oberflächenmarker (CD28, ICOS, CTLA-4, PD-1) und der Aktivierungsmarker (CD69, CD25, CD71, CxCr3) auf CD3+ Zellen am FACS gemessen. Die mit Con A stimulierten CD3+ Zellen zeigten im Vergleich zu den unstimulierten Proben eine hohe Expression aller oben genannten kostimulatorischen und aktivierenden Oberflächenmarker. In Abbildung 5.1 wird beispielhaft das Histogramm der FACS-Analyse des Markers CD25 CD3+ Zellen aufgezeigt.

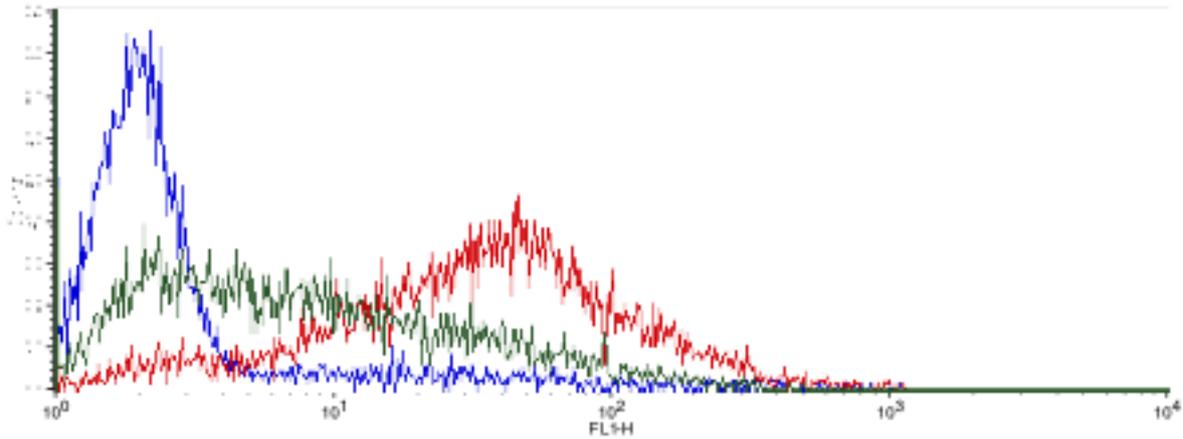


Abbildung 5.1: **Histogramm der FACS-Analyse des FITC-gelabelten Oberflächenmarkers CD25 (x-Achse) auf PE-markierten CD3+ Zellen (y-Achse) nach 72h Inkubation.** Der blaue Graph symbolisiert die Population der unstimulierten, nur mit DMSO behandelten CD25+ CD3+ Zellen. Rot dargestellt ist die Population der mit Con A stimulierten und nur mit DMSO behandelten CD25+ CD3+ Zellen. Die Population der mit Con A stimulierten und zugleich mit 500 nM Sotrastaurin behandelten CD25+ CD3+ Zellen wird durch den grünen Graph repräsentiert. Erkennbar ist die Verschiebung der Kurve durch Behandlung mit dem Immunsuppressivum in Richtung der unbehandelten Kontrollgruppe.

5.1.1 Auswirkungen auf die Expression der aktivierenden Oberflächenmoleküle

5.1.1.1 CD69

Es fällt die große interindividuelle Spannbreite des Anteils CD69-exprimierender Zellen in der Lösungsmittelkontrolle auf, der zwischen 28% und 68% liegt. Die Anwendung von Sotrastaurin führte in der FACS-Analyse zu einer Reduktion der medianen Expressionsrate des frühen Aktivierungsmarkers CD 69 von initial 58% auf maximal 44%. Der Unterschied erwies sich in der statistischen Untersuchung als nicht signifikant.

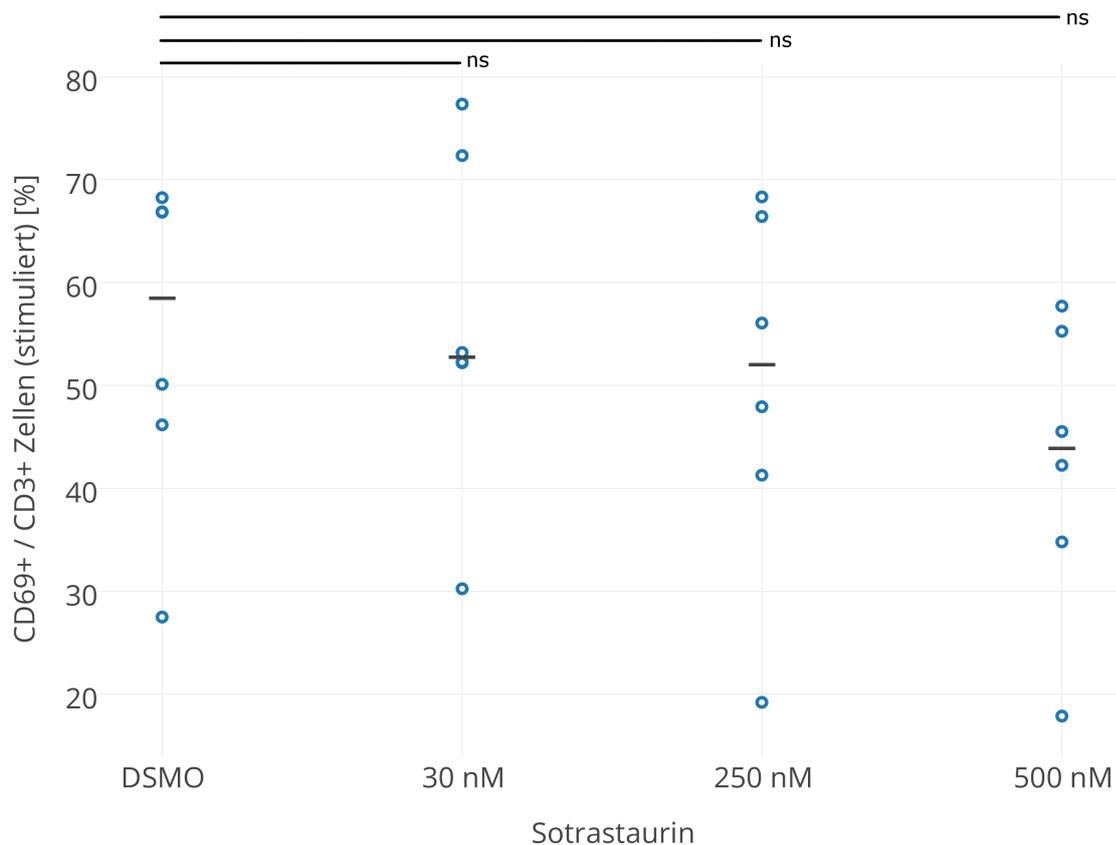


Abbildung 5.2: **Einfluss von Sotrastaurin auf die Expression des frühen Aktivierungsmarkers CD69 auf CD3+ Zellen.** Die Behandlung mit dem Proteinkinase-C Inhibitor hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Markerexpression. Die Analyse erfolgte nach 72h Stimulation mit Con A und Behandlung mit Sotrastaurin. Kreise repräsentieren die Expressionsrate der gesunden Spender ($n = 6$). Der Median wird durch die waagerechte Linie dargestellt.

5.1.1.2 CD71

Durchflusszytometrisch ließ sich nach mitogener Stimulation mit Con A im Vergleich zu den Lösungsmittelkontrollen eine deutliche Reduktion des Anteils CD71-exprimierender CD3+ Zellen von Median 82% auf maximal 62% nach Behandlung mit 500nM des Immunsuppressivums detektieren. Nach Anwendung von 30nM Sotrastaurin lag der Median der CD71-exprimierenden T-Zellen in der FACS-Analyse um 8% niedriger als bei den Lösungsmittelkontrollen. Dieser Unterschied erwies sich bereits als signifikant. Wurden die Zellen mit 250 bzw. 500nM Sotrastaurin behandelt, verringerte sich der Median der Expressionsrate um 20% bzw. 24%. Der PKC-Inhibitor hemmt dosisabhängig und signifikant die Expression von CD71 auf T-Zellen.

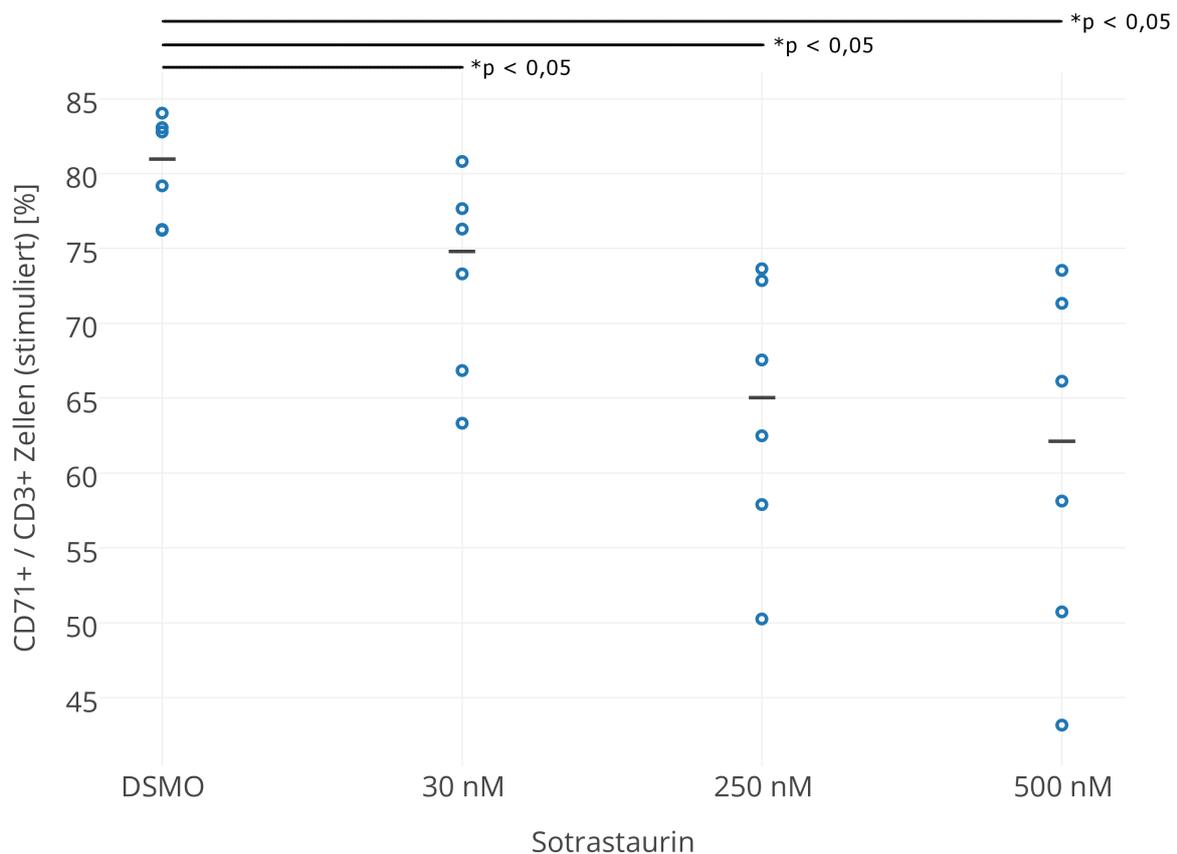


Abbildung 5.3: **Einfluss von Sotrastaurin auf die Expression des Aktivierungsmarkers CD 71 auf CD3+ Zellen.** Nach 72h Stimulation und Behandlung inhibiert bereits eine Konzentration von 30nM Sotrastaurin die CD71 Expression von CD3+ Zellen in der FACS-Analyse signifikant. Es zeigte sich eine dosisabhängige signifikante Reduktion. Kreise symbolisieren die Expressionsrate der gesunden Spender ($n = 6$). Der Median wird durch die waagerechte Linie dargestellt.

5.1.1.3 CD25

Die mediane Expressionsrate der für die T-Zell-Aktivierung essentiellen alpha-Kette des IL-2-Rezeptors auf CD3+ Zellen konnte mit 30 nM Sotrastaurin im Vergleich zu den Lösungsmittelkontrollen von 77% auf 67% und damit um 15,0% signifikant reduziert werden. Nach Behandlung mit 250nM konnte die Rate um 37%, nach Behandlung mit 500nM um 47% gesenkt werden. Es zeigte sich in der FACS-Analyse eine signifikante dosisabhängige Reduktion der Expressionsrate von CD25.

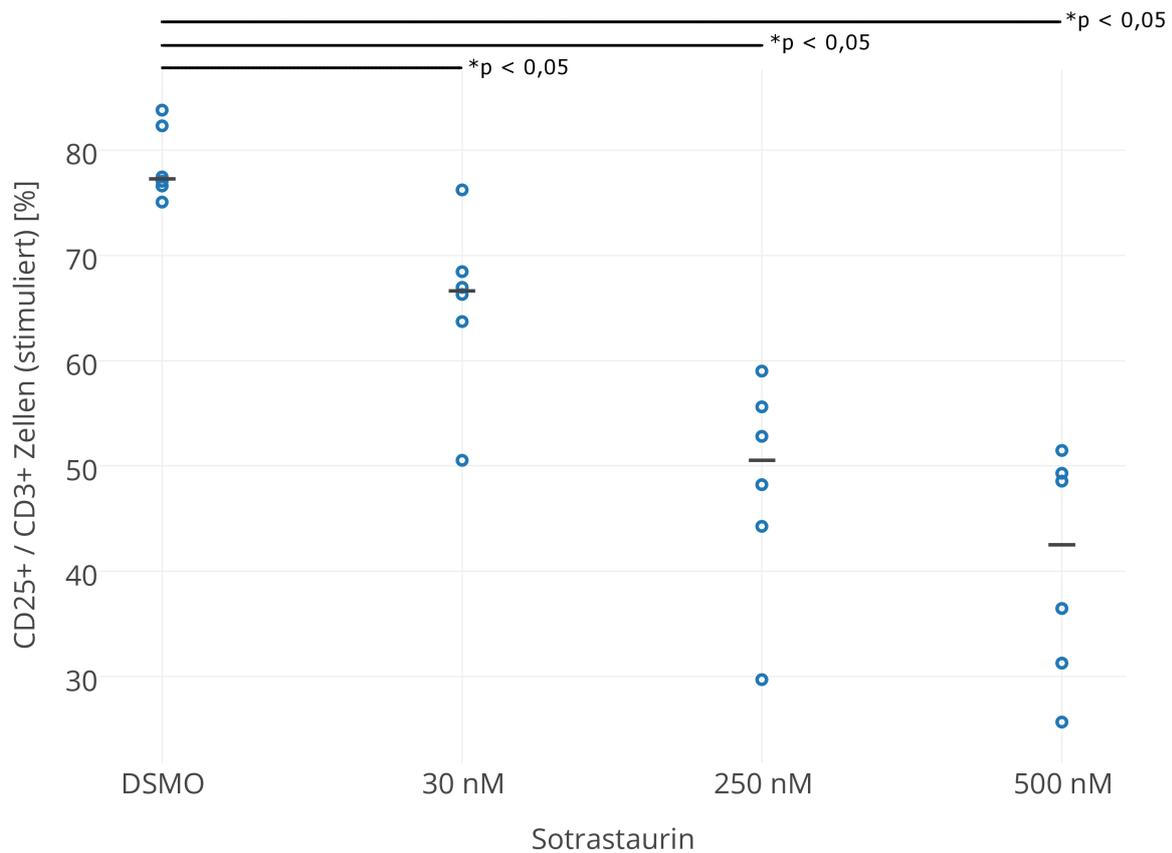


Abbildung 5.4: **Einfluss von Sotrastaurin auf den Aktivierungsmarker CD 25.** Die Behandlung mit Sotrastaurin inhibiert signifikant die Expression der IL-2-Rezeptor-Untereinheit CD25 von CD3+ Zellen nach mitogener Stimulation. In der FACS Analyse zeigte sich eine signifikante dosisabhängige Reduktion der Expressionsrate. Kreise repräsentieren die Expressionsrate der gesunden Spender ($n = 6$). Der Median wird durch die waagerechte Linie dargestellt.

5.1.1.4 CxCr3 Chemokin-Rezeptor

Nach mitogener Stimulation und Behandlung mit Sotrastaurin führte die Konzentration von 30 nM Sotrastaurin zu einer Verringerung der medianen Expressionsrate des Chemokin-Rezeptors CxCr3 von 52% in der Lösungsmittelkontrolle auf 44% und damit im Vergleich um 11%. Als signifikant erwies sich erst die Behandlung mit 250nM bzw. 500nM Sotrastaurin. Dosisabhängig wurde der Median der Expressionsrate um 33% bzw. 43% abgesenkt.

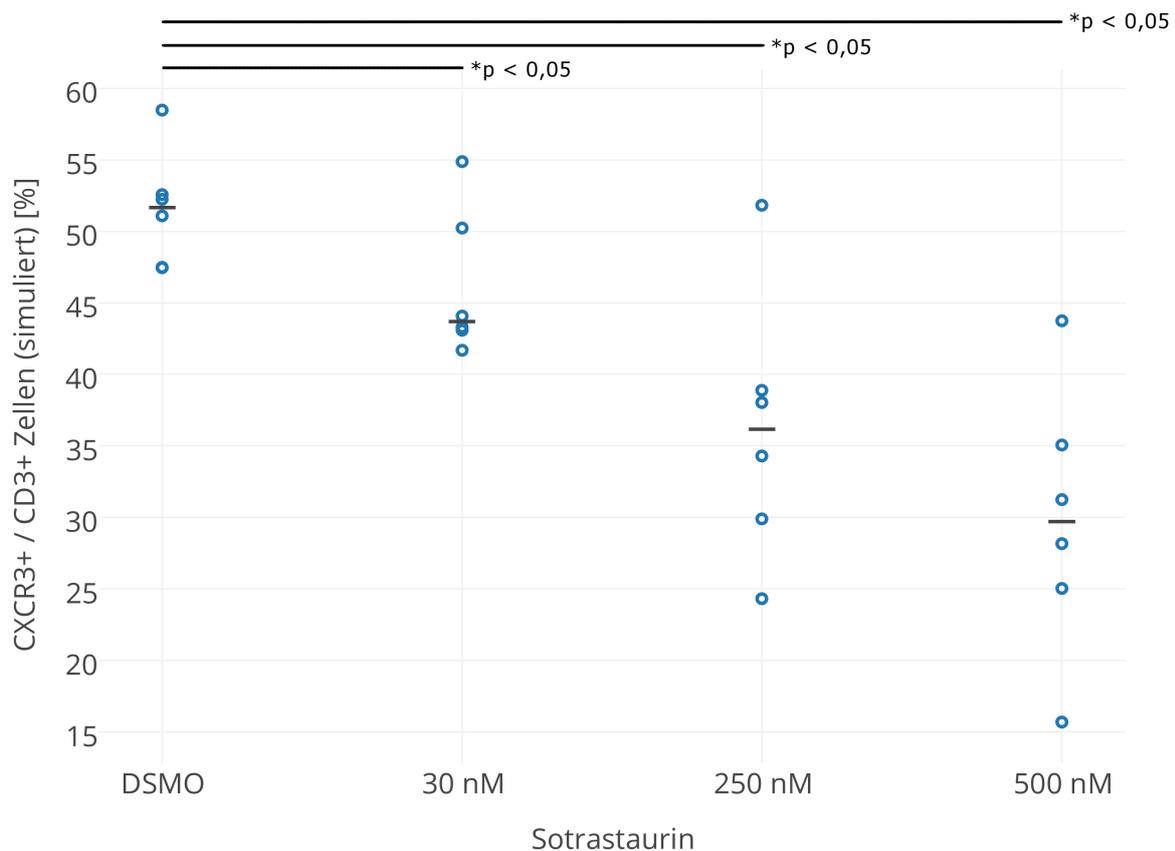


Abbildung 5.5: **Einfluss von Sotrastaurin auf den Aktivierungsmarker CD CxCr3.** In der FACS-Analyse zeigte sich eine dosisabhängige Reduktion der Expression des Rezeptors auf CD3+ Zellen. Signifikant waren die Auswirkungen ab einer Konzentration von 250nM. Kreise repräsentieren die Expressionsrate der gesunden Spender ($n = 6$). Der Median wird durch die waagerechte Linie dargestellt.

5.1.2 Auswirkungen auf die Expression der kostimulatorischen Oberflächenmoleküle

5.1.2.1 ICOS

Die Expression des kostimulatorischen Markers ICOS ließ sich im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle bereits ab einer Konzentration von 30nM Sotrastaurin ein signifikanter Abfall der Expressionrate CD3+ Zellen von 34% auf auf 21% und damit um insgesamt 44% beobachten. Die Anwendung von 250nM des Proteinkinase-C-Inhibitors senkte den Anteil der ICOS exprimierenden T-Zellen um 65%, 500nM sogar um 77%. In Abhängigkeit von der Sotrastaurindosis resultierte eine drastische, hochsignifikante Reduktion der Markerexpression.

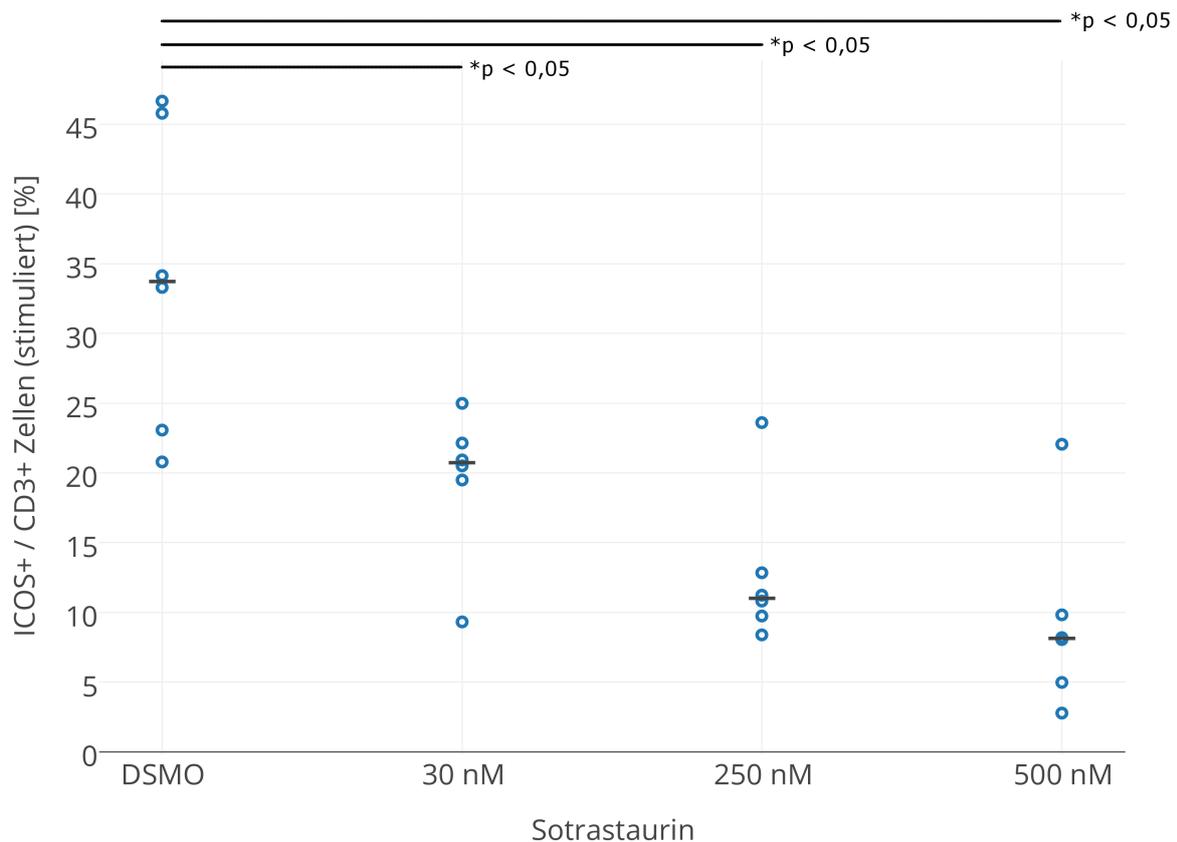


Abbildung 5.6: **Einfluss von Sotrastaurin auf den kostimulatorischen Marker ICOS.** Bereits die Behandlung mit 30nM Sotrastaurin führte nach Stimulation mit Con A nach 72h zu einer ausgeprägten, signifikanten Reduktion der Expressionsrate ICOS auf CD3+ Zellen in der FACS-Untersuchung. Die Anwendung höherer Dosierungen des Proteinkinase-C-Inhibitors verstärkte diesen Effekt dosisabhängig. Kreise repräsentieren die Expressionsrate der gesunden Spender ($n = 6$). Der Median wird durch die waagerechte Linie dargestellt.

5.1.2.2 CTLA-4

Es fällt die insgesamt niedrige Expressionsrate von 2% bis maximal 14% der einzelnen gesunden Spender auf. Nach mitogener Stimulation führte bereits die Anwendung der niedrigsten Dosierung Sotrastaurin in der FACS-Analyse zu einer maximalen und signifikanten Inhibition der CTLA-4-Expression der CD3+ Zellen von 35%. Die Anwendung von 250nM Sotrastaurin führte nur zu einer Verringerung der Expression um 29%. Wohingegen der Zusatz von 500nM Sotrastaurin eine Verringerung der CTLA-4-Expression, aber ohne statistische Signifikanz, zur Folge hatte. Somit wird die Expression des auf die T-Zell-Aktivierung inhibitorisch wirkenden

Rezeptors durch alle Dosierungen des Proteinkinase-C-Inhibitors gehemmt, doch ist dies nur bei Anwendung von 30nM und 250nM statistisch signifikant.

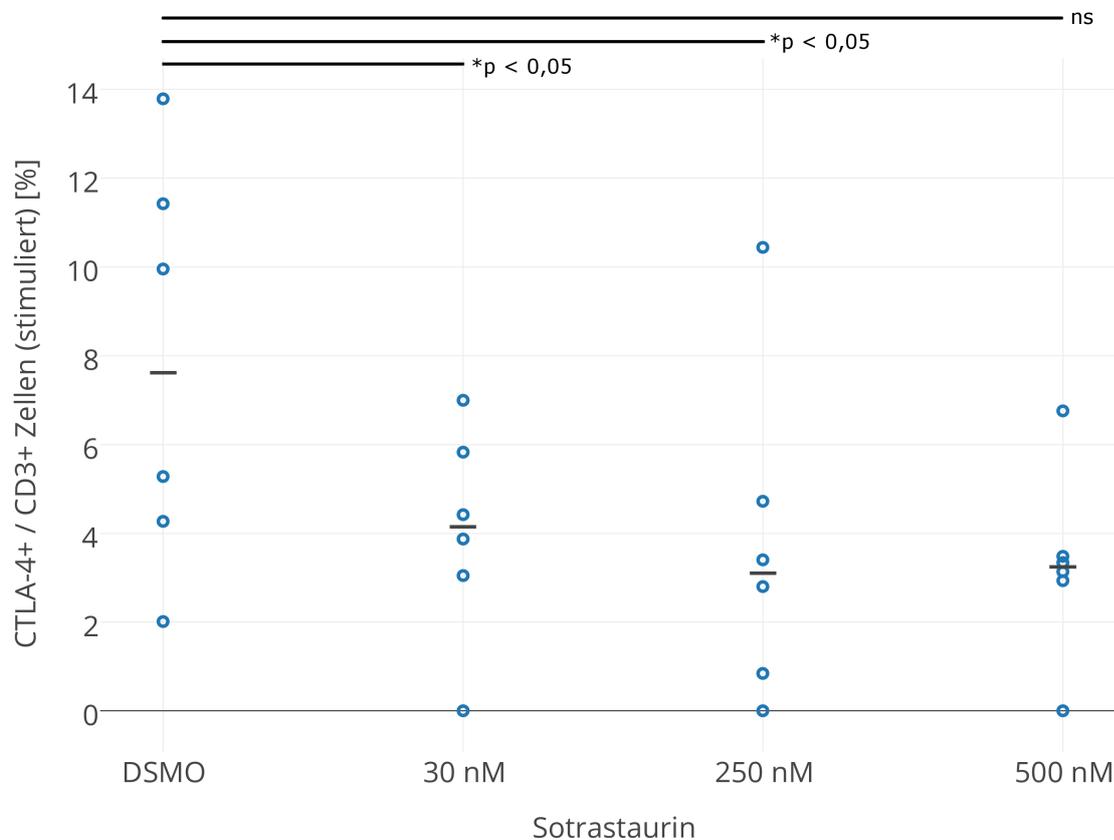


Abbildung 5.7: **Einfluss von Sotrastaurin auf den kostimulatorischen Marker CTLA-4.**

Die durchflusszytometrische Analyse erfolgte nach 72h Stimulation mit Con A und Behandlung mit Sotrastaurin. Die maximale Inhibition der Expression von CTLA-4 auf CD3+ Zellen wurde durch 30nM Sotrastaurin bewirkt. Die Anwendung von 250nM hatte einen geringeren Effekt auf die Rate. Durch die höchste Dosierung des Immunsuppressivums wurde die Markerexpression zwar reduziert, doch blieb dies ohne statistische Signifikanz. Kreise repräsentieren die Expressionsrate der gesunden Spender ($n = 6$). Der Median wird durch die waagerechte Linie dargestellt.

5.1.2.3 CD134 (Ox40)

Nach Stimulation mit Con A reduzierte sich durch die Behandlung mit 30 nM Sotrastaurin die mediane Expressionsrate des kostimulatorischen Oberflächenmoleküls Ox40 auf CD3+ Zellen signifikant von 36% auf 25% um insgesamt 29%. Die Behandlung mit 250 bzw. 500nM des Proteinkinase-C-Inhibitors verringerte die Rate der exprimierenden T-Zellen um 55 bzw. 66%. Es zeigte sich eine signifikante, dosisabhängige Korrelation zur Markerexpression.

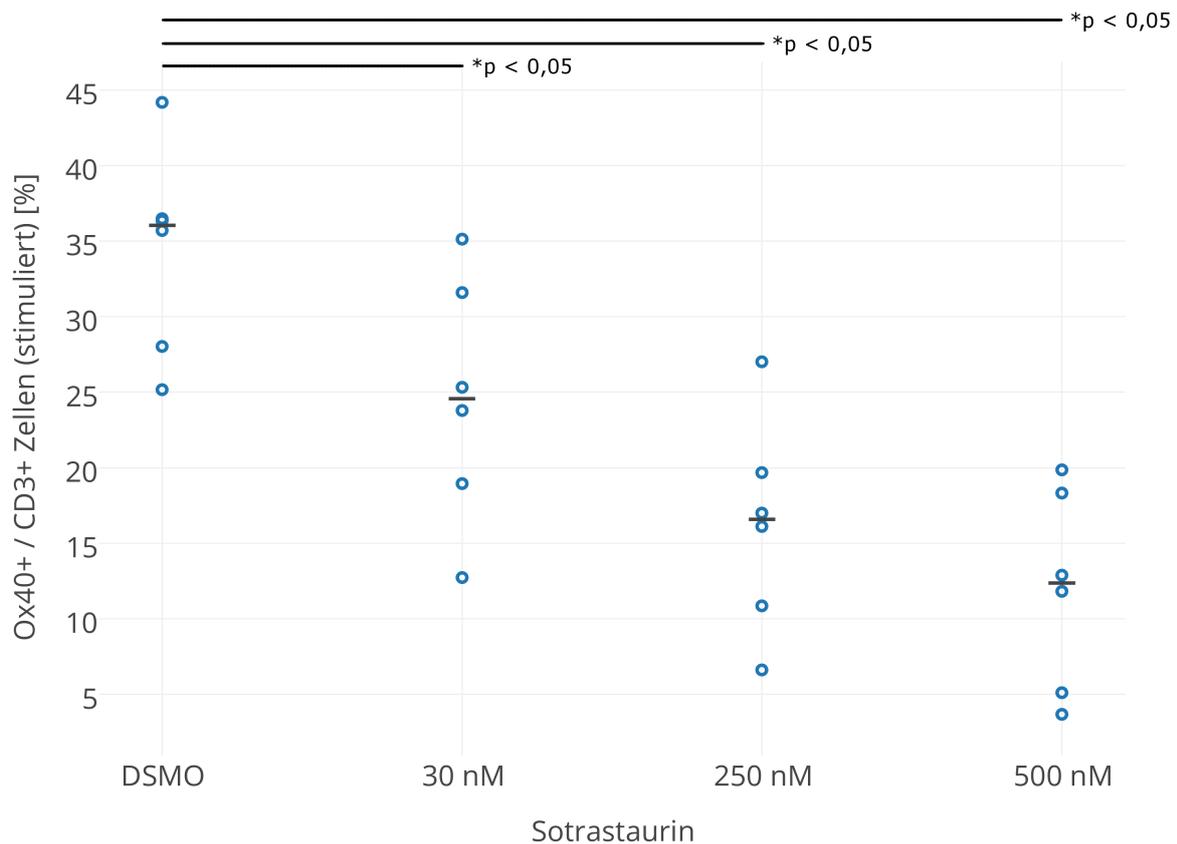


Abbildung 5.8: **Einfluss von Sotrastaurin auf den kostimulatorischen Marker CD134 (Ox40)**. Der Proteinkinase-C-Inhibitor hemmte in Abhängigkeit von der Dosis signifikant die Expression von Ox40 nach mitogener Stimulation mit Con A. Die durchflusszytometrische Analyse der CD3+ Zellen erfolgte nach 72h Stimulation mit Con A im Hinblick auf die Expression von Ox40. Kreise repräsentieren die Expressionsrate der gesunden Spender ($n = 6$). Der Median wird durch die waagerechte Linie dargestellt.

5.1.2.4 PD-1

In der FACS-Analyse verringerte sich im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle die mediane Expression des kostimulatorischen Oberflächenmoleküls von 41% auf 38% nach Anwendung von 30nM bzw. auf 37% bei 250nM Sotrastaurin. Erst ab einer Konzentration von 500nM war ein signifikanter Abfall der Rate auf 32% und damit ein Abfall um 28% zu beobachten.

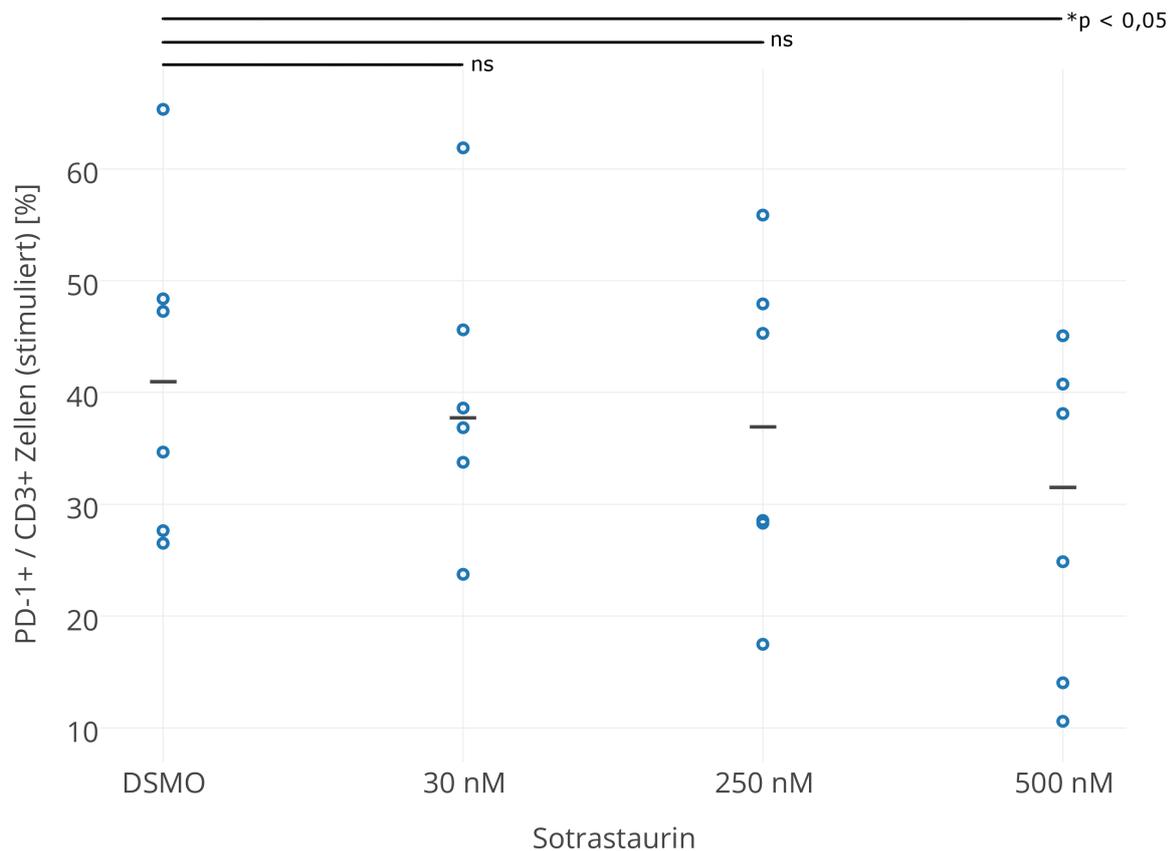


Abbildung 5.9: **Einfluss von Sotrastaurin auf den kostimulatorischen Marker PD-1.** Nur die Anwendung von 500nM resultiert in einer signifikanten Inhibition des kostimulatorischen Markers PD-1 in der durchflusszytometrischen Analyse der CD3+ Zellen. Die Analyse der T-Zellen erfolgte nach Stimulation mit Con A und Behandlung mit Sotrastaurin für 72h. Kreise repräsentieren die Expressionsrate der gesunden Spender ($n = 6$). Der Median wird durch die waagerechte Linie dargestellt.

5.2 Wirkung von Sotrastaurin auf die intrazelluläre Zytokinexpression

Ziel der folgenden Untersuchungen war es, die Auswirkungen von Sotrastaurin auf die Synthese von, für die T-Zell-Aktivierung bedeutsamen, Zytokinen zu analysieren. Die mononukleären Zellen wurden mit PMA und Ionomycin stimuliert. Brefeldin A wurde zur Anreicherung der Zytokine hinzugefügt. Nach 5h Inkubation wurde die Zytokinexpression von IL-2 und IFN γ mit Hilfe der Durchflusszytometrie erfasst. In den Abbildungen 5.10, 5.11 und 5.12 werden beispielhaft die FACS-Bilder der IL-2-exprimierenden CD3+ Zellen gezeigt.

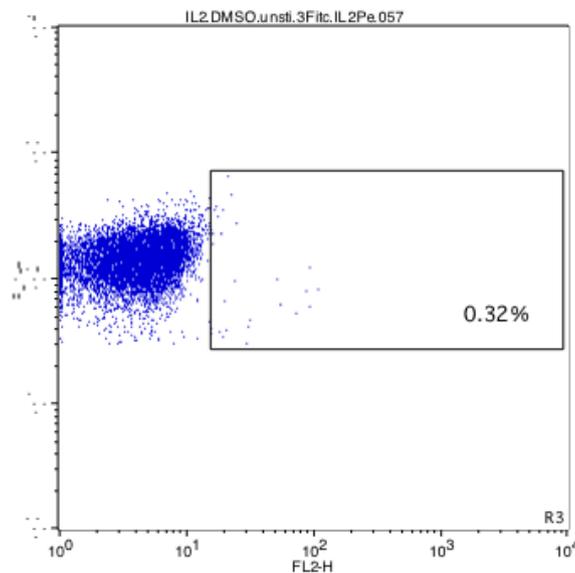


Abbildung 5.10: **Darstellung humaner FITC-gelabelter CD3+ T-Zellen (x-Achse) in der FACS-Analyse nach Färbung mit IL-2/ PE (y-Achse) nach 5h Inkubation. Unstimulierte Lösungsmittelkontrolle.** Links die Population der CD3+ Zellen. Im Gate rechts sind die zusätzlich IL-2 exprimierenden CD3+ Zellen dargestellt. Der Anteil beträgt 0,3%.

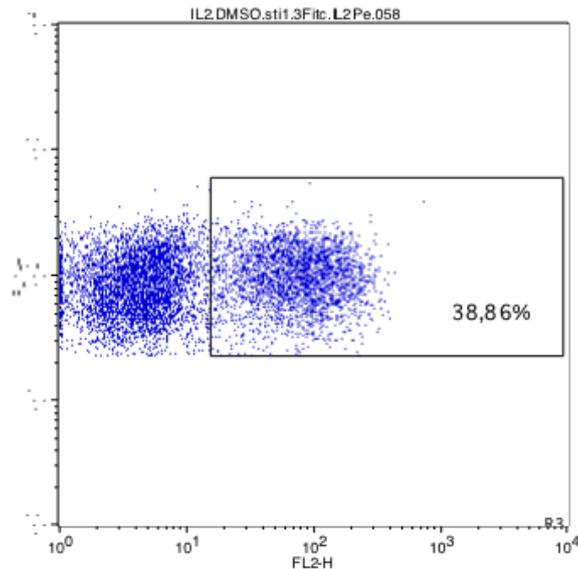


Abbildung 5.11: **Darstellung humaner FITC-gelabelter CD3+T-Zellen (x-Achse) in der FACS-Analyse nach Färbung mit IL-2/PE (y-Achse) nach 5h Inkubation mit Ionomycin und PMA. Stimulierte Lösungsmittelkontrolle.** Links die Population der CD3+ Zellen. Im Gate rechts sind die zusätzlich IL-2 exprimierenden CD3+ Zellen dargestellt. Der Anteil beträgt 39%. Dieser ist im Vergleich zur unstimulierten Probe deutlich erhöht.

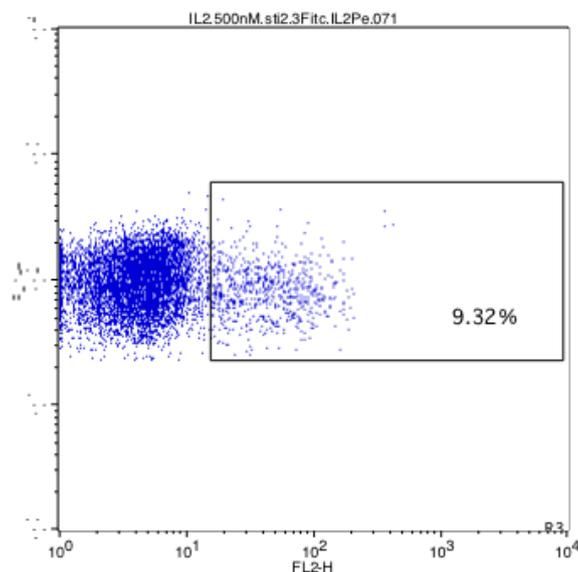


Abbildung 5.12: **Darstellung humaner FITC-gelabelter CD3+T-Zellen (x-Achse) in der FACS-Analyse nach Färbung mit IL-2/PE (y-Achse) nach 5h Inkubation mit Ionomycin und PMA. Stimulierte und mit 500nM behandelte Sotrastaurin Probe.** Links die Population der CD3+ Zellen. Im Gate rechts sind die zusätzlich IL-2 exprimierenden CD3+ Zellen dargestellt. Der Anteil beträgt 9%. Durch die Behandlung mit dem Immunsuppressivum wird der Anteil signifikant reduziert.

5.2.1 Interleukin 2

In der FACS-Analyse fällt die große interindividuelle Bandbreite der IL-2-produzierenden Zellen nach Stimulation mit PMA und Ionomycin auf. Diese schwankt zwischen 20% - 40% bei den Lösungsmittelkontrollen. Nach Behandlung mit Sotrastaurin verringert sich erst bei einer Konzentration von 250nM im Kulturmedium der Anteil der IL-2-produzierenden Zellen signifikant auf 22%. Durch die Behandlung mit 500nM Sotrastaurin reduzierte sich der Anteil auf 8%.

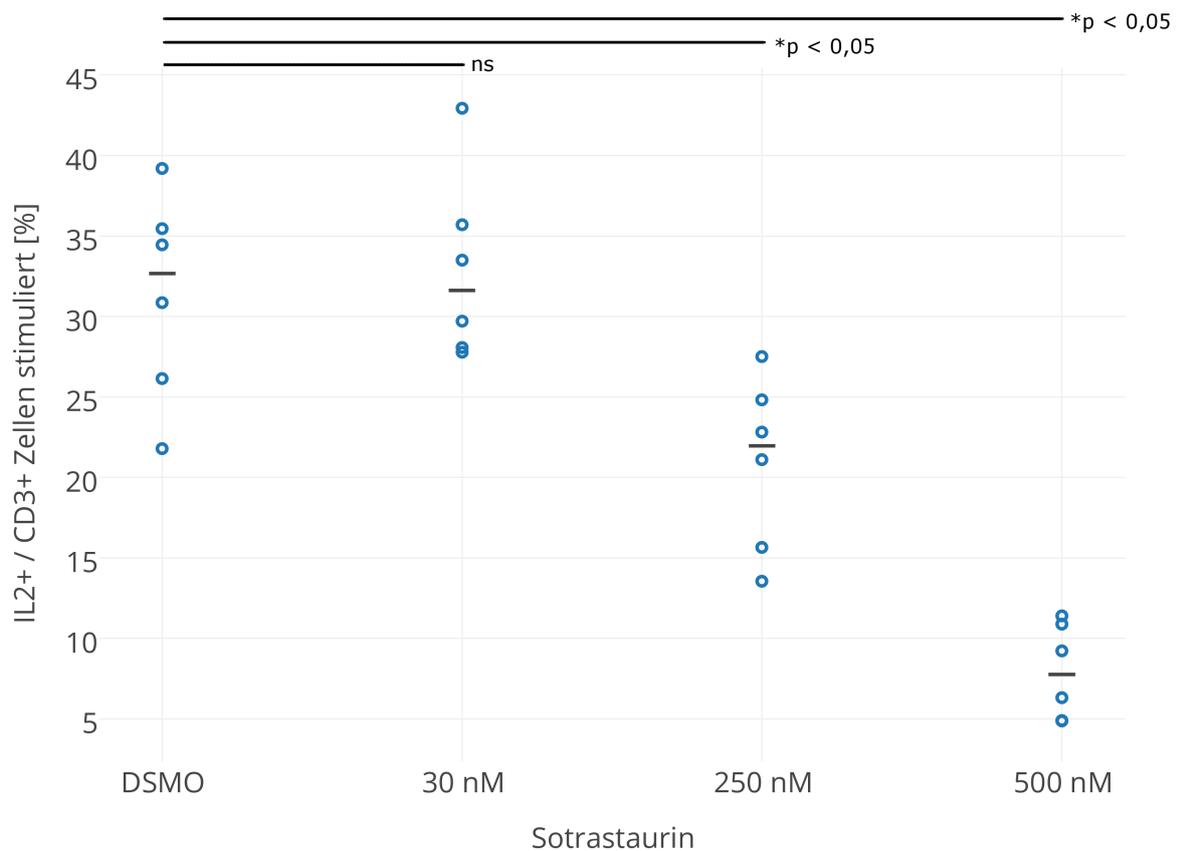


Abbildung 5.13: **Einfluss von Sotrastaurin auf das Zytokin IL-2.** Die Behandlung mit Sotrastaurin reduziert nach Stimulation mit PMA und Ionomycin die Produktion von IL-2 in CD3+ Zellen in der durchflusszytometrischen Untersuchung. Die Anwendung hoher Dosierungen führte zu einem signifikanten Rückgang der Zytokinproduktion. Kreise repräsentieren die Expressionsrate der gesunden Spender ($n = 6$). Der Median wird durch die waagerechte Linie dargestellt.

5.2.2 Interferon γ

Der Anteil der IFN γ -produzierenden CD3+ Zellen betrug in den Lösungsmittelkontrollen nach Stimulation mit PMA und Ionomycin durchschnittlich nur 10%. Nach Behandlung mit Sotrastaurin reduzierte sich dieser Anteil auf 7%. Doch erst nach Anwendung von 500nM zeigte sich eine signifikante Verringerung der das Zytokin IFN γ produzierenden T-Zellen auf 4%.

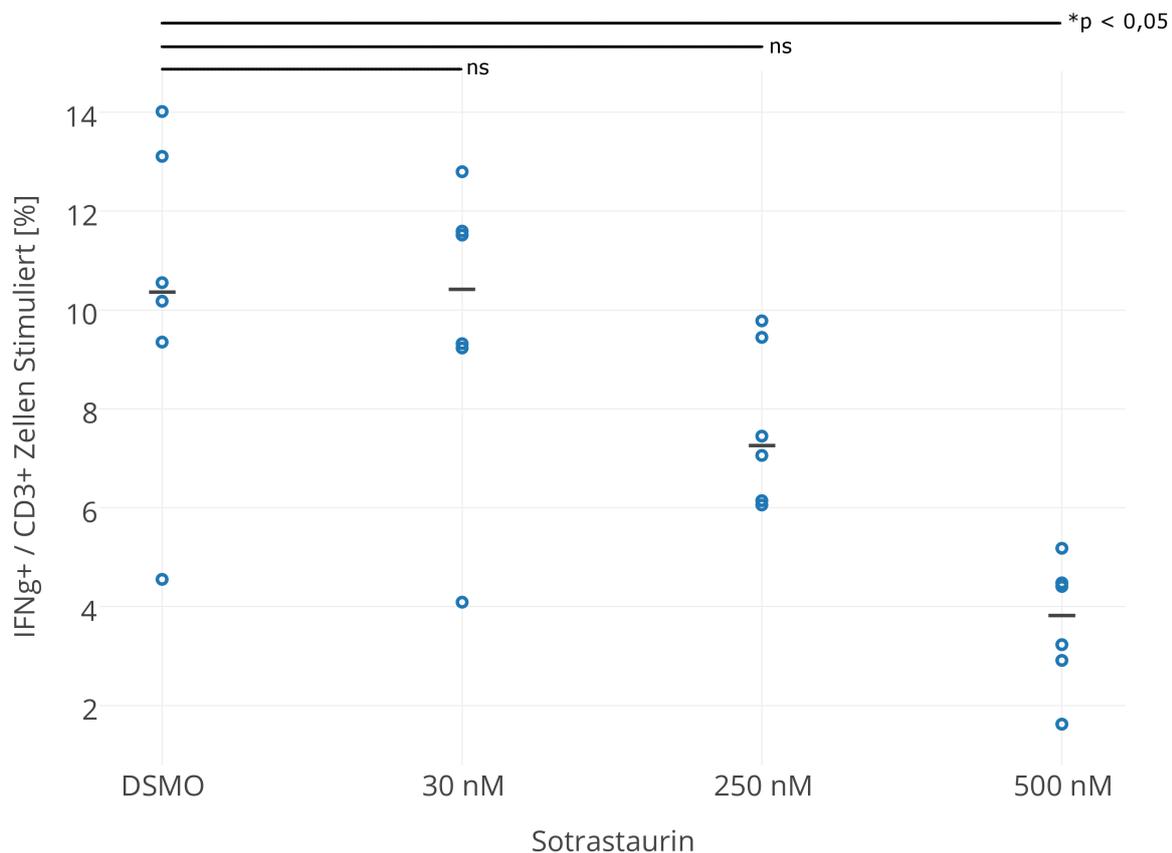


Abbildung 5.14: **Einfluss von Sotrastaurin auf das Zytokin IFN γ .** Bei insgesamt niedriger Expressionsrate der CD3+ Zellen reduziert nach Stimulation mit PMA und Ionomycin nur die Anwendung der höchsten Konzentration Sotrastaurin signifikant die Zahl der IFN γ -produzierenden Zellen in der FACS-Analyse. Kreise repräsentieren die Expressionsrate der gesunden Spender ($n = 6$). Der Median wird durch die waagerechte Linie dargestellt.

5.3 Wirkung von Sotrastaurin auf die Proliferation von T-Zellen

Nachdem die Auswirkungen von Sotrastaurin auf isolierte Merkmale von mitogen stimulierten T-Zellen untersucht worden waren, war es das Ziel der folgenden Analyse den Einfluss des Proteinkinase-C-Inhibitors auf den Endpunkt der T-Zell-Aktivierung, die T-Zell-Proliferation zu untersuchen. Die mit CFSE markierten mononukleären Zellen wurden mit Con A stimuliert und mit verschiedenen Dosierungen Sotrastaurin behandelt. Nach 96h Inkubation wurde durchflusszytometrisch der Anteil der Zellteilung befindlichen CD4+ Zellen bestimmt. Die Proliferationsrate der Lösungsmittelkontrolle lag bei durchschnittlich 82%. Ab einer Konzentration von 50nM Sotrastaurin im Kulturmedium war die Inhibition der Proliferation signifikant mit einer Rate von 70%. Nach Anwendung von 250nM, 500nM und 5000nM lag diese bei 51%, 36% bzw. 6%. Somit wird die Proliferation von CD4+ Zellen bereits in niedrigen Dosierungen signifikant und dosisabhängig gehemmt.

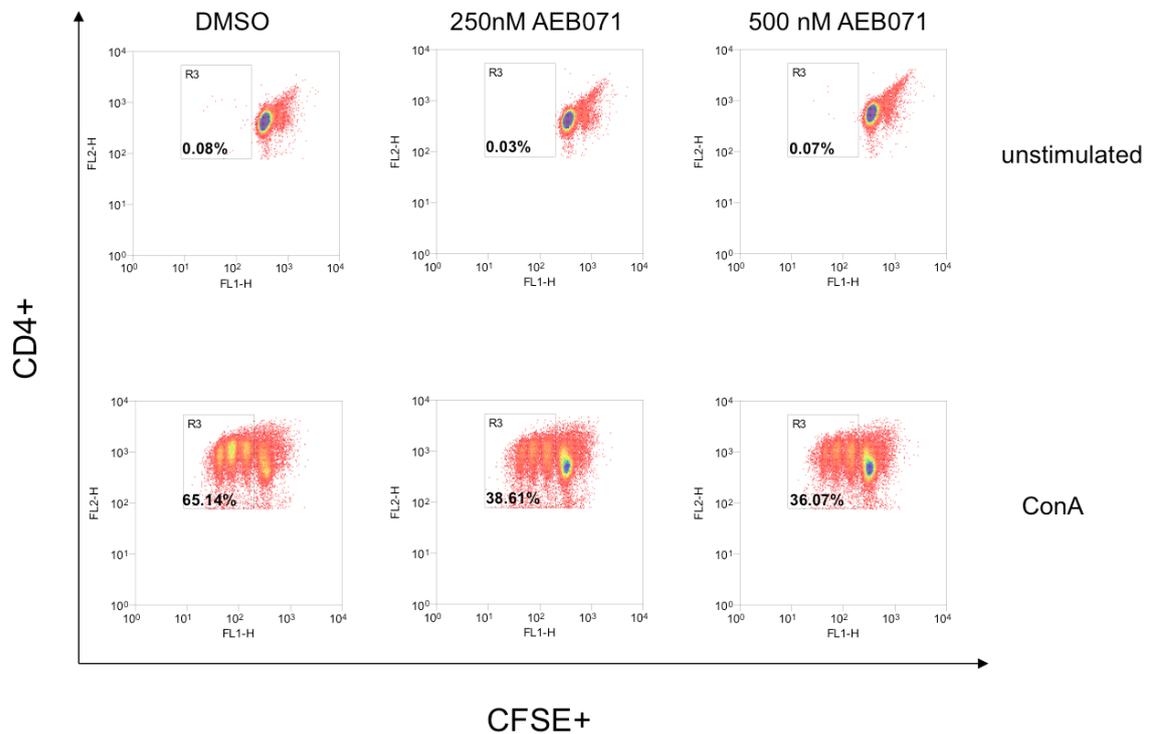


Abbildung 5.15: **Darstellung der mit CFSE+ (x-Achse) und PECy5- markierten CD4+ Zellen (y-Achse) eines Probanden nach 96h Inkubation mit DMSO bzw. Sotrastaurin.** Die drei oberen Diagramme stellen die Ergebnisse der behandelten, aber unstimulierten Proben dar. Es zeigt sich nur eine Population mit homogener CFSE-Intensität, d.h. Tochtergenerationen haben sich nicht gebildet. Die CD4+ Zellen sind nicht proliferiert. In der unteren Reihe sind die FACS-Bilder der behandelten und auch mit Con A stimulierten Proben des Probanden dargestellt. Nach 96h zeigen sich 4 Populationsgruppen, die sich anhand der logarithmisch aufgetragenen CFSE-Intensität unterscheiden. Wobei die Subpopulation mit der höchsten CFSE-Intensität die Muttergeneration ist. Die Proliferationsrate entspricht der Zellzahl der Tochtergenerationen in Prozent der CD4+ Gesamtpopulation. Durch Einsatz von Sotrastaurin wird die Proliferationsrate nach 96h Stimulation mit Con A ab einer Konzentration von 50nM signifikant inhibiert.

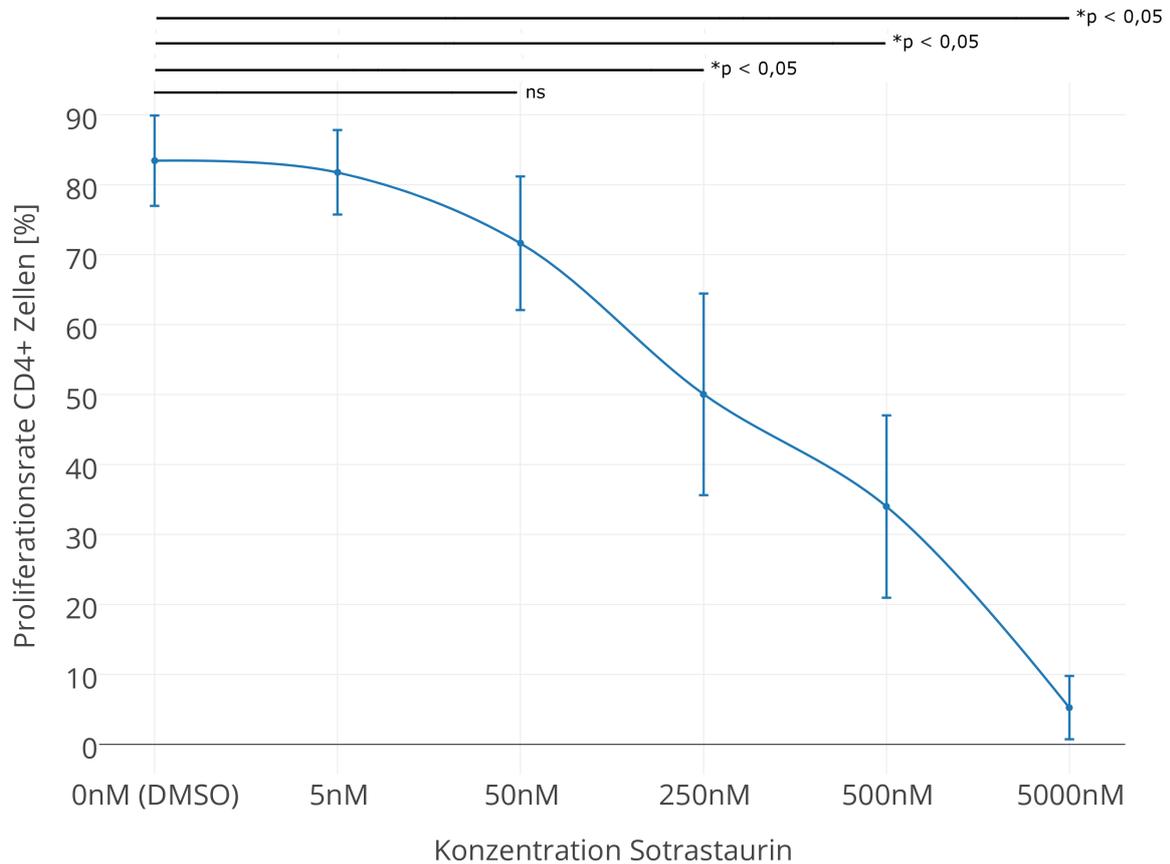


Abbildung 5.16: **Einfluss von Sotrastaurin auf die T-Zell-Proliferation.** Nach Stimulation mit Con A wurden die CFSE-markierten Zellen mit verschiedenen Dosierungen des Proteinkinase-C-Inhibitors behandelt. Nach 96h Inkubation wurde die Proliferationsrate der CD4+ Zellen durchflusszytometrisch evaluiert. Sotrastaurin hemmt signifikant und dosisabhängig ab einer Konzentration von 50nM die Proliferation von CD4+ Zellen. Gezeigt wird im Box-Plot der durchschnittliche Anteil CD4+ Zellen in Zellteilung mit Median und Standardabweichung ($n = 6$).

6 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung der immunsuppressiven Substanz Sotrastaurin auf humane T-Zellen *in vitro* untersucht. Anhand einer Vielzahl phänotypischer Merkmale, der Produktion proinflammatorischer Zytokine und der Proliferationsrate, die alle bedeutsam im Rahmen der Immunantwort nach Transplantation sind, wurde der Einfluss des neuen Immunsuppressivums auf Aktivierung und Funktion von humanen T-Zellen analysiert.

Aus dem Blut gesunder Spender wurden die mononukleären Zellen isoliert. Durch den Einsatz verschiedener Stimuli wurde die Antigenaktivierung der mononukleären Zellen simuliert. Dem Einsatz artifizierlicher Stimuli wurde der Vorzug gegeben, um homogene Versuchsbedingungen bei vergleichbarer Effektivität der Aktivierung zu schaffen. In Anlehnung an die effektiven Sotrastaurinspiegel bei nierentransplantierten Patienten wurden die Zellen mit ansteigenden Konzentrationen des Immunsuppressivums behandelt und unter optimalen Bedingungen kultiviert.

Die Ergebnisse der Untersuchung zeigen, dass Sotrastaurin wirksam die Expression der kostimulatorischen Oberflächenmoleküle ICOS, CTLA-4, CD134 (Ox40), PD-1, die der Aktivierungsmarker CD71, CD25, CxCr3, die Produktion der Zytokine IL-2 und IFN γ sowie die Proliferation von T-Zellen dosisabhängig inhibiert. Die Expression von CD69 wurde durch keine der verwendeten Sotrastaurin-Konzentrationen beeinflusst. Die gewonnenen Erkenntnisse geben einen Einblick in die komplexe Funktionsweise dieses neuartigen Wirkstoffes.

6.1 Oberflächenmoleküle

6.1.1 Oberflächenmoleküle, die die T-Zell-Aktivierung stimulieren bzw. inhibieren

Nach erfolgter Organtransplantation präsentieren die APZs den T-Zellen prozessiertes Donor-Antigen. Die T-Zellen erkennen das präsentierte Antigen nur in Verbindung mit dem körpereigenen MHC-Komplex über ihren T-Zell-Rezeptor (TZR). Dieses sogenannte Signal 1 kann nur zu einer immunologischen Reaktion führen, wenn ihm ein zweites, kostimulatorisches Signal folgt. Signal 2 spielt eine entscheidende Rolle bei der Regulation der Immunantwort und kann abhängig vom Oberflächenmolekül die T-Zell-Aktivierung inhibieren und/oder aktivieren. Einerseits sorgen stimulatorische Impulse für die Initiierung der T-Zell-Antwort, andererseits stellen die hemmenden Signale ein Gegengewicht dar und verhindern überschießende Reaktionen

des Immunsystems. [52]

CD28 ist der Prototyp eines positiv wirkenden kostimulatorischen Moleküls und wird bereits auf naiven T-Zellen exprimiert. Die Liganden von CD28 sind B7.1 (CD80) und B7.2 (CD86). Sie werden von den APZs ohne vorherigen Antigenkontakt exprimiert. Durch den Einfluss des Zytokins $\text{IFN}\gamma$ kann die Expression von CD80 noch verstärkt werden. Die Bindung von CD28 an einen seiner Liganden initiiert gemeinsam mit dem Signal 1 einen Prozess, an dessen Ende die Erhöhung der IL-2-Produktion steht. IL-2 ist das Schlüsselzytokin, welches die klonale Expansion der T-Zellen erst ermöglicht. Die klonale Expansion antigen-spezifischer T-Zellen dient der Eliminierung des Antigens und ist somit die Voraussetzung für den Rejektionsprozess nach einer Transplantation. [28] [52] Dieser Aktivierungsmechanismus wird kontrolliert durch den inhibitorischen Rezeptor CTLA-4, welcher nach erfolgter Aktivierung des TZR durch Antigen von den T-Zellen exprimiert wird. CTLA-4 hat eine höhere Affinität als CD28 zu den gemeinsamen Liganden CD80/CD86 und kann auf diesem Wege der T-Zell-Aktivierung entgegenwirken. [80] [35] Beispielfhaft sei der Einsatz des CTLA-4-Antikörpers Belatacept genannt, der durch Bindung an die gemeinsamen Liganden CD80/CD86 von CD28 und CTLA-4 die Kostimulation durch CD28 inhibiert. [40] In zwei Phase III Studien zeigte Belatacept die gleiche Effektivität hinsichtlich der Prävention von Rejektionen wie Ciclosporin in Kombination mit MPA, Steroiden und Basiliximab, so dass 2011 die Zulassung für den Arzneimittelmarkt erfolgen konnte. [157]

Die Expression dieses inhibitorischen Moleküls wird nur bei Anwendung der niedrigen Dosierungen Sotrastaurin signifikant gehemmt. Mit steigender Dosis fiel die Beeinflussung der Expressionsrate geringer aus. Eventuell wären Tendenzen nach einer Erhöhung der Anzahl der Experimente besser erkennbar.

PD-1, ein weiteres Mitglied der CD28-Superfamilie, wird unter anderem auf aktivierten T-Zellen exprimiert. Welche Aufgabe PD-1 im Rahmen der T-Zell-Aktivierung übernimmt, ist noch umstritten, da sowohl inhibierende als auch stimulierende Effekte durch PD-1 und seine Liganden PD-L1 und PD-L2 übermittlelt werden. So wird nach Interaktion von PD-1 mit seinen Liganden PD-L1 und PD-L2 die Zytokinproduktion der T-Zellen gedrosselt und so die T-Zell-Proliferation gehemmt. [17] [29] [75] Andererseits konnte durch den Einsatz von monoklonalen Antikörpern, die sich gegen PD-1 richten, auch die Proliferation von T-Zellen stimuliert werden. Sehr wahrscheinlich verfügt der Rezeptor PD-1 über extrazelluläre Domänen, die in Abhängigkeit von Umgebungsfaktoren, die Proliferation von aktivierten T-Zellen fördern bzw. hemmen können. PD-1 wäre es damit möglich, kostimulatorische als auch regulative Funktionen im Rahmen der T-Zell-Aktivierung zu übernehmen. [118]

In der hier vorgestellten Arbeit ließ sich die Expression von PD-1 nur in der höchsten verwendeten Konzentration Sotrastaurin signifikant inhibieren. Eventuell könnte es sich um eine regulative Reaktion der T-Zellen auf die starke Suppression durch den PKC-Inhibitor handeln, die auf diesem Wege versuchen, ein Überschießen der hemmenden Impulse zu verhindern.

ICOS war eines der ersten Mitglieder der CD28-Superfamilie, die entdeckt wurden. [51] Be-

reits naive T-Zellen exprimieren ICOS. Doch erst nach Aktivierung der T-Zellen werden Expressionsraten ähnlich dem des CD28-Moleküls erreicht. [117] [144] Die Liganden von ICOS befinden sich auf B-Zellen und APZs. ICOS hat dabei eine wichtige Rolle bei der Vermittlung der Kommunikation zwischen B- und T-Zellen inne. Der Marker ist entscheidend an der terminalen Differenzierung von B-Zellen zu Plasma- bzw. Gedächtnis-Zellen beteiligt. [51] [175] Kurzfristig schütten ICOS-kostimierte Zellen große Mengen Zytokine, aber kein IL-2 aus. Doch die klonale Expansion ist den so stimulierten T-Zellen, sehr wahrscheinlich aufgrund des IL-2-Mangels, nicht möglich und nach 3-5 Zellteilungen werden sie apoptotisch. [117] Wird ICOS durch einen spezifischen Antikörper blockiert, resultiert hieraus im Tiermodell ein signifikant verlängertes Überleben des Allo-Transplantats. [104] Ursächlich dafür könnte die bei ICOS-defizienten Mäusen nachgewiesene Hemmung von T-Zell-Aktivierung und -Proliferation sowie der humoralen Immunantwort sein. [24]

Die Anwendung von Sotrastaurin führte in den durchgeführten Untersuchungen zu einem drastischen Abfall der ICOS-Expression der humanen T-Zellen, was auf eine Hemmung der frühen T-Zell-Aktivierung schließen lässt. Die Auswirkungen auf die humorale Immunantwort könnten in weiterführenden Versuchen untersucht werden.

Der kostimulatorische Marker Ox40 gehört zur Superfamilie der TNF-Rezeptoren. Die Aktivierung von Ox40 stimuliert die Aktivierung und Proliferation von T-Zellen und fördert die Differenzierung zu Effektor-T-Zellen. [143] [34] In einer aktuellen Arbeit konnte ein weiterer Aspekt dieses Markers gezeigt werden. Ox40 wird auch von regulatorischen T-Zellen (T-Regs) exprimiert. Untersuchungen an Foxp3gfp knockin-Mäusen zeigten, dass durch Blockade von Ox40 die Differenzierung zu regulatorischen T-Zellen inhibiert und die Suppressorfunktion von Foxp3+-Tregs behindert wird. Die Aktivierung von Ox40 wirkt sich in zweierlei Hinsicht aktivierend auf das T-Zell-System aus. Es stimuliert die T-Zell-Aktivierung und hemmt die regulatorischen T-Zellen. [163]

Die in dieser Arbeit gezeigte Reduktion der Expressionrate von Ox40 könnte sich demzufolge nicht nur auf die verminderte Kostimulation der T-Zellen durch Ox40 beschränken, sondern auch Auswirkungen auf die Differenzierung von regulatorischen T-Zellen und somit auch auf deren supprimierende Potenz haben.

6.1.2 Auswirkungen auf Aktivierungsmarker

Die Aktivierung einer naiven T-Zelle via Signal 1 und 2 induziert die Expression einer Vielzahl weiterer Oberflächenmoleküle. Dazu gehören unter anderem auch die untersuchten Marker CD69, CD25, CD71 und CxCr3.

CD69 ist ein sehr früher Aktivierungsmarker, der bereits eine Stunde nach erfolgter Aktivierung nachweisbar ist. [177] Die Bedeutung von CD69 für das Rejektionsgeschehen ist jedoch weiterhin unklar. Widersprüchlich sind die Untersuchungsergebnisse, die sich mit einem möglichen Zusammenhang zwischen Marker und Transplantationserfolg beschäftigen. [57] [109]

Eine effektive Suppression der CD69-Expression humaner T-Zellen von Nierentransplantatempfängern, die mit Sotrastaurin behandelt wurden, konnte durch Kovarik et al. gezeigt werden. Die Stimulation der Zellen erfolgte mit PMA und α -CD28-Antikörper. [66] In den hier vorgestellten Untersuchungen reduzierte die Behandlung mit Sotrastaurin die Expression von CD69 durch mit Con A stimulierten humanen primären T-Zellen. Allerdings war der Unterschied nicht signifikant. Ursächlich für diese Differenz könnte die Verwendung unterschiedlicher Stimuli sein. Größere Klarheit im Hinblick auf die Auswirkungen des Proteinkinase-C-Inhibitors auf den frühen Aktivierungsmarker könnte eine größere Anzahl an Untersuchungen schaffen.

CD25 ist ein Bestandteil des aus drei Untereinheiten bestehenden IL-2-Rezeptors. Die beiden Untereinheiten β und γ des IL-2-Rezeptors sind dauerhaft auf der Zellmembran der T-Zellen präsent und verfügen nur über eine geringe Affinität gegenüber IL-2. Erst nach Aktivierung der T-Zelle durch ein Antigen wird auch die α -Untereinheit (CD 25) exprimiert. [167] [119] Die Affinität des IL-2-Rezeptors für IL-2 steigt um ein Vielfaches, wenn alle drei Untereinheiten auf der Zellmembran vorhanden sind. Eine Blockade des CD25-Rezeptors bewirkt, dass die Bindung des proinflammatorischen IL-2 und somit ein bedeutender Proliferationsreiz inhibiert wird. Klinische Relevanz beweist dieses Prinzip eindrücklich mit der weit verbreiteten Anwendung der nicht-depletierenden CD25-Antikörper Basiliximab und Daclizumab. Konnte doch die Zahl der Rejektionen durch den Einsatz dieser Antikörper signifikant gesenkt werden, bei gleichzeitig günstigem Nebenwirkungsprofil. [97] [54] [159]

In der Veröffentlichung von Evenou et al. 2009 konnte die Expression von CD25 in CD4+ und CD8+-Mäusezellen durch Sotrastaurin bereits im nanomolaren Bereich signifikant verringert werden. Das deckt sich mit den Ergebnissen dieser Arbeit an humanen T-Zellen in vitro. Sotrastaurin inhibiert die Expression des, für die Rejektion bedeutsamen, Markers dosisabhängig signifikant. Mit einer Konzentration von 500nM, dies entspricht ca. 250ng/ml, konnte die mediane Expressionsrate der alpha-Kette des IL-2-Rezeptors nahezu halbiert werden. Die im Rahmen von Studien gemessenen Sotrastaurin-Konzentrationen bei Nierentransplantierten lagen im Bereich von 300ng/ml und 1000ng/ml, so dass von einer Inhibierung der für das Rejektionsgeschehen so bedeutsamen IL-2-Kaskade und somit letztendlich auch der T-Zell-Aktivierung sowie T-Zell-Proliferation auszugehen ist. [30]

Der Transferrinrezeptor TfR1 (CD71) wird von den meisten kernhaltigen Zellen des Körpers exprimiert. Insbesondere stark proliferierende Zellen weisen hohe Expressionsraten von CD71 auf, wohingegen dieser Marker auf Zellen, die sich nicht teilen, nur gering bzw. nicht nachweisbar ist. [113] Die Blockade des Rezeptors im Tiermodell wirkt sich protektiv auf das Transplantat aus. [5] [172] Standardimmunsuppressiva wie z.B. MPA, CNI und Steroide sind in der Lage, die Expression von CD71 zu inhibieren. [55] [14]

Die Behandlung der stimulierten humanen primären T-Zellen mit Sotrastaurin führte in der hier gezeigten Studie ebenfalls zu einer signifikanten dosisabhängigen Reduktion. Eine effektive Expressionshemmung des T-Zell-Aktivierungsmarkers CD71, der gleichwohl durch die aktuell verwendeten Standardimmunsuppressiva inhibiert wird, ist ein Hinweis für die immunmodula-

torische Potenz des Wirkstoffes Sotrastaurin.

Insbesondere T-Zellen vom Th1-Typ exprimieren nach ihrer Aktivierung den Chemokinrezeptor CxCr3. [114] Die Liganden des Rezeptors, die Chemokine CxCl9, CxCl10 und CxCl11, werden von Zellen am Ort eines Entzündungsgeschehens produziert und können so die Bewegung dieser Leukozyten zum Entzündungsherd regulieren. CxCr3 defiziente Mäuse bzw. mit CxCr3-Antikörpern behandelte Mäuse zeigten eine Verlängerung des Transplantatüberlebens. [44] [122]

Die Expression des für das Rejektionsgeschehen interessanten Markers auf stimulierten humanen primären T-Zellen wird durch eine Behandlung mit Sotrastaurin dosisabhängig signifikant inhibiert. Indem die Expression dieses Oberflächenmarkers reduziert wird, könnte die Migration von Leukozyten zum Transplantat und somit die physiologische Immunantwort gehemmt werden.

Es lässt sich zusammenfassen, dass Sotrastaurin die Expression wichtiger positiver kostimulatorischer Moleküle inhibiert und gegenregulatorisch auch die Expression inhibitorisch wirkender kostimulatorischer Marker *in vitro* signifikant verringert. Da bisher keine Daten zur Expression dieser Oberflächenmarker bei mit Sotrastaurin behandelten Transplantierten vorliegen, sollte sich aufgrund der Komplexität des Rejektionsgeschehens eine Überprüfung der Ergebnisse *in vivo* anschließen.

6.1.3 Modulation der Th1-Antwort

Anhand der Oberflächenmoleküle CD4 und CD8 unterscheidet man zwei Subpopulationen reifer T-Zellen. Die zytotoxischen CD8 T-Zellen erkennen Antigene, die ihnen über MHC Klasse I Moleküle präsentiert werden. Die auf diesem Wege aktivierten Zellen können die erkannten Zellen lysieren. So können z.B. virusinfizierte oder maligne entartete Zellen eliminiert werden. Für die Initiierung der Transplantatabstoßung ist jedoch die Reaktion der CD4 Zellen auf Fremdantigen entscheidend. [71]

Nach Aktivierung über MHC Klasse II Moleküle in Verbindung mit Antigen produzieren die nun proliferierenden T-Helferzellen verschiedene Zytokine. Mit deren Hilfe orchestrieren sie die verschiedenen Zellen des Immunsystems und generieren eine adäquate Immunantwort. Man kann die proliferierenden T-Helferzellen anhand des von ihnen produzierten Zytokinmusters in zwei Subpopulationen, die TH1- und TH2-Helferzellen, einteilen. Nach Aktivierung der Helferselle durch das Fremdantigen entscheidet eine Vielzahl von Faktoren darüber, ob sich die Zelle zu einer TH1- oder einer TH2-Zelle differenziert. Die Art des Antigens, die beteiligten kostimulatorischen Moleküle und die Zytokinantwort des angeborenen Immunsystems sind an diesem Prozess beteiligt. [52]

Die TH1-Zellen sind von besonderer Bedeutung für die zelluläre Immunantwort und produzieren typischerweise $\text{IFN}\gamma$, Tumornekrosefaktor α ($\text{TNF}\alpha$) und IL-2. IL-2 kann von allen aktivierten T-Zellen gebildet werden, doch ist es besonders kennzeichnend für die TH1-Antwort.

Typische Zytokine der TH2-Helferzellen sind Interleukine 4, 5 und 10, welche die humorale Immunabwehr induzieren. Beide Subpopulationen beeinflussen sich gegenseitig. [52]

IL2 ist das zentrale Zytokin der T-Zell-Aktivierung. Zeitgleich mit Beginn der IL-2-Synthese beginnt die Zelle mit der Expression der noch fehlenden α -Kette des IL-2-Rezeptors. Die Zunahme der IL-2-Produktion und die höhere Affinität des nun vollständigen Rezeptors ermöglichen erst die massive klonale Expansion der durch Antigen stimulierten Ursprungs-T-Zelle. Bleibt aber nach Antigen-Kontakt das kostimulatorische Signal aus, geht diese T-Zelle in den Zustand der Anergie über. Kennzeichnend hierfür ist die Unfähigkeit, das für das Rejektionsgeschehen essentielle IL-2 zu produzieren und damit zu proliferieren. [73] [131] In vivo und in vitro reduziert die Anwendung von Calcineurininhibitoren, Sirolimus, MPA und Steroid die Expression von IL-2, dem Schlüsselzytokin der T-Zell-Aktivierung. [15] [112]

Durch kompetitive Blockade des IL-2-Rezeptors mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers Basiliximab konnte die Zahl der frühen postoperativen Rejektionen reduziert und dadurch Einsparungen der Basisimmunsuppression ermöglicht werden. [54] [97] [158] Nach Behandlung von humanen T-Zellen mit Sotrastaurin zeigte sich eine signifikante Inhibition der IL-2-Expression. Dies deckt sich mit den Ergebnissen anderer Arbeiten. [27] Die Inhibition der Proteinkinase C führt somit zu einer Hemmung der Transkriptionsfaktoren, die essentiell für die IL-2-Synthese und somit auch für die T-Zell-Aktivierung sind.

Untersuchungen an gesunden Probanden, die einmalig Sotrastaurin und/oder Cyclosporin A erhielten, zeigten nach Stimulation der Blutproben mit PMA und aCD28 in Gegenwart von Brefeldin A eine signifikante Inhibition der IL-2-Produktion sowohl nach Einnahme der einzelnen Substanzen als auch eine signifikante Verstärkung des Effekts durch Kombination der beiden Substanzen. Die Auswirkungen der Anwendung ließen sich auch auf mRNA-Ebene nachweisen. [67] Die zusätzliche Einnahme von Tacrolimus führte hingegen bei den Probanden nicht zu einer additiven Reduktion der IL-2-Expression. Dieses Ergebnis überrascht insofern, da die beiden Calcineurininhibitoren einen sehr ähnlichen Wirkmechanismus aufweisen. Durch die zeitgleiche Anwendung von Sotrastaurin und Cyclosporin, nicht aber Tacrolimus, erhöht sich die Sotrastaurinkonzentration im Blut. Der erhöhte Wirkstoffspiegel von Sotrastaurin in vivo ist möglicherweise die Ursache für den Unterschied zwischen den beiden Calcineurininhibitoren. [68] Die klinische Bedeutung der Kombination von Sotrastaurin mit einem Calcineurininhibitor wurde daher in verschiedenen Studien untersucht, deren Ergebnisse unter 6.4.1 dargestellt werden.

Entscheidend für die weitere Differenzierung der naiven T-Zellen ist das vorherrschende Zytokinmilieu. $\text{IFN}\gamma$, ein typisches Zytokin der TH1-Zellen, induziert die Differenzierung zu TH1-Zellen und supprimiert die Entwicklung zu TH2-Zellen. [32] Indem $\text{IFN}\gamma$ durch positive Rückkopplung die TH1-Antwort verstärkt und zugleich die TH2-Antwort reduziert, fördert dies eine zelluläre Immunantwort. [9] Das Zytokin selbst aktiviert zudem APZs und steigert deren Fähigkeit, Antigen zu prozessieren und zu präsentieren. [129] Und doch reguliert $\text{IFN}\gamma$ auch B-Zell-Funktionen, wie Immunglobulin-Produktion und -Klassenwechsel, und es beeinflusst auf

diesem Wege auch die humorale Reaktion des Organismus. [9] Im Hinblick auf die humorale Rejektion wurde in einer Arbeit von Hamer et al. gezeigt, dass $\text{IFN}\gamma$ - wie spezifische HLA-Antikörper - die Bildung des Komplementfaktors C4 durch renales mikrovaskuläres Endothelium induzieren kann. Zwar kommt dem Komplement C3 eine zentrale Rolle in den Komplementkaskaden zu, doch lässt sich in Transplantat-Biopsien meist kein C3 nachweisen. [21] Der Nachweis von C4d, einem Abbauprodukt von C4, entspricht laut Banff-Klassifikation einem Kriterium der humoralen Rejektion. [136] Die Inhibition der $\text{IFN}\gamma$ -Produktion durch Immunsuppressiva könnte eine zusätzliche Bedeutung für die Vermeidung einer lokalen Produktion des Komplementfaktors C4 im Transplantat haben. [43]

Die Einflussmöglichkeiten von $\text{IFN}\gamma$ auf die zelluläre und humorale Immunantwort sind vielschichtig. In dieser Arbeit zeigte sich, dass Sotrastaurin die $\text{IFN}\gamma$ -Produktion von humanen T-Zellen signifikant inhibiert. Evenou et al. konnten diesen Effekt sowohl bei primären murinen als auch humanen T-Zellen demonstrieren. [27] Die Hemmung dieser für das Rejektionsgeschehen entscheidenden Zytokine IL-2 und $\text{IFN}\gamma$ ist ein weiteres Indiz für die immunsuppressive Potenz des Proteinkinase-C-Inhibitors. IFN ist zudem ein wichtiger Mediator der DC-Reifung. [105] Welche Auswirkungen Sotrastaurin auf die Zytokine der TH2-Antwort und somit die humorale Reaktion des Organismus hat, müsste in weiterführenden Untersuchungen geklärt werden. Der direkte Einfluss von Sotrastaurin auf die für das Rejektionsgeschehen bedeutsamen dendritischen Zellen wurde in weiterführenden Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe untersucht. Die Ergebnisse werden unter 6.2.1 dargestellt.

6.1.4 Auswirkungen der Proteinkinase-C-Inhibition auf den Endpunkt Proliferation

Ziel der immunsuppressiven Therapie ist es, die Abstoßung des allogenen Transplantats zu verhindern. Der Erfolg der Calcineurininhibitoren auf dem Gebiet der Transplantationsmedizin beruht auf der besonders effektiven Fähigkeit, die T-Zell-Aktivierung und damit einen bedeutenden Schrittmacher des Rejektionsgeschehens zu hemmen. Endpunkt der Aktivierungskaskade ist die T-Zell-Proliferation, d.h. die klonale Expansion antigenspezifischer T-Zellen. [42] Es liegt nahe, bei der Evaluation von Sotrastaurin nicht nur einzelne Indikatoren, die sich als hilfreich in der Beurteilung des Aktivierungsgrades von T-Zellen erwiesen haben zu untersuchen, sondern ebenfalls die Inhibition der Antigen-induzierten T-Zell-Proliferation selbst.

Eine Vielzahl von untereinander vernetzten Signalkaskaden während der Antigen-induzierten T-Zell-Aktivierung ermöglicht ein sehr komplexes Reaktionsmuster des Organismus auf die unterschiedlichsten Antigene. Erkennt der TZR das präsentierte Antigen, so bindet sich der TZR-CD3-Komplex der T-Zelle an den Antigen-MHC-Komplex der APZ. Erst wenn dieses erste Signal der T-Zell-Aktivierung durch ein zweites kostimulatorisches Signal verifiziert wird, führt eine Vielzahl an Phosphorylierungsschritten und die Aktivierung weiterer Tyrosinkinasen zur Bildung einer immunologischen Synapse. [127] Die immunologische Synapse stellt eine

Plattform dar, über die verschiedene, für die T-Zell-Aktivierung notwendige, Signaltransduktionsketten aktiviert werden. Diese führen unter anderem zur Aktivierung der Transkriptionsfaktoren, z.B. NF- κ B, AP-1 und NFAT. [18] [130] Diese Faktoren regulieren die Zytokinexpression und kontrollieren die Gene, welche T-Zell-Aktivierung, -Differenzierung und -Proliferation steuern. [130] [56] Die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF- κ B, AP-1 und NFAT erfolgt über drei unterschiedliche Signalkaskaden. Gemeinsamer Ausgangspunkt dieser Signalkaskaden ist die Aktivierung der Phospholipase C über die immunologische Synapse. Im Anschluss spaltet diese Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) in Inositol-1,4,5 triphosphat (IP₃) und 1,2-Diacylglycerol (DAG). IP₃ diffundiert in das Zytosol der Zelle und setzt aus dem endoplasmatischen Retikulum Calcium in der Zelle frei - wobei DAG in der Zellmembran verbleibt. [154] Die Erhöhung der Calciumkonzentration aktiviert über das Calcium-empfindliche Calmodulin die Phosphatase Calcineurin. Der Calcineurin-Phosphatase ist es so möglich, den für die IL-2-Expression essentiellen Faktor NFAT zu dephosphorylieren, was dessen nukleäre Translokation und Aktivierung zur Folge hat. [20] Ihre Wirkung entfalten die Calcineurininhibitoren hauptsächlich über die Hemmung der NFAT-Dephosphorylierung. [137]

Bedeutsam in diesem Zusammenhang ist, dass die Bindung von NFAT an die DNA nur schwach ist. Eine Reihe weiterer Transkriptionsfaktoren, welche aus der Aktivierung des Proteinkinase-C- und MAP (mitogen associated protein kinase)-Kinase-Weges resultieren, sind zur Unterhaltung dieser Bindung notwendig. [84] Die aus der Aktivierung von Phospholipase C resultierenden Spaltprodukte DAG und das durch IP₃ freigesetzte Calcium ermöglichen die Aktivierung der Proteinkinase. [100] Nach ihrer Aktivierung wird diese zur Zellmembran rekrutiert und befähigt so die Mitglieder der NF- κ B-Familie, in den Zellkern zu translozieren und ebenfalls Gene anzusteuern, die für die Entwicklung und Proliferation der T-Zellen im Rahmen der Immunantwort notwendig sind. [130] DAG aktiviert einen weiteren Signalweg, den der MAP-Kinase, und veranlasst die Verlagerung von Ras zur Zellmembran. [26] Die Aktivierung durch die MAP-Kinase stellt nur eine Möglichkeit dar, Ras zu aktivieren. Die Phosphorylierung des Proteins Ras kann aber auch durch die Proteinkinase C erfolgen - ein weiterer Schnittpunkt der Signalkaskaden. [121] [33] Ras ist mitbeteiligt an der Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1. [22] Erst das komplexe Zusammenspiel der beschriebenen Signalkaskaden ermöglicht letztendlich die Transkription von IL-2 und damit die klonale Expansion der T-Zellen im Kontext der Rejektion eines allogenen Transplantats. [84]

Aufgrund des Einflusses der Proteinkinase C auf die Transkriptionsfaktoren NF- κ B, AP-1 und NFAT in der Grundlagenforschung hat diese sich als mögliches Ziel für die Inhibition der T-Zell-Aktivierung herauskristallisiert. So zeigen T-Zellen von PKC θ -Knock-out-Mäuse bei in vivo Aktivierung eine Verminderung der Transkriptionsfaktoren AP1, NF- κ B, und NFAT. Zusätzlich ist die Expression von verschiedenen Zytokinen z.B. IL-2, IL-4, IFN γ und TNF α reduziert. [2] Der Einsatz von Sotrastaurin im Mausmodell führt zu einer Hemmung der Transduktionskaskaden NFAT und NF- κ B. Entsprechend der Schlüsselstellung der gehemmten Transkriptionsfaktoren werden, wie erwartet, auch die frühen Marker der T-Zell-Aktivierung IL-2 und

CD25 inhibiert. Und folgerichtig wird die Proliferation der murinen T-Zellen gehemmt. [27] Von den verschiedenen T-Zell-Subpopulationen sind die T-Helfer-Zellen entscheidend für die Einleitung des Rejektionsprozesses. Sie produzieren die meisten der Zytokine, die für die Auslösung einer Immunantwort notwendig sind. [69] Diese Botenstoffe wirken stimulierend auf die CD4+ Zellen selbst sowie auf andere Zellen, die auch an der Immunantwort beteiligt sind (z.B. CD8+ Zellen, Makrophagen und B-Zellen). Die Abstoßung eines allogenen Transplantates ist ohne die CD4+ Zellen nicht möglich. [70]

Daher haben wir in den hier gezeigten Untersuchungen die Proliferation dieser wichtigen Untergruppe evaluiert. Nach Behandlung der primären humanen T-Zellen mit Sotrastaurin zeigte sich eine hochsignifikante dosisabhängige Hemmung der Proliferation dieser T-Zell-Subpopulation. In Lymphozytenfunktionstests an gesunden Probanden und nierentransplantierten Patienten nach Einnahme des Wirkstoffes bestätigten sich die Ergebnisse. [66] Im Vergleich zur Einzelbehandlung mit Sotrastaurin führte die zusätzliche Einnahme von Cyclosporin A bzw. Tacrolimus zu einem signifikanten synergistischen Effekt im Hinblick auf die Inhibition der T-Zell-Proliferation. [67] [68] Sotrastaurin inhibiert somit nicht nur einzelne Aktivierungsmarker oder die Produktion von Zytokinen sondern auch den Endpunkt der Aktivierungskaskade - die Proliferation. Entscheidend für den Rejektionsprozess ist das Zusammenspiel der verschiedenen Zellen des Immunsystems. Inwiefern Sotrastaurin die anderen Zellen beeinflusst, sollte in weiterführenden Untersuchungen der Arbeitsgruppe analysiert werden.

6.2 Sotrastaurin und die Effekte auf andere Zellen des Immunsystems

6.2.1 Dendritische Zellen

Von entscheidender Bedeutung für die Einleitung einer Immunantwort nach Transplantation ist die Präsentation des Antigens durch die APZ. Wichtigste Vertreter dieser Gruppe sind die dendritischen Zellen.

Nach Aktivierung einer unreifen dendritischen Zelle durch Antigen wandert diese in die peripheren Lymphorgane, um dort den T-Zellen das prozessierte Antigen zu präsentieren. Aktivierte Dendriten ändern ihre Morphologie und beginnen mit der Expression zahlreicher MHC-Klasse-II-Moleküle und einer Vielzahl kostimulatorischer Marker. Die Veränderungen der Oberflächenstruktur dienen dazu, die Aktivierung der T-Zellen zu stimulieren. [52] In diesen Prozess greifen Immunsuppressiva wie z.B. Cyclosporin [76], Glukokortikoide [87], Sirolimus [41] und MPA [36] ein. Die Anwendung der genannten Substanzen im Transplantationsmodell führte zu einer Hemmung der Dendritenreifung. [92] [148] [74] Charakteristisch für die reife dendritische Zelle sind die kostimulatorischen Marker CD80 und CD86, die Liganden des CD28-Rezeptors der T-Zelle sowie CD40. [52] B7-DC gehört ebenfalls zur Gruppe der kostimulatorischen Molekü-

le. Er dient als Ligand für den T-Zellrezeptor PD-1. Für diesen Rezeptor wurden in der Literatur sowohl stimulierende als auch regulative Funktionen beschrieben. Die Arbeiten, die sich mit der Bedeutung von B7-DC für die Immunantwort beschäftigen, bestätigen auch für den Liganden diese gegensätzlichen Eigenschaften. [153] [75] Das Molekül CD83 wird ebenfalls auf reifen Dendriten exprimiert. Der Ligand dieses Markers ist noch nicht bekannt. Die Ergebnisse verschiedener Arbeitsgruppen zur Bedeutung von CD83 im Hinblick auf die T-Zell-Aktivierung sind widersprüchlich. [111] [110]

Eine dendritische Zelle, die durch Antigen aktiviert wird, exprimiert verstärkt MHC-Moleküle. Diese dienen der Präsentation des pathogenen Antigens. Bestandteil des MHC-Komplexes ist das HLA-DR-Molekül. Es dient als Marker für die gesteigerte Expression. [176] [3] Ziel der Arbeitsgruppe war es, die Effekte von Sotrastaurin auf die Reifung dendritischer Zellen nach Antigenstimulation zu untersuchen. Nach Gewinnung von Monozyten aus dem Blut der Spender, wurden diese mit einer Vielzahl von Reifungsfaktoren behandelt. Nach Behandlung der so gewonnenen dendritischen Zellen mit Sotrastaurin wurden die oben genannten Marker durchflusszytometrisch evaluiert. Bis auf minimale Effekte auf die Expression von B7-DC blieb die Expression der phänotypischen Oberflächenmerkmale unverändert. Dies zeigt, dass dieser wichtige erste Schritt der Immunantwort, die Ausbildung T-Zell-stimulierender Oberflächenmoleküle nach Antigenkontakt, durch Sotrastaurin nicht inhibiert wird. In wie weit Sotrastaurin die Fähigkeit von Dendriten hemmt, T-Zellen zur Proliferation anzuregen, war Gegenstand einer weiteren Versuchsreihe. Es zeigte sich, dass die Proliferation der so stimulierten T-Zellen nicht beeinflusst wurde. [90] Diese Ergebnisse legen nahe, dass Sotrastaurin keinen Einfluss auf die durch Dendriten vermittelte T-Zell-Aktivierung nach Antigenstimulation hat.

6.2.2 Natürliche Killerzellen

NK-Zellen sind wichtige Vertreter der angeborenen Immunantwort. Für die T-Zell-Antwort ist eine Vielzahl von Aktivierungsschritten notwendig. Bei NK-Zellen hingegen führt allein das Ausbleiben inhibitorischer Signale zur Aktivierung und unmittelbaren Lyse der Zielzelle. Über KIR-Rezeptoren (killer immunoglobulin-like receptors) erkennen NK-Zellen Zellen, die keine, wenige oder als fremd erkannte MHC-I-Moleküle exprimieren. Bleibt dieses inhibitorische Signal aus, so werden diese unmittelbar lysiert. Literatur, die sich mit der Rolle der NK-Zellen auseinandersetzt, ist rar. Es ist belegt, dass NK-Zellen bereits kurze Zeit nach Transplantation im Transplantat aktiviert werden. [156] In einer aktuellen Arbeit an Nierenbiopsien von Transplantatempfängern mit Spender-spezifischen Antikörpern wurde eine Beteiligung der NK-Zellen an der humoralen Rejektion postuliert. [48] Doch welche Rolle NK-Zellen bei akuten und chronischen Rejektionsprozessen spielen, ist noch nicht ausreichend geklärt. [6]

Ziel war es, den Einfluss von Sotrastaurin im Hinblick auf diese Zellpopulation zu untersuchen. Die lytische Aktivität von NK-Zellen wurde nach Stimulation und Behandlung mit Sotrastaurin mit Zellen einer Zelllinie bestimmt, die keine MHC-Klasse-I-Moleküle exprimieren. Es zeigte

sich, dass die lytische Aktivität der NK-Zellen durch Sotrastaurin signifikant gehemmt wurde. [90] Von welcher Relevanz dieses Ergebnis im Hinblick auf das Rejektionsgeschehen ist, kann erst in weiterführenden Untersuchungen geklärt werden.

6.3 Weiterführende Untersuchungen B-Zellen

Ein wichtiges, bisher nur unzureichend erforschtes Gebiet der Transplantationsmedizin ist die Pathophysiologie der humoralen Rejektion. Die humorale Abstoßung wird im wesentlichen von B-Zellen vermittelt. Notwendig ist die Interaktion der naiven B-Zellen mit aktivierten T-Zellen, um eine suffiziente humorale Reaktion der B-Zellen mit effektiver Antikörper-Produktion und Ausbildung von memory-B-Zellen zu generieren. Dies induziert die Aktivierung von Komplement und die Zell-vermittelte Zytotoxizität. Eine Schädigung des allogenen Transplantats ist die Folge dieser grundlegenden Mechanismen. [141]

Der Nachweis von Antikörpern, die sich gegen das Transplantat richten, geht häufig bereits der klinisch und paraklinisch evidenten Transplantatverschlechterung bis hin zum Transplantatversagen voraus, so dass dem Nachweis von donorspezifischen Antikörpern eine prediktive Bedeutung hinsichtlich des Transplantatüberlebens zukommt. [151] [150] Auch wenn die Mechanismen der humoralen Rejektion nach wie vor nur unvollständig verstanden sind, besteht in der Klinik ein dringender Bedarf für suffiziente Therapieoptionen, um eine Verschlechterung der Transplantatfunktion der betroffenen Patienten zu verhindern. Plasmapherese, intravenöse Immunglobuline, Immunadsorption und Rituximab werden bereits in der Behandlung eingesetzt. [4] [115] Neuartige Substanzen wie der Proteasomen-Inhibitor Bortezomib, der sich gegen reife Plasmazellen richtet, [166] und Eculizumab, [140] welches die Aktivierung von Komplement inhibiert, sind in der Erprobung. Doch eine etablierte Therapie zur Behandlung der humoralen Rejektion steht weiterhin nicht zur Verfügung.

Daher kommt der Prophylaxe eine besondere Bedeutung zu. Die im Vorfeld der Transplantation durchgeführten Untersuchungen auf HLA-Antikörper [82] und die Durchführung eines Crossmatches [23] helfen, das Risiko zu minimieren, aber doch nicht gänzlich zu verhindern. Idealerweise sollten Immunsuppressiva die T- und B-Zell-Antwort inhibieren. MPA und Sirolimus sind in der Lage, die B-Zell-Antwort direkt, d.h. die B-Zell-Proliferation und die Immunglobulinproduktion, stark zu inhibieren, wohingegen die Calcineurininhibitoren ihre immunsuppressive Wirkung überwiegend über die Hemmung der T-Zell-Antwort entfalten. [46] [47]

Ziel der Arbeitsgruppe war es, die Effekte von Sotrastaurin im Hinblick auf die Mediatoren der humoralen Rejektion - die B-Zellen - zu beleuchten. Exemplarisch wurden die Auswirkungen des neuen Wirkstoffs auf Expression von Aktivierungsmarkern, Immunglobulinproduktion, T-zellvermittelte Aktivierung von B-Zellen, Proliferation und auch das Apoptoseverhalten evaluiert. [88] B-Zellen verfügen mit den Oberflächenmolekülen CD80 und CD86 über Li-

ganden der bedeutsamen kostimulatorischen Moleküle CD28 und CTLA-4. CD86 wird dabei bereits von B-Zellen im Ruhezustand exprimiert, eine Aktivierung führt zu einer zusätzlichen Steigerung der Expressionsrate. Hingegen führt erst die Aktivierung einer B-Zelle zur Expression von CD80. [77] [124] Die Behandlung der B-Zellen führte zu keiner Beeinflussung der CD80-Expression. CD86 hingegen wurde sogar verstärkt exprimiert. [88] Nur in hohen Dosierungen konnte Sotrastaurin die Bildung von IgG, nicht aber die von IgM inhibieren. [88] Die T-Zell-induzierte IgG- und IgM-Produktion wurde durch Sotrastaurin reduziert. [88] Hingegen wurde die Proliferation und auch die Apoptoseneigung der B-Zellen durch Sotrastaurin nicht beeinflusst. In Zusammenschau der Ergebnisse blieb die B-Zell-Antwort weitgehend unbeeinflusst von der Behandlung mit dem PKC-Inhibitor. Dies überraschte insofern, da B-Zellen nach Antigen-Stimulation die Expression von PKC-Isoformen steigern. Diese Isoformen sind von Bedeutung für die B-Zell-Entwicklung und werden auch durch Sotrastaurin inhibiert (z.B. PKC alpha, beta, delta, epsilon). [145] [126] [78] [39] [27]

Die bisher nur unvollständig verstandenen Vorgänge der B-Zell-Aktivierung ließen sich in vitro durch die Anwendung von Sotrastaurin nur in geringem Maße beeinflussen. Detaillierte Untersuchungen auf mechanistischer Ebene sind notwendig, dies zu verifizieren.

6.4 Klinischer Ausblick - die Anwendung von Sotrastaurin

6.4.1 Transplantation

Der Einsatz von Sotrastaurin auf dem Gebiet der Nierentransplantation wurde in einer Vielzahl von Studien untersucht. Nach den vielversprechenden Ergebnissen der Voruntersuchungen in vitro und im Transplantationsmodell, die auf eine nebenwirkungsarme Alternative zu den Calcineurininhibitoren hoffen ließen, wurden zwei Studien an de novo nierentransplantierten Patienten initiiert. [27] [164] [165] [10] [7] [30]

In einer ersten dreiarmligen, randomisierten, multizentrischen Phase I/II-Studie über 12 Monate wurde die Wirkung von 200mg Sotrastaurin in Kombination mit einer normalen oder einer reduzierten Dosis Tacrolimus und Steroiden mit dem Standardregime Tacrolimus, MPA sowie Steroiden verglichen. Die Studie wurde vorzeitig beendet, da der Ersatz von Tacrolimus durch MPA im Sotrastaurin-Arm drei Monate nach erfolgter Transplantation zu einer erhöhten Rejektionsrate führte. [13]

In einer zweiten Studie wurde die Effektivität von 300mg Sotrastaurin, MPA und Steroiden mit dem Standardregime Tacrolimus, MPA und Steroiden evaluiert. Signifikant erhöhte Rejektionsraten im CNI-freien Arm führten ebenfalls zum Abbruch der Studie. [30]

Da sich Sotrastaurin im direkten Vergleich mit dem bewährten Wirkstoff Tacrolimus in der Prophylaxe von Rejektionen unterlegen zeigte, wurde in einer 2011 beendeten Studie überprüft, ob

Sotrastaurin in Kombination mit Everolimus wirksamer Rejektionen verhindert als Cyclosporin A und Everolimus. Auch hier traten höhere Rejektionsraten im Calcineurininhibitor-freien Sotrastaurin-Arm auf. [149] Somit zeigte sich Sotrastaurin im direkten Vergleich mit den Calcineurininhibitoren in der Prophylaxe von Rejektionen unterlegen.

Nachfolgend wurde daher der mögliche Einsatz von Sotrastaurin als weniger myelotoxische Alternative für MPA überprüft. In einer Dosisfindungsstudie wurde der Einsatz von verschiedenen Dosierungen Sotrastaurin mit der Standarddosierung MPA in Kombination mit Tacrolimus und Steroid verglichen. In den Dosierungen 200mg und 300mg konnte Sotrastaurin vergleichbar gut Rejektionen verhindern. Zwar traten weniger Leukopenien im Sotrastaurin-Arm auf, doch um den Preis häufigerer Anämien insbesondere bei der hohen Dosierung des Proteinkinase-C-Inhibitors. [125]

Nach den ersten Erfahrungen auf dem Gebiet der Nierentransplantation wurde im Anschluss an eine erste pharmakokinetische Studie mit Sotrastaurin an de novo lebertransplantierten Patienten eine zweite Dosisfindungsstudie initiiert. [65] Es wurde die Kombination aus zwei verschiedenen Dosierungen Sotrastaurin sowie Tacrolimus und Steroid mit der Standardtherapie bestehend aus Tacrolimus, MPA und Steroid bei de novo lebertransplantierten Patienten verglichen [19]. Die Ergebnisse dieser 2012 beendeten Studie stehen noch aus.

In Zusammenschau der Studienergebnisse konnte Sotrastaurin die hochgesteckten Erwartungen insbesondere als mögliche Alternative zu den Calcineurininhibitoren nicht erfüllen. Daher wurden im März 2012 alle Studien mit Sotrastaurin auf dem Gebiet der Transplantationsmedizin eingestellt.

6.4.2 Autoimmunerkrankungen

In einer ersten proof-of-concept-Studie konnte die gute Wirksamkeit von Sotrastaurin im Hinblick auf die T-Zell-vermittelte Psoriasis nachgewiesen werden. [133] Die Ergebnisse einer bereits durchgeführten Dosisfindungsstudie an psoriasis-erkrankten Patienten stehen noch aus. [19]

Bei zwei weiteren Autoimmunerkrankungen, Colitis ulcerosa und Uveitis, wurden Studien zur klinischen Wirksamkeit durchgeführt. Die Colitis-ulcerosa-Studie musste aufgrund ausbleibendem Wirksamkeitsnachweis vorzeitig beendet werden. Zu beiden Studien wurden noch keine Ergebnisse veröffentlicht. [19]

6.4.3 Onkologie

In Voruntersuchungen erwies sich die Inhibition des NF- κ B-Signalweges als vielversprechend für die Therapie des großzelligen B-Zell-Lymphoms mit CD79-Mutation. [98] Da der Proteinkinase-C-Inhibitor Sotrastaurin diesen Transduktionsweg hemmt, werden in einer aktuell laufenden Studie betroffene Patienten rekrutiert, um diesen Therapieansatz zu evaluieren. [19] Für

Zellen des Aderhautmelanoms mit GNAQ-Mutation zeigte sich, dass die Isoformen der Proteinkinase C von funktioneller Bedeutung sind und somit ein mögliches therapeutisches Ziel darstellen. [174] Im Rahmen einer klinischen Studie wird die Wirksamkeit von Sotrastaurin an Patienten mit metastasiertem Aderhautmelanom aktuell evaluiert. [19]

7 Literaturverzeichnis

- [1] ALLISON, AC.: *Immunosuppressive drugs: the first 50 years and a glance forward*. Immunopharmacology 47: 63-83, 2000
- [2] ANDERSON, K. ; FITZGERALD, M. ; DUPONT, M. et al.: *Mice deficient in PKC theta demonstrate impaired in vivo T cell activation and protection from T cell-mediated inflammatory diseases*. Autoimmunity, 2006 Sep;39(6):469-78
- [3] ARDESHNA, KM. ; PIZZEY, AR. ; DEVEREUX, S. et al.: *The PI3 kinase, p38 SAP kinase, and NF-kappaB signal transduction pathways are involved in the survival and maturation of lipopolysaccharide-stimulated human monocyte-derived dendritic cells* Blood. 2000 Aug 1;96(3):1039-46
- [4] BARTEL, G. ; SCHWAIGER, E. ; BOHMIG, GA.: *Prevention and treatment of alloantibody-mediated kidney transplant rejection*. Transpl Int 2011; 24: 1142
- [5] BAYER, AL. ; BALIGA, P. ; WOODWARD, JE.: *Differential effects of transferrin receptor blockade on the cellular mechanisms involved in graft rejection*. Transpl Immunol, 1999 Sep;7(3):131-9
- [6] BEILKE, JN. ; GILL, RG.: *Frontiers in nephrology: the varied faces of natural killer cells in transplantation—contributions to both allograft immunity and tolerance*. J Am Soc Nephrol 2007; 18: 2262–2267
- [7] BIGAUD, M. ; E, Wieczorek G; P. et al.: *NVP-AEB071 (AEB), the novel oral inhibitor of proteine kinase C (PKC) and early T-cell activation, prolongs non-human primate (NHP) kidney allograft survival when combined with everolimus (RAD), ERL089 (ERL) or FTY720 (FTY) without calcineurin inhibitor (CNI)*. Transplantaion 2006; 1: 251-252 (Abstract 550)
- [8] BJORKMAN, PJ.: *MHC restriction in three dimensions: a view of T cell receptor/ligand interactions*. Cell 89 , 167-170, 1997
- [9] BOEHM, U. ; KLAMP, T. ; GROOT, M. et al.: *Cellular responses to interferon-gamma*. Annu Rev Immunol, 1997;15:749-95
- [10] BRUNS, C. ; PALLY, C. ; BEERLI, C. et al.: *NVP-AEB071 (AeB), a novel oral inhibitor of early T-cell activation, prolongs rat cardiac allograft survival when used alone and*

- in combination with cyclosporin, everolimus or FTY720.* Transplantation 2006; 1:316 (Abstract 741)
- [11] BUDDE, K. ; GIESSING, M. ; LIEFELDT, L. et al.: *Immunsuppressiva nach Nierentransplantation.* Der Urologe Moderne 45(1):9-17, 2006 Jan
- [12] BUDDE, K. ; GIESSING, M. ; LIEFELDT, L. ; NEUMAYER, HH. ; GLANDER, P.: *Modern immunosuppression following renal transplantation, Standard or tailor made?* Urologe A 45: 9-17, 2006
- [13] BUDDE, K. ; SOMMERER, C. ; BECKER, T. et al.: *AEB071, a novel protein kinase C-inhibitor: First clinical results of an AEB071 plus tacrolimus regimen in renal transplant recipients.* Am J Transplant 2009 9 Suppl 2 Abs 391
- [14] BÖHLER, T. ; CANIVET, C. ; NGUYEN, PN. et al.: *Cytokines correlate with age in healthy volunteers, dialysis patients and kidney-transplant patients.* Cytokine, 2009 Mar;45(3):169-73
- [15] BÖHLER, T. ; NOLTING, J. ; KAMAR, N. et al.: *Validation of immunological biomarkers for the pharmacodynamic monitoring of immunosuppressive drugs in humans.* Ther Drug Monit, 2007 Feb;29(1):77-86
- [16] CALNE, R.: *Cyclosporine as a milestone in immunosuppression.* Transplant Proc, 2004 Mar;36(2 Suppl):13S-15S
- [17] CARTER, L. ; FOUSER, LA. ; JUSSIF, J. et al.: *PD-1:PD-L inhibitory pathway affects both CD4(p) and CD8(p) T cells and is overcome by IL-2.* Eur J Immunol 2002; 32 (3):634–643
- [18] CLEMENTS, JL. ; BOERTH, NJ. ; LEE, JR. et al.: *Integration of T cell receptor-dependent signaling pathways by adapter proteins.* Annu Rev Immunol, 1999;17:89–108
- [19] CLINICAL, Trials.: *US National Institutes of Health.* <http://www.clinicaltrials.gov> eingesehen am 25.11.2014
- [20] CLIPSTONE, NA. ; CRABTREE, GR.: *Identification of calcineurin as a key signalling enzyme in T-lymphocyte activation.* Nature, 1992 Jun 25;357(6380):695-7
- [21] COLVIN, R.: *Antibody-mediated renal allograft rejection: Diagnosis and pathogenesis.* J Am Soc Nephrol 2007; 18: 1046
- [22] D'AMBROSIO, D. ; CANTRELL, DA. ; FRATI, L. et al.: *Involvement of p21ras activation in T cell CD69 expression.* Eur J Immunol, 1994 Mar;24(3):616-20

- [23] DAVIS, CL. ; HRICIK, DE.: *Transplant: immunology and treatment of rejection*. Am J Kidney Dis, 2004 Jun; 43(6):1116-37
- [24] DONG, C. ; JUEDES, AE. ; TEMANN, UA. et al.: *ICOS co-stimulatory receptor is essential for T-cell activation and function*. Nature, 2001 Jan 4;409(6816):97-101
- [25] (DSO), Deutsche Stiftung O.: *Jahresbericht 2013 Organspende und Transplantation in Deutschland*. 2014 Apr
- [26] EBINU, JO. ; BOTTORFF, DA. ; CHAN, EY. et al.: *RasGRP, a Ras guanyl nucleotide-releasing protein with calcium- and diacylglycerol-binding motifs*. Science, 1998 May 15;280(5366):1082-6
- [27] EVENOU, JP. ; WAGNER, J. ; ZENKE, G. et al.: *The potent protein kinase C-selective inhibitor AEB071 (sotrastaurin) represents a new class of immunosuppressive agents affecting early T-cell activation*. J Pharmacol Exp Ther, 2009 Sep;330(3):792-801
- [28] FRAUWIRTH, KA. ; THOMPSON, CB.: *Activation and inhibition of lymphocytes by co-stimulation*. J Clin Invest, 2002 Feb;109(3):295-9
- [29] FREEMAN, GJ. ; LONG, AJ. ; IWAI, Y. et al.: *Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation*. J Exp Med, 2000;192: 1027-1034
- [30] FRIMAN, S. ; ARNS, W. ; NASHAN, Bi.: *Sotrastaurin, a novel small molecule inhibiting protein-kinase C: randomized phase II study in renal transplant recipients*. Am J Transplant, 2011 Jul;11(7):1444-55
- [31] FUNCTION, Regulation of t. ; REVIEW expression: ; UPDATE: *Transferrin receptor in T cell activation and transplantation*
- [32] GAJEWSKI, TF. ; FITCH, FW.: *Anti-proliferative effect of IFN-gamma in immune regulation*. I, IFN-gamma inhibits the proliferation of Th2 but not Th1 murine helper T lymphocyte clones J
- [33] GENOT, E. ; CANTRELL, DA.: *Ras regulation and function in lymphocytes*. Curr Opin Immunol, 2000 Jun;12(3):289-94
- [34] GRAMAGLIA, I. ; WEINBERG, AD. ; LEMON, M. ; et al.: *Ox-40 ligand: a potent co-stimulatory molecule for sustaining primary CD4 T cell responses*. J Immunol 1998; 161:6510–6517
- [35] GREENWALD, RJ. ; FREEMAN, GJ. ; SHARPE, AH.: *The B7 family revisited*. Annu RevImmunol 2005; 23:515–548

- [36] GREGORI, S. ; CASORATI, M. ; AMUCHASTEGUI, S. et al.: *Regulatory T cells induced by 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3 and mycophenolate mofetil treatment mediate transplantation tolerance*. J Immunol 167: 1945-1953, 2001
- [37] GRUBER, T. ; HERMANN-KLEITER, N. ; PFEIFHOFER-OBERMAIR, C. et al.: *PKC theta cooperates with PKC alpha in alloimmune responses of T cells in vivo*. Mol Immunol 46(10):2071-9, 2009 Jun
- [38] GUILD, WR. ; HARRISON, JH. et al.: *Successful homotransplantation of the kidney in an identical twin*. Trans Am Clin Climatol Assoc, 1955-1956;67:167-73
- [39] GUO, B. ; SU, TT. ; RAWLINGS, DJ.: *Protein kinase C family functions in B-cell activation*. Curr Opin Immunol 2004; 16: 367
- [40] GUPTA, G. ; WOMER, KL.: *Profile of belatacept and its potential role in prevention of graft rejection following renal transplantation*
- [41] HACKSTEIN, H. ; TANER, HT. ; ZAHORCHAK, AF. et al.: *Rapamycin inhibits IL-4-induced dendritic cell maturation in vitro and dendritic cell mobilization and function in vivo*. Blood 101: 4457-4463, 2003
- [42] HALLORAN, PF.: *Immunosuppressive drugs for kidney transplantation*. N Engl J Med, 2004 Dec 23;351(26):2715-29
- [43] HAMER, R. ; MOLOSTVOV, G. ; LOWE, D. et al.: *Human leukocyte antigen-specific antibodies and gamma-interferon stimulate human microvascular and glomerular endothelial cells to produce complement factor C4*. Transplantation, 2012 May 15;93(9):867-73
- [44] HANCOCK, WW. ; LU, B. ; GAO, W. et al.: *Requirement of the chemokine receptor CxCr3 for acute allograft rejection*. J Exp Med, 2000 Nov 20;192(10):1515-20
- [45] HAUSER, IA. ; NEUMAYER, HHR.: *Tacrolimus and cyclosporine efficacy in high-risk kidney transplantation*. European Multicentre Tacrolimus (FK506) Renal Study Group, Transpl Int 11 Suppl 1:S73-7
- [46] HEIDT, S. ; ROELEN, DL. ; EIJSINK, C. et al.: *Calcineurin inhibitors affect B cell antibody responses indirectly by interfering with T cell help*
- [47] HEIDT, S. ; ROELEN, DL. ; EIJSINK, C. et al.: *Effects of Immunosuppressive Drugs on Purified Human B Cells: Evidence Supporting the Use of MMF and Rapamycin*
- [48] HIDALGO, LG. ; SIS, B. ; SELLARES, J. et al.: *NK cell transcripts and NK cells in kidney biopsies from patients with donor-specific antibodies: evidence for NK cell involvement in antibody-mediated rejection*. Am J Transplant, 2010 Aug;10(8):1812-22

- [49] HOOGEN MW, Van den ; HILBRANDS, LB.: *Use of monoclonal antibodies in renal transplantation*. Immunotherapy, 2011 Jul;3(7):871-80
- [50] HRICIK, DE. ; ALMAWI, WY. ; STROM, TB.: *Trends in the use of glucocorticoids in renal transplantation*. Transplantation, 1994 Apr 15;57(7):979-89
- [51] HUTLOFF, A. ; DITTRICH, AM. ; BEIER, KC. et al.: *ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28*. Nature, 1999;397: 263-266
- [52] JANEWAY, CA. ; TRAVERS, P. ; WALPORT, M. et al.: *Immunobiology - The immune system in health and disease*. Chapter 8, T Cell-Mediated Immunity, 5th edition New York, USA: Garland Science, 2001
- [53] KAHAN, BD.: *Cyclosporine*. N Engl J Med, 1989 Dec 21; 321(25):1725-38
- [54] KAHAN, BD. ; RAJAGOPALAN, PR. ; HALL, M.: *Reduction of the occurrence of acute cellular rejection among renal allograft recipients treated with basiliximab, a chimeric anti-interleukin-2-receptor monoclonal antibody*. United States simulect Reanl Study Group, Transplantation 67(2):276-284, 1999
- [55] KAMAR, N. ; GLANDER, P. ; NOLTING, J. et al.: *Pharmacodynamic evaluation of the first dose of mycophenolate mofetil before kidney transplantation*. Clin J Am Soc Nephrol, 2009 May;4(5):936-42
- [56] KARIN, M. ; LIN, A.: *NF-kappaB at the crossroads of life and death*. Nat Immunol, 2002 Mar;3(3):221-7
- [57] KARPINSKI, M. ; RUSH, D. ; JEFFERY, J. et al.: *Heightened peripheral blood lymphocyte CD69 expression is neither sensitive nor specific as anoninvasive diagnostic test for renal allograft rejection*. J Am Soc Nephrol 2003; 14: 226–233
- [58] KASISKE, BL. ; ZEIER, MG. ; CHAPMAN, JR. et al.: *KDIGO clinical practice guideline for the care of kidney transplant recipients: a summary*. Kidney Int, 2010 Feb;77(4):299-311
- [59] KAY, JE.: *Mechanisms of T lymphocyte activation*. Immunol Lett, 1991, 29(1-2): 51-4 Review
- [60] KEITH, DS. ; DEMATTOS, A. ; GOLCONDA, M. et al.: *Factors associated with improvement in deceased donor renal allograft function in the 1990s*. J Am Soc Nephrol 16: 15212–15212, 2005
- [61] KNIGHT, SR. ; RUSSELL, NK. ; BARCENA, L. ; MORRIS, PJ.: *Mycophenolate mofetil decreases acute rejection and may improve graft survival in renal transplant recipients*

- when compared with azathioprine: a systematic review.* Transplantation 87(6):785-94
Review PMID: 19300178, 2009 Mar 27
- [62] KNOLL, G.: *Trends in kidney transplantation over the past decade.* Drugs, 2008;68
Suppl 1:3-10
- [63] KORNIEJEWSKA, A. ; WATSON, M. ; WARD, S.: *Analysis of CxCR3 and atypical variant
expression and signalling in human T lymphocytes.* Methods Mol Biol, 2010;616:125-47
- [64] KOVARIK, JM. ; BARTLETT, M. ; RORDORF, C. et al.: *Sotrastaurin and everolimus
pharmacokinetics after single-dose coadministration.* Int J Clin Pharmacol Ther, 2010
Feb;48(2):103-8
- [65] KOVARIK, JM. ; NEUHAUS, P. ; CILLO, U. ; WEBER, M. ; STITAH, S. ; GATLIK, E. ;
MEISER, K. ; SLADE, A.: *Sotrastaurin single-dose pharmacokinetics in de novo liver
transplant recipients.* Transpl Int, 2010 Dec 7
- [66] KOVARIK, JM. ; SLADE, A.: *Overview of sotrastaurin clinical pharmacokinetics.* Ther
Drug Monit, 2010 Oct;32(5):540-3
- [67] KOVARIK, JM. ; STITAH, S. ; SLADE, A. et al.: *Sotrastaurin and cyclosporine drug
interaction study in healthy subjects.* Biopharm Drug Dispos, 2010 Jul;31(5-6):331-9
- [68] KOVARIK, JM. ; STITAH, S. ; SLADE, A. et al.: *Sotrastaurin and tacrolimus coadmini-
stration: effects on pharmacokinetics and biomarker responses.* J Clin Pharmacol, 2010
Nov;50(11):1260-6
- [69] KRENSKY, AM. ; WEISS, A. ; CRABTREE, G. et al.: *T-lymphocyte-antigen interactions
in transplant rejection.* N Engl J Med 1990; 322:510-7
- [70] KRIEGER, FR. ; YIN, DP. ; FATHMAN, CG.: *CD4+ but not CD8+ cells are essential for
allorejection.* J Exp Med, 1996 Nov 1;184(5):2013-8
- [71] KRIEGER, NR. ; DENGPIING, Y. ; FATHMAN, CG.: *CD4+ but not CD8+ cells are essen-
tial for allorecognition.* J Exp Med 1996 184: 2013–2018
- [72] KÄLBLE, T. ; ALCARAZ, A. ; BUDDE, K. ; HUMKE, U. ; KARAM, G. et al.: *Guidelines
on Renal Transplantation.* European Association of Urology, 2010
- [73] KÜNDIG, T. ; SCHORLE, H. ; BACHMANN, MF. et al.: *Immune responses in interleukin-2
deficient mice.* Science 262:1059–1061, 1993
- [74] LAN, YY. ; WANG, Z. ; RAIMONDI, G. et al.: *Alternatively activated dendritic cells
preferentially secrete IL-10, expand Foxp3+CD4+ T cells, and induce long-term organ
allograft survival in combination with CTLA4-Ig.* J Immunol, 2006 Nov 1;177(9):5868-
77

- [75] [LATCHMAN, Y. ; WOOD, CR. ; CHERNOVA, T. et al.: *PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation*. Nat Immunol, 2001;2: 261-268
- [76] LEE, JI. ; GANSTER, RW. ; GELLER, DA. et al.: *Cyclosporine A inhibits the expression of costimulatory molecules on in vitro-generated dendritic cells: association with reduced nuclear translocation of nuclear factor κ B*. Transplantation 68: 1255-1263, 1999
- [77] LENSCHOW, DJ. ; TL, Walunas ; JA, Bluestone: *CD28/B7 system of T cell costimulation*. Annu Rev Immunol 14: 233-258, 1996
- [78] LI, ZW. ; OMORI, SA. ; LABUDA, T. et al.: *KK beta is required for peripheral B cell survival and proliferation*. J Immunol 2003; 170: 4630
- [79] LIEFELDT, L. ; BRAKEMEIER, S. ; GLANDER, P. et al.: *Donor-specific HLA antibodies in a cohort comparing everolimus with cyclosporine after kidney transplantation*. Am J Transplant 12(5):1192-8, 2012 May
- [80] LINSLEY, PS. ; GREENE, JL. ; BRADY, W. et al.: *Human B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) bind with similar avidities but distinct kinetics to CD28 and CTLA-4 receptors*. Immunity 1994; 1 (9):793–801
- [81] LONG, A. ; KELLEHER, D. ; LYNCH, S. ; VOLKOV, Y.: *Cutting edge: protein kinase C beta expression is critical for export of Il-2 from T cells*. J Immunol 167(2):636-40, 2001 Jul 15
- [82] LUCAS, JG. ; CO, JP. ; NWAOGWUGWU, UT. et al.: *Antibody-mediated rejection in kidney transplantation: an update*. Expert Opin Pharmacother, 2011 Mar; 12(4):579-92
- [83] LYONS, AB. ; PARISH, CR.: *Determination of lymphocyte division by flow cytometry*. J Immunol Methods, 1994 May 2;171(1):131-7
- [84] MACIAN, F.: *NFAT proteins: key regulators of T-cell development and function*. Nat Rev Immunol, 2005 Jun;5(6):472-84
- [85] MARCEN, R.: *Immunosuppressive drugs in kidney transplantation: impact on patient survival, and incidence of cardiovascular disease, malignancy and infection*. Drugs 69(16): p, 2227-43
- [86] MARSLAND, BJ. ; KOPF, M.: *T-cell fate and function: PKC-theta and beyond*. Trends Immunol 29(4):179-85, 2008 Apr
- [87] MATYSZAK, MK. ; CITTERIO, S. ; RESCIGNO, M. et al.: *Differential effects of corticosteroids during different stages of dendritic cell maturation*. Eur J Immunol 30: 1233-1232, 2000

- [88] MATZ, M. ; LEHNERT, M. ; LORKOWSKI, C. et al.: *Effects of sotrastaurin, mycophenolic acid and everolimus on human B-lymphocyte function and activation*. Transpl Int, 2012 Oct;25(10):1106-16
- [89] MATZ, M. ; NAIK, M. ; MASHREGHI, MF. et al.: *Evaluation of the novel protein kinase C inhibitor sotrastaurin as immunosuppressive therapy after renal transplantation*. Expert Opin Drug Metab Toxicol, 2011 Jan;7(1):103-13
- [90] MATZ, M. ; WEBER, U. ; MASHREGHI, MF. ; LORKOWSKI, C. ; LADHOFF, J. ; KRAMER, S. ; NEUMAYER, HH. ; BUDDE, K.: *Effects of the new immunosuppressive agent AEB071 on human immune cells*. Nephrol Dial Transplant, 2010 Jul;25(7):2159-67
- [91] MEIER-KRIESCHE, HU. ; SCHOLD, JD. ; SRINIVAS, TR. et al.: *Lack of improvement in renal allograft survival despite a marked decrease in acute rejection rates over the most recent era*. Am J Transplant 4: 378–383, 2004
- [92] MIRENDA, V. ; BERTON, I. ; READ, J. ; COOK, T. ; SMITH, J. ; DORLING, A. ; LECHLER, RI.: *Modified dendritic cells coexpressing self and allogeneic major histocompatibility complex molecules: an efficient way to induce indirect pathway regulation*. J Am Soc Nephrol 15: 987-997, 2004
- [93] MISUMI, Y. ; MISUMI, Y. ; MIKI, K. et al.: *Novel blockade by brefeldin A of intracellular transport of secretory proteins in cultured rat hepatocytes*. J Biol Chem, 1986 Aug 25;261(24):11398-403
- [94] MONKS, CR. ; KUPFER, H. ; TAMIR, I. et al.: *Selective modulation of protein kinase C- θ during T-cell activation*. Nature 385(6611):83-6, 1997 Jan 2
- [95] MORATH, C. ; ARNS, W. ; SCHWENGER, V. et al.: *Sirolimus in renal transplantation*. Nephrol Dial Transplant
- [96] NAESENS, M. ; KUYPERS, DR. ; SARWAL, M.: *Calcineurin inhibitor nephrotoxicity*. Clin J Am Soc Nephrol, 2009 Feb; 4(2):481-508
- [97] NASHAN, B. ; MOORE, R. ; AMLOT, P. et al.: *Randomised trial of basiliximab versus placebo for control of acute cellular rejection in renal allograft recipients*. CHIB 20 International Study Group, Lancet 350(9086):1193-1198, 1997
- [98] NAYLOR, TL. ; TANG, H. ; RATSCH, BA. et al.: *Cancer Res Protein kinase C inhibitor sotrastaurin selectively inhibits the growth of CD79 mutant diffuse large B-cell lymphomas*. 2011 Apr 1;71(7):2643-53, Epub 2011 Feb 15
- [99] NICKELEIT ; V et al.: *BK-virus nephropathy in renal transplants-tubular necrosis, MHC-class II expression and rejection in a puzzling game*. Nephrol Dial Transplant 15(3): p, 324-32

- [100] NISHIZUKA, Y.: *Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses.* Faseb J, 1995 Apr;9(7):484-96
- [101] OJO, AO. ; HELD, PJ. ; PORT, FK. ; WOLFE, RA. ; LEICHTMAN, AB. ; YOUNG, EW. ; ARNDORFER, J. ; CHRISTENENN, L. ; MERION, RM.: *Chronic renal failure after transplantation of a nonrenal organ.* N Engl J Med, 2003 Sep 4;349(10):931-40
- [102] OPELZ, G.: *Influence of treatment with cyclosporine, azathioprine and steroids on chronic allograft failure.* The Collaborative Transplant Study; Kidney Int Suppl 52:S89-92, 1995 Dec
- [103] OPELZ, G. ; HENDERSON, R.: *For the collaborative Transplant study.* Incidence of non-Hodgkin lymphoma in kidney and heart transplant recipients, Lancet 342:1514-1516
- [104] OZKAYNAK, E. ; GAO, W. ; SHEMMERI, N. et al.: *Importance of ICOS-B7RP-1 costimulation in acute and chronic allograft rejection.* Nat Immunol 2001; 2 (7):591-596
- [105] PAN, J. ; ZHANG, M. ; WANG, J. et al.: *Interferon-gamma is an autocrine mediator for dendritic cell maturation.* Immunol Lett, 2004 Jun 15;94(1-2):141-51
- [106] PESTANA, JO. ; GRINYO, JM. ; VANRENTERGHEM, Y. et al.: *Three-year outcomes from BENEFIT-EXT: a phase III study of belatacept versus cyclosporine in recipients of extended criteria donor kidneys.* Am J Transplant, 2012 Mar;12(3):630-9
- [107] PFEIFHOFER, C. ; GRUBER, T. ; LETSCHKA, T. et al.: *Defective IgG2a/2b class switching in PKC alpha-/- mice.* J Immunol 176(10):6004-11, 2006 May 15
- [108] PFEIFHOFER, C. ; KOFLER, K. ; GRUBER, T. et al.: *Protein kinase C theta affects Ca²⁺ mobilization and NFAT cell activation in primary mouse T cells.* J Exp Med, 2003 Jun 2;197(11):1525-35
- [109] POSSELT, AM. ; VINCENTI, F. ; BEDOLLI, M. et al.: *CD69 expression on peripheral CD8 T cells correlates with acute rejection in renal transplant recipients.* Transplantation 2003; 76: 190-195
- [110] PRAZMA, CM. ; TEDDER, TF.: *Dendritic cell CD83: a therapeutic target or innocent bystander?* Immunol Lett, 2008 Jan 15;115(1):1-8
- [111] PRECHTEL, AT. ; STEINKASSERER, A.: *CD83: an update on functions and prospects of the maturation marker of dendritic cells.* Arch Dermatol Res, 2007 May;299(2):59-69
- [112] PUZIK, A. ; SCHULTZ, C. ; IBLHER, P. et al.: *Effects of ciclosporin A, tacrolimus and sirolimus on cytokine production in neonatal immune cells.* Acta Paediatr, 2007 Oct; 96(10):1483-9

- [113] QIAN, ZM. ; LI, H. ; SUN, H. et al.: *Targeted drug delivery via the transferrin receptor-mediated endocytosis pathway*. Pharmacol Rev, 2002 Dec;54(4):561-87
- [114] QIN, S. ; ROTTMAN, JB. ; MYERS, P. et al.: *The chemokine receptors CxCr3 and CCR5 mark subsets of T cells associated with certain inflammatory reactions*. J Clin Invest, 1998 Feb 15;101(4):746-54
- [115] RAMANATH, V. ; NISTALA, R. ; CHAUDHARY, K.: *Update on the role of rituximab in kidney diseases and transplant*. Expert Opin Biol Ther, 2012 Feb;12(2):223-33
- [116] REMUZZI, G. ; LESTI, M. ; GOTTI, E. et al.: *Mycophenolate mofetil versus azathioprine for prevention of acute rejection in renal transplantation (MYSS): a randomised trial*. Lancet 364 (9433): 503–12 doi:10.1016/S0140-6736(04)16808-6, 2004
- [117] RILEY, JL. ; BLAIR, PJ. ; MUSSER, JT. et al.: *ICOS co-stimulation requires IL-2 and can be prevented by CTLA-4 engagement*. J Immunol, 2001;166: 4943-4948
- [118] RIO, ML. del ; PENUELAS-RIVAS, G. ; DOMINGUEZ-PERLES RET al.: *Antibody-mediated signaling through PD-1 costimulates T cells and enhances CD28-dependent proliferation*. Eur J Immunol, 2005 Dec;35(12):3545-60
- [119] ROBB, RJ. ; MUNCK, A. ; SMITH, KA.: *T-cell growth factor receptors*. J Exp Med 1982;154:1455–74
- [120] RON, D. ; KAZANIETZ, MG.: *New insights into the regulation of protein kinase C and novel phorbol ester receptors*. Faseb J 1999; 13: 1658–1676
- [121] ROOSE, JP. ; MOLLENAUER, M. ; GUPTA, VA. et al.: *A diacylglycerol-protein kinase C-RasGRP1 pathway directs Ras activation upon antigen receptor stimulation of T cells*. Mol Cell Biol, 2005 Jun;25(11):4426-41
- [122] ROSENBLUM, JM. ; ZHANG, QW. ; SIU, G. et al.: *CxCr3 antagonism impairs the development of donor-reactive, IFN-gamma-producing effectors and prolongs allograft survival*. Transplantation, 2009 Feb 15;87(3):360-9
- [123] ROSTAING, L. ; KAMAR, N.: *mTOR inhibitor/proliferation signal inhibitors: entering or leaving the field?* J Nephrol, 2010, 23(2): p, 133 42
- [124] ROY, M. ; ARUFFO, A. ; LEDBETTER, J. et al.: *Studies on the interdependence of gp39 and B7 expression and function during antigen-specific immuneresponses*. Eur J Immunol, 1995 Feb;25(2):596-603
- [125] RUSS, GR. ; TEDESCO-SILVA, H. ; KUYPERS, DR. et al.: *Efficacy of sotrastaurin plus tacrolimus after de novo kidney transplantation: randomized, phase II trial results*. Am J Transplant, 2013 Jul;13(7):1746-56

- [126] SAIJO, K. ; MECKLENBRAUKER, I. ; SANTANA, A. et al.: *Protein kinase C beta controls nuclear factor kappaB activation in B cells through selective regulation of the Ikap-paB kinase alpha*. J Exp Med 2002; 195: 1647
- [127] SAMELSON, LE.: *Signal transduction mediated by the T cell antigen receptor: the role of adapter proteins*. Annu Rev Immunol, 2002;20:371-94
- [128] SCHNUELLE, P. ; LORENZ, D. ; TREDE, M. et al.: *Impact of renal cadaveric transplantation on survival in end-stage renal failure: evidence for reduced mortality risk compared with hemodialysis during long-term follow-up*. J Am Soc Nephrol, 1998;9(11):2135-41
- [129] SCHRODER, K. ; HERTZOG, PJ. ; RAVASI, T. et al.: *Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions*. J Leukoc Biol, 2004 Feb;75(2):163-89
- [130] SCHULZE-LUEHRMANN, J. ; GHOSH, S.: *Antigen-receptor signaling to nuclear factor kappa B*. Immunity, 2006 Nov;25(5):701-15
- [131] SCHWARTZ, RH.: *T cell anergy*. Annu Rev Immunol 21: 305–334, 2003
- [132] SHARPE, AH.: *Mechanisms of costimulation*. Immunol Rev, 2009 May;229(1):5-11
- [133] SKVARA, H. ; DAWID, M. ; KLEYN, E. et al.: *The PKC inhibitor AEB071 may be a therapeutic option for psoriasis*. J Clin Invest, 2008 Sep;118(9):3151-9
- [134] SLADE, A.: , *NVP-AEB071:Safety, Tolerability, Pharmacokinetics (PK) and Pharmacodynamics (PD) of Single Doses from 10 to 1100 mg*. Am J Transplant 2007 Suppl 2 abstract #145
- [135] SLADE, A.: *NVP-AEB071 pharmacokinetics:combination with mycophenolate mofetil is safe and does not result in an interaction*. AmJ Transplant 6 2006 Suppl 2 abstract #2436
- [136] SOLEZ, K.: *History of the Banff classification of allograft pathology as it approaches its 20th year*. Curr Opin Organ Transplant, 2010 Feb;15(1):49-51
- [137] SOMMERER, C. ; MEUER, S. ; ZEIER, M. et al.: *Calcineurin inhibitors and NFAT-regulated gene expression*. Clin Chim Acta, 2012 Sep 8;413(17-18):1379-86
- [138] STARZL, TE. ; BARKER, C.: *The origin of clinical organ transplantation revisited*. JAMA, 2009 May 20;301(19):2041-3
- [139] STARZL, TE. ; WEIL R 3rd. ; IWATSUKI, S. et al.: *The use of cyclosporin A and prednisone in cadaver kidney transplantation*. Surg Gynecol Obstet, 1980 Jul; 151(1):17-26
- [140] STEGALL, MD. ; DIWAN, T. ; RAGHAVAIAH, S. et al.: *Terminal complement inhibition decreases antibody-mediated rejection in sensitized renal transplant recipients*. Am J Transplant, 2011 Nov; 11(11):2405-13

- [141] STEGALL, MD. ; GLOOR, JM.: *Deciphering antibody-mediated rejection: new insights into mechanisms and treatment*. *Curr Opin Organ Transplant*, 2010 Feb;15(1):8-10
- [142] STENGEL, B.: *Chronic kidney disease and cancer: a troubling connection*. *J Nephrol* 23(3): p, 253-62
- [143] STUBER, E. ; STROBER, W.: *The T cell–B cell interaction via OX40–OX40L is necessary for the T cell-dependent humoral immune response*. *J Exp Med* 1996; 183:979–989
- [144] SU, B. ; JACINTO, E. ; HIBI, M. et al.: *JNK is involved in signal integration during costimulation of T lymphocytes*. *Cell*, 1994;77: 727-736
- [145] SU, TT. ; GUO, B. ; KAWAKAMI, Y. et al.: *PKC-beta controls I kappa B kinase lipid raft recruitment and activation in response to BCR signaling*. *Nat Immunol* 2002; 3: 780
- [146] SUN, Z. ; ARENDT, CW. ; SCHAEFFER, EM. et al.: *PKC-theta is required for TCR-induced NF-kappaB activation in mature but not immature T lymphocytes*. *Nature* 404(6776):402-7, 2000 Mar 23
- [147] TAKAI, Y. ; KISHIMOTO, A. ; INOUE, M. et al.: *Studies on a cyclic nucleotideindependent protein kinase and its proenzyme in mammalian tissues. Purification and characterization of an active enzyme from bovine cerebellum*. *J Biol Chem* 1977; 252: 7603–7609
- [148] TANER, T. ; HACKSTEIN, H. ; WANG, Z. et al.: *Rapamycin-treated, alloantigen-pulsed host dendritic cells induce Ag-specific T cell regulation and prolong graft survival*. *Am J Transplant* 5: 228-236, 2005
- [149] TEDESCO-SILVA, H. ; KHO, MM. ; HARTMANN, A. et al.: *Sotrotaurin in Calcineurin Inhibitor-Free Regimen Using Everolimus in De Novo Kidney Transplant Recipients*. *Am J Transplant*, 2013 May 9
- [150] TERASAKI, PI. ; CAI, J.: *Human leukocyte antigen antibodies and chronic rejection: from association to causation*. *Transplantation*, 2008 Aug 15;86(3):377-83
- [151] TERASAKI, PI. ; OZAWA, M.: *Predictive value of HLA antibodies and serum creatinine in chronic rejection: results of a 2-year prospective trial*. 2005 Nov 15;80(9):1194-7
- [152] TRUNEH, A. ; ALBERT, F. ; GOLSTEIN, P. et al.: *Early steps of lymphocyte activation bypassed by synergy between calcium ionophores and phorbol ester*. *Nature*, 1985 Jan 24-30;313(6000):318-20
- [153] TSENG, SY. ; OTSUJI, M. ; GORSKI, K. et al.: *B7-DC, a new DC molecule with potent costimulatory properties for T cells*. *J Exp Med* 193: 839-846, 2001

- [154] TSIEN, RY. ; POZZAN, T. ; RINK, TJ.: *T-cell mitogens cause early changes in cytoplasmic free Ca²⁺ and membrane potential in lymphocyte*. Nature, 1982 Jan 7;295(5844):68-71
- [155] USLU, A. ; NART, A.: *Treatment of first acute rejection episode: systematic review of level I evidence*. Transplant Proc, 2011 Apr;43(3):841-6
- [156] VAMPA, ML. ; NORMAN, PJ. ; BURNAPP, L. et al.: *Natural killer-cell activity after human renal transplantation in relation to killer immunoglobulin-like receptors and human leukocyte antigen mismatch*. Transplantation 2003; 76: 1220–1228
- [157] VANRENTERGHEM, Y. ; BRESNAHAN, B. ; CAMPISTOL, J. et al.: *Belatacept-based regimens are associated with improved cardiovascular and metabolic risk factors compared with cyclosporine in kidney transplant recipients (BENEFIT and BENEFIT-EXT studies)*. Transplantation, 2011 May 15;91(9):976-83
- [158] VINCENTI, F. ; ANDRES, A. de ; BECKER, T. et al.: *Interleukin-2 receptor antagonist induction in modern immunosuppression regimens for renal transplant recipients*. Transplant Int, 2006;19:446–457
- [159] VINCENTI, F. ; KIRKMAN, R. ; LIGHT, S. et al.: *Interleukin-2-receptor blockade with daclizumab to prevent acute rejection in renal transplantation (Daclizumab Triple Therapy Study Group)*. N Engl J Med 338 (3):161-165, 1998
- [160] VINCENTI, F. ; LARSEN, C. ; DURRBACH, A. et al.: *Costimulation blockade with belatacept in renal transplantation*. N Engl J Med, 2005 Aug 25;353(8):770-81
- [161] VINCENTI, F. ; LARSEN, CP. ; ALBERU, J. et al.: *Three-year outcomes from BENEFIT, a randomized, active-controlled, parallel-group study in adult kidneytransplant recipients*. Am J Transplant 12(1):210-7, 2012 Jan
- [162] VOLKOV, Y. ; LONG, A. ; MCGRATH, S. et al.: *Crucial importance of PKC-beta(I) in LFA-1-mediated locomotion of activated T cells* Nat Immunol. 2001 Jun;2(6):508-14
- [163] VU, MD. ; XIAO, X. ; GAO, W. et al.: *OX40 costimulation turns off Foxp3⁺ Tregs*. Blood 2007; 110:2501–2510
- [164] WAGNER, J. ; EVENOU, J-P. ; ZENKE, G. et al.: *The first-in-class oral protein kinase C (PKC) inhibitor NVP-AEB071 (AEB) prolongs renal allograft survival in non-human primates (NHP) and suppresses lymphocyte proliferation at safe exposures in human proof-of-concept studies*. Transplantation 2006; 82:86 (Abstract 57)
- [165] WAGNER, J. ; MATT, P. von ; SEDRANI, R. et al.: *Discovery of 3-(1H-indol-3-yl)-4-[2-(4-methylpiperazin-1-yl)quinazolin-4-yl]pyrrole-2, 5 -dione (AEB071), a potent and selective inhibitor of protein kinase C isotypes*. J Med Chem 2009; 52: 6193–6196

- [166] WAISER, J. ; BUDDE, K. ; SCHUTZ, M. et al.: *Comparison between bortezomib and rituximab in the treatment of antibody- mediated renal allograft rejection*. Nephrol Dial Transplant 2012; 27: 1246
- [167] WALDMANN, TA.: *The structure, function, and expression of interleukin-2 receptors on normal and malignant T-cells*. Science 1986;232:727–32
- [168] WATTS, TH.: *TNF/TNFR family members in costimulation of T cell responses*. Annu Rev Immunol, 2005;23:23-68
- [169] WECKBECKER, G. ; PALLY, C. ; BEERLI, C. et al.: *Effects of the novel protein kinase C inhibitor AEB071 (Sotrastaurin) on rat cardiac allograft survival using single agent treatment or combination therapy with cyclosporine, everolimus or FTY720*. Transpl Int, 2010 May 1;23(5):543-52
- [170] WOLFE, RA. ; ASHBY, WB. ; MILFORD, EL. et al.: *Comparison of mortality in all patients on dialysis, patients on dialysis awaiting transplantation and recipients of a first cadaveric transplant*. N Engl J Med 341: 1725–1730, 1999
- [171] WOODLE, ES. ; THISTLETHWAITE, JR. ; GORDON, JH. et al.: *A multicenter trial of FK506 (Tacrolimus) therapy in refractory acute renal allograft rejection*. A report of the Tacrolimus Kidney Transplantation Rescue Group, Transplantation 62(5):594-9, 1996
- [172] WOODWARD, JE. ; BAYER, AL. ; BALIGA, P.: *Enhanced allograft survival via simultaneous blockade of transferrin receptor and interleukin-2 receptor*. Transplantation, 1999 Nov 15;68(9):1369-76
- [173] WORK, Group. T.: *Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO clinical practice guideline for the care of kidney transplant recipients*. Am J Transplant 9 Suppl 3: p, S1-155
- [174] WU, X. ; LI, J. ; ZHU, M. et al.: *Protein kinase C inhibitor AEB071 targets ocular melanoma harboring GNAQ mutations via effects on the PKC/Erk1/2 and PKC/NF- κ B pathways*. Mol Cancer Ther, 2012 Sep;11(9):1905-14
- [175] YOSHINAGA, SK. ; WHORISKEY, JS. ; KHARE, SD. et al.: *T-cell co-stimulation through B7RP-1 and ICOS*. Nature 1999; 402 (6763):827–832
- [176] YOUNG, JW. ; STEINMAN, RM.: *The hematopoietic development of dendritic cells: a distinct pathway for myeloid differentiation*. Stem Cells, 1996 Jul;14(4):376-87
- [177] ZIEGLER, SF. ; RAMSDELL, F. ; MR. ; ALDERSON: *The activation antigen CD69*. Stem Cells 12, 456-465, 1994

8 Eidesstattliche Versicherung

Ich, Ulrike Agnes Weber, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Einfluss des Proteinkinase-C-Inhibitors Sotrastaurin auf humane T-Zellen“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet. Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer un- wahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.

Datum:

Unterschrift:

9 Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version der Arbeit nicht veröffentlicht.

10 Publikationen

Matz M, Fabritius K, Lorkowski C, Dürr M, Gaedeke J, Durek P, Grün JR, Goestemeyer A, Bachmann F, Wu K, Rudolph B, Schmidt D, **Weber U**, Haftmann C, Unterwalder N, Lachmann N, Radbruch A, Neumayer HH, Mashreghi MF, Budde K. Identification of T-cell-mediated vascular rejection after kidney transplantation by the combined measurement of 5 specific microRNAs in blood. *Transplantation*. 2015 Aug 24.(Epub ahead of print)

Matz M, Lehnert M, Lorkowski C, Fabritius K, **Weber UA**, Mashreghi MF, Neumayer HH, Budde K. Combined standard and novel immunosuppressive substances affect B-lymphocyte function. *Int Immunopharmacol*. 2013 Apr;15(4):718-25.

Matz M, Lehnert M, Lorkowski C, Fabritius K, Unterwalder N, Doueiri S, **Weber UA**, Mashreghi MF, Neumayer HH, Budde K. Effects of sotrastaurin, mycophenolic acid and everolimus on human B-lymphocyte function and activation. *Transpl Int*. 2012 Oct;25(10):1106-16.

Matz M, **Weber UA**, Mashreghi MF, Lorkowski C, Ladhoff J, Kramer S, Neumayer HH, Budde K. Effects of the new immunosuppressive agent AEB071 on human immune cells. *Nephrol Dial Transplant*. 2010 Jul;25(7):2159-67.

Matz M, **Weber UA**, Mashreghi MF, Ladhoff J, Kramer S, Neumayer HH, Budde K. Effects of the new immunosuppressive agent AEB071 on human immune cells in vitro. *Poster*. American Transplant Congress, San Diego, 2010 und European Congress of Immunology, Berlin, 2009

Weber UA, Matz M, Glander P, Nolting J, Neumayer HH, Budde K. Differences in IL-2 and TNF-alpha Expression in mitogen-stimulated whole blood of renal allograft recipients and healthy volunteers. *Poster*. American Transplant Congress, San Francisco, 2007 und Deutsche Transplantationsgesellschaft Jahrestagung, Mainz, 2007

Mareen M, **Weber UA**, Kramer S, Glander P, Neumayer HH, Budde K. Effects of the new immunosuppressive agent AEB071 on T-cell activation in vitro. *Poster*. American Transplant Congress, San Francisco, 2007

11 Danksagung

Herrn Professor Dr. med. Klemens Budde danke ich für Möglichkeit, an diesem interessanten Thema zu arbeiten. Seine fachliche und persönliche Betreuung sowie kontinuierliche Unterstützung waren mir eine große Hilfe.

Mein besonderer Dank gilt Dr. rer. medic. Mareen Matz, die mir bei allen praktischen und theoretischen Fragen stets zur Seite stand. Ihre Motivation und Unterstützung ermöglichten mir die Fertigstellung der Dissertation.

Christine Lorkowski und Dipl.-Ing. Jochen Nolting danke ich für die Anleitung im Labor und die kollegiale Zusammenarbeit.

Meinem Mann Jan Nabbefeld danke ich, dass er mir bei diesem Langzeit-Projekt und insbesondere bei der technischen Umsetzung tapfer zur Seite stand.

Meinen Söhnen Jurek, Arthur und Wilhelm danke ich für die vielen fröhlichen Nachfragen nach dem Fortgang der Dissertation.

Meiner Mutter Renate Weber danke ich für ihre uneingeschränkte Unterstützung, ohne deren Hilfe ich unter anderem diese Dissertation nicht hätte beenden können. Ihr ist diese Arbeit gewidmet.