

Aus der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Nephrologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Pharmakodynamisches Monitoring immunsuppressiver
Therapie nach Nierentransplantation

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Niels Gauer

aus Regensburg

Datum der Promotion: 22.06.2014

Inhaltsverzeichnis

1.	ABSTRACT	6
2.	ZUSAMMENFASSUNG	8
3.	EINLEITUNG	10
3.1.	Die Nierentransplantation als Therapie der terminalen Niereninsuffizienz	10
3.2.	Immunologische Barrieren der Nierentransplantation	10
3.3.	Mechanismen der Immunsuppression	14
3.4.	Fortschritte in der Transplantationsmedizin	16
3.5.	Das Problem des Langzeitüberlebens	18
3.5.1.	Die chronische Transplantatdysfunktion	18
3.5.2.	Die kardiovaskuläre Mortalität	20
3.5.3.	Infektionen und Neoplasien	20
3.6.	Strategien zur Verbesserung des Langzeitüberlebens	21
3.6.1.	Toleranzinduktion	21
3.6.2.	Individualisierung der Immunsuppression	22
3.7.	Therapeutic Drug Monitoring: Pharmakokinetik	22
3.8.	Therapeutic Drug Monitoring: Pharmakodynamik	23
3.8.1.	Spezifische pharmakodynamische Biomarker	23
3.8.2.	Unspezifische Pharmakodynamische Biomarker	24
4.	FRAGESTELLUNG	28
5.	PATIENTEN, MATERIAL UND METHODEN	30
5.1.	Patienten	30
5.1.1.	Studienaufbau	30
5.1.2.	Ein- und Ausschlusskriterien	31
5.2.	Materialien	32
5.2.1.	Reagenzien	32
5.2.1.1.	Antikörper	32
5.2.1.2.	Stimulantien	32

5.2.1.3.	Enzyme -----	33
5.2.1.4.	Zellkulturmedien und Zusätze -----	33
5.2.1.5.	Chemikalien -----	33
5.2.2.	Geräte-----	34
5.2.3.	Software -----	34
5.3.	Methoden-----	35
5.3.1.	Gewinnung der Proben -----	35
5.3.2.	Chromatographische Bestimmung der Enzymaktivität der IMPDH-----	35
5.3.2.1.	HPLC -----	35
5.3.2.2.	Der IMPDH-Assay -----	36
5.3.3.	Durchflusszytometrische Assays-----	37
5.3.3.1.	FACS-----	37
5.3.3.2.	Prinzip und Aufbau der Assays-----	38
5.3.3.3.	Der Zytokinassay-----	39
5.3.3.4.	Der Oberflächenmarker-Assay -----	40
5.3.3.5.	Der Proliferationsassay -----	41
5.3.4.	Statistische Auswertung -----	43
5.3.5.	Modellierung von Kennzahlen zur Beschreibung der Immunsuppression -----	43
6.	ERGEBNISSE -----	47
6.1.	Demographische Daten -----	47
6.2.	Pharmakokinetik -----	49
6.3.	Pharmakokinetik und Pharmakodynamik-----	52
6.3.1.	Der Zusammenhang zwischen Dosis und Talspiegel von Cyclosporin A und den pharmakodynamischen Parametern -----	52
6.3.2.	Der Zusammenhang zwischen Dosis und Talspiegel von Everolimus und den pharmakodynamischen Parametern -----	54
6.3.3.	Der Zusammenhang zwischen EC-MPS Dosis und MPA-Talspiegel und den pharmakodynamischen Parametern -----	55
6.3.4.	Methylprednisolon und die pharmakodynamischen Parameter -----	56
6.4.	Die Korrelationen unter den pharmakodynamischen Parametern -----	58

6.5.	Die Beschreibung der immunsuppressiven Therapie durch die gemessenen Parameter bis zum Zeitpunkt der Randomisierung -----	59
6.5.1.	Die Ausgangswerte der untersuchten Parameter vor der Transplantation -----	59
6.5.2.	Enzymaktivität: IMPDH -----	61
6.5.3.	Proliferationsrate -----	62
6.5.4.	Oberflächenmarkerexpression: CD25 und CD71 -----	63
6.5.5.	Zytokinsynthese: IL 2 und TNF- α -----	66
6.6.	Unterschiede im Verhalten der Biomarker nach der Randomisierung -----	68
6.6.1.	Hemmung der Enzymaktivität: IMPDH -----	68
6.6.2.	Proliferationsrate -----	69
6.6.3.	Oberflächenmarker: CD25 und CD71 -----	70
6.6.4.	Zytokinsynthese: IL-2 und TNF- α -----	72
6.7.	Vergleich der Immunsuppression zwischen den Studienarmen vor und nach der Randomisierung -----	74
6.8.	Der Zusammenhang zwischen der Expression der Biomarker und dem Auftreten von Rejektionen und Infektionen-----	78
6.8.1.	Der Zusammenhang zwischen der IMPDH-Aktivität vor der Transplantation und der Notwendigkeit vorzeitiger Dosisreduktionen von EC-MPS-----	82
6.8.2.	Der Zusammenhang zwischen der Ausgangsaktivität der untersuchten Parameter vor der Transplantation und dem Auftreten klinischer Ereignisse -----	84
6.8.3.	Der Zusammenhang zwischen der maximalen Suppression der untersuchten Parameter und dem Auftreten klinischer Ereignisse-----	87
6.8.4.	Der Zusammenhang zwischen der kumulierten Restaktivität (AUE) der untersuchten Parameter und dem Auftreten klinischer Ereignisse -----	90
6.8.5.	Der Zusammenhang zwischen der kumulierten Suppression (AAC) der untersuchten Parameter und dem Auftreten klinischer Ereignisse -----	94
6.8.6.	Die pharmakodynamischen Parameter während des Auftretens klinischer Ereignisse -----	97
6.9.	Multivariate Varianzanalyse und ROC-Analyse -----	104
7.	DISKUSSION -----	106
7.1.	Die verwendeten Assays -----	106
7.1.1.	Die FACS-Assays-----	106
7.1.2.	Der HPLC-Assay-----	108
7.2.	Pharmakokinetik und Pharmakodynamik-----	109
7.3.	Die Ausgangswerte vor Transplantation -----	113

7.4.	Die Beschreibung der immunsuppressiven Therapie durch die gemessenen Parameter bis zum Zeitpunkt der Randomisierung -----	116
7.5.	Die Beschreibung der immunsuppressiven Therapie durch die gemessenen Parameter nach der Randomisierung -----	121
7.6.	Der Zusammenhang zwischen der Expression der Biomarker und dem Auftreten von Rejektionen und Infektionen -----	125
7.7.	Limitationen der vorliegenden Arbeit -----	130
8.	LITERATURVERZEICHNIS -----	132
9.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS -----	147
10.	TABELLENVERZEICHNIS -----	149
11.	ABBILDUNGSVERZEICHNIS -----	150
12.	DANKSAGUNG -----	152
13.	LEBENS LAUF -----	153
14.	SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG -----	154

1. *Abstract*

Background: The individualization of immunosuppressive therapy to avoid the risks of over- and under-immunosuppression is an important goal in transplantation. Too little immunosuppression entails the risk of acute or chronic rejection of the transplant, over-immunosuppression may lead to infection, malignancy and substance-specific toxicity. To avoid these risks, the development of a therapeutic window for immunosuppressive agents and combination regimes is required. So far, therapeutic drug monitoring has been used to keep drug levels within the recommended range. Yet, pharmacokinetics can only tell “what the body does to the drug, not what the drug does to the body”. Hence pharmacodynamic biomarkers have been developed as surrogate markers for the biological effects of immunosuppression.

Methods: In 86 de novo renal transplant patients, who were initially treated with Cyclosporin, mycophenolic acid, steroids and Basiliximab, the proliferation of T-cells, their expression of surface markers CD25 and CD71 and their expression of intracellular IL-2 and TNF- α as markers of immunosuppression were determined by FACS over the first year after renal transplantation. Simultaneously the activity of the inosine monophosphate dehydrogenase (IMPDH) as a specific marker of the action of the immunosuppressant mycophenolate was measured by HPLC. After 4,5 months, patients were randomized to continue on Cyclosporin or receive Everolimus instead. Biologic effects of both therapies were compared. The relationship of biomarkers and clinical outcomes with respect to infection and rejection was of particular interest.

Results: All pharmacodynamic parameters showed the extent of immunosuppression after renal transplantation. Most pronounced was the suppression of the ability of T-cells to proliferate after stimulation. Decrease in CD25-expression in the first month after basiliximab was more pronounced than decrease in CD71-expression. Least pronounced was the suppression of intracellular cytokine-expression and IMPDH-activity. Whereas IMPDH-activity decreased over time, all other parameters increased over time again, yet failed to reach the pretransplant values. After conversion to Everolimus, IMPDH-activity decreased further. The ability to proliferate and the expression of CD71 were significantly lower in the Everolimus group whereas cytokine-synthesis tended to be higher. There was no direct relationship between pretransplant expression of biomarkers and clinical outcomes. Patients that required a mycophenolate dose reduction had more infections. Early dose reductions were associated with a lower pretransplant IMPDH-activity. The relationship between clinical outcomes and the calculated parameters of biomarker activity was ambiguous. For the “area under the pharmacodynamic ef-

fect time curve” in the first 225 days posttransplant (AUE₂₂₅) of IL-2-synthesis we identified a cut-off-value of 27% CD3+IL-2+ , which had a sensitivity of 80% and a specificity of 75% for the diagnosis of acute rejection.

Conclusion: The studied biomarkers provide new insights into the molecular action of immunosuppressant agents and their use in combination therapy.

The determination of the IMPDH-activity may help to assess the effect of mycophenolate in an immunosuppressive combination therapy with cyclosporine and everolimus.

The relationship between the biomarkers and the clinical outcomes of rejection and infection are less clear.

More research is needed to establish reliable biomarkers to guide an individualized immunosuppressive therapy.

2. Zusammenfassung

Hintergrund: Die Entwicklung individualisierter Therapieregimes ist ein wichtiges Ziel der Transplantationsmedizin, um die Risiken einer zu starken oder zu schwachen Immunsuppression zu vermeiden. Eine zu geringe Immunsuppression birgt das Risiko einer akuten oder chronischen Abstoßung des Transplantats, eine zu starke Immunsuppression kann zur Entwicklung von Infektionserkrankungen und Malignomen führen. Zudem gilt es, die substanzspezifischen toxischen Effekte der Immunsuppressiva zu vermeiden. Deshalb ist die Etablierung eines therapeutischen Fensters für die einzelnen Immunsuppressiva und ihre Kombinationen notwendig. Bislang sind pharmakokinetische Verfahren angewendet worden, um die Spiegel der immunsuppressiven Medikamente in den empfohlenen Zielbereichen zu halten. Diese Verfahren geben aber nur Auskunft über die Verstoffwechslung der Medikamente, nicht jedoch über ihre biologische Wirkung. Als Surrogatparameter für die biologische Wirkung sind deshalb pharmakodynamische Biomarker entwickelt worden.

Methoden: Bei 86 neu nierentransplantierten Patienten, die initial mit einer Kombinationstherapie aus Cyclosporin, Mycophenolsäure, Steroiden und Basiliximab behandelt wurden, wurden die Proliferationsrate, die Expression der Oberflächenmarker CD25 und CD71 sowie der intrazelluläre Gehalt an IL-2 und TNF- α mittels FACS im Verlauf nach Transplantation bestimmt und mit dem Wert direkt vor Transplantation verglichen. Zudem wurde als spezifischer Marker für die Wirkung der Mycophenolsäure die Aktivität der Inosinmonophosphatdehydrogenase (IMPDH) mit HPLC gemessen. Nach 4,5 Monaten wurden die Patienten in einen Cyclosporin- und einen Everolimusarm randomisiert und die biologischen Effekte der beiden Medikamente verglichen. Von besonderem Interesse war die Untersuchung einer Beziehung der Biomarker zu den klinischen Endpunkten Abstoßung und Infektion.

Ergebnisse: Alle pharmakodynamischen Parameter bilden das Ausmaß der Immunsuppression nach der Nierentransplantation ab. Am stärksten ausgeprägt war die Unterdrückung der Fähigkeit der T-Zellen, nach Stimulation zu proliferieren. Die Expression von CD25 war im ersten Monat nach Basiliximab-Gabe stärker unterdrückt, als die Expression von CD71. Die Unterdrückung der IMPDH-Aktivität und der intrazellulären Zytokinexpression war zu den untersuchten Zeitpunkten weniger stark ausgeprägt. Die Unterdrückung der IMPDH-Aktivität nahm im Zeitablauf zu, alle anderen Parameter stiegen im Verlauf wieder an, ohne jedoch das Vortransplantationsniveau wieder zu erreichen. Nach der Umstellung auf Everolimus sank die IMPDH-Aktivität weiter ab. Die Proliferationsrate und die CD71-Expression waren in

der Everolimusgruppe signifikant niedriger, die intrazelluläre Zytokinsynthese war hingegen tendentiell stärker ausgeprägt. Ein direkter Zusammenhang zwischen den Vortransplantationswerten der Biomarker und klinischen Endpunkten konnte nicht nachgewiesen werden. Patienten, bei denen eine Dosisreduktion von Mycophenolsäure notwendig war, litten häufiger unter Infektionserkrankungen. Frühe Dosisreduktionen waren mit niedrigeren IMPDH Werten vor der Transplantation assoziiert. Der Zusammenhang zwischen den klinischen Endpunkten und den berechneten Parametern war nicht eindeutig. Für die *“area under the pharmacodynamic effect time curve”* in den ersten 225 Tagen nach Transplantation (AUE₂₂₅) der IL-2-Synthese konnte bei einem cut-off-Wert von 27% CD3⁺IL-2⁺ eine akute Abstoßung mit einer Sensitivität von 80% und einer Spezifität von 75% identifiziert werden.

Schlussfolgerung: Die untersuchten Biomarker erlauben neue Erkenntnisse zu den molekularen Wirkmechanismen der einzelnen Immunsuppressiva und ihres Einsatzes in einer Kombinationstherapie. Die Bestimmung der IMPDH-Aktivität kann bei der Abschätzung der Wirkung der Mycophenolsäure in einer immunsuppressiven Kombinationstherapie mit Cyclosporin oder Everolimus hilfreich sein. Der Zusammenhang zwischen den Biomarkern und den klinischen Endpunkten Abstoßung und Infektionserkrankung ist nicht eindeutig. Um eine individualisierte immunsuppressive Therapie anhand von Biomarkern verlässlich steuern zu können, bedarf es weiterer Studien.

3. Einleitung

3.1. Die Nierentransplantation als Therapie der terminalen Niereninsuffizienz

Die terminale Niereninsuffizienz ist eine Erkrankung mit stetig steigender Prävalenz und Inzidenz. Dazu tragen vor allem die zunehmende Lebenserwartung sowie die steigende Inzidenz des Diabetes mellitus und der vaskulären Nephropathien bei. Patienten mit einer terminalen Niereninsuffizienz (K/DOQI Stadium V mit einer glomerulären Filtrationsrate von weniger als 15 ml/min) müssen zwingend mit einer chronischen Nierenersatztherapie behandelt werden. Waren im Jahre 1995 in Deutschland noch 54.656 Patienten auf eine chronische Nierenersatztherapie angewiesen, stieg die Anzahl bis 2006 auf den Wert von 91.718 Patienten an (1).

Während die Hämodialyseverfahren von 41.350 um etwa 50 Prozent auf 66.508 anstiegen, verdoppelte sich die Anzahl der Patienten in Transplantationsnachsorge im gleichen Zeitraum sogar annähernd von 13.306 auf 25.110, obwohl die Zahl der jährlichen Transplantationen nur von 2.128 auf 2.776 gesteigert werden konnte (1). Seit 2006 stagnierte Ihre Anzahl bei Werten knapp unter 3.000 Transplantationen pro Jahr, der Höchststand von 2937 Transplantationen wurde 2010 erreicht, im Jahre 2011 wurden 2850 Transplantationen durchgeführt (2).

Ein wesentlicher Anteil der Steigerung entfiel dabei auf die vermehrte Durchführung von Lebendspenden, die im Jahre 2011 bereits 27,9 Prozent aller Transplantationen ausmachten (2), wohingegen die Zahl der Transplantationen verstorbener Spender trotz Einführung eines eigenen Eurotransplant-Senior-Programmes mit erweiterten Spenderkriterien nicht ausgeweitet werden konnte (3). Deshalb betrug die Zeit auf der Warteliste für ein Nierentransplantat im Jahr 2011 über 40 Monate (2).

Der sich in diesen Zahlen widerspiegelnde zunehmende Bedarf für Nierentransplantationen gründet auf der Tatsache, dass die Transplantation ein halbes Jahrhundert nach ihrer Einführung in die klinische Praxis unbestritten die beste Therapie der chronischen Niereninsuffizienz ist: Sowohl die Überlebenszeit als auch die Lebensqualität der Patienten werden im Vergleich zu den alternativen Dialyseverfahren durch eine Transplantation deutlich gesteigert (4).

3.2. Immunologische Barrieren der Nierentransplantation

Der Erfolg einer Nierentransplantation als einer Verpflanzung allogenen, d.h. genetisch nicht identischen Gewebes, hängt von der Überwindung der immunologischen Abwehr des Empfängers ab. Gelingt diese nicht, wird das Transplantat durch die Abwehr des Empfängers zerstört.

Entscheidend für die Abstoßungsreaktion sind dabei die Mechanismen der spezifischen, adaptiven Immunität, vorbereitet und verstärkt werden sie jedoch durch die Aktivierung des unspezifischen, angeborenen Immunsystems. Über die Rezeptoren des unspezifischen Immunsystems, die *pathogen-associated pattern recognition receptors* (PRRs) können Botenstoffe (*damage-associated molecular patterns*, DAMPs) erkannt werden, welche durch Schäden am Transplantat entstehen, etwa durch den Tod des Spenders (bei postmortaler Organspende), das chirurgische Trauma oder die Ischämie und Reperfusion des Organs. Durch die Aktivierung der PRRs durch die DAMPs wird eine Entzündungsreaktion ausgelöst, die wesentlich zur Aktivierung des adaptiven Immunsystems beiträgt. Durch die unspezifische Immunreaktion alleine kann das Transplantat in der Regel nicht abgestoßen werden, aber je stärker das Transplantat vorgeschädigt ist, desto höher fällt die immunologische Barriere aus, die zu überwinden ist, um ein Überleben des Transplantates sicherzustellen (5).

Grundlage der adaptiven Immunreaktion ist die Identifizierung des Transplantates als körperfremd (*allorecognition*) durch die Lymphozyten des Empfängers anhand der auf dem MHC (*major histocompatibility complex*) codierten *human leukocyte antigens* (HLA), aber auch weiterer *minor histocompatibility antigens* (6).

Werden potente Alloantigene wie die MHC-Moleküle oder die ABO-Blutgruppenantigene durch präformierte Antikörper des Empfängers erkannt, folgt als unmittelbare immunologische Antwort (*alloresponse*) eine hyperakute Abstoßung. Dies kann nach vorhergehender Sensibilisierung des Empfängers geschehen – etwa durch eine Bluttransfusion oder eine Schwangerschaft – in etwa 1% der Bevölkerung jedoch auch ohne erkennbaren Grund (7). Die Antikörper binden an die Endothelzellen des Transplantats und lösen die klassische Komplementkaskade aus, ein unmittelbarer Transplantatverlust durch thrombotische Komplikationen ist die Folge (8). Hyperakute Abstoßungen können inzwischen durch serologische Untersuchungen vor der Transplantation in der Regel vermieden werden (9).

Antikörper gegen das Transplantat können allerdings auch nach der Transplantation durch B-Zellen des Empfängers gebildet werden und akute Abstoßungsreaktionen auslösen oder zu ihnen beitragen. Zur *de-novo*-Antikörpersynthese gegen die MHC-Antigene des Spenders bedarf es jedoch einer vollständigen Aktivierung der B- und T-Zellen des Empfängers (8).

Gegenwärtig geht man davon aus, dass naive T-Zellen zur vollständigen Aktivierung gleichzeitig drei verschiedene Signale erhalten müssen. Ist dies nicht der Fall, sind Anergie oder sogar Apoptose die Folge. Eine vollständige Aktivierung ist nur durch den Kontakt der T-Zelle zu einer professionellen antigenpräsentierenden Zelle (APC) möglich, in der Regel einer dendritischen Zelle (10).

Eine deutlich niedrigere Aktivierungsschwelle weisen *Memory*-Zellen auf, deren Anteil unter den T-Zellen mit zunehmendem Alter zunimmt und bei Erwachsenen sogar die Mehrzahl der T-Zellen ausmachen kann. Durch Kreuzreaktivität kann ein Teil dieser *Memory*-T-Zellen auch gegen das Transplantat aktivierbar sein (11).

Bildet sich nach der initialen Bindung von Adhäsionsmolekülen zwischen APC und T-Zelle die immunologische Synapse aus, kann das erste Signal durch die Interaktion der antigenpräsentierenden MHC-Moleküle der APC mit dem T-Zell-Rezeptor (TCR) gegeben werden (12).

Zusätzlich liefert die APC über costimulatorische Moleküle das zweite Signal. Nun können eine Reihe von intrazellulären Signalkaskaden ausgelöst werden, die schließlich zur Aktivierung der Phosphatase Calcineurin führen, welche die Freisetzung von Transkriptionsfaktoren wie NFAT auslöst, die in den Kern dislozieren, dort unter anderem an das IL-2-Gen binden und die Synthese dieses Zytokins, der hochaffinen α -Kette seines Rezeptors (CD25) und einer ganzen Reihe weiterer wichtiger Moleküle auslösen (13).

Wachstumsfaktoren und Zytokine wie IL-2 geben auto- und parakrin das dritte Signal, welches über weitere intrazelluläre Signalkaskaden schließlich den mTOR-*pathway* erreicht und somit den Eintritt in den Zellzyklus und die Proliferation der T-Zellen ermöglicht (5).

In der frühen Phase nach der Transplantation aktivieren vor allem die im Transplantat verbliebenen APC des Spenders die Empfängerlymphozyten, insbesondere in die sekundären lymphatischen Gewebe des Empfängers ausgewanderte dendritische Zellen (*direct pathway of allorecognition*) (7). Begünstigt wird die Migration der APC des Spenders durch die initiale Immunantwort der unspezifischen Abwehr (14). Gegenüber den auf diese Weise präsentierten Alloantigenen sind sehr viel mehr Lymphozyten des Empfängers reaktiv, als etwa gegen virale oder bakterielle Antigene, so dass eine sehr starke Immunantwort induziert werden kann (15). Dies erklärt die Dynamik und Vehemenz einer frühen akuten Abstoßungsreaktion (8).

Im Laufe der Zeit nimmt die Zahl der verbliebenen professionellen APC des Spenders ab. Intakte MHC-Moleküle des Spenders können jedoch auch von APC des Empfängers aufgenommen und präsentiert werden (*semidirect allorecognition*).

Langfristig spielt die entscheidende Rolle jedoch die Präsentation von allogenen Peptiden über die eigenen MHC-Moleküle der APC des Empfängers (*indirect allorecognition*) nach Aufbereitung der MHC-Moleküle des Spenders und weiterer „*minor histocompatibility antigens*“ (16). Späte Abstoßungsreaktionen werden über den indirekten *pathway of allorecognition* vermittelt. Sie sind aufgrund der geringeren Anzahl der über diesen *pathway* aktivierbaren T-Zellen weniger dynamisch als frühe Rejektionen (8).

Nach erfolgter *allorecognition* und T-Zell-Aktivierung erfolgt die Bereitstellung der Effektor-mechanismen der Immunantwort, der *alloresponse*. Dabei kommt es im lymphatischen Gewebe des Transplantatempfängers zunächst zur Differenzierung der T-Zellen sowie zur klonalen Expansion. In den letzten Jahren konnten zahlreiche Subgruppen der CD4⁺-Helferzellen und der CD8⁺-zytotoxischen Zellen identifiziert und ihre Beteiligung an der Abstoßungsreaktion nachgewiesen werden. Auch geht man inzwischen von einer regelhaften Beteiligung von B-Zellen an akuten und vor allem chronischen Abstoßungsreaktionen aus. Weiterhin werden Elemente des angeborenen Immunsystems wie NK-Zellen, Makrophagen, Neutrophile sowie das Komplementsystem miteinbezogen. Durch die Erzeugung eines Chemokingradienten und die Hochregulation der Expression von Adhäsionsmolekülen wird die Rekrutierung der Effektorzellen in das Transplantat sichergestellt (5).

Im Rahmen einer akuten T-Zell-basierten Abstoßungsreaktion (TCMR) entsteht das histologische Bild einer interstitiellen Infiltration mit Tubulitis, teilweise tritt zudem eine Vaskulitis auf (17). Nach der aktuellen Banff-Klassifikation für die histologische Einstufung von Abstoßungsreaktionen in Transplantatbiopsien werden nach Schweregraden die Typen I (interstitielle Infiltration mit Tubulitis), II (Arteritis der Intima) und III (transmurale Arteritis, Nekrose der glatten Muskulatur) unterschieden. Zudem werden grenzwertige Veränderungen (*borderline changes*) als eigene Kategorie aufgeführt. Dabei handelt es sich um histologische Veränderungen, die auf eine T-Zell-getragene Abstoßung hinweisen (interstitielle Infiltration mit Tubulitis), aber noch nicht den Schweregrad der akuten Abstoßung Typ I erreichen (18).

Antikörperbasierte Abstoßungen (ABMR) werden nach Läsionsart in drei Kategorien eingeteilt (tubuläre Entzündung, Schädigung der kapillären und oder glomerulären Mikrozirkulation und arterielle Entzündung), ein Nachweis des Komplementspaltprodukts C4d wird zur Diagnosestellung nicht mehr gefordert, sind jedoch ein wichtiges prognostisches Kriterium (19).

Klinisch manifestieren sich Abstoßungsreaktionen in zunehmendem Transplantatversagen mit Reduktion der GFR und Anstieg der Retentionsparameter (20). Frühe akute Abstoßungen treten fünf Tage bis drei Monate nach der Transplantation auf, spätere akute Abstoßungen sind jedoch möglich, in der Regel als Ausdruck einer zu geringen Immunsuppression, sei es iatrogen bedingt, oder durch eine geringe Therapieadhärenz des Patienten (8). Späte akute Abstoßungen sind oft schwerwiegend und dann, vor allem bei humoraler Beteiligung, mit einem endgültigen Transplantatversagen assoziiert (21).

Langsamere und schwächere, jedoch auch auf einer immunologischen Antwort beruhende chronische Abstoßungsprozesse werden ebenfalls beobachtet. Wurde eine chronische Abstoßung früher vor allem als T-Zell-getragener Prozess angesehen, wird aktuell die Kausalität einer anti-

körperbasierten Immunantwort postuliert (22). Auch wenn der genaue Pathomechanismus und die Zuordnung histologisch nachweisbarer Läsionen zu immunologischen Prozessen oder nicht-immunologischen Schädigungen noch umstritten ist, erscheint eine wesentliche Rolle der anti-körperbasierten chronischen Abstoßung bei der Entstehung der chronischen Transplantatdysfunktion, insbesondere der schweren, zu einem Transplantatverlust führenden Form, gesichert zu sein (21).

3.3. *Mechanismen der Immunsuppression*

Bis heute die wichtigsten, wenn auch aufgrund ihrer Nebenwirkungen zunehmend umstrittenen immunsuppressiven Medikamente sind die Calcineurininhibitoren (CNI) Tacrolimus und Cyclosporin A. Nach erfolgter Lymphozytenaktivierung über den B- oder T-Zell-Rezeptor wird das Signal über den Calcium-Calcineurin-*pathway* weitergeleitet, was schließlich zu einer Dephosphorylierung des Transkriptionsfaktors NFAT durch das Schlüsselenzym Calcineurin führt. Binden Komplexe aus Cyclosporin A und Cyclophilin oder aus Tacrolimus/FK506 und FK-binding-protein-12 (FKBP12) an Calcineurin, wird die Lymphozytenaktivierung unterbunden (23). Cyclosporin A und Tacrolimus sind unter den bislang bekannten Immunsuppressiva die effektivsten, insbesondere in der Unterdrückung der T-Zell-Aktivierung (24).

Ebenso häufig wie die CNI und als deren bevorzugte Kombinationspartner werden die Proliferationshemmer eingesetzt. Der Purin-Antimetabolit Azathioprin behindert die DNA-Synthese, ist aber aufgrund seiner geringen Selektivität mit einer hohen Toxizität behaftet und wurde in den meisten Protokollen durch die Mycophenolsäurederivate ersetzt (10). Die Mycophenolsäure hemmt die von den Lymphozyten zur Neubildung von DNA benötigte *de novo*-Purinsynthese durch Blockade des Enzyms IMPDH und ist, da andere Zellarten den Wiederverwertungsstoffwechsel nutzen können, weniger toxisch als Azathioprin (25).

Leflunomid behindert als Hemmer des Enzyms Dihydroorotat-Dehydrogenase die Pyrimidin- und damit ebenfalls die DNA-Synthese. In der Transplantationsmedizin spielt es wegen seiner antiviralen Wirkung lediglich bei CMV- oder BK-Virus-Infektionen als Substitut für die anderen Proliferationshemmer eine Rolle (26).

Ebenfalls häufig im Rahmen einer Kombinationstherapie eingesetzt – in den letzten Jahren vermehrt anstelle der CNI – werden die mTOR-Inhibitoren Sirolimus/Rapamycin und Everolimus. Beide binden wie Tacrolimus an das FKBP12, der Komplex blockiert jedoch die Aktivität eines anderen Enzyms, des *mammalian Target of Rapamycin* (mTOR). Dieses ist nach Eingang des Signals 3 notwendig, um den Eintritt der Zelle in den Zellzyklus und damit ihre Proliferation zu

ermöglichen (27). Die mTOR-Inhibitoren sind die ersten Immunsuppressiva mit antineoplastischen Eigenschaften (28).

Seit langem bekannt sind die immunsuppressiven Eigenschaften der Steroide. Die molekularen Mechanismen sind komplex, die Hemmung der Lymphozytenaktivierung kann jedoch im Wesentlichen durch eine Hemmung der über den Glukokortikoidrezeptor vermittelten Unterdrückung der Expression der Transskriptionsfaktoren NF κ B und AP-1 erklärt werden (29). Nahezu alle immunsuppressiven Protokolle nach Nierentransplantation beinhalten Steroide; erst in den letzten Jahren führten ihre Nebenwirkungen zu einem verstärkten Interesse an steroidfreien Regimes (30).

Der unlängst für die Kombinationstherapie nach Nierentransplantation zugelassene, nicht depletierende Antikörper Belatacept bindet an CD28 und verhindert als Costimulationsinhibitor das Signal 2 der Lymphozytenaktivierung (31).

IL-2-Rezeptor-Antagonisten wie Basiliximab werden häufig im Rahmen einer Induktionstherapie eingesetzt. Das Ziel dieser nicht depletierenden Antikörper ist es, durch Bindung an CD25 das Signal 3 der Lymphozytenaktivierung zu verhindern (32).

Ebenfalls zur Induktionstherapie oder zur Behandlung akuter Rejektionsepisoden werden die depletierenden Antikörper eingesetzt. Sie führen zur direkten, antikörpervermittelten Zerstörung von Zellen des Immunsystems. Polyklonale Antikörperpräparate wie Antithymozytenglobulin (ATG) oder Thymoglobulin binden dazu an eine Vielzahl verschiedener Oberflächenstrukturen von Lymphozyten. Die monoklonalen Antikörper Muromonab/OKT3 und Alemtuzumab/Campath-1H richten sich spezifisch gegen den TCR (CD3), bzw. gegen CD52, welches von den meisten mononukleären Zellen ausgeprägt wird (33).

Rituximab ist ein B-Zell-depletierender Antikörper, der mit CD20 interagiert und im Rahmen der Transplantationsvorbereitung bei Blutgruppeninkompatibilität sowie in der Therapie antikörpervermittelter Abstoßungen eingesetzt wird (34). Eculizumab ist ein Antikörper, welcher zur Therapie der paroxysmalen nächtlichen Hämoglobinurie zugelassen ist. Er bindet den Komplementfaktor C5 und verhindert somit die komplementvermittelte Zytolyse. Experimentell erfolgte ebenfalls bereits der Einsatz bei antikörpervermittelten Rejektionen (35). Bortezomib ist ein Proteasomeninhibitor, der bei Zellen mit hoher Proteinsyntheserate wie Plasmazellen Apoptose auslösen kann. Das zur Therapie des multiplen Myeloms zugelassene Medikament wird experimentell zur Therapie von antikörpervermittelten akuten Abstoßungen eingesetzt (35). Im Prozess der klinischen Zulassung befindet sich der JAK-Inhibitor Tofacitinib, der die Weiterleitung des über CD25 vermittelten Signal 3 über den Jak-STAT-*pathway* verhindert und von dem erwartet wird, dass er eine therapeutische Alternative zu den CNI darstellen könnte (36).

Um eine Abstoßungsreaktion initiieren zu können, müssen T-Lymphozyten durch drei Signale vollständig aktiviert werden: Das erste Signal wird gegeben, indem der T-Zell-Rezeptor auf MHC II-Molekülen dargebotenes Antigen erkennt. Die Interaktion verschiedener Oberflächenmoleküle auf APC und Lymphozyt stellt das zweite Signal dar. Das dritte Signal bildet schließlich die Stimulation der T-Zelle durch Zytokine wie IL-2. Diese und weitere zur Proliferation und Reifung notwendige Genprodukte können nur synthetisiert werden, wenn bestimmte Transkriptionsfaktoren in den Zellkern gelangen. Dazu bedarf es der Tätigkeit von Enzymen wie Calcineurin oder IKK, welche durch Inhibitoren gehemmt werden können. Die Mycophenolsäure und Everolimus blockieren die Tätigkeit der Enzyme IMPDH und mTOR, welche zur Proliferation notwendige Nucleotide bereitstellen, bzw. verschiedene wichtige Funktionen, u.a. bei der Einleitung des Zellzyklus, wahrnehmen.

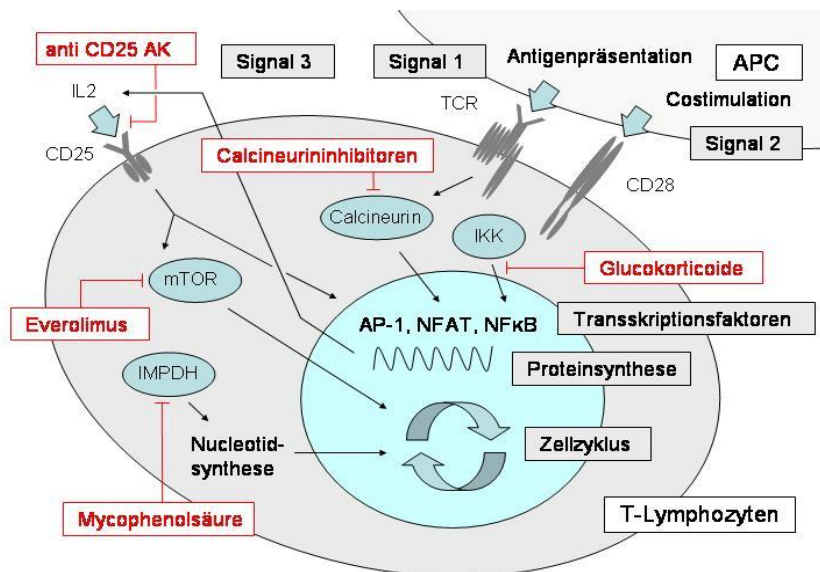


Abbildung 1: Immunsuppressiva der Zeus-Studie

3.4. Fortschritte in der Transplantationsmedizin

Um den gegenwärtig erreichten therapeutischen Nutzen einer Nierentransplantation erzielen zu können, bedurfte es eines erheblichen Fortschrittes in der Transplantationsmedizin. Neben der Verbesserung der Operationstechniken und des perioperativen Managements trugen vor allem das kontinuierlich zunehmende Verständnis der immunologischen Vorgänge und die damit in engem Zusammenhang stehende Entwicklung neuer immunsuppressiver Strategien zu diesem inzwischen 60 Jahre andauernden Prozess bei.

Um nur eine möglichst schwache immunologische Reaktion des Empfängers auf das Transplantat zu provozieren, werden seit den 60er Jahren Spender und Empfänger mit möglichst geringen immunologischen Unterschieden (*HLA-matching*) einander zugeordnet. Zur optimalen Allokation der Organe wurde 1967 Eurotransplant gegründet, 1977 folgte auch in den USA ein Transplantationsnetzwerk, aus dem sich das *United Network for Organ sharing* (UNOS) entwickelte (37). Ebenfalls ab den 60er Jahren wurde damit begonnen, vor der Transplantation serologische Untersuchungen zum Nachweis präformierter Antikörper gegen das Transplantat durchzuführen, um hyperakute Abstoßungsreaktionen zu vermeiden (38). Die frühen immunsuppressiven Regimes setzten auf Ganzkörperbestrahlung und den Einsatz verschiedener Zytostatika, um die schnell proliferierenden Lymphozyten auszuschalten. Die Proliferationshemmung war auch das Ziel von Roy Calne, der zu Beginn der 60er Jahre erstmals den Anti-metaboliten Azathioprin einsetzte (39). Die Kombination von Azathioprin mit den etwa zeitgleich eingeführten

Steroiden brachte der Transplantationsmedizin ihren ersten Durchbruch: Die Reduktion der Zahl der akuten Abstoßungen auf etwa 50% im ersten Jahr nach der Transplantation machte die Verpflanzung allogener Organe in größerer Zahl möglich. Die geringe Selektivität der Medikamente hatte jedoch massive Nebenwirkungen zur Folge (40).

Ende der 60er Jahre wurde mit der Therapie akuter Abstoßungen durch polyklonale Antikörper gegen Lymphozyten ein neues Prinzip der Immunsuppression eingeführt. Wegen der geringen Spezifität der Präparate kam es aber ebenfalls zu erheblichen Nebenwirkungen (41). Mit der Einführung der Calcineurininhibitoren in den 80er Jahren standen erstmals Medikamente zur Verfügung, die zugleich hocheffizient und relativ nebenwirkungsarm waren. Cyclosporin A und das zehn Jahre später eingeführte Tacrolimus konnten Anzahl und Schweregrad der akuten Abstoßungen erheblich reduzieren. Durch die erhöhte Selektivität gingen in gleichem Maße die Infektionsrate und die Knochenmarktoxizität der Therapie zurück. Durch den Einsatz der CNI wurde auch die erfolgreiche Transplantation weiterer solider Organe wie Herz oder Lunge in größerem Umfang ermöglicht. Zugleich stieg die Anzahl der Transplantationen dramatisch an. Die Einführung der CNI stellt deshalb einen Meilenstein in der Geschichte der Transplantationsmedizin dar (42).

Eine weite Verbreitung fanden die nicht depletierenden Antikörper gegen den IL-2-Rezeptor CD25, welche Ende der 90er Jahre entwickelt wurden und den Vorteil minimaler Toxizität boten. Durch ihren Einsatz in der Induktionstherapie konnte das Auftreten akuter Abstoßungen weiter reduziert und dabei der Verbrauch nebenwirkungsreicherer Immunsuppressiva reduziert werden (32). Etwa zeitgleich ermöglichte die Entwicklung von Mycophenolat Mofetil (MMF) die Ablösung von Azathioprin durch einen Antimetaboliten mit deutlich verbesserter Spezifität (43). Als Mycophenolsäurederivat mit veränderter Galenik stellt zudem das 2003 eingeführte Mycophenolat-Natrium (EC-MPS) eine weitere Alternative dar (44). Die Einführung der mTOR-Inhibitoren Sirolimus (45) und Everolimus (46) in den Jahren um die Jahrtausendwende gab der Transplantationsmedizin aufgrund ihres spezifischen Wirkprofils erstmals Immunsuppressiva an die Hand, welche möglicherweise einen günstigen Einfluss auf die Entstehung von Neoplasien zeigten (10). Seit 2011 in klinischer Anwendung ist schließlich auch der Costimulationsinhibitor Belatacept, von dem man sich eine Erhaltungstherapie mit günstigem Nebenwirkungsprofil verspricht (47).

Mit diesen Medikamenten gelang es im Laufe der Jahre immer besser, die immunologische Antwort auf die Nierentransplantation zu kontrollieren und akute Abstoßungen transplantierte Nieren zu verhindern.

3.5. Das Problem des Langzeitüberlebens

Bis Mitte der 90er Jahre verbesserte sich zudem das Langzeitüberleben der Transplantate (48). Seitdem fand jedoch eine Entkopplung statt: Während die bereits niedrige Rate akuter Rejektionen noch weiter gesenkt werden konnte, stagnierte die Überlebenszeit mit funktionierendem Transplantat. Während die Quote der nach einem Jahr noch funktionstüchtigen Nierentransplantate in den USA aktuell bei über 90% liegt, sind nach fünf Jahren noch etwa 75%, nach zehn Jahren aber unter 50 Prozent der Transplantate funktionstüchtig (49). Für die Halbwertszeit der postmortalen Transplantate (Zeit, nach der nur noch 50% der Transplantate funktionsfähig waren), die vom Transplantationsjahr 1989 bis 1999 noch von 6,6 Jahren auf 8,6 Jahre gesteigert werden konnte, wird für die Zeit bis 2005 nur eine minimale Steigerung auf 8,8 Jahre erwartet. Der größte Anteil der Steigerung in der Dekade von 1989 bis 1999 wurde erzielt, indem frühe Verluste durch Abstoßungen im ersten Jahr verhindert wurden. Deshalb fiel die Steigerung der Halbwertszeit bei den Lebendspenden, die schon seit langem exzellente Einjahresfunktionsraten aufweisen, bereits von 1989 bis 1997 nur gering aus (11,4 auf 12,0 Jahre). Auch bei den Lebendspenden wird eine signifikante weitere Steigerung der Halbwertszeit der Transplantate nicht erwartet (50).

Damit vollzog sich in der Transplantationsmedizin ein Paradigmenwechsel: Während in den ersten Jahrzehnten die Beherrschung der akuten Abstoßungen das zentrale Ziel war, steht nunmehr die Sicherstellung des langfristigen Überlebens der Empfänger mit einem funktionstüchtigen Transplantat im Vordergrund. Die häufig vertretene Ansicht, durch die Vermeidung oder Unterdrückung akuter Abstoßungen werde gleichzeitig auch die langfristige Prognose des Transplantates befördert, erwies sich als unbegründet (51).

Die Ursachen dafür sind vielschichtig, lassen sich jedoch einteilen in Probleme des Überlebens des Transplantates selbst (die chronische Transplantatdysfunktion) und Probleme des Transplantatempfängers, vor allem wegen einer erhöhten kardiovaskulären Mortalität und wegen des vermehrten Auftretens von Infektionen und Neoplasien.

3.5.1. Die chronische Transplantatdysfunktion

Der Begriff der chronischen Transplantatdysfunktion (*chronic allograft dysfunction, CAD*) ist rein deskriptiv und beschreibt das klinische Problem, mit welchem die Transplantationsmedizin konfrontiert wird. Er beschreibt kein eigenständiges Krankheitsbild, sondern ist der klinische Ausdruck verschiedener Pathologien. Der Vorgängerbegriff der chronischen Transplantatnephr-

pathie (*chronic allograft nephropathy*, CAN) ist deshalb verlassen worden. Auch der in der aktuellen Banff-Klassifikation vorgesehene histologisch-deskriptive Begriff der „interstitiellen Fibrose und tubulären Atrophie“ (IFTA) wird als gemeinsame Endstrecke verschiedener Schädigungen verstanden und sollte nur verwendet werden, wenn eine ätiologische Zuordnung nicht möglich ist (52).

Nachdem seit den 90er Jahren vor allem nichtimmunologische Ursachen für die chronische Transplantatdysfunktion verantwortlich gemacht wurden, geht man heute wieder davon aus, dass immunologische Prozesse im Vordergrund stehen (53). Vor allem durch die Möglichkeit, durch verfeinerte Labormethoden sehr sensitiv das Auftreten gegen das Transplantat gerichteter Antikörper (*donor specific antibodies*, DSA) nachzuweisen (54), und durch die Neubewertung histologischer Befunde, vor allem durch den Verzicht auf den obligatorischen Nachweis von C4d im Biopat, setzte sich die Erkenntnis der Bedeutung chronischer antikörperbasierter Abstoßungsprozesse (ABMR) durch (55). Die chronische ABMR zeichnet sich durch Schädigungen der Mikrozirkulation aus. Sie ist weit häufiger als T-Zell-basierte Abstoßungen (TCMR), schwer zu behandeln und führt oft zum Verlust des Transplantats (56). Eine akute TCMR hingegen spricht meist auch in fortgeschrittenen Stadien gut auf Steroide an, hinterlässt weniger irreversible Schäden und führt seltener zu einem Transplantatverlust (17). Das Vorhandensein einer chronischen TCMR wird von einigen Autoren sogar ganz bestritten (55).

Bemerkenswert ist, dass sowohl ABMR als auch TCMR oft bei Patienten mit fraglicher Therapieadhärenz auftreten. Es wird vermutet, dass eine mangelhafte Medikamenteneinnahme bis zu 30% der Transplantatverluste erklären kann (57).

Neben der immunologischen Schädigung der Transplantate tragen weitere, nichtimmunologische Schädigungen zur chronischen Transplantatdysfunktion bei. Die Tatsache, dass die derzeit wichtigsten Medikamente in der Nierentransplantation, die Calcineurininhibitoren, nephrotoxisch sind, ist seit langem bekannt, eine Vielzahl histologischer Schädigungsmuster wurde beschrieben (58). Einerseits tritt bereits nach 10 Jahren Behandlungsdauer bei einem Viertel aller mit CNI behandelten Patienten nach Herz- oder Lebertransplantation eine chronische Niereninsuffizienz im Stadium IV auf, zehn Prozent benötigen eine Dialysetherapie (59). Andererseits zeigen die Daten aktueller Studien aber, dass die Calcineurininhibitortoxizität nicht die zentrale Rolle für die chronische Transplantatdysfunktion und den Transplantatverlust spielt, die ihr in der Vergangenheit zugeschrieben wurde (60).

Weiterhin führen die Erkrankungen des Empfängers, wie die arterielle Hypertonie, metabolische Erkrankungen, wie Diabetes mellitus oder Hyperlipidämie, Infektionserkrankungen, wie Harnwegsinfekte oder die BK-Virus-Nephropathie, sowie die Rekurrenz der zur Niereninsuffizienz

führenden Grunderkrankung zu einer Schädigung des Transplantats (20). Auch werden bereits durch den Hirntod des Spenders und den Verbleib des Organs im seinem Körper, anschließend durch die Operationstätigkeit bei Entnahme und Verpflanzung, sowie durch den Transport und die daraus resultierenden Ischämiezeiten und Reperfusionsschäden im Transplantat Läsionen gesetzt, welche dessen Funktion sowohl direkt schädigt, als auch für eine weitere Schädigung durch das Immunsystems des Empfängers prädestinieren kann (61). Schließlich darf auch nicht vergessen werden, dass es sich bei der chronischen Niereninsuffizienz um eine progrediente Erkrankung handelt. Im Vergleich zu nicht transplantierten Patienten mit chronischer Nierenerkrankung schreitet die Niereninsuffizienz bei Transplantierten – bei vergleichbarer Mortalität – sogar etwas langsamer voran (62).

3.5.2. Die kardiovaskuläre Mortalität

Neben dem Problem der chronischen Transplantatdysfunktion besteht eine weitere Ursache der unbefriedigenden Langzeitergebnisse der Nierentransplantation in der hohen Zahl der Patienten, welche mit funktionierendem Transplantat versterben. In der Tat ist der Tod des Patienten die häufigste Ursache für den Transplantatverlust in den ersten fünf Jahren nach der Transplantation, gefolgt von chronischer Dysfunktion und – mit weitem Abstand – der akuten Rejektion; andere Ursachen, wie die Rekurrenz der Grunderkrankung oder eine geringe Therapieadhärenz, sind demgegenüber weniger relevant (63).

Die führende Todesursache besteht in kardiovaskulären Erkrankungen – wegen des zusätzlichen kardiovaskulären Risikofaktors der Niereninsuffizienz und der hohen Comorbidität der Patienten weit über das bei der Normalbevölkerung auftretende Maß hinaus (64). Deshalb ist die Tendenz der Calcineurininhibitoren, arterielle Hypertonie, Hyperlipidämie und Diabetes mellitus zu verstärken oder auszulösen, höchst problematisch. Auch die nach wie vor oft eingesetzten Steroide wiesen ein ähnliches Nebenwirkungsprofil auf. Vor diesem Hintergrund ist zu verstehen, dass die Entwicklung calcineurininhibitor- und steroidfreier Therapieregimes weiterhin eine hohe Priorität genießt (65, 66).

3.5.3. Infektionen und Neoplasien

Direkte Folge der immunsuppressiven Therapie ist schließlich das Auftreten von Neoplasien und Infektionen. Seit langem ist bekannt, dass maligne Erkrankungen unter immunsuppressiver Therapie sehr viel häufiger auftreten als in der Normalbevölkerung (67). Das relative Risiko der Entwicklung aller Neoplasien ist erhöht, dramatische Häufungen treten aber zu Beginn der immun-

suppressiven Therapie vor allem bei lymphoproliferativen Erkrankungen auf, mit zunehmender Dauer der Immunsuppression dann immer mehr bei Hauttumoren. In beiden Fällen können onkogene Viren an der Entstehung beteiligt sein (68).

Infektionen nach Nierentransplantation lassen sich nach Fishman and Rubin in drei Gruppen einteilen: Frühe postoperative Infektionen im ersten Monat sind in der Regel Wund- und katheter-assoziierte Infektionen. Unter der massiven Immunsuppression des ersten halben Jahres nach Transplantation treten dann opportunistische Infektionen auf, etwa durch CMV, EBV, Polyoma und *Pneumocystis jirovecii* (69). Diese Gefahr sinkt in dem Maße, in dem die Immunsuppression in der Folgezeit reduziert wird, annähernd auf das Maß der Normalbevölkerung. Patienten mit weiterhin schlechter Nierenfunktion und hoher Immunsuppression bleiben allerdings mit einem hohen Infektionsrisiko behaftet.

Zur Mortalität nach Nierentransplantation tragen Infektionen mit über 15% aller Todesfälle, Neoplasien mit über 10% aller Todesfälle in den ersten fünf Jahren nach Transplantation bei. Im weiteren Verlauf steigt dann der Anteil der Tumorerkrankungen weiter an (63).

3.6. Strategien zur Verbesserung des Langzeitüberlebens

Angesichts dieser Probleme hat sich die wissenschaftliche Diskussion auf dem Gebiet der Transplantationsmedizin in den letzten Jahren auf zwei mögliche Lösungen konzentriert: Erstens wird versucht, eine Toleranz des Wirtes gegenüber dem Transplantat zu erzeugen, um eine Langzeitimmunsuppression vollständig zu vermeiden. Der zweite Ansatz geht davon aus, dass eine immunsuppressive Therapie dauerhaft notwendig ist. Die Wirkungen sollen jedoch optimiert und die Nebenwirkungen begrenzt werden. Dazu notwendig sind die Entwicklung neuer, nebenwirkungsärmerer Medikamente und Therapieregimes sowie die Entwicklung besserer Möglichkeiten der Therapiesteuerung.

3.6.1. Toleranzinduktion

Eine ideale Lösung stellt zweifellos die Induktion von Toleranz gegenüber dem Transplantat dar – gelänge sie, könnte die immunsuppressive Therapie mit all ihren Nachteilen entfallen. Seit 60 Jahren währende Versuche, dieses Ziel zu erreichen, haben bislang jedoch nicht zum Erfolg geführt. Regimes zur Etablierung eines gemischten Chimärismus durch Stammzelltransplantation sind trotz erster Erfolge bislang experimentell und durch ihre Toxizität limitiert (70). Die anfängliche Hoffnung, durch den Einsatz des Costimulationsinhibitors Belatacept könne Toleranz

induziert werden, hat sich nicht erfüllt (71). Auch die Induktion von Toleranz durch den Einsatz von regulatorischen T-Zellen ist bis auf wenige Ausnahmen bislang auf das Tiermodell beschränkt (72). Somit ist Toleranzinduktion derzeit und in naher Zukunft keine klinische Option.

3.6.2. Individualisierung der Immunsuppression

Der konkretere Weg aus dem Dilemma von Abstoßung und Toxizität besteht deshalb in der Entwicklung maßgeschneiderter Therapieregimes (73, 74). Da das Spektrum der zur Verfügung stehenden Immunsuppressiva stetig erweitert wurde, verlässt man die früher gängige Praxis, alle Patienten mit der mehr oder weniger gleichen Medikamentenkombination zu behandeln, heute zugunsten einer bedarfsgerechteren Beeinflussung des Immunsystems (75, 76, 77).

3.7. Therapeutic Drug Monitoring: Pharmakokinetik

Da das therapeutische Fenster bei vielen immunsuppressiven Medikamenten eng ist und ein mehr oder weniger direkter Zusammenhang zwischen Exposition, Effektivität und Toxizität besteht, ist es üblich geworden, die Blutspiegel der Medikamente zu messen und die Therapie anhand dieser pharmakokinetischen Daten zu steuern. Das pharmakokinetische Routinemonitoring ist mittlerweile Standard bei der Therapie mit den Calcineurin- und den mTOR-Inhibitoren (78, 79). Auch bei den Mycophenolsäurederivaten wird über die Vorteile einer pharmakokinetisch kontrollierten Therapie gegenüber einer fixen Dosierung kontrovers diskutiert, eine regelhafte Umsetzung in der klinischen Praxis erfolgt bislang jedoch in der Regel nicht (80). In der Tat sind auch bei den Calcineurin- und den mTOR-Inhibitoren weiterhin zahlreiche Fragen offen, beispielsweise ist unklar, wann die Messung erfolgen sollte. Während bei Tacrolimus, Sirolimus und Everolimus der Talspiegel (C_0) ein gutes Maß für die Gesamtexposition des Patienten darstellt und weitgehend unumstritten ist (81), versprach man sich bei Cyclosporin A von der Messung des zwei Stunden nach Medikamenteneinnahme erreichten Spitzenspiegels (C_2) einen Vorteil gegenüber der Messung des Talspiegels (C_0). Der Nachweis klinischer Vorteile für die Patienten und die weit verbreitete Anwendung des Messprinzips blieben jedoch aus (82). Unklar ist zudem, ob Toxizität und Effektivität überhaupt anhand der gleichen Parameter abgebildet werden können (79).

Schließlich können pharmakokinetische Messungen nur die individuell teils sehr unterschiedliche Aufnahme, Verstoffwechslung und Verteilung der immunsuppressiven Medikamente im Körper des Patienten nachweisen. Die Art und Weise, wie dessen Immunsystem auf die Medi-

kamentenspiegel reagiert, wird nicht erfasst, zeigt aber ebenfalls hohe interindividuelle Unterschiede auf (83).

3.8. Therapeutic Drug Monitoring: Pharmakodynamik

Um diese Lücke zu schließen, hat man pharmakodynamische Untersuchungsverfahren etabliert. Anhand von Biomarkern soll der Immunstatus der Patienten charakterisiert werden. Ein Biomarker wird dabei definiert als „*a characteristic that is objectively measured and evaluated as an indicator of normal biological processes, pathogenic processes, or pharmacologic responses to a therapeutic intervention*“ (84). Ziel der Bestimmung der Biomarker ist es, das Ansprechen der Abwehr des Patienten auf die einzelnen Medikamente und deren Kombinationen zu ermitteln und dadurch sowohl quantitativ die richtige Stärke, als auch qualitativ die ideale Zusammensetzung des immunsuppressiven Regimes zu finden (85).

Wünschenswert sind Biomarker zur Einschätzung des immunologischen Risikos vor der Transplantation, zur pharmakodynamischen Verlaufsbeobachtung unter der immunsuppressiven Therapie sowie zur Identifizierung von Patienten mit niedrigem immunologischen Risiko, die für eine Reduktion der immunsuppressiven Therapie geeignet wären. Im weiteren Sinne sind auch Biomarker zur Früherkennung von Abstoßungsreaktionen zum immunologischen Monitoring zu zählen (86).

Die in den letzten Jahren entwickelten pharmakodynamischen Verfahren zur Verlaufsbeobachtung lassen sich in spezifische und globale, unspezifische Marker unterteilen (87).

3.8.1. Spezifische pharmakodynamische Biomarker

Dabei bildet der molekulare Wirkmechanismus der verschiedenen immunsuppressiven Medikamente die Grundlage der spezifischen Biomarker. Mehrere Immunsuppressiva hemmen Enzyme, der Nachweis der Hemmung der Enzymaktivität stellt somit einen direkten Marker für die Effektivität des Medikaments dar (88). Beispiele sind die gut etablierte Bestimmung der IMPDH-Aktivität für die Mycophenolsäurederivate durch Glander (89) und die weniger gut validierten Verfahren der Messung der Calcineurinaktivität als Marker für die Calcineurininhibitoren (90) und der p70S6-Kinase für die mTOR-Inhibitoren (91). Wegen der überragenden Bedeutung der Dephosphorylierung von NFAT durch Calcineurin kann die von Giese und Sommerer etablierte Quantifizierung der NFAT-regulierten Genexpression (IL-2, IFN- γ , GM-CSF in stimulierten

PBMC) mittels rt-PCR ebenfalls als ein spezifisches Verfahren für das pharmakodynamische Monitoring einer Calcineurininhibitortherapie angesehen werden (92).

Wie die Besetzung eines Rezeptors als direkter pharmakodynamischer Effekt eines Medikaments evaluiert werden kann, demonstrierte Kovarik für Basiliximab und seine Zielstruktur CD25 (93). Tkaczuk untersuchte die Wirkung von Daclizumab auf Expression und Internalisierung von CD25 sowie auf die Phosphorylierung von Komponenten des Jak-STAT-*pathways* (94). Zum pharmakodynamischen Monitoring des JAK1/JAK3-Inhibitors Tofacitinib wurde ein Assay entwickelt, mit welchem zytometrisch phosphoryliertes STAT5 in T-Zellen nach Aktivierung durch Zytokine der IL-2-Familie nachgewiesen werden kann (95). Wie von Vadafari für die Calcineurininhibitoren und Basiliximab gezeigt werden konnte, kann dieser Assay wegen der im Verlauf der T-Zell-Aktivierung erst spät erfolgenden Aktivierung des JAK-STAT-*pathways* (nach Eingang des Signals 3) jedoch auch die immunsuppressiven Eigenschaften anderer Medikamente aufzeigen (96). Auch die Elimination einer Zellpopulation aus dem peripheren Blut durch ein Antikörperpräparat kann als spezifisches Verfahren aufgefasst werden. Ein Beispiel dafür ist die Arbeit von Buchler zu Antithymozytenglobulin (97). Eine anhaltende CD4-T-Zell-Lymphopenie nach Gabe von depletierenden Antikörpern ist mit einer erhöhten Mortalität und Morbidität durch Malignome assoziiert worden (98).

3.8.2. Unspezifische pharmakodynamische Biomarker

Der Vorteil der unspezifischen Verfahren besteht in der Möglichkeit, die aggregierten Effekte heute üblicher Kombinationstherapien abzubilden.

Da alle immunsuppressiven Medikamente letztlich Einfluss nehmen auf die gemeinsame Endstrecke der T-Zell-Aktivierung, nämlich DNA-Synthese und klonale Expansion, ist die Messung der Proliferationsfähigkeit stimulierter Lymphozyten eines der ältesten pharmakodynamischen Verfahren (99). Basierend auf Vorarbeiten von Ferron und Jusko (100) etablierten Mitglieder der Arbeitsgruppe von Morris an der Stanford-Universität Proliferationsassays, welche die Inkorporation des radioaktiven Markers [³H]TdR in die DNA messen oder per FACS-Analyse in die DNA interkaliertes PI sowie angefärbtes PCNA darstellen konnten (101). In den zahlreichen weiteren Arbeiten der Gruppe setzte sich später das nichtradioaktive Verfahren durch. Klupp konnte dabei eine Korrelation des pharmakodynamischen Markers mit dem histologisch gesicherten Schweregrad der akuten Abstoßung von Herztransplantaten bei Ratten nachweisen (102). Dambrin und Klupp gelang es sogar, eine immunsuppressive Therapie anhand pharmakodynamischer Parameter zu steuern und bei Affen, welche nach Maßgabe der Proliferationsrate Si-

rolimus erhielten, die Entstehung der *graft vascular disease* bei Aortentransplantaten zu verhindern (103). In einer aktuellen Arbeit von Wieland wurde die Proliferationsrate unter immunsuppressiver Vierfachkombination anhand eines kommerziell verfügbaren Assays charakterisiert, in welchem BrdU in *de-novo*-synthetisierte DNA integriert und dann durch einen Antikörper markiert wurde (104). Ein weiteres Proliferationsassay wurde unlängst von Niwa publiziert. Durch rt-PCR-gestützte Messung der PCNA-Expression konnte eine Suppression der Proliferation durch die Calcineurininhibitoren, MMF und Prednisolon aufgezeigt werden (105).

Die Untersuchung der Expression von Oberflächenmarkern stimulierter Lymphozyten verlief in der Gruppe um Morris weitgehend parallel zu der Entwicklung der Proliferationsassays. Untersucht wurden die im Rahmen der Lymphozytenaktivierung eine Rolle spielenden Marker CD11a (Teil des Integrins LFA-1), CD95 (Fas-Rezeptor), CD134 (costimulatorisches Molekül), CD154 (costimulatorisches Molekül) (106) sowie CD25 (Teil des IL-2-Rezeptors) und CD71 (Transferrinrezeptor), (104, 107-109). Eine Gruppe aus Pittsburgh untersuchte die Expression von CD25, CD54 (Integrin ICAM-1), CD69 (Lektin, früher Aktivierungsmarker), CD71, CD86 (costimulatorisches Molekül) und CD95. Ziel war es, eine ideal hemmende Kombination von Sirolimus und Mycophenolsäure zu ermitteln (110, 111). Die Expression von auf CD25, CD27 (costimulatorisches Molekül), CD28, CD70 (costimulatorisches Molekül, Ligand von CD27) und CD279 (PD-1, negative Regulation) untersuchte He, um den Effekt der Mycophenolsäure auf durch CD28-stimulierte T-Zellen zu charakterisieren (112). Der costimulatorische Oberflächenmarker CD26 entspricht der Dipeptidylpeptidase-4 (DPP4). Shipkova und Wieland konnten in einem atypischen Oberflächenmarkerassay zeigen, dass Immunsuppressiva *in vitro* die Enzymaktivität in unstimuliertem Vollblut unterdrücken und dass die Enzymaktivität bei Patienten mit akuten Abstoßungen erhöht, bei Patienten mit Leukopenie und schweren Infektionen reduziert ist (87, 104). Ein weiterer atypischer Oberflächenmarker ist CD30, ein costimulatorisches Molekül, das nach T-Zell-Aktivierung als sCD30 ins Blut übertritt und mit Hilfe eines ELISA gemessen werden kann. Erhöhte Werte vor oder nach der Transplantation wiesen auf ein erhöhtes Risiko für akute Abstoßungen hin (113).

Zytokine haben einen wichtigen Platz in der Lymphozytenaktivierung (114). In den Arbeiten zur Transplantationsmedizin standen vor allem IL-2 als Signal 3 der Lymphozytenaktivierung, wie auch IFN- γ und TNF- α als Botenstoffe aktivierter T-Zellen im Vordergrund. Sowohl Zytokinspiegel im Blut als auch die intrazelluläre Zytokinkonzentration und Zytokinsynthese, mit oder ohne Stimulationsverfahren, sind untersucht worden, um das Ansprechen der Patienten auf immunsuppressive Medikamente darzustellen und den Zusammenhang mit klinischen *outcomes*, wie Abstoßungsreaktionen, herzustellen. Schon 1992 wies Anderson mit fluoreszenzmikroskopischer

schen Techniken den hemmenden Einfluss von Cyclosporin A und Tacrolimus auf die Produktion von IL-2, IFN- γ und TNF- α in stimulierten Lymphozyten nach (115). Kimball untersuchte, ob das Monitoring der Zytokine IL-1, IL-2, IL-6, IL-8 und TNF- α im unstimulierten peripheren Blut mit Hilfe eines ELISA ermöglichen würde, die Abstoßung von Herztransplantaten vorherzusagen (116). Millán setzte das ELISA-Verfahren zur Messung der IL-2-Produktion im mit PHA stimulierten PBMC im Verein mit einer Messung der Calcineurinaktivität ein (117). Stein nutzte einen ELISA in PHA-stimuliertem Vollblut, um die Inhibition der IL-2-Synthese unter Cyclosporintherapie nachzuweisen (118). Härtel führte zur Einschätzung der pharmakodynamischen Effekte von Cyclosporin A die Bestimmung der mRNA der Zytokine IL-2, IL-4 und TNF- α mittels rt-PCR ein und schlug die „*area of cytokine mRNA expression over time*“ als geeigneten Parameter zur Therapieüberwachung vor (119). Die Gruppe um Rostaing und Tkaczuk setzte 1999 die FACS-Analyse zur Bestimmung von IL-2, IFN- γ , TNF- α und weiterer Zytokine in PBMC ein. Dabei wurden verschiedene Stimulationsverfahren evaluiert und die Muster der Zytokinsynthese untersucht. (120, 121). Die Gruppe um Morris untersuchte frühzeitig Zytokine als Ausdruck der Aktivierbarkeit des Immunsystems. Stalder beschrieb erstmals die Inhibition der stimulierten Synthese von IL-2, IFN- γ und TNF- α durch stimulierte Lymphozyten im humanen Vollblut (122). Barten erweiterte die Methodik durch den Einsatz eines zytometrischen *bead array*, der es ermöglichte, sechs Zytokine parallel zu messen. Dabei konnte er zeigen, dass der Nachweis der Auswirkungen einer immunsuppressiven Therapie nur nach vorheriger Stimulation der Lymphozyten möglich ist (123). Das Verdienst von Flores ist es, parallel FACS-Analysen mit den Stanford-Assays zur Bestimmung des Effekts von Cyclosporin und Tacrolimus auf die intrazelluläre Zytokinsynthese und die Bestimmung von mRNA derselben Zytokine mittels rt-PCA durchgeführt zu haben. Beide Verfahren erbrachten dabei annähernd das gleiche Ergebnis einer dosisabhängigen Inhibition der Zytokinsynthese (124). Boleslawski et al. konzentrierten sich bei ihrer Untersuchung auf den Nachweis der IL-2-Synthese in CD8⁺-T-Zellen und konnten einen Zusammenhang dieser mit dem Auftreten akuter Rejektionen bei Lebertransplantierten zeigen (125), ein Ergebnis, welches von Akoglu (126) und Millan (127, 194) reproduziert werden konnte.

Ein weiteres unspezifisches Verfahren zur Bestimmung des Immunstatus von Patienten unter immunsuppressiver Therapie wurde unlängst durch Kowalski validiert (128). Es erhielt 2002 die offizielle Zulassung der amerikanischen FDA als geeignetes Verfahren zur Überwachung einer immunsuppressiven Therapie. In dem kommerziell verfügbaren Assay wird der ATP-Gehalt der CD4⁺-T-Zellen nach ihrer Lyse gemessen. Anhand einer Analyse von 504 Patienten postulierte Kowalski 2006 fest umrissene, signifikant unterschiedliche Aktivierungszustände der Helferzel-

len bei stabilen, akut abstoßenden und von Infektionen betroffenen Patienten (129). Seitdem ist der ImmuKnow® Cyclex Assay von verschiedenen Gruppen eingesetzt worden. Dabei stellte sich heraus, dass einzelne Messungen mit dem ImmuKnow®-Assay keine zuverlässige Vorhersage über die Immunfunktion des Patienten oder das Auftreten von Rejektionen oder Infektionen zulassen (130, 131). Wiederholte Messungen haben sich jedoch jenseits fix definierter Risikobereiche für Über- und Unterimmunsuppression als aussagekräftiger erwiesen und haben bereits mehrfach zu therapeutischen Entscheidungen beigetragen (132, 133). Der Assay ist insbesondere sensitiv in der Beschreibung eines reduzierten Immunstatus als Ausdruck einer Infektion (vor allem einer CMV-Infektion), die gemessenen Werte kehren nach dem Abklingen der Infektionen wieder auf die Ausgangswerte zurück (134).

4. *Fragestellung*

Wegen der unbefriedigenden Langzeitprognose der Nierentransplantate und ihrer Empfänger ist eine Fortentwicklung der gegenwärtig praktizierten immunsuppressiven Therapie unverzichtbar. Einen wichtigen Ansatz dazu stellt die Entwicklung maßgeschneiderter Therapieregimes dar, welche Ausmaß und Zusammensetzung der immunsuppressiven Therapie an die individuellen Erfordernisse der Patienten anpassen sollen.

Gegenwärtig wird die immunsuppressive Medikation erst beim Auftreten inakzeptabler Nebenwirkungen angepasst. Um aber nicht nur reagieren zu können, sondern um Nebenwirkungen von vorneherein zu vermeiden, sind pharmakokinetische Verfahren entwickelt worden, mit deren Hilfe es möglich ist, die Aufnahme, Verteilung, Verstoffwechselung und Ausscheidung der wichtigsten Immunsuppressiva zu untersuchen.

Die Pharmakokinetik kann aber nur das weitere Schicksal der Medikamente nach ihrer Verabreichung abbilden, nicht jedoch ihre Wirkung – oder mit anderen Worten: „*pharmacokinetics can tell you what the body does to the drug, but not what the drug does to the body*“ (79). Will man Art und Menge des Einsatzes immunsuppressiver Medikamente optimal auf den Patienten zuschneiden, ist jedoch nicht nur der Spiegel der Medikamente von Interesse, sondern vor allem ihre immunsuppressive Wirkung. Deshalb versucht man seit Jahren, die pharmakokinetischen Verfahren der Therapieüberwachung durch pharmakodynamische Verfahren zu ergänzen. Diese bilden auf verschiedene Weise den Effekt der immunsuppressiven Medikamente ab: entweder medikamentenspezifisch, beispielsweise als Assay, welches die Aktivität eines blockierten Zielenzym nachweist, oder unspezifisch, beispielsweise als Nachweis der Proliferationstätigkeit der T-Zellen. Keines der angewandten pharmakodynamischen Verfahren konnte sich bislang jedoch durchsetzen, ein Standard bezüglich der zu messenden Zielgröße oder des zu untersuchenden Mediums hat sich noch nicht etabliert.

In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, im Rahmen einer klinischen Studie durch die zeitgleiche Messung sechs verschiedener Parameter unter dem Einsatz von spezifischen und unspezifischen Untersuchungstechniken ein möglichst umfassendes Bild der immunsuppressiven Wirkung zweier wichtiger gegenwärtig eingesetzter Therapieregimes zu zeichnen. Daraus ergeben sich folgende Fragestellungen:

- 1) Besteht ein Zusammenhang zwischen den pharmakokinetischen und den pharmakodynamischen Daten?
- 2) Sind die gewählten Parameter geeignet, um den immunsuppressiven Effekt der eingesetzten Medikamentenkombinationen abzubilden?
- 3) Sind die Parameter sensitiv genug, um die Unterschiede der immunsuppressiven Wirkung eines mTOR-Inhibitor-basierten Therapieregimes im Vergleich mit einem Calcineurin-Inhibitor-basierten Regime aufzudecken?
- 4) Lassen sich aus dem anhand der untersuchten Parameter gewonnenen Abbild der Funktion des Immunsystems und seiner Unterdrückung Rückschlüsse auf das Auftreten der klinischen Korrelate einer zu starken bzw. zu schwachen Immunsuppression ziehen?

Diese Fragestellungen wurden an einer Studienpopulation untersucht, bei der von einem Zeitpunkt kurz vor der Transplantation bis zum Ende des Beobachtungszeitraums ein Jahr später kontinuierlich Daten erhoben wurden. Damit stellt die vorliegende Arbeit eine der ersten langfristigen pharmakodynamischen Verlaufsbeobachtungen *de novo*-nierentransplantierter Patienten dar.

5. Patienten, Material und Methoden

5.1. Patienten

5.1.1. Studienaufbau

Die vorliegende Arbeit beruht auf einer pharmakodynamischen Substudie zur ZEUS-Studie. Die ZEUS-Studie ist eine multizentrische, offene, prospektive, randomisierte klinische Parallel-Gruppen-Studie, in welche in den Jahren 2005 bis 2007 in 17 Transplantationszentren in Deutschland und der Schweiz insgesamt 503 Patienten eingeschlossen wurden (135). An der pharmakodynamischen Substudie konnten nur die Patienten teilnehmen, die in einer der beiden an der ZEUS-Studie teilnehmenden Berliner Zentren (die medizinischen Kliniken mit Schwerpunkt Nephrologie der Charité Campus Mitte und Charité Campus Virchow) eingeschlossen worden waren, insgesamt 86 Patienten.

Die Studie und die Substudie sind von der Ethikkommission der Charite genehmigt worden. Alle Probanden gaben nach vorheriger Information über die Studie ihr freies schriftliches Einverständnis zur Hauptstudie und zur vorliegenden Substudie.

Die in die Studie eingeschlossenen Patienten erhielten einheitlich eine Induktionstherapie mit Basiliximab (Simulect®) 20mg i.v. zwei Stunden vor der Nierentransplantation und an Tag vier nach der Transplantation. Zudem erhielten alle Patienten Mycophenolsäure (EC-MPS, Myfortic®) in einer Zieldosis von 1440mg/Tag (eine Reduktion im Verlauf war zulässig) und Steroide nach Ermessen des Transplantationszentrums, mindestens jedoch in einer Dosis von 5mg Prednisolon(äquivalent)/Tag. Cyclosporin A (Sandimmun® Optoral) wurde spiegel-kontrolliert verabreicht. Der Zielspiegel C₀ (Talspiegelkonzentration) betrug bis Monat 4,5 150-220ng/ml, von Monat 4,5 bis Monat 6 120-180ng/ml, und ab Monat 6 bis zum Studienende im Monat 12 100-150ng/ml; alternativ konnte nach C₂-Spiegel (Spiegel zwei Stunden nach Einnahme) dosiert werden, die Zielspiegel betrugen in diesem Fall 1100-1400ng/ml (Monat 1), 950-1300ng/ml (Monat 2), 800-1200ng/ml (Monate 3 bis 4,5), 700-1000ng/ml (Monate 4,5 bis 6) bzw. 500-800 ng/ml (Monate 6 bis 12). Der Cyclosporinspiegel wurde durch Immunoassay bestimmt.

Nach Ablauf von 4,5 Monaten wurden die zu diesem Zeitpunkt in der Studie verbleibenden Patienten mit einem geeigneten Verfahren in zwei Studienarme randomisiert. Die Patienten des ersten Studienarmes erhielten weiterhin Cyclosporin, um die oben geschilderten Zielspiegel zu erreichen. Im zweiten Studienarm wurde Cyclosporin in höchstens vier Wochen in drei Schritten (Reduktion auf 50%, 25% und 0% der Vordosis) ausgeschlichen und dafür Everolimus (Certi-

can®) verabreicht. Der Zielspiegel für Everolimus lag im ersten Schritt bei 3-8ng/ml und anschließend bis zum Studienende bei 6-10ng/ml. Der Everolimusspiegel wurde ebenfalls durch Immunoassay bestimmt.

Die Erhebung von Daten für die ZEUS-Studie sowie pharmakodynamische Messungen für die Substudie erfolgten vor der Transplantation (Tag 0) und an Tag 4, 11 sowie an Monat 1, 3, 4,5, 6, 7,5 und 12 nach der Transplantation. Gemessen wurden die Parameter IMPDH-Aktivität, IL-2- und TNF- α -Synthese, die CD25- und CD71-Expression sowie die lymphozytäre Proliferationsrate. Die Proliferationsrate wurde definiert durch die vermehrte Expression von *proliferating cell nuclear antigen* (PCNA^{high}) und den Gehalt von mit Propidium Iodid angefärbter DNA (PI^{high}). Zudem finden folgende im Rahmen der ZEUS-Studie erhobene Parameter Eingang in die vorliegende Arbeit: demographische Daten der Patienten, pharmakokinetische Daten (die Talspiegel für Cyclosporin A, Everolimus und die Mycophenolsäure) sowie das Vorliegen und die Art von Abstoßungsreaktionen, Infektionen und Malignomen.

Das primäre Ziel der ZEUS-Studie war der Nachweis einer signifikant besseren Nierenfunktion (gemessen als GFR nach der Nankivell-Methode) im Everolimus-Arm zum Studienende ein Jahr nach Transplantation. Die Ziele der pharmakodynamischen Substudie wurden im Abschnitt 2 (Fragestellung) erläutert.

5.1.2. Ein- und Ausschlusskriterien

Eingeschlossen wurden Patienten zwischen 18 und 65 Jahren, bei denen eine *de novo*-Nierentransplantation erfolgte, bei denen eine Schwangerschaft während des Studienzeitraums ausgeschlossen werden konnte und die der Studienteilnahme zustimmten. Als *de novo*-Transplantationen wurden auch Zweittransplantationen bezeichnet und eingeschlossen, bei denen die Empfänger das erste Transplantat nicht innerhalb des ersten Jahres wegen einer Abstoßungsreaktion verloren hatten. Es wurden sowohl Empfänger von Transplantaten verstorbener Spender, als auch Empfänger von „*living donor*“-Transplantaten eingeschlossen, bei der Randomisierung wurden die Patienten aber im Hinblick auf die Lebendspende stratifiziert.

Patienten mit einem besonders hohen immunologischen Risiko wurden ausgeschlossen (Zweittransplantation bei Verlust des Ersttransplantates aus immunologischen Gründen binnen eines Jahres nach Transplantation; multiple Vortransplantationen oder Vortransplantationen anderer Organe; AB0-inkompatible Transplantate; HLA-Antikörper gegen das Transplantat; panel-reaktive Antikörper >25%). Auch wurden Empfänger von Transplantaten, die nach dem Herztod des Spenders entnommen worden waren, sowie von Transplantaten, deren Spender jünger als 5

Jahre oder älter als 65 Jahre war, ausgeschlossen. Die Empfänger durften nicht unter einer schweren Grunderkrankung leiden (HIV, Hepatitis B oder C, sonstige behandlungsbedürftige Infektionskrankheit, schwere Leberfunktionsstörung, Ulcus, Durchfälle, nicht kontrollierbarer Diabetes mellitus, Malignome in den letzten 5 Jahren, Drogen- oder Alkoholabusus, sonstige schwere somatische oder psychische Erkrankung, Thrombozytopenie $<75.000/\text{mm}^3$, Leukopenie $<2.500/\text{mm}^3$, Neutrophile $<1.500/\text{mm}^3$, Hb $<6\text{g/dl}$), eine Hypersensitivität gegen die Studienmedikation aufweisen oder diese in den vier Wochen vor Studienbeginn eingenommen haben.

Vor Randomisierung waren folgende Kriterien zu erfüllen: Die immunsuppressive Kombinationstherapie musste Cyclosporin A, Steroide und EC-MPS in einer Dosierung von mindestens 720mg/Tag beinhalten. Zudem war ein Kreatinin-Wert unter 3,0mg/dl erforderlich. Nicht randomisiert wurden Patienten mit Transplantatverlust oder Dialysepflicht zum Zeitpunkt der Randomisierung, Proteinurie $>1\text{g/Tag}$, schwerer akuter Abstoßung (entweder \geq Banff II, wiederkehrend oder nicht steroidsensibel) oder klinisch signifikanter Infektion sowie mit von der Studienmedikation abweichendem immunsuppressiven Regime, schweren Nebenwirkungen zum Zeitpunkt der Randomisierung oder den bereits bei Studieneinschluss geltenden Kriterien bezüglich Blutbildveränderungen oder Leberfunktionsstörung.

5.2. Materialien

5.2.1. Reagenzien

5.2.1.1. Antikörper

- PerCP-konjugierter Maus-Antikörper gegen humanes CD3, BD Biosciences
- FITC-konjugierter Maus-Antikörper gegen humanes CD25, BD Biosciences
- PE-konjugierter Maus-Antikörper gegen humanes CD71, BD Biosciences
- PE-konjugierter Maus-Antikörper gegen humanes IL-2, BD Biosciences
- FITC-konjugierter Maus-Antikörper gegen humanes TNF- α , BD Biosciences
- FITC-konjugierter Maus-Antikörper gegen humanes PCNA, BD Biosciences

5.2.1.2. Stimulantien

- Concanavalin A (ConA), Sigma
- Ionomycin, MP Biomedicals
- Phorbol 12-Myristat 13-Acetat (PMA), Sigma

5.2.1.3. Enzyme

- Ribonuklease A, Sigma

5.2.1.4. Zellkulturmedien und Zusätze

- RPMI-1640, Biochrom AG
- L-Glutamin, Biochrom AG
- Penicillin, Biochrom AG
- Streptomycin, Biochrom AG

5.2.1.5. Chemikalien

- Adenosinmonophosphat (AMP), Sigma
- Ammoniumchlorid (NH₄Cl), Calbiochem
- Dimethylsulfoxid (DMSO), Serva
- Di-Natrium-Ethylendiamintetraacetat (Na₂-EDTA), Sigma
- Ethanol, J.T. Baker
- Fetales Kälberserum (FCS), Biochrom AG
- Fetales Serumalbumin, Sigma
- Formalin, J.T. Baker
- Golgi Plug (Brefeldin A + Dimethylsulfoxid), BD Biosciences
- Inosinmonophosphat (IMP), Sigma
- Intraprep 1 (Lösung mit Formaldehyd), Beckman Coulter
- Intraprep 2 (Lösung mit Saponin), Beckman Coulter
- Kaliumcarbonat (Merck)
- Kaliumchlorid (Merck)
- Kaliumhydrogencarbonat (KHCO₃), Merck
- Kaliumhydrogenphosphat (KH₂PO₄), Merck
- Methanol, J.T. Baker
- Natriumdihydrogenphosphat (Merck)
- Nikotinamidadenindinucleotid (NAD⁺), Sigma
- Phosphatgepufferte Kochsalzlösung ohne Calcium/Magnesium (PBS), PAA-Laboratories

- Propidium Iodid (PI), Sigma
- Saponin, Sigma
- Tetra-N-Butylammoniumhydrogensulfat, Merck
- Xanthosinmonophosphat (XMP), Sigma
- HPLC-Wasser (Merck)

5.2.2. *Geräte*

- Ficoll-Paque-Röhrchen, Greiner Bio-One
- Reinraumarbeitsbank Laminair 2000, Heraeus Instruments
- Tischzentrifuge 5451C Biofuge fresco, Heraeus Instruments
- Zentrifuge Multifuge 2.0 3 S-R, Heraeus Instruments
- Brutschrank Cellhouse 200, Heto
- Wasserbad Master Shake, Heraeus Instruments
- FACS-Calibur mit 488nm Argonlaser, BD Biosciences
- HPLC-Gerät LC-2010 mit UV-VIS Detektor (Wellenlänge 256nm), Shimadzu
- Chromatographiesäule ProntoSIL AQ C18 (Partikelgröße 3µm, 3mm x 150mm), Bischoff Chromatographie
- Elektrische Pipettierhilfe Accu-Jet, Sigma
- Multipette, Eppendorf
- Thermomixer, Eppendorf
- Kühlschrank, Gefrierschrank -80°C
- Vortexmixer Genie 2, Scientific Industries

5.2.3. *Software*

- Word, Microsoft
- Excel, Microsoft
- Access, Microsoft
- Cellquest Pro, BD Biosciences
- Class VP Software, Shimadzu
- SPSS, IBM
- T-Base-Transplantationsdatenbank, Charité

5.3. Methoden

5.3.1. Gewinnung der Proben

Die Blutentnahme erfolgte unmittelbar vor Einnahme der immunsuppressiven Medikation unter Verwendung steriler Materialien. Es wurden jeweils 20ml venöses Blut in Lithium-Heparin-Monovetten entnommen und bei Raumtemperatur (15-25°C) bis zu 24 Stunden gelagert.

5.3.2. Chromatographische Bestimmung der Enzymaktivität der IMPDH

5.3.2.1. HPLC

Die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (*High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) ist ein Verfahren zur Trennung und Mengenbestimmung von in Flüssigkeiten befindlichen Substanzen anhand ihrer Polarität. Die zu untersuchende Probenflüssigkeit wird in ein Laufmittel (flüssige Phase, Eluat) eingebracht und durchläuft dann eine Trennsäule (stationäre Phase). Je nachdem, wie stark die Wechselwirkungen des gelösten Stoffes mit der stationären Phase sind, benötigt er für die Durchquerung der Trennsäule eine kürzere oder längere (Retentions-)Zeit. Hinter der Trennsäule ist ein zum Nachweis der durchgelaufenen Stoffe geeigneter Detektor montiert. Die Auswertung kann somit anhand der vom Detektor gemessenen Ausschläge (*peaks*) der verschiedenen Stoffe auf einer Zeitachse vorgenommen werden (136). Im Falle der *reversed phase* HPLC (RP-HPLC) ist die Oberfläche der stationären Phase streng apolar, d.h. die Geschwindigkeit, mit der polare Substanzen die Trennsäule durchlaufen, sinkt mit steigender Polarität.

Für die vorliegende Arbeit kam das automatische RP-HPLC-System LC-2010 von Shimadzu mit einem UV-VIS-Detektor und einer lipophilen ProntoSIL-AQ-C18 Säule (Partikelgröße 3µm, 3mm innerer Durchmesser x 150mm) als stationäre Phase bei 40°C zum Einsatz. Das isokratisch applizierte polare Laufmittel bestand aus einer Mischung von 6 Anteilen Methanol und 94 Anteilen eines Puffers, welcher aus 50mmol/l Kaliumhydrogenphosphat und 7mmol/l Tetra-N-Butylammoniumhydrogensulfat bestand, mit einem pH-Wert von 5,5. Bei isokratischen Trennungen verbleibt das Elutionsmittel während der gesamten Dauer in derselben Konzentration. Bei einer Flussrate von 1ml/min betrug die Durchlaufzeit der injizierten Probenmenge von 5µl 25 Minuten.

Bei der Etablierung des in der vorliegenden Arbeit genutzten Assays zur Bestimmung der IMPDH-Aktivität konnte Glander (137) einen chromatographischen Peak für XMP, das Produkt

der von der IMPDH katalysierten Reaktion, identifizieren, welcher bei Zugabe von IMP, des Substrates der IMPDH, mit dem Cosubstrat NAD^+ , nicht jedoch ohne das Cosubstrat oder mit dem Cosubstrat alleine reproduzierbar war. Die Enzymaktivität wurde den gängigen Standards entsprechend anhand des Proteingehaltes des Zelllysats normalisiert. Die Enzymaktivität wurde dementsprechend in $\text{nmol/h/mg Protein XMP}$ ausgedrückt.

Die Zuverlässigkeit des Verfahrens im klinischen Einsatz ist in zahlreichen Veröffentlichungen belegt worden (108, 139-150)

5.3.2.2. Der IMPDH-Assay

Bei normalem Blutbild wurden 2,5ml Patientenblut für den IMPDH-Assay verwendet, bei bekannter Lymphopenie des Patienten die doppelte Menge.

Zellseparation: Zunächst wurden die mononukleären Zellen durch eine Dichtegradientenzentrifugation mit Ficoll-Paque mit einem spezifischen Gewicht von 1,077g/ml isoliert. Dazu wurde die angegebene Menge Blutes, mit der gleichen Menge PBS gemischt, in ein Ficoll-Paque-Röhrchen eingebracht und bei Raumtemperatur für 20 Minuten bei 1200g zentrifugiert. Dann wurden die mononukleären Zellen aus der Interphase entfernt und mit 5ml PBS über 10 Minuten bei 1200g und 4°C zentrifugiert, um die Zellen zu waschen. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet auf Eis gestellt.

Lyse und Proteinbestimmung: Durch Resuspension des Pellets mit 250 μl 4°C kaltem Wasser in HPLC-Reinheitsqualität wurden die Zellen lysiert und die Proben bis zur weiteren Bearbeitung bei -80°C aufbewahrt. Im Lysat wurde der Proteingehalt mit Hilfe des kommerziell verfügbaren *BCA-Protein Assay Kit* bestimmt.

Vorbereitung der Messung der Aktivität der IMPDH: Nach dem Auftauen wurden unlösliche Zellfragmente durch Zentrifugation bei 1000g über 2 Minuten entfernt. Zur Bestimmung der IMPDH-Aktivität im Zelllysat wurde eine Reaktionsmischung aus 1mmol/l des Substrates Inosinmonophosphat, 0,5mmol/l des notwendigen Cosubstrates Nikotinamidadenindinucleotid sowie aus 40mmol/l Natriumdihydrogenphosphat und 100mmol/l Kaliumchlorid (pH 7,4) hergestellt.

Enzymatische Reaktion: 50 μl Überstand wurden mit 130 μl Reaktionsmischung in einen 1,5ml Microtube in einem Eppendorf-Thermomixer bei 37°C und 800rpm inkubiert. In dieser Zeit erfolgte die Umsetzung des im Puffer enthaltenen Substrates durch die IMPDH. Nach Ablauf der Inkubationszeit von 150 Minuten wurde die Reaktion durch Zugabe von 20 μl eiskalter Perchlorsäure in einer Konzentration von 4mol/l beendet und die Proben auf Eis gelegt. Ausgefällte Pro-

teine wurden durch eine fünfminütige Zentrifugation mit 15800g entfernt und 170µl des Überstandes mit 10µl Kaliumcarbonat in einer Konzentration von 5 mol/l vermischt und mindestens 30 Minuten bei -80°C gelagert.

HPLC: Nach dem Auftauen und einmaliger Zentrifugation wurde der Überstand in die HPLC-Röhrchen überführt. 5µl des Überstandes wurden injiziert und das Laufmittel mit einer konstanten Flussgeschwindigkeit von 1ml/min für 25 Minuten über die stationäre Phase gepumpt. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Class VP-Software von Shimadzu, die IMPDH-Aktivität wurde in nmol/h/mg Protein XMP angegeben.

5.3.3. Durchflusszytometrische Assays

5.3.3.1. FACS

Eine elegante Methode, Größe, Granularität und angefärbte Strukturen von Zellen zu bestimmen, ist die Durchflusszytometrie. Bei den dabei verwendeten „*Fluorescence Activated Cell Sorters*“ (FACS) handelt es sich um Geräte, welche in einer Probenflüssigkeit enthaltene Zellen durch Luftüberdruck in einen laminaren Flüssigkeitsstrom überführen, der eine Messkammer durchläuft. Dort passieren sie einzeln nacheinander einen vom Gerät erzeugten Laserstrahl. Analysiert wird die Brechung des monochromatischen Lichtes dieses Laserstrahles durch die Partikel. Sie erlaubt zwei Aussagen: Erstens erzeugen bereits unmarkierte Objekte nach vorne (*Forward Scatter*, FSC) und zur Seite (*Side Scatter*, SSC) hin abgelenktes Streulicht, welches mit Detektoren erfasst werden kann. Dieses ist ein Maß für die Größe (FSC) und Granularität (SSC) der Partikel. Zweitens können Strukturen der Zellen mit an Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelten Anti-körpern oder anderen Molekülen markiert werden. Da die Farbstoffe unterschiedliche Absorptions- und Emissionsspektren haben, können mit einem einzigen Laser mehrere Farbstoffe angeregt und somit Emissionen ganz unterschiedlicher Wellenlänge erzeugt werden. Fluoreszenzlichtdetektoren liefern Informationen über die Wellenlänge des emittierten Lichts, über seine Signalstärke und über die Signaldauer. Nach adäquater Kompensation, d.h. nach Entfernung des durch Überlappung der Emissionsspektren erzeugten Fehlers, liefern sie präzise Informationen über die angefärbten Strukturen der vermessenen Zellen.

Bei dem für die vorliegende Arbeit verwendeten drei-Farben-FACS-Gerät handelte es sich um ein FACS Calibur der Firma BD Biosciences mit einem 488nm Argonionenlaser. Zur Markierung der Zielstrukturen wurden die bei dieser Wellenlänge absorbierenden Fluoreszenzfarbstoffe

FITC, PE, PI und PerCP verwendet und bei ihrem jeweiligen Emissionsmaximum von 521, 575, 617 und 670nm gemessen (151).

5.3.3.2. *Prinzip und Aufbau der Assays*

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten drei FACS-basierten Assays weisen zwar entsprechend der jeweils untersuchten Zielstrukturen gewisse Unterschiede auf, bestehen jedoch alle aus drei grundsätzlichen Arbeitsschritten:

1) *Stimulation*: Zunächst erfolgte eine unspezifische Stimulation der Lymphozyten, um deren Aktivierbarkeit unter den Bedingungen der immunsuppressiven Medikation nach allogener Nierentransplantation abzubilden. Dazu wurde im Zytokinassay Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA) und Ionomycin, im Oberflächenmarker- und im Proliferationsassay Concanavalin A (Con A) verwendet.

Der hauptsächliche Wirkmechanismus des Phorbolesters PMA ist die Aktivierung der Protein-kinase C. Im Synergismus mit einem Calciumeinstrom aus Extrazellulärraum und Endoplasmatischem Retikulum, welcher durch das Calciumionophor Ionomycin auslöst werden kann, können die intrazellulären Effekte der Lymphozytenaktivierung über den T-Zell-Rezeptor nachgeahmt werden, ohne dass eine Bindung von Antigen an den Rezeptor und seine Aktivierung notwendig ist (152).

Das pflanzliche Lektin Concanavalin A ist in der Lage, eine ganze Reihe von zur T-Zell-Aktivierung notwendiger Glykoproteine der Zellmembran zu binden, quervernetzen und somit zu aktivieren (153). Die wichtigste betroffene Struktur ist dabei CD3. In der Literatur wird jedoch davon ausgegangen, dass der stimulierende Effekt von Con A auf einer Summation zahlreicher Einzeleffekte beruht (154).

Während die Stimulation der Zytokinproduktion durch PMA und Ionomycin binnen weniger Stunden die gewünschten Ergebnisse zeigt, tritt der mitogene Effekt von Con A erst verzögert auf, weshalb bei den Oberflächenmarker- und Proliferationsassays eine längere Inkubationszeit eingehalten und Nährlösung zugesetzt werden musste (107).

2) *Färbung*: Nach der Stimulation der T-Zellen erfolgte die Färbung der gesuchten Zielstrukturen mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern.

3) *Messung*: In einem letzten Schritt wurden die Proben wie oben beschrieben der FACS-Messung unterzogen und die Daten mit Hilfe der CellQuest-Software erfasst. Eine genaue Abgrenzung der zu untersuchenden Zellpopulation in für den jeweiligen Assay entwickelten Analy-

sefenstern (*Gates*) war notwendig. Bei allen Assays wurde das Ergebnis als prozentueller Anteil der stimulierten T-Zellen an der Gesamtzahl der gemessenen CD3⁺-Zellen bestimmt.

Alle drei Assays wurden ursprünglich von einer Arbeitsgruppe um Randall E. Morris Ende der 90er Jahre in Stanford (USA) etabliert. Der Einsatz erfolgte zunächst nur experimentell im Tierversuch (101). 2003 setzte Barten die Assays erstmals in der Arbeit mit Humanblut ein (106). Böhler und Nolting entwickelten sie bis zu der in der vorliegenden Dissertation verwendeten Form weiter und validierten sie in ihrer Arbeit aus dem Jahr 2007 (107).

5.3.3.3. Der Zytokinassay

Stimulation: Eine PMA-Stammlösung mit 100µg/ml PMA in 1000µl des Lösungsmittels DMSO und eine Ionomycin-Stammlösung mit 500µg/ml Ionomycin in 1000µl Ethanol wurde aliquotiert und bei -20°C aufbewahrt. Unmittelbar vor Beginn des Assays wurden eine PMA-Arbeitslösung durch Zugabe von 1323µl PBS zu 10µl PMA-Stammlösung und eine Ionomycin-Arbeitslösung durch Zugabe von 123µl PBS zu 10µl Ionomycin-Stammlösung erzeugt. 2µl der jeweiligen Arbeitslösungen wurden mit 96µl Lithium-Heparin-Blut in ein Polypropylenröhrchen überführt, vermischt und für 30 Minuten bei 37°C in einem Brutschrank mit einer feuchten 5%-CO₂-Atmosphäre inkubiert. Bei allen Inkubationsschritten des Assays wurde auf eine schnelle Durchführung geachtet, um die Lichtexposition möglichst gering zu halten.

Sekretionshemmung: Anschließend wurde 1µl Golgi-Plug-Arbeitslösung zum stimulierten Blut hinzugefügt, mit ihm vermischt und dann gemeinsam erneut für 4 Stunden inkubiert. Die Golgi-Plug-Arbeitslösung bestand aus 90µl PBS und 10µl Golgi-Plug-Stammlösung (Brefeldin A gelöst in DMSO im Verhältnis 1:9, gelagert bei -4°C). Brefeldin A ist in der Lage, den Transport von Proteinen vom Endoplasmatischen Retikulum über den Golgi-Apparat zur Zellmembran zu verhindern und führt so zur intrazellulären Akkumulation (155).

Färbung des T-Zell-Oberflächenmarkers: Nach Abschluss der Inkubation wurden 50ml des stimulierten Patientenblutes in für das FACS-Gerät geeignete Polystyrenröhrchen mit je 2µl von an den Fluoreszenzfarbstoff PerCP gekoppelten Antikörpern gegen CD3 überführt. Nach gründlicher Durchmischung wurden die Proben 15 Minuten bei Raumtemperatur im Dunklen aufbewahrt, um den Antikörpern Zeit zur Bindung an ihre Zielstrukturen zu lassen.

Fixierung: Im nächsten Schritt erfolgte die Fixierung der Zellen mit dem Reagenz Intraprep 1. Eine weitere Proteinbiosynthese wurde durch dieses 5,5-prozentiges Formaldehyd enthaltende Reagenz effektiv unterbunden (156). Nach weiteren 15 Minuten bei Raumtemperatur im Dunk-

len schloss sich ein erster Waschdurchgang mit 4ml PBS, anschliessender gründlicher Durchmischung und 6 Minuten Zentrifugation mit 210g bei Raumtemperatur an.

Permeabilisierung und Lyse der Erythrozyten: Nach Absaugen des Überstandes und gründlichem Mischen mit dem Vortexgerät wurde das Pellet mit 100µl Intraprep 2 resuspendiert und vorsichtig durchmischt. Dabei diente der Inhaltsstoff Saponin der Permeabilisierung der Zellmembranen, um den fluoreszenzmarkierten Antikörpern den Zugang zu den intrazellulären Zytokinen zu ermöglichen (157). Zugleich wurden durch diesen Schritt die Erythrozyten lysiert.

Intrazelluläre Färbung: Nach fünf Minuten in Dunkelheit bei Raumtemperatur wurden je 2µl PE-markierte IL-2-Antikörper und FITC-markierte TNF- α -Antikörper hinzugefügt und nach vorsichtiger Durchmischung weitere 15 Minuten Einwirkzeit in Dunkelheit bei Raumtemperatur gegeben.

Vorbereitung zur FACS-Messung: Nach einem zweiten Waschdurchgang mit 4ml PBS, gründlicher Durchmischung und 6 Minuten Zentrifugation mit 210g bei Raumtemperatur wurde der Überstand erneut abgesaugt und das Pellet in 500µl 0,5-prozentiger Formalinlösung bis zur FACS-Analyse bei 4°C gelagert.

FACS-Messung: Zunächst wurde im FSC/SSC-Dot Plot ein Gate um die Lymphozytenpopulation gelegt. Die im Gate befindlichen Zellen wurden mit Hilfe des PerCP-Signals im Histogramm in CD3⁺-T-Lymphozyten und andere Zellen unterschieden. Anschließend wurden in zwei weiteren Dot Plots anhand der FITC- und PE-Signale die TNF- α - und die IL-2-positiven Zellen von den nicht stimulierten T-Zellen abgegrenzt. Gemessen wurde bis zu einer Zahl von 3000 CD3-positiven Zellen.

5.3.3.4. Der Oberflächenmarker-Assay

Stimulation: Zur unspezifischen Stimulation der Zellen wurde zunächst eine Stammlösung von 1mg/ml Con A gelöst in dem Nährmedium RPMI 1640 (welches zuvor durch Zusatz von 100 U/ml Penicillin und 10 µg/ml Streptomycin gegen eine bakterielle Überwucherung geschützt und durch 2mM der instabilen essentiellen Aminosäure L-Glutamin angereichert wurde) aliquotiert und bei -20°C gelagert. Dann wurden jeweils 200µl Vollblut mit 1800µl RPMI in eine 24-Well-Platte eingebracht und mit 15µl der Con A-Stammlösung stimuliert. Die Inkubation erfolgte über 72 Stunden in einem feuchten Brutschrank mit 37°C und 5%-CO₂-Atmosphäre.

Färbung der Oberflächenmarker: Zur Färbung der Oberflächenmarker wurde kurz vor dem Ende der Inkubationszeit eine Färbelösung hergestellt: Sie bestand aus je 2µl PerCP-konjugierten Antikörpern gegen CD3, FITC-konjugierten Antikörpern gegen CD25 und PE-konjugierten An-

tikörpern gegen CD71, die in 100µl einer Lösung von 3% (v/v) FCS in PBS eingebracht wurden. Dem fetalen Kälberserum kam dabei die Aufgabe zu, freie Proteinbindungsstellen abzublocken, um eventuell auftretende unspezifische Fehlbindungen der Antikörper zu unterdrücken (151).

Nach Ablauf der dreitägigen Inkubationszeit wurden jeweils 400µl des stimulierten Blutes mit 100µl der Färbelösung in ein 15ml-Polystyren-Falcon tube überführt, gut durchmischt und 30 Minuten in Raumtemperatur und Dunkelheit aufbewahrt.

Lyse der Erythrozyten: Anschließend erfolgte die Lyse der Erythrozyten mit 10ml hypotonem Lysierungspuffer (5,76g/l NH₄Cl, 25,8mg/l Na₂EDTA, 0,69g/l KHCO₃ in destilliertem Wasser). Nach einer Einwirkzeit von etwa fünf Minuten wurden die Proben für 8 Minuten mit 477g bei Raumtemperatur zentrifugiert und dann der Überstand abgesaugt.

Fixierung: Abschließend wurden die Pellets mit 4ml PBS gewaschen, erneut mit 477g für 6 Minuten bei 10°C zentrifugiert und dann nach Absaugen des Überstandes in 500µl einprozentiger Formalinlösung fixiert. Bis zur kurz darauf folgenden FACS-Messung wurden die Proben dunkel gelagert.

FACS-Messung: Zunächst wurde im FSC/SSC-Dot Plot ein Gate um die Lymphozytenpopulation gelegt. Die im Gate befindlichen Zellen wurden mit Hilfe des PerCP-CD3-Signals in T-Lymphozyten und andere Zellen unterschieden. Anschließend wurden in zwei weiteren Dot Plots die FITC-konjugierten CD25⁺- und die PE-konjugierten CD71⁺-Zellen von den nicht stimulierten T-Zellen unterschieden. Gemessen wurde bis zu einer Zahl von 5000 Ereignissen im erstgenannten Gate.

5.3.3.5. Der Proliferationsassay

Stimulation: Die Stimulation wurde analog zum Oberflächenmarker-Assay mit Con A durchgeführt. Jeweils 200µl Vollblut des Patienten wurden mit 1800µl RPMI in eine 24-Well-Platte eingebracht und mit 15µl der Con A-Stammlösung stimuliert. Die Inkubation erfolgte über 72 Stunden in einem Brutschrank mit 37°C und 5%-CO₂-Atmosphäre.

Lyse der Erythrozyten: Am Ende der Inkubationszeit wurden jeweils 800µl des stimulierten Blutes in ein 15ml-Polystyren-Röhrchen überführt und mit 10ml Lysierungspuffer (5,76g/l NH₄Cl, 25,8mg/l Na₂EDTA, 0,69g/l KHCO₃ in destilliertem Wasser) vermischt. Nach der etwa fünfminütigen Einwirkzeit wurde für 8 Minuten mit 477g bei Raumtemperatur zentrifugiert und der Überstand abgesaugt.

Fixierung: Im Anschluss wurden die Zellen mit 3ml PBS gewaschen, mit 477g für 6 Minuten bei 10°C zentrifugiert und nach dem Absaugen des Überstandes in 1ml einprozentiger Formalin-

lösung fixiert. Es folgte eine Pause von 5 Minuten, um das Formalin einwirken zu lassen. Diese Pause verbrachten die Proben genauso wie die folgenden Pausen auf Eis, da so die Fixierung langsamer und schonender erfolgte (151).

Permeabilisierung: Der Fixierung folgte ein weiterer Waschgang mit 2ml PBS, die Zentrifugation mit 477g für 6 Minuten bei 10°C und das Absaugen des Überstandes. Danach wurden 2ml Methanol vorsichtig zugegeben. Dabei stand die Eigenschaft von Methanol, Zellen zu permeabilisieren, im Vordergrund. Die ebenfalls durch Methanol vermittelte weitere Fixierung durch Dehydratation war ein erwünschter Nebeneffekt (151). Weitere 10 Minuten auf Eis in Dunkelheit schlossen sich an.

Färbung der Proliferationsmarker: Zur Färbung der Proliferationsmarker mussten folgende Reagenzien vorbereitet werden: 20mg RNase A wurden in 200µl destilliertem Wasser gelöst, zur Inaktivierung von möglicherweise vorhandener DNase auf 99°C über 10 Minuten erhitzt und nach dem Abkühlen mit 1800µl PBS verdünnt (RNase A-Stammlösung). 50mg Saponin wurden mit 500µl FCS in 49,5ml PBS gelöst (Perm Buffer). 1mg/ml des in doppelsträngige DNA interkalierenden Propidiumiodid (PI) wurde in destilliertem Wasser gelöst (PI-Stammlösung). Als Färbelösung wurden 107µl Perm Buffer mit 10µl RNase A-Stammlösung, 5µl PI-Stammlösung und 2,5µl FITC-markierten Antikörpern gegen das von proliferierenden Zellen obligat exprimierte PCNA, ein Hilfsprotein der DNA-Polymerase, angesetzt (158). Nach einem Waschgang mit 4ml PBS, Zentrifugation mit 477g für 6 Minuten bei 10°C und Absaugen des Überstandes wurden den Proben 125µl Färbelösung zugegeben und gut gemischt. 30 Minuten in einem abgedunkelten Wasserbad bei 37°C gaben den Färbemitteln Gelegenheit, sich mit ihren Zielstrukturen zu verbinden, und führten zur Rehydrierung der Zellen. Zudem ermöglichte das Wasserbad der RNase A den Abbau von noch in den Zellen vorhandenen RNA-Strängen, bevor sie sich mit PI verbinden und so das Messergebnis verfälschen konnten. Der Perm Buffer vollendete den zuvor durch die Zugabe von Methanol begonnenen Prozess der Permeabilisierung der Zellen. Im Anschluss an die Färbung wurden die Zellen noch einmal mit 4ml PBS gewaschen, mit 477g für 6 Minuten bei 10°C zentrifugiert und nach dem Absaugen des Überstandes in 500µl zuvor hergestellter einprozentiger PI-Lösung (1 ml PI-Stammlösung in 99 ml PBS) resuspendiert.

FACS-Messung: Zunächst wurde im FSC/SSC-Dot Plot ein Gate um die Lymphozytenpopulation gelegt. Die im Gate befindlichen Zellen wurden dann mit Hilfe eines Dot Plots, welches die zeitliche Breite auf der x-Achse und die über die Zeit integrierte Fläche des Fluoreszenzsignals beim Durchqueren des Laserstrahls auf der y-Achse abbildete, erneut mit einem Gate umgeben, um Doubletten, d.h. Partikel aus mehreren aneinander gehefteten Zellen, auszugrenzen. Ab-

schließlich wurde die Stärke des PI- und FITC-Signals in einem weiteren Dot Plot abgetragen und die Anzahl der PI- und PCNA-positiven Zellen bestimmt. Gemessen wurde bis zu einer Zahl von 3000 als einzelne Zellen erkannten Ereignissen im Gate zur Doublettenseparation.

5.3.4. Statistische Auswertung

Die Daten wurden mit der Statistik-Software SPSS statistisch analysiert. Je nach Skalenniveau der Daten wurden unterschiedliche statistische Tests zur Überprüfung der Signifikanz angewendet: Nichtmetrische Daten wurden in Kreuztabellen mit dem Chi-Quadrat-Test ausgewertet. Mittelwertvergleiche bei normalverteilten, unabhängigen Daten erfolgten durch den T-Test nach Student und die einfaktorielle ANOVA, bei abhängigen Daten kamen der T-Test bei gepaarten Stichproben und die einfache Varianzanalyse mit Messwiederholungen zum Einsatz. Mittelwertvergleiche nicht normalverteilter, unabhängiger Daten wurden mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests und des H-Tests nach Kruskal und Wallis durchgeführt, bei abhängigen Daten erfolgte die Analyse durch den Wilcoxon- und den Friedman-Test. Korrelationen normalverteilter Daten wurden durch den Rangkorrelationskoeffizienten nach Pearson, Korrelationen nicht normalverteilter Daten durch denjenigen nach Spearman-Rho ermittelt. Ein Signifikanzniveau kleiner 5% musste erreicht werden, um als statistisch signifikant angesehen zu werden. Der zeitliche Verlauf der untersuchten Parameter im gesamten Studienzeitraum wurde einheitlich als Boxplot dargestellt, nach der Randomisierung gruppiert nach Studienarm. Auch zur Beschreibung des Zusammenhangs zwischen den Parametern und klinischen outcomes wurden gruppierte Boxplots verwendet.

5.3.5. Modellierung von Kennzahlen zur Beschreibung der Immunsuppression

Zur Beschreibung des Effekts der immunsuppressiven Therapie nach der Nierentransplantation wurden verschiedene Variablen modelliert, die bei der Suche nach einem Zusammenhang mit dem klinischem *outcome* der Therapie eingesetzt werden konnten.

Ausgehend von den Werten der untersuchten Parameter in der Visite am Tag vor der Transplantation (V_0), wurde deren maximale Unterdrückung innerhalb der ersten 30 Tage nach Transplantation, also dem Zeitraum, in welchem die höchsten Dosierungen der Immunsuppressiva verabreicht wurden, als Maß für den Erfolg der Immunsuppression berechnet:

$$\text{maximale Suppression} = (V_0 - \text{Min}[V_{1-3}]) / V_0$$

Analog zu dem in der Pharmakokinetik weit verbreiteten Konzept der Berechnung der *Area under the curve* (AUC) anhand der Trapezoidalregel als Korrelat der Gesamtexposition des Patienten gegenüber einem Medikament wurde dann eine weitere Variable berechnet:

$$AUE_x = \{[(V_0+V_1)/2](Z_1-Z_0)+[(V_1+V_2)/2](Z_2-Z_1)... +[(V_{x-1}+V_x)/2](Z_x-Z_{x-1})\}/Z_x$$

Die von Barten (159) vorgeschlagene Bezeichnung der Variablen als „*area under the pharmacodynamic effect time curve*“ (AUE_x) wurde beibehalten. Die AUE ist ein Maß für die kumulierte Restaktivität der untersuchten Parameter im entsprechenden Zeitraum (Z_x-Z_{x-1}). Um eine Vergleichbarkeit verschiedener Zeiträume zu ermöglichen, wurde sie pro Tag angegeben. Ermittelt wurden die AUE_{30} , die AUE_{135} vor der Randomisierung, die AUE_{225} , die AUE_{365} und die AUE_{nR} für den Zeitraum der drei Monate nach der Randomisierung.

Die AUE_{30} bezieht sich ebenso wie die Variable der maximalen Suppression auf einen Zeitraum von 30 Tagen nach der Transplantation. Um eine Verzerrung der Ergebnisse durch fehlende Werte zu vermeiden, wurden zur Berechnung der AUE_{30} nur Datensätze herangezogen, die für den betrachteten Zeitraum (Visiten 0-3) vollständig waren. Zur Berechnung der AUE_{135} (vor der Randomisierung) wurden nur diejenigen Patienten ausgewertet, bei denen Werte der Visiten an Tag 4 oder an Tag 11 nach Transplantation und vom Zeitpunkt der Randomisierung verfügbar waren. Obwohl sich die AUE_{225} nur auf den Zeitraum bis zur vorletzten Studienvisite 7,5 Monate nach Studienbeginn bezieht (nur Datensätze wurden verwendet, für die eine AUE_{135} und Daten der Visite an Tag 225 vorlagen), ist sie diejenige Variable, die in der vorliegenden Arbeit für eine Aussage über den gesamten Studienzeitraum herangezogen werden musste, da die AUE_{365} wegen fehlender Daten nur für zu wenige Patienten berechnet werden konnte. Aus dem gleichen Grund bezieht sich die AUE_{nR} (nach Randomisierung) ebenfalls nur auf den Zeitraum bis zum Tag 225. Auf eine Darstellung der AUE_{365} wurde verzichtet.

Bereits mit der Berechnung der AUE für Zeiträume über die Wirkdauer eines Pharmakons hinaus wurde die enge Anlehnung an das ursprüngliche Konzept der AUC erweitert. Für die vorliegende Arbeit wurde darüber hinaus ein weiterer Parameter berechnet und als „*area above the curve*“ (AAC_x) bezeichnet, welcher die Unterdrückung der Vortransplantationswerte der entsprechenden Parameter durch die immunsuppressive Therapie im entsprechenden Zeitraum pro Tag angibt. Er wurde nach Normalisierung des Datensatzes anhand der Ausgangswerte der Parameter vor Transplantation mit folgender Formel berechnet:

$$AAC_X = 1 - AUE_X \text{ (normalisiert)}$$

Die AAC quantifiziert somit den kumulierten immunsuppressiven Effekt der Therapie im entsprechenden Zeitraum pro Tag, bezogen auf den Ausgangswert der Parameter vor der Transplantation. Die für die Berechnung der AUE verwendeten Kriterien wurden zur Berechnung der AAC unverändert übernommen, die AAC_{nR} bezieht sich ebenfalls lediglich auf die drei Monate nach der Randomisierung, auf eine Darstellung der AUE₃₆₅ wurde verzichtet.

Die folgende Tabelle gibt an, wie viele AUE und AAC jeweils für die einzelnen Parameter berechnet werden konnten.

Variable										
Parameter	AUE ₃₀	AUE ₁₂₅	AUE ₂₂₅	AUE ₃₆₅	AUE _{nR}	AAC ₃₀	AAC ₁₂₅	AAC ₂₂₅	AAC ₃₆₅	AAC _{nR}
IMPDH	36	41	22	5	26	36	36	21	5	24
Proliferation	37	45	22	4	26	37	40	21	4	25
CD25	39	46	23	5	26	39	41	22	5	25
CD71	37	46	23	5	26	37	41	22	5	25
IL-2	32	43	20	5	26	32	33	17	3	21
TNF- α	33	43	20	5	26	33	33	17	3	21

AUE = Area under the pharmacodynamic effect time curve, AAC = Area above the curve, nR = nach Randomisierung

Tabelle 1: Fallzahl der berechneten Variablen

Weiterhin wurde der zeitlichen Begrenzung der klinischen Ereignisse Infektion und Rejektion Rechnung getragen, indem diese den Visiterterminen zugeordnet wurden.

Die pharmakodynamischen Daten, die innerhalb einer Woche vor dem Termin der Biopsie bei Patienten, die eine biopsisch gesicherte Abstoßung aufwiesen, erhoben worden waren, wurden dem klinischen Ereignis Abstoßung zugeordnet.

Daten, die während der in den *case report files* der Zeus-Studie angegebenen Zeiträume von Infektionserkrankungen für die jeweiligen Patienten erhoben wurden, wurden dem klinischen Ereignis Infektion zugeordnet.

Anschließend wurden die den Ereignissen zugeordneten Daten der Patienten mit den Daten der Patienten, die ereignisfrei geblieben waren, verglichen.

6. *Ergebnisse*

6.1. *Demographische Daten*

Im Rahmen der pharmakodynamischen Substudie zur ZEUS-Studie wurden 79 Patienten an den beiden Standorten Charité Campus Mitte (CCM, N=45) und Campus Virchow-Klinikum (CVK, N=34) eingeschlossen. Bis zum Studienende hatten 11 Patienten (4 CCM, 7 CVK) ihr Einverständnis zur weiteren Teilnahme widerrufen. Daten dieser Patienten wurden ab dem Zeitpunkt des Widerrufs nicht mehr erhoben. Acht Patienten nahmen ihre Einverständniserklärung vor dem Zeitpunkt der Randomisierung zurück, weshalb diese nicht mehr erfolgte. Bei zwei Patienten erfolgte keine Randomisierung wegen Proteinurie >1g/Tag zum jeweiligen Zeitpunkt. Acht Patienten konnten nicht randomisiert werden, da sie das Studienprotokoll verletzende Immunsuppressiva erhielten (fünf Patienten erhielten Tacrolimus, drei Patienten Sirolimus und zwei Patienten OKT-3). Zwei Patienten wurden wegen Transplantatverlustes nicht mehr randomisiert.

Daraus ergibt sich eine Einteilung der 79 Patienten in drei Gruppen: Cyclosporin-Gruppe (CyA, N=31), Everolimus-Gruppe (EVA, N=29) und „Nicht-Randomisierte“ (N=19).

Nach der Randomisierung erhielten drei Patienten das Studienprotokoll verletzende Immunsuppressiva (zweimal OKT3, einmal Tacrolimus), bei einem weiteren Patienten wurde die Mycophenolsäure entgegen den Bestimmungen des Studienprotokolls zeitweise vollständig pausiert. Eine Patientin wurde nach Umstellung auf Everolimus wieder zurück auf Cyclosporin umgestellt. Die Daten dieser Patienten wurden jeweils ab dem Zeitpunkt der Protokollverletzung nicht mehr berücksichtigt. Fünf Patienten hatten bereits zum Zeitpunkt der Probenabnahme vor der Transplantation Immunsuppressiva eingenommen (viermal die Studienmedikation, in einem Fall Tacrolimus und MMF), die Vortransplantationsdaten dieser Patienten wurden nicht verwendet.

Die demographischen Daten der in die Studie eingeschlossenen Patienten sind in folgender Tabelle dargestellt. Bis auf eine signifikant schlechtere Primärfunktion des Transplantats in der Gruppe der nicht randomisierten Patienten ($p=0,036$) ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Gruppen.

	Cyclosporin	Everolimus	Keine Randomisierung	Gesamt
Patientenzahl	31	29	19	79
davon weiblich (%)	16 (52%)	11 (38%)	8 (42%)	35 (44%)
Empfängeralter ¹	44,7 ± 10,9	46,1 ± 11,5	46,1 ± 11,5	45,9 ± 10,7
Spenderalter ¹	47,7 ± 11,0	44,3 ± 12,5	44,3 ± 12,5	45,8 ± 12,2
Anteil Lebendspende (%)	10 (32%)	9 (31%)	5 (26%)	24 (30%)
Anteil Zweittransplantation (%)	2 (7%)	1 (4%)	2 (11%)	5 (6%)
Dialyseverfahren				
• präemptiv (%)	1 (3%)	4 (14%)	1 (5%)	6 (8%)
• Hämodialyse (%)	27 (87%)	22 (76%)	18 (85%)	67 (85%)
• CAPD (%)	3 (10%)	3 (10%)	0	6 (8%)
Dialysedauer in Jahren ¹	5,0 ± 3,2	3,7 ± 3,0	3,7 ± 3,0	4,9 ± 3,5
Grunderkrankung				
• GN (%)	14 (45%)	12 (41%)	5 (26%)	31 (39%)
• Zystennieren (%)	5 (16%)	4 (14%)	6 (32%)	15 (19%)
• Pyelonephritis (%)	1 (3%)	7 (24%)	2 (11%)	10 (13%)
• Urologische Erkrankung (%)	2 (6,5%)	2 (7%)	1 (5%)	5 (6%)
• Stoffwechselerkrankung (%)	3 (10%)	0	1 (5%)	4 (5%)
• Hypertensive Nephropathie (%)	2 (6,5%)	2 (7%)	0	4 (5%)
• Interstitielle Nephritis (%)	1 (3%)	1 (3,5%)	1 (5%)	3 (4%)
• HUS (%)	0	0	3 (16%)	3 (4%)
• Nicht bekannt (%)	3 (10%)	1 (3,5%)	0	4 (5%)
missmatch broad ¹	2,9 ± 1,7	2,8 ± 1,6	2,8 ± 1,6	2,8 ± 1,6
Primärfunktion (%)	23 (74%)	22 (79%)	8 (44%)	53 (69%)
Warme Ischämie ¹	3,6 ± 13,8	0,5 ± 0,8	0,5 ± 0,8	2,2 ± 9,4
Gemischte Ischämie ¹	44,4 ± 18,5	46,1 ± 15,7	46,1 ± 15,7	45,1 ± 17,5
Kalte Ischämie ¹	9,6 ± 6,2	9,8 ± 6,6	9,8 ± 6,6	9,7 ± 6,0
¹ Mittelwert ± Standardabweichung Berechnung der Unterschiede zwischen den Gruppen mit dem Chi-Quadrat-Test				

Tabelle 2: Demographische Daten der in die Studie eingeschlossen Patienten

6.2. Pharmakokinetik

An den jeweiligen Visiterminen während des Untersuchungszeitraumes wurden bei allen Patienten im jeweiligen Studienarm morgens die Talspiegel von Cyclosporin A und Everolimus gemessen, zudem die Talspiegel der Mycophenolsäure. Die Werte der pharmakodynamischen Parameter wurden aus dem Blut der gleichen Blutabnahmen gewonnen. Die korrespondierenden Medikamentendosen, auf die im Folgenden Bezug genommen wird, sind diejenigen des Vortages.

Die Tabellen zeigen die Medikamentendosen der Gesamtheit der Patienten, der Cyclosporin-Gruppe, der auf Everolimus umgestellten Patienten und der nicht randomisierten Patienten zum jeweiligen Visitermin. Da Everolimus nur im entsprechenden Studienarm verabreicht wurde, wird bei den Dosierungen von Everolimus nur dieser dargestellt.

Dosierung von Cyclosporin A am Vortag (mg/Tag)										
Visite		1	2	3	4	5	5.1	6	7	8
CyA ¹	CyA	524 ± 143	476 ± 120	329 ± 83	252 ± 67	233 ± 60	225 ± 61	219 ± 54	211 ± 52	200 ± 48
	EVA	528 ± 175	479 ± 140	332 ± 90	264 ± 52	243 ± 56	123 ± 50	0	0	0
	n.R.	473 ± 144	466 ± 194	390 ± 153	279 ± 77	252 ± 105	-	-	-	-
	Alle	514 ± 156	475 ± 143	340 ± 100	260 ± 62	239 ± 61	178 ± 79	124 ± 120	115 ± 115	109 ± 108
CyA = Cyclosporin A (-Gruppe); EVA = Everolimusgruppe; n.R. = nicht randomisiert ; ¹ Mittelwert ± Standardabweichung										

Tabelle 3: Vortagesdosis von Cyclosporin A

Dosierung von Everolimus am Vortag (mg/Tag)										
Visite		1 ⁴	2	3	4	5	5.1	6	7	8
EVA ¹	EVA ²	0	0	0	0	0	1,5 ± 0,7	3,0 ± 1,1	2,9 ± 1,0	2,8 ± 1,0
EVA = Everolimus (-Gruppe), ¹ Mittelwert ± Standardabweichung ² kein Patient der Cyclosporin-Gruppe und kein nicht randomisierter Patient erhielt im Verlauf Everolimus										

Tabelle 4: Vortagesdosis von Everolimus

Dosierung der Mycophenolsäure am Vortag (mg/Tag)										
Visite		1 ⁴	2	3	4	5	5.1	6	7	8
EC-MPS ¹	CyA	1440 ± 0 (0/0)	1428 ± 67 (1/360)	1428 ± 66 (1/360)	1344 ± 266 (4/720)	1320 ± 273 (6/600)	1302 ± 274 (7/591)	1266 ± 322 (8/653)	1198 ± 373 (10/702)	1204 ± 364 (10/684)
	EVA	1440 ± 0 (0/0)	1402 ± 147 (2/540)	1365 ± 295 (2/1080)	1303 ± 279 (6/660)	1260 ± 373 (6/840)	1303 ± 279 (6/660)	1221 ± 330 (9/680)	1149 ± 338 (12/630)	1163 ± 342 (11/655)
	n.R.	1398 ± 175 (1/720)	1311 ± 389 (2/900)	1375 ± 217 (1/720)	1260 ± 333 (2/720)	1080 ± 416 (2/720)	-	-	-	-
	Alle	1431 ± 83 (1/720)	1395 ± 200 (5/648)	1394 ± 212 (4/810)	1316 ± 277 (12/690)	1277 ± 330 (14/720)	1307 ± 271 (13/623)	1248 ± 322 (17/667)	1173 ± 352 (23/650)	1176 ± 350 (22/671)
EC-MPS = Enteric coated Mycophenolate Sodium; CyA = Cyclosporin A (-Gruppe); EVA = Everolimus (-Gruppe); n.R. = nicht randomisiert ; ¹ Mittelwert ± Standardabweichung (Zahl der Patienten mit Dosisreduktion gegenüber dem Standardwert von 1440mg/d / durchschnittliches Volumen der Reduktion)										

Tabelle 5: Vortagesdosis der Mycophenolsäure

Dosierung von Methylprednisolon am Vortag (mg/Tag)										
Visite		1	2	3	4	5	5.1	6	7	8
MP ¹	CyA	80 (210) / 0	32 (274) / 0	20 (20) / 0	8 (12) / 0	4 (8) / 0	4 (496) / 1	4 (2) / 0	4 (0) / 0	4 (0) / 0
	EVA	80 (85) / 0	40 (44) / 0	20 (496) / 1	8 (12) / 0	4 (8) / 0	4 (496) / 1	4 (0) / 0	4 (0) / 0	4 (496) / 1
	n.R.	80 (110) / 0	32 (40) / 0	16 (20) / 0	6 (12) / 0	4 (12) / 0	-	-	-	-
	Alle	80 (210) / 0	32 (290) / 0	18 (496) / 1	8 (12) / 0	4 (12) / 0	4 (496) / 2	4 (2) / 0	4 (0) / 0	4 (496) / 1
MP = Methylprednisolon; CyA = Cyclosporin A-Gruppe; EVA = Everolimusgruppe; n.R. = nicht randomisiert ; ¹ Median (Spannweite) / Zahl der Patienten mit MP-Stoßtherapie zum Visitenzeitpunkt										

Tabelle 6: Vortagesdosis von Methylprednisolon

Signifikante Unterschiede zwischen den Studienarmen in bezug auf die Dosierung der immunsuppressiven Comedikation mit EC-MPS und Methylprednisolon traten nicht auf. Insbesondere die wegen klinisch nicht vertretbaren Nebenwirkungen notwendigen Dosisreduktionen von EC-MPS waren in Bezug auf Zeitpunkt und Volumen der Reduktion nicht signifikant unterschied-

lich. Auch lag vor der Randomisierung kein signifikanter Unterschied in der Dosierung von Cyclosporin A zwischen dem Cyclosporin- und dem Everolimusarm vor.

Die Tabelle stellt die durchschnittlichen Talspiegel von Cyclosporin A und Everolimus in den einzelnen Studienarmen dar. Bis zur Randomisierung bestand kein signifikanter Unterschied zwischen den Talspiegeln von Cyclosporin A der verschiedenen Studienarme.

Talspiegel der immunsuppressiven Medikamente (ng/ml)										
Visite		1	2	3	4	5	5.1	6	7	8
CyA	CyA	162 ± 49	224 ± 72	176 ± 54	141 ± 37	141 ± 60	114 ± 25	123 ± 45	112 ± 23	95 ± 25
EVA	CyA	175 ± 60	261 ± 68	232 ± 244	135 ± 33	146 ± 77	77 ± 57	0	0	0
	EVA	0	0	0	0	0	5,3 ± 2,4	6,9 ± 4,7	6,1 ± 1,9	5,6 ± 1,3
n.R.	CyA	172 ± 73	197 ± 53	185 ± 53	151 ± 36	128 ± 63	-	-	-	-

CyA = Cyclosporin A (-Gruppe); EVA = Everolimus (-Gruppe); n.R. = nicht randomisiert;
dargestellt sind Mittelwert ± Standardabweichung

Tabelle 7: Talspiegel der Immunsuppressiva am Untersuchungstag

Die folgenden Abbildungen zeigen die Korrelationen zwischen der Vortagesdosierung von Everolimus und Cyclosporin A und dem Talspiegel des Medikaments auf.

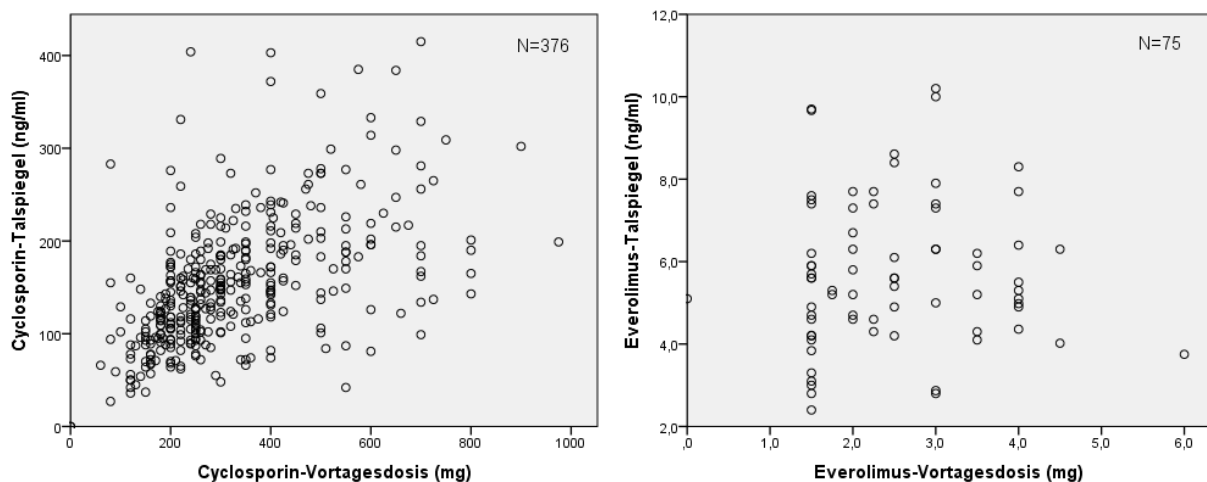


Abbildung 2: Verhältnis von Cyclosporin A- und Everolimus-Vortagesdosis und -Talspiegel

Es konnte keine signifikante Korrelation zwischen Vortagesdosis und Talspiegel von Everolimus beobachtet werden. Für Cyclosporin A lag eine signifikante Korrelation mittlerer Stärke zwischen Vortagesdosis und morgendlichem Talspiegel vor ($r=0,59$, $p<0,001$).

Bei der Mycophenolsäure konnte ein wenn auch nicht starker, so doch signifikanter Zusammenhang zwischen der Vortagesdosierung und dem morgendlichen Talspiegel beobachtet werden ($r=0,39$, $p<0,001$). Folgende Abbildung zeigt die Vortagesdosis von EC-MPS und den MPA-Talspiegel.

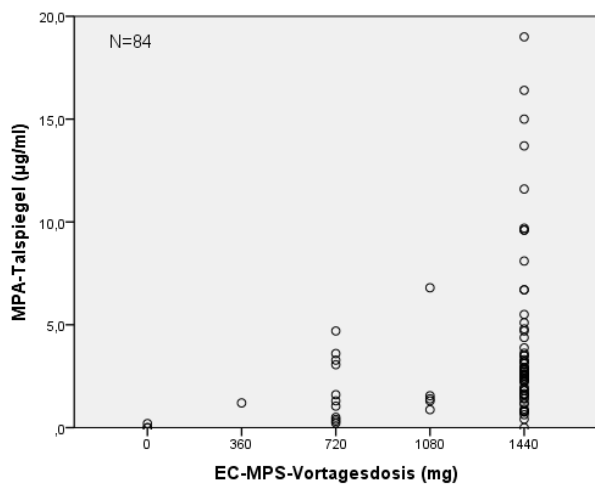


Abbildung 3: Verhältnis von EC-MPS-Vortagesdosis und MPA-Talspiegel

6.3. *Pharmakokinetik und Pharmakodynamik*

6.3.1. *Der Zusammenhang zwischen Dosis und Talspiegel von Cyclosporin A und den pharmakodynamischen Parametern*

Auch wenn die Aktivität der unspezifischen pharmakodynamischen Parameter das Resultat verschiedener Einflussfaktoren darstellt, ist der Zusammenhang mit den pharmakokinetischen Daten von besonderem Interesse. Die folgenden Abbildungen geben den Zusammenhang des Cyclosporin-Talspiegels mit den Messwerten der FACS-Parameter und der IMPDH-Aktivität wieder.

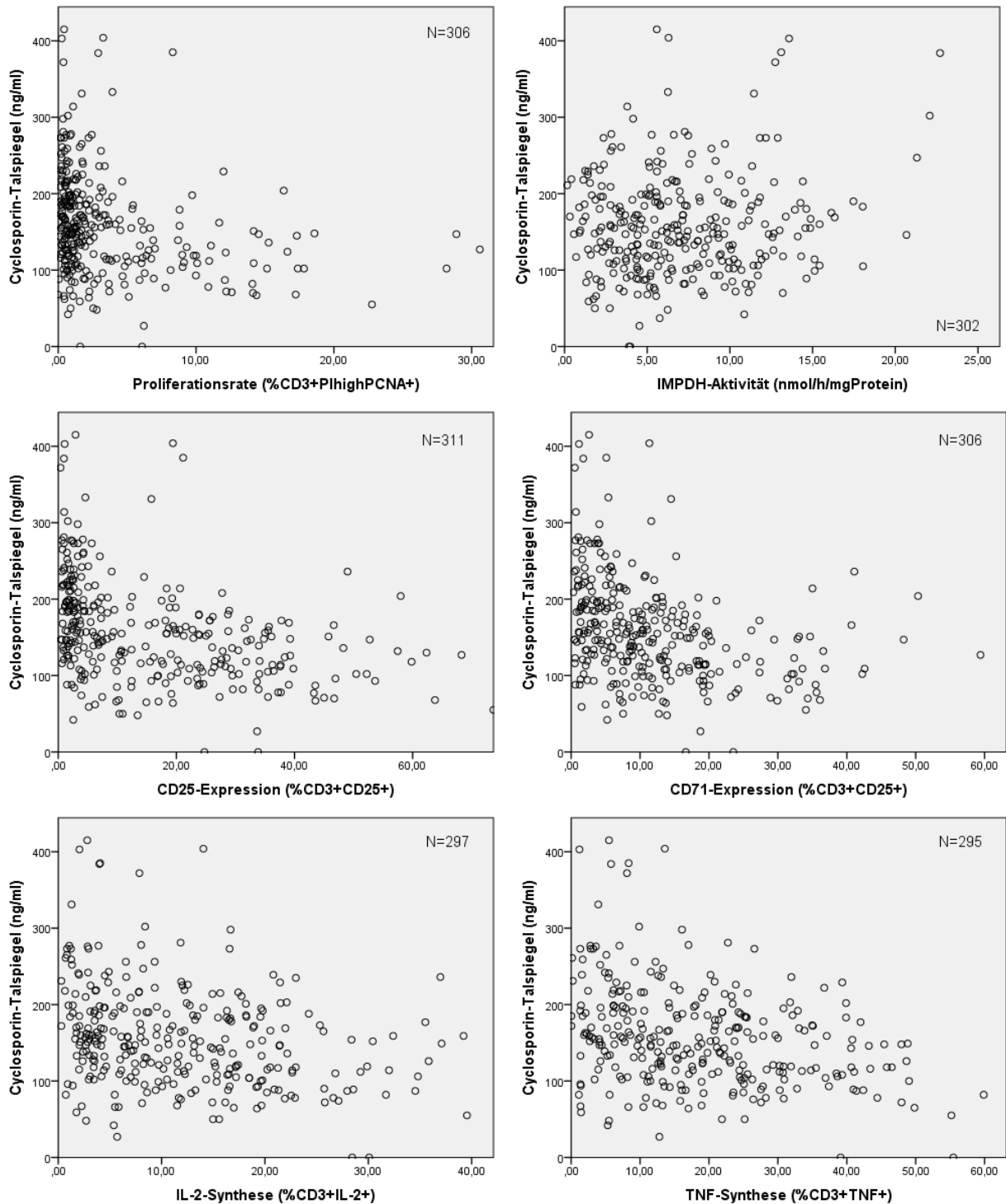


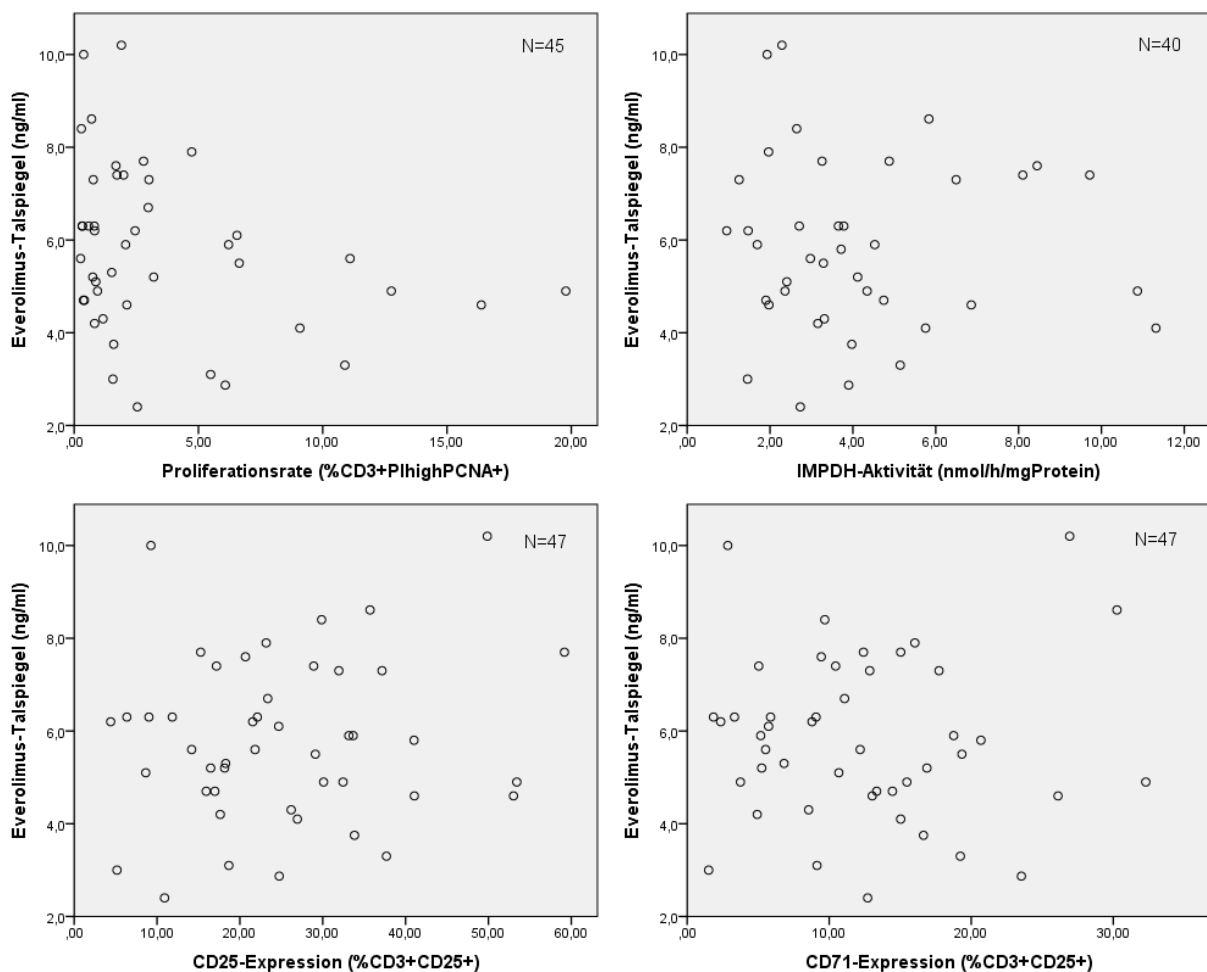
Abbildung 4: Verhältnis der pharmakodynamischen Parameter zum Cyclosporin A-Talspiegel

Signifikante, aber wenig ausgeprägte Korrelationen bestanden zwischen dem Cyclosporin-Talspiegel und der Expression der Oberflächenmarker CD25 ($r=0,49$) und CD71 ($r=0,43$) sowie der Proliferationsrate ($r=0,34$) und der Synthese von IL-2 ($r=0,30$) und TNF- α ($r=0,32$, jeweils $p<0,001$). Die Aktivität der IMPDH war nicht mit dem Cyclosporinspiegel korreliert.

Darüber hinaus bestanden signifikante Korrelationen der Cyclosporin-Vortagesdosis mit der Expression von CD25 ($r=0,63$) und CD71 ($r=0,43$) und der Proliferationsrate ($r=0,46$, jeweils $p<0,001$). Die signifikanten Korrelationen mit der Zytokinsynthese waren sehr schwach, mit der IMPDH-Aktivität bestand kein Zusammenhang.

6.3.2. *Der Zusammenhang zwischen Dosis und Talspiegel von Everolimus und den pharmakodynamischen Parametern*

Folgende Abbildungen stellen den Zusammenhang des Everolimus-Talspiegels mit ausgewählten Messwerten der FACS-Parameter und der IMPDH-Aktivität wieder. Eine signifikante Korrelation des Talspiegels lag nur mit der Proliferationsrate vor ($r=0,30$, $p=0,04$). Es bestand kein Zusammenhang zwischen der Vortagesdosierung von Everolimus und den pharmakodynamischen Parametern.



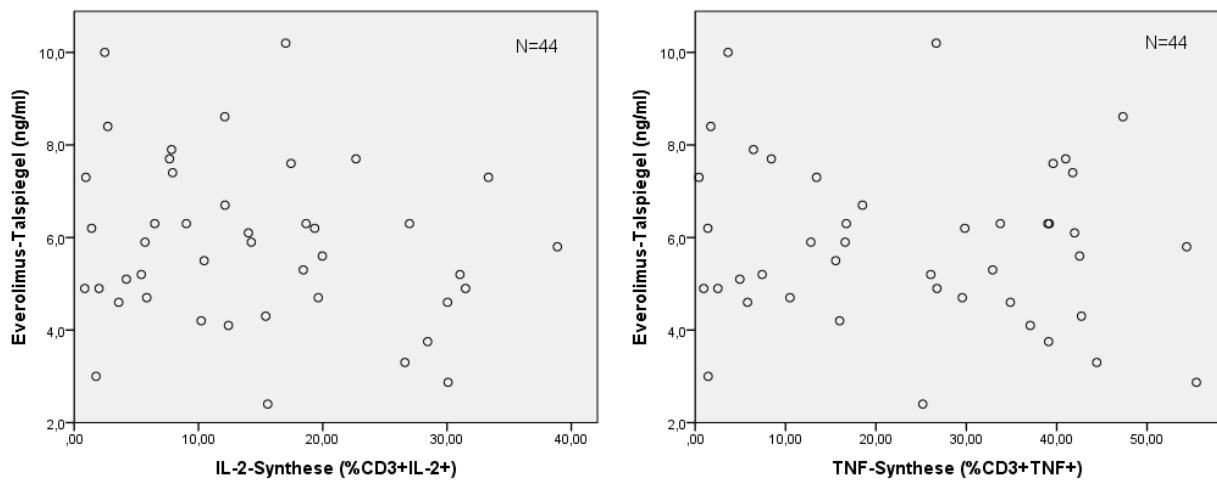
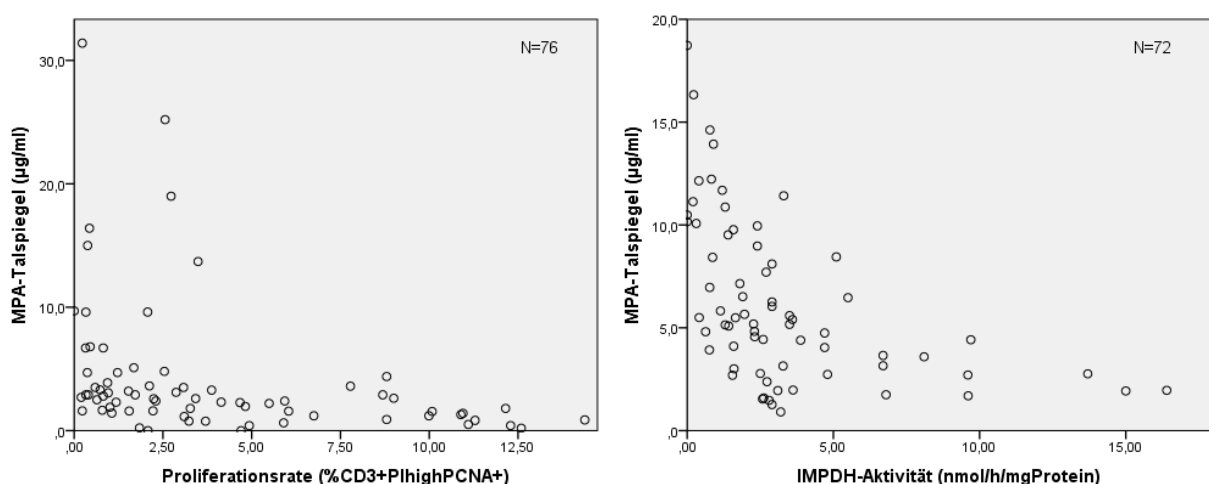


Abbildung 5: Verhältnis der pharmakodynamischen Parameter zum Everolimus-Talspiegel

6.3.3. Der Zusammenhang zwischen EC-MPS Dosis und MPA-Talspiegel und den pharmakodynamischen Parametern

Da die Aktivität des Enzyms IMPDH einen spezifischen pharmakodynamischen Parameter darstellt, ist der Zusammenhang zwischen den gegebenen EC-MPS-Dosen, den erreichten Mycophenolsäurespiegeln und der Hemmung der Enzymaktivität von besonderem Interesse. Die folgenden Abbildungen zeigen die Korrelation zwischen dem MPA-Spiegel und den untersuchten Parametern dar. Die stärkste Korrelation war diejenige mit der Proliferationsrate ($r=0,56$), gefolgt von derjenigen mit der Enzymaktivität der IMPDH ($r=0,54$). Auch zwischen dem MPA-Talspiegel und der CD71-Expression ($r=0,40$, alle $p<0,001$) und deutlich schwächer der CD25-Expression ($r=0,28$, $p=0,016$) fanden sich signifikante Korrelationen, nicht hingegen zwischen dem MPA-Spiegel und der Zytokinsynthese.



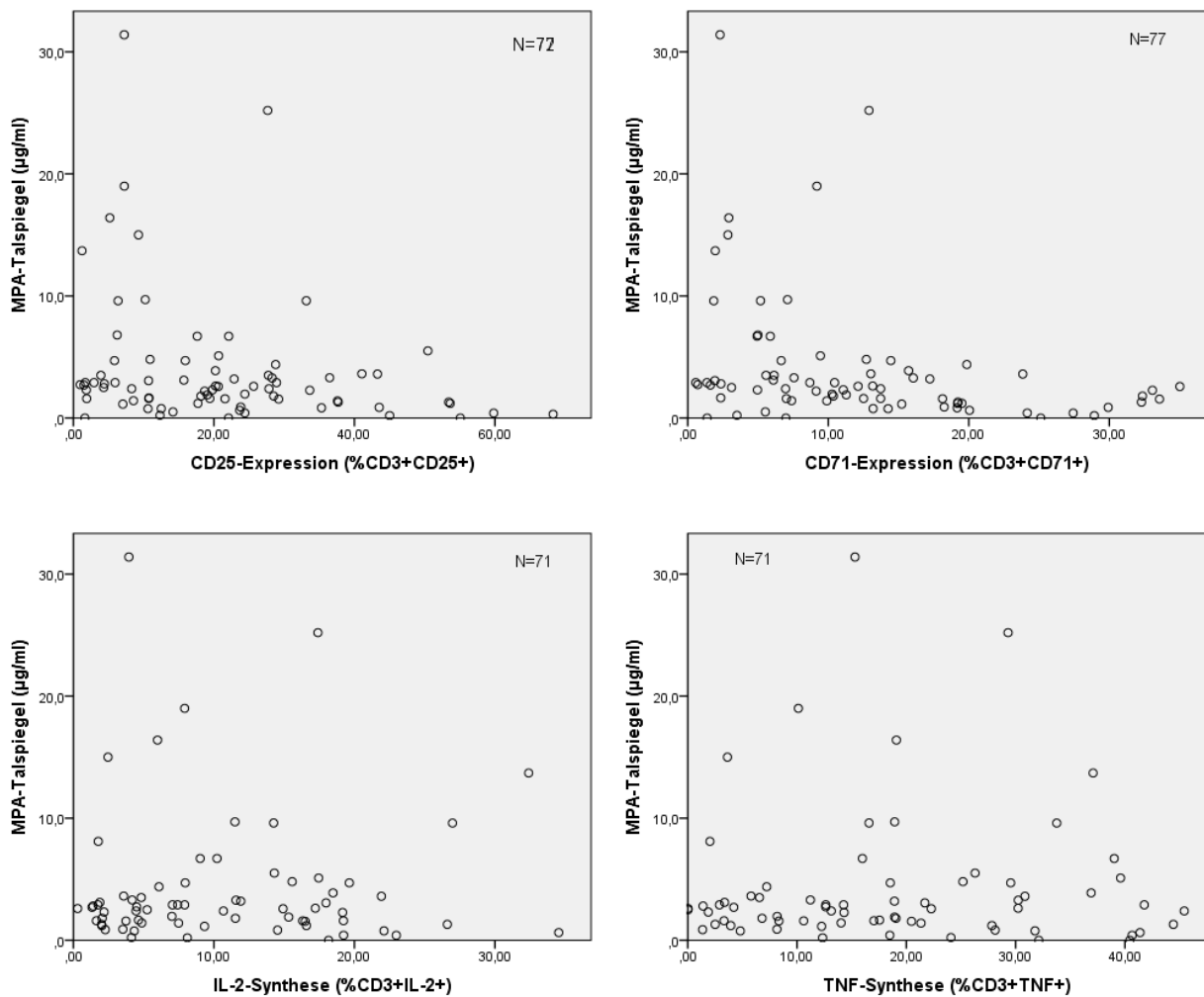


Abbildung 6: Verhältnis der pharmakodynamischen Parameter zum MPA-Talspiegel

Eine signifikante Korrelation bestand zudem zwischen der EC-MPS-Vortagesdosis und der IMPDH-Aktivität ($r=0,34$) und vor allem der Proliferationsrate ($r=0,52$) und der Expression der Oberflächenmarker CD25 ($r=0,49$) und CD71 ($r=0,44$, jeweils $p<0,001$). Zur Zytokinsynthese bestand lediglich eine geringe, wenn auch signifikante Korrelation.

6.3.4. Methylprednisolon und die pharmakodynamischen Parameter

Die Vortagesdosen von Methylprednisolon waren signifikant ($p<0,001$) mit allen pharmakodynamischen Parametern korreliert. Ausgeprägt war diese Korrelation bei den Oberflächenmarkern CD25 ($r=0,73$), CD71 ($r=0,56$) und der Proliferationsrate ($r=0,58$), schwach hingegen bei der Zytokinsynthese und der IMPDH-Aktivität.

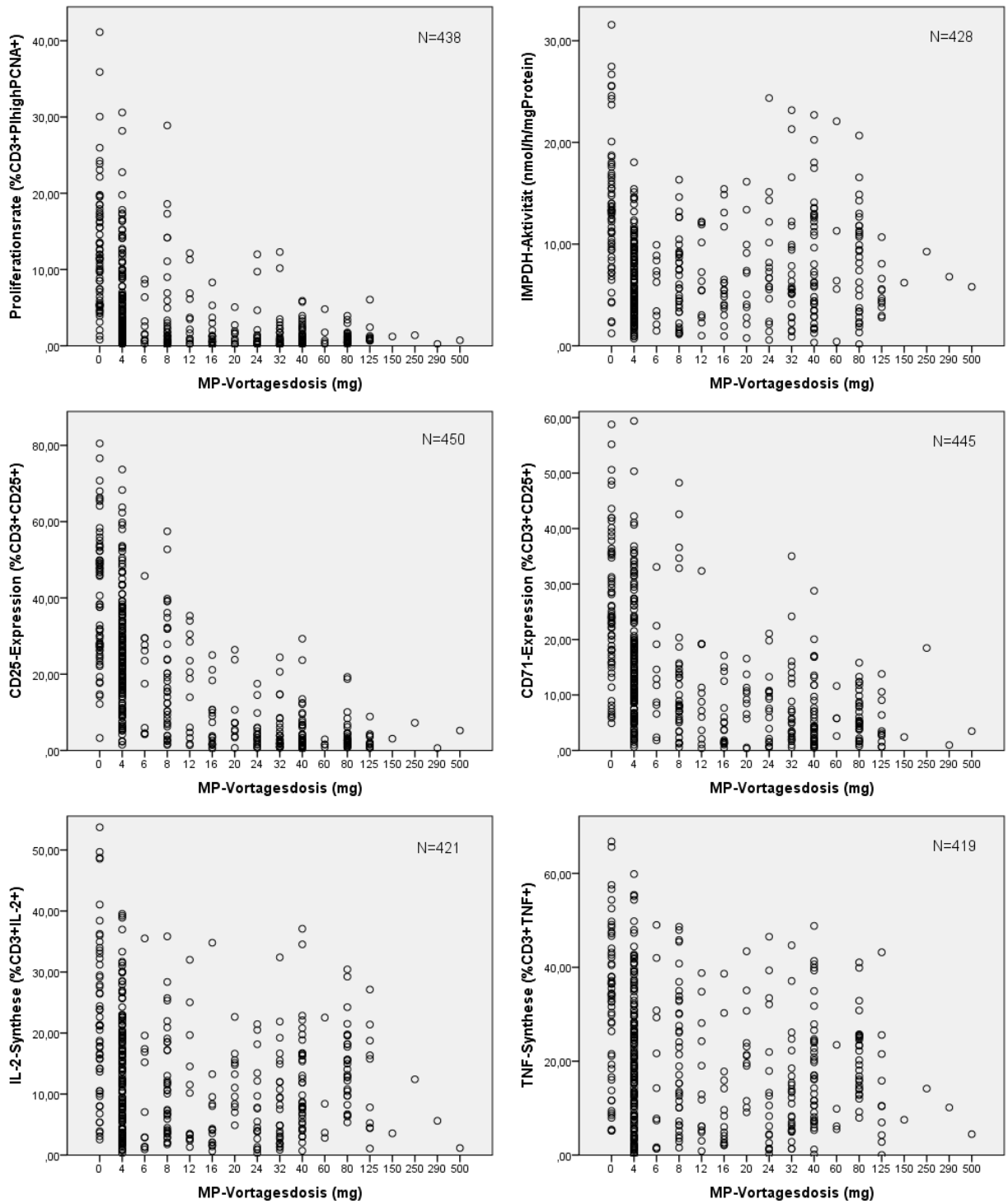


Abbildung 7: Verhältnis der pharmakodynamischen Parameter zur Methylprednisolon-Vortagesdosis

6.4. Die Korrelationen unter den pharmakodynamischen Parametern

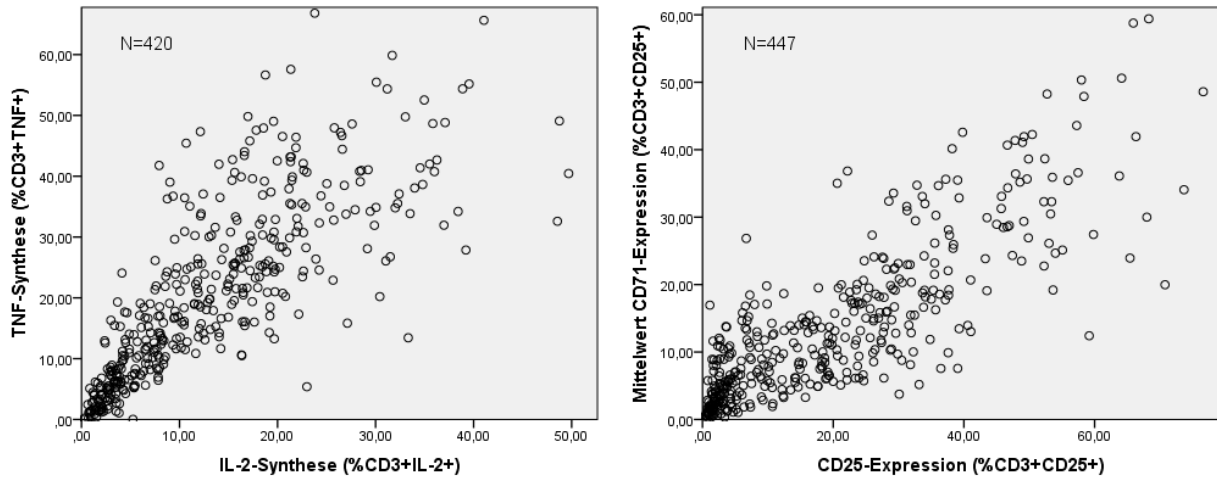


Abbildung 8: Verhältnis der Synthese der beiden untersuchten Cytokine und der Expression der beiden untersuchten Oberflächenmarker zueinander

Eine hohe Korrelation wiesen die Zytokine IL-2 und TNF- α auf ($r=0,86$), gefolgt von den Oberflächenmarkern CD25 und CD71 ($r=0,82$).

Die Oberflächenmarker wiesen auch eine mittlere Korrelation mit der Proliferationsrate aus ($r=0,72$ für CD25 und $r=0,69$ für CD71), während die Zytokine mit dieser nur schwach korreliert waren. Eine starke Korrelation der IMPDH-Aktivität mit der Proliferationsrate ($r=0,32$) konnte nicht nachgewiesen werden. Alle Korrelationen waren signifikant ($p<0,001$).

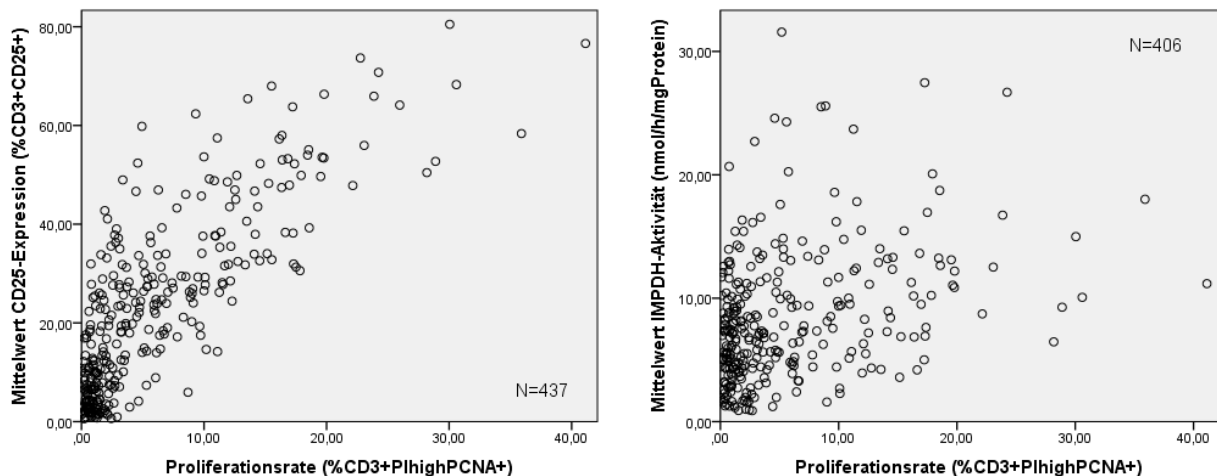


Abbildung 9: Verhältnis der CD25-Expression und der IMPDH-Aktivität zur Proliferationsrate

6.5. Die Beschreibung der immunsuppressiven Therapie durch die gemessenen Parameter bis zum Zeitpunkt der Randomisierung

6.5.1. Die Ausgangswerte der untersuchten Parameter vor der Transplantation

Vor Beginn der immunsuppressiven Therapie zum Zeitpunkt der Transplantation wiesen die gemessenen Biomarker der untersuchten Patienten beträchtliche interindividuelle Unterschiede auf, wobei die Variabilität der Werte bei Proliferationsrate und IL-2-Synthese am höchsten, bei der Expression von CD25 und der IMPDH-Aktivität am niedrigsten ausfiel.

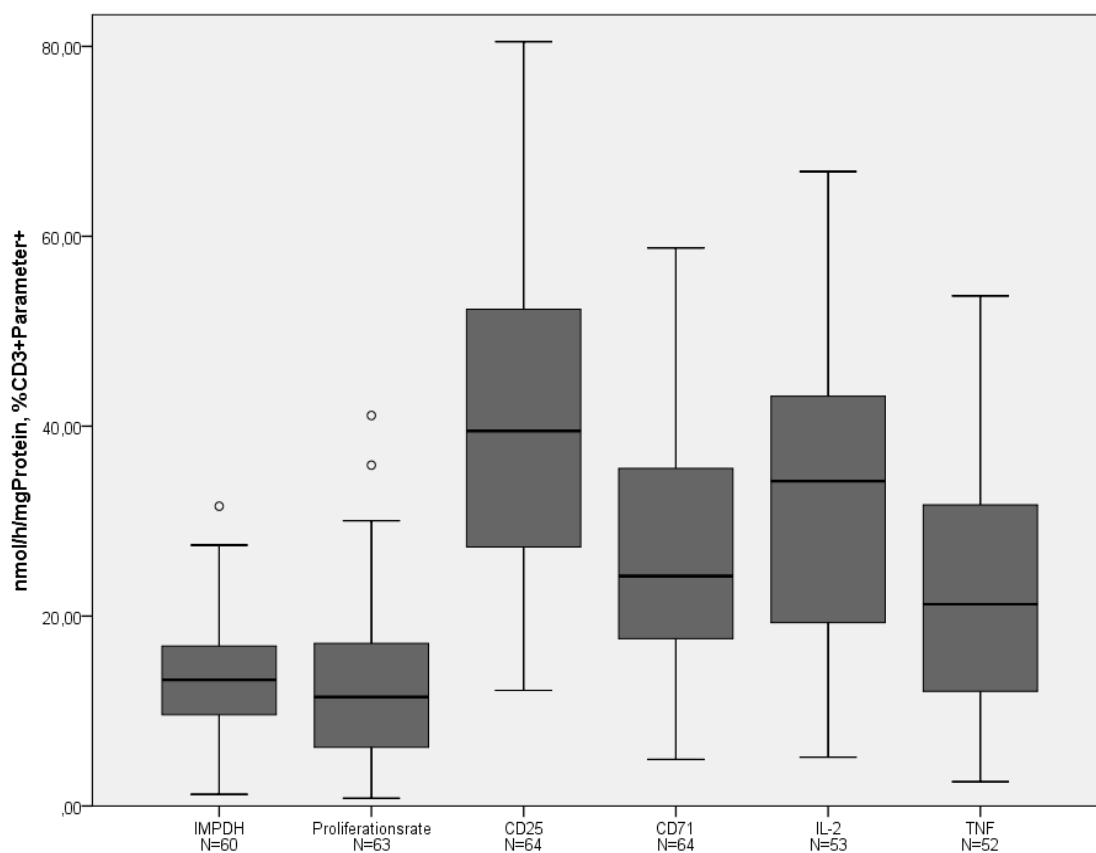


Abbildung 10: Die Ausgangswerte der untersuchten Parameter vor der Transplantation

Es bestand eine hohe Korrelation der Oberflächenmarker untereinander ($r=0,80$) und der Oberflächenmarker mit der Proliferationsrate ($r=0,77$ für CD25, $r=0,73$ für CD71). Auch zwischen der Synthese von IL-2 und TNF- α bestand eine mittlere Korrelation ($r=0,64$, jeweils $p<0,001$). Die IMPDH-Aktivität und die Proliferationsrate waren nicht korreliert.

Ausgangswerte vor Transplantation							
Parameter	N	Minimum	Maximum	Mittelwert	SD	SEM	CV
IMPDH	60	1,23	31,57	13,79	6,5	0,8	47,5
Proliferation	63	0,81	41,13	12,83	8,0	1,0	62,5
CD25	64	12,18	80,49	40,89	16,6	2,1	40,6
CD71	64	4,90	58,77	26,35	12,7	1,6	48,0
IL-2	53	2,55	53,72	22,52	13,0	1,8	49,4
TNF- α	52	5,14	66,82	32,61	16,1	2,2	57,9

N = Fallzahl, SD = Standardabweichung, SEM = Standardfehler, CV = Variationskoeffizient

Tabelle 8: Deskriptive Statistik der Ausgangswerte vor Transplantation

Eine Dialysetherapie vor der Transplantation wirkte sich nicht signifikant auf die Werte der pharmakodynamischen Parameter vor der Transplantation aus.

Die IMPDH-Aktivität der Dialysepatienten betrug $13,8 \pm 6,6$ nmol/h/mg Protein, diejenige der präemptiv transplantierten Patienten $13,4 \pm 0,4$ nmol/h/mg Protein. Die Proliferationsrate der Patienten, welche vor der Transplantation dialysepflichtig waren, war niedriger ($12,5\% \pm 8,2\%$) als der Anteil der proliferationsfähigen T-Zellen bei den präemptiv transplantierten Patienten ($15,8\% \pm 3,4\%$). Die Expression der Oberflächenmarker CD25 und CD71 war bei den dialysepflichtigen Patienten ebenfalls niedriger ($40,1\% \pm 16,6\%$ für CD25 und $26,1\% \pm 13\%$ für CD71) als bei nicht dialysepflichtigen Patienten ($52,3\% \pm 12,2\%$ für CD25 und $30,5\% \pm 4\%$ für CD71). Bei den vor der Transplantation dialysepflichtigen Patienten betrug die IL-2-Syntheserate $32,7\% \pm 16,2\%$, die TNF- α -Synthese betrug $22,8\% \pm 13,3\%$. Etwas niedriger waren die Werte bei den präemptiv Transplantierten, der Anteil IL-2-synthetisierender T-Zellen betrug $30,9\% \pm 15,1\%$, für die TNF- α -Synthese beliefen sich die entsprechenden Werte auf $18,4\% \pm 9\%$. Die Dauer der Dialysetherapie wirkte sich nicht signifikant auf einen der pharmakodynamischen Parameter aus. Zwischen dem Alter der Patienten und der Proliferationsrate ($r=0,27$, $p=0,034$) sowie der CD71-Expression ($r=0,30$, $p=0,016$) fanden sich signifikante, aber nur geringe Korrelationen. Die Parameter IMPDH, TNF- α , CD25 und IL-2 waren nicht signifikant mit dem Alter korreliert. Es bestand keine Korrelation zwischen dem Geschlecht oder der Grunderkrankung der Patienten und einem der pharmakodynamischen Parameter.

Auch waren die Vortransplantationswerte der Patienten, die ein Transplantat von einem Lebendspender erhielten, von denjenigen, die ein postmortal transplantiertes Organ erhielten, vergleichbar.

6.5.2. Enzymaktivität: IMPDH

Die folgende Abbildung zeigt den Verlauf der gemessenen IMPDH-Aktivität im Zeitablauf bis zum Tag der Randomisierung. Deutlich ist die Reduktion der Enzymaktivität nach dem Einsetzen der immunsuppressiven Therapie zu erkennen. Die Reduktion der Aktivität, sowohl von vor der Transplantation bis zur ersten Visite als auch im gesamten Zeitablauf bis zur Randomisierung, ist statistisch signifikant ($p < 0,001$).

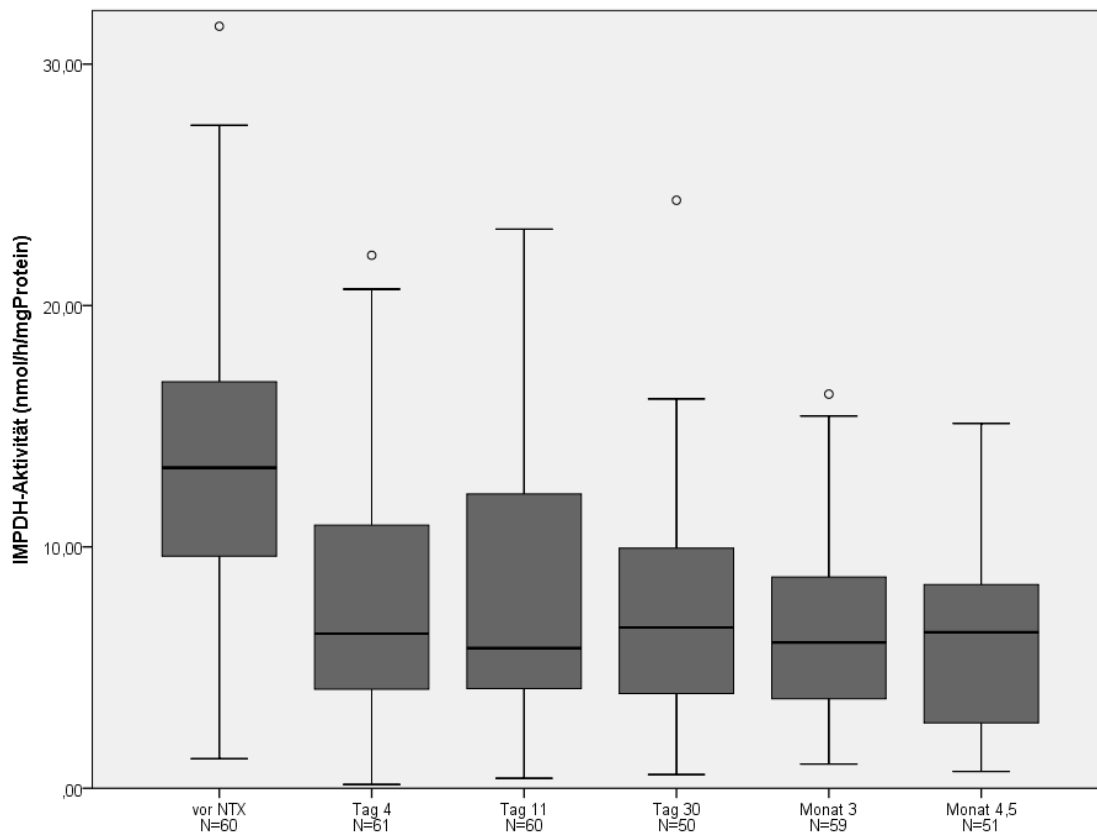


Abbildung 11: Die Aktivität der IMPDH im Zeitablauf bis zur Randomisierung

Im Gegensatz zu den anderen untersuchten Parametern nahm die Hemmung der IMPDH-Aktivität mit zunehmender Dauer der immunsuppressiven Therapie zu, zum Ende des Beobachtungszeitraums wurde eine maximale Hemmung von durchschnittlich 57% des Ausgangswertes vor der Transplantation erreicht.

6.5.3. Proliferationsrate

Noch deutlicher ist der Rückgang der Proliferationsrate nach Beginn der immunsuppressiven Therapie zu erkennen. Die maximale Hemmung von 90% des Ausgangswertes vor der Transplantation entwickelte sich bereits innerhalb der ersten vier Tage nach dem Eingriff. Der Rückgang der Proliferationsrate bis zur ersten Visite und für den gesamten Zeitraum bis zur Randomisierung ist signifikant ($p < 0,001$).

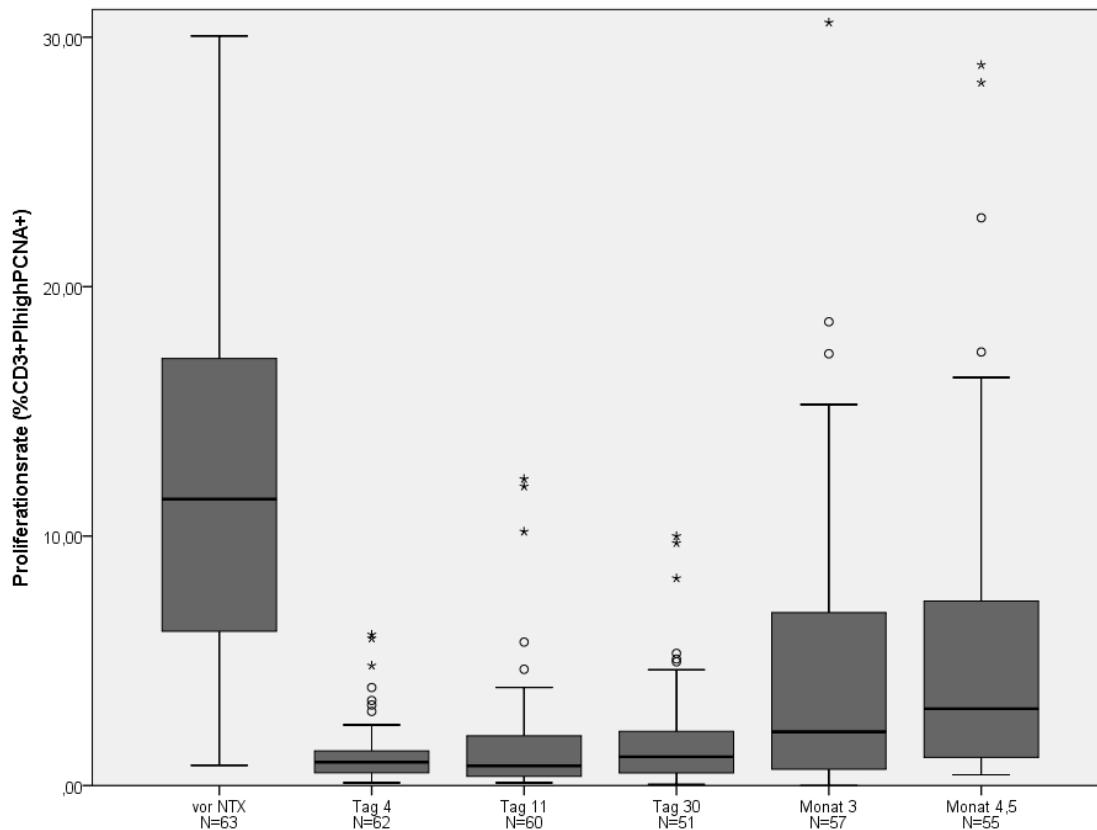


Abbildung 12: Die Proliferationsrate im Zeitablauf bis zur Randomisierung

Besonders niedrig ist der Anteil zur Proliferation stimulierbarer T-Zellen im ersten Monat nach der Transplantation, dem Zeitraum der höchsten Dosierungen der immunsuppressiven Medikamente. Auch der Unterschied zwischen den Werten an den Visiten nach einem und drei Monaten, als sich bereits eine Erholung der Proliferationsfähigkeit abzeichnete, ist signifikant ($p = 0,002$). Die Ausgangswerte vor Transplantation wurden bis zur Randomisierung nicht erreicht.

6.5.4. Oberflächenmarkerexpression: CD25 und CD71

Die Expression der Oberflächenmarker wurde durch die immunsuppressive Therapie stark unterdrückt. Der Rückgang der Expression der Oberflächenmarker für den gesamten Zeitraum bis zur Randomisierung ist signifikant. Dabei sind der Rückgang von der Visite vor Transplantation zur ersten Visite danach und der erneute Anstieg von nach einem Monat (jeweils $p < 0,001$) sowie der weitere Anstieg bis zur Randomisierung ($p = 0,007$) statistisch signifikant.

Von allen gemessenen Parametern ging die Expression von CD25 in den ersten Tagen nach der Transplantation am stärksten zurück (maximale Hemmung von durchschnittlich 89% des Ausgangswertes vor Transplantation nach vier Tagen).

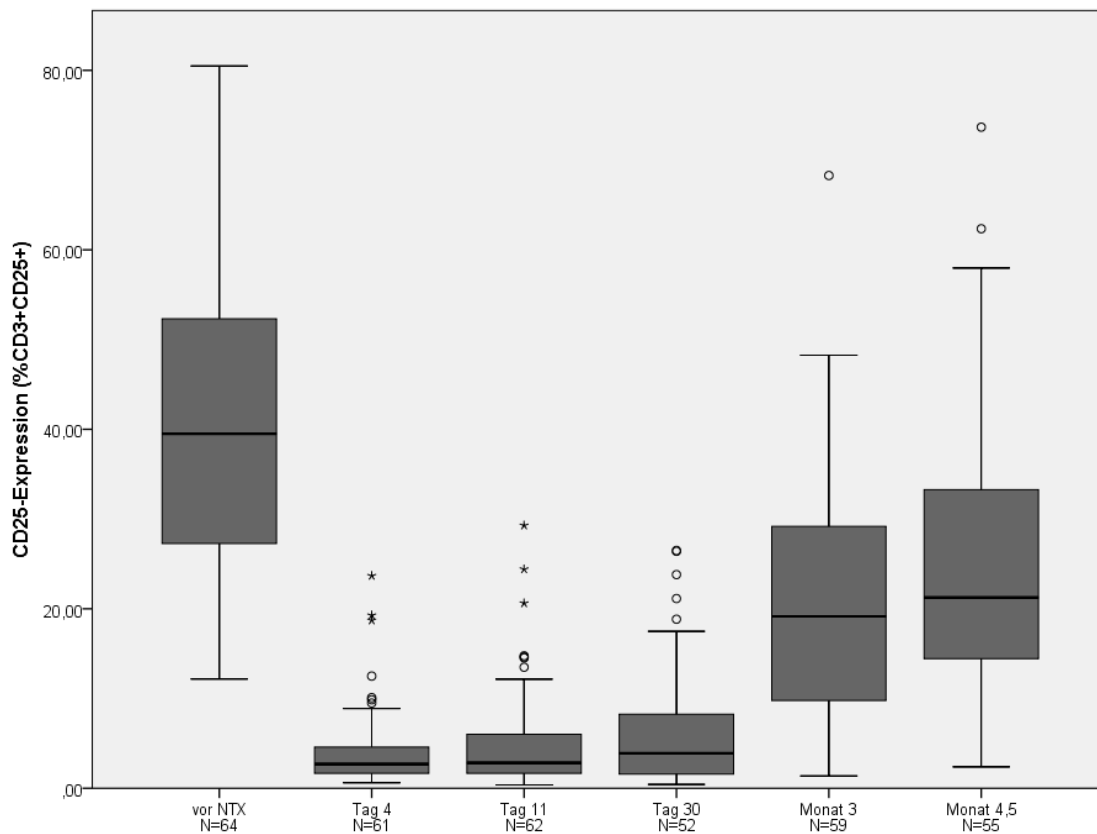


Abbildung 13: Die CD25-Expression im Zeitablauf bis zur Randomisierung

Auch die Expression des zweiten Oberflächenmarkers, des Transferrinrezeptors CD71, sank mit Beginn der immunsuppressiven Therapie merklich ab. Der Rückgang während des gesamten Zeitraumes bis zur Randomisierung ist ebenso signifikant wie der Rückgang von der Visite vor bis zur ersten Visite nach Transplantation (jeweils $p < 0,001$). Auch der erneute Anstieg der CD71-Expression von der Visite nach dem ersten Monat zur Visite nach drei Monaten ist signi-

signifikant ($p=0,002$). Die maximale Hemmung von 74% des Ausgangswertes entwickelte sich bis zum Tag 11 nach der Transplantation.

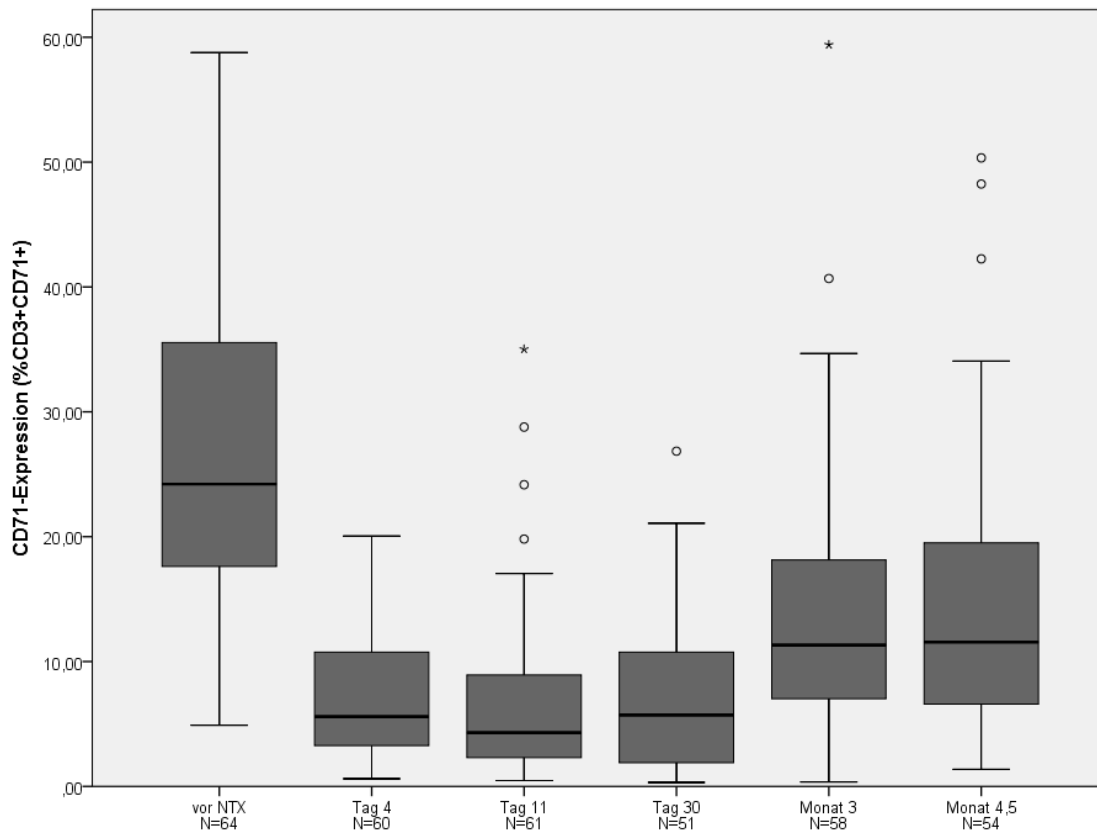


Abbildung 14: Die CD71-Expression im Zeitablauf bis zur Randomisierung

Bei beiden Parametern wurde die Ausgangsaktivität der Visite vor der Transplantation bis zur Randomisierung nicht erreicht.

Folgende Abbildung zeigt den zeitlichen Verlauf der prozentualen Expression beider Oberflächenmarker – bezogen auf den Vortransplantationswert – im Vergleich. Es fällt auf, dass der Anteil der CD25-exprimierenden T-Zellen unmittelbar nach der Transplantation deutlich stärker abfiel, als derjenige der CD71-exprimierenden T-Zellen. Diese Beobachtung ist für die Visiten an Tag 4, Tag 11 ($p<0,001$) und Tag 30 ($p=0,003$) statistisch signifikant. Nach drei Monaten konnten dann in Relation zum Ausgangswert wieder annähernd gleiche Mengen der Oberflächenmarker nachgewiesen werden.

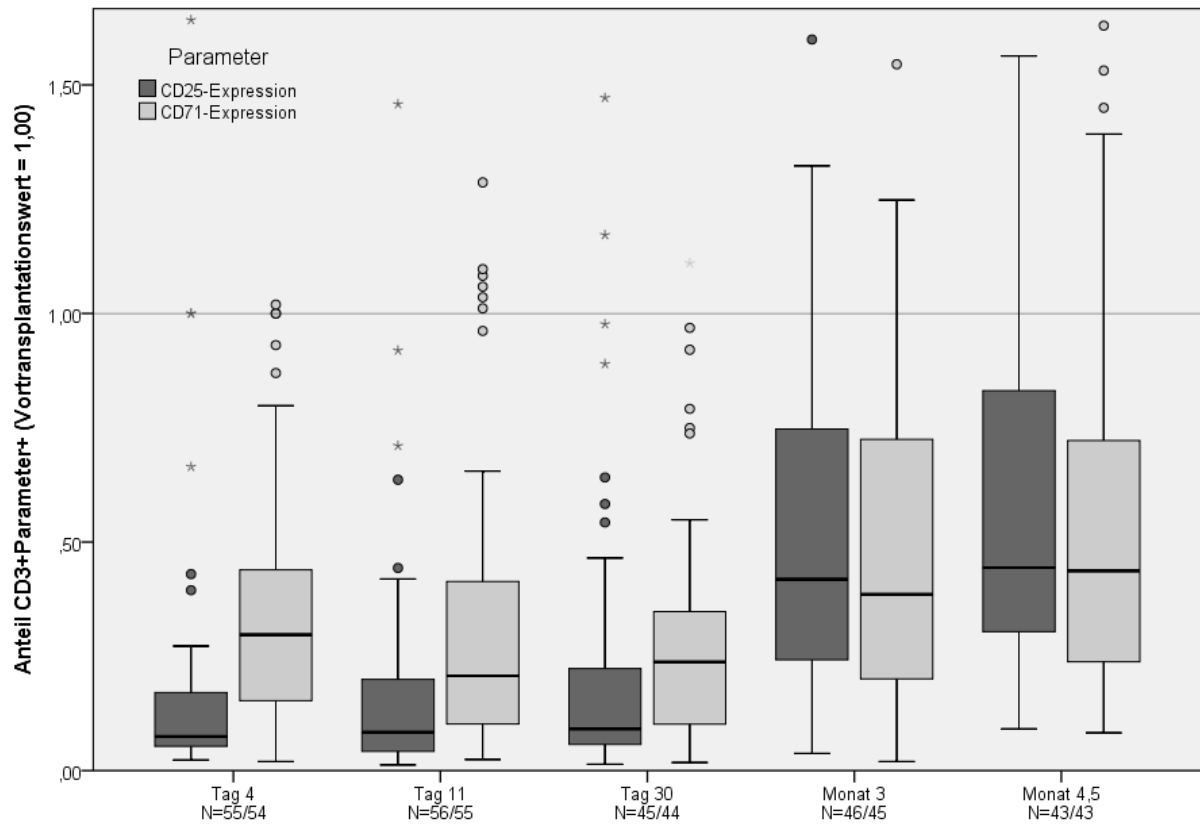


Abbildung 15: Vergleich der Expression der Oberflächenmarker CD25 und CD71 bis zur Randomisierung

6.5.5. Zytokinsynthese: IL 2 und TNF- α

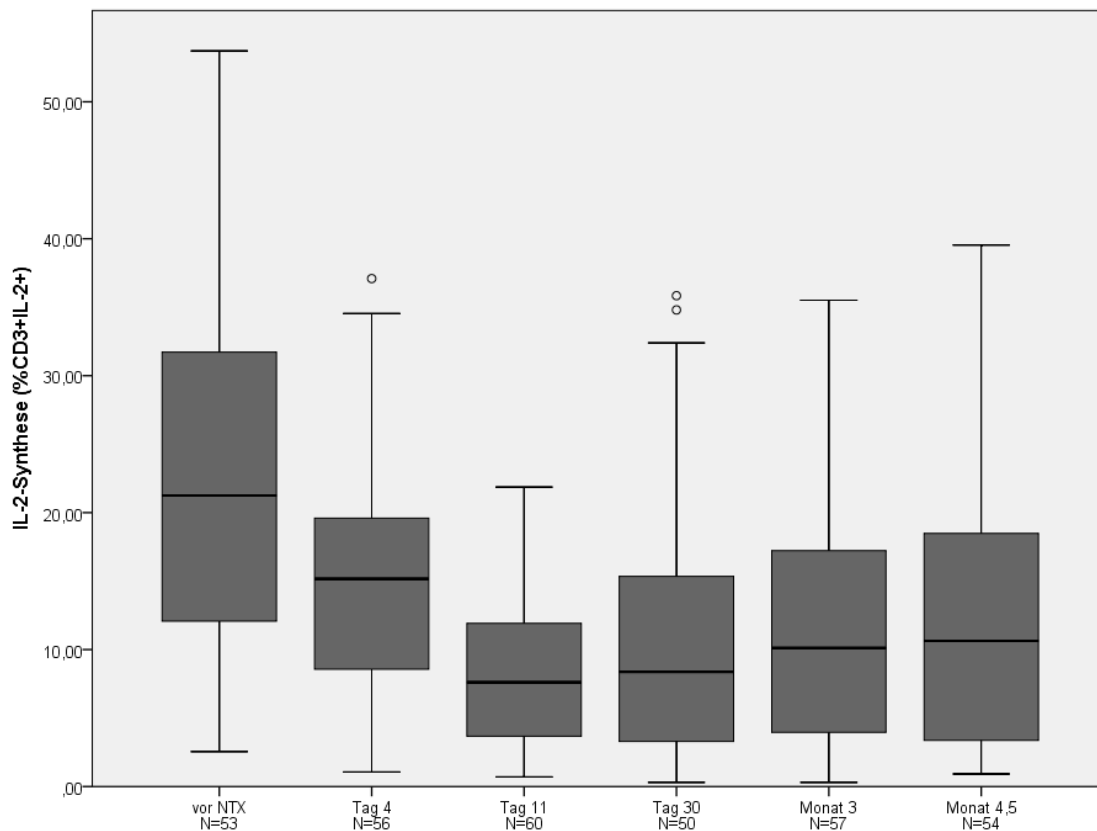


Abbildung 16: Die IL-2-Synthese im Zeitablauf bis zur Randomisierung

Die Synthese der in den T-Zellen gemessenen Zytokine ging mit dem Einsetzen der immunsuppressiven Therapie weniger stark zurück als die Proliferationsrate und die Oberflächenmarkerexpression, die maximale Hemmung wurde bis zur Visite 2 an Tag 11 nach der Transplantation erreicht. Sie erreichte mit 56% für IL-2 und mit 63% für TNF- α einen der Unterdrückung der Aktivität der IMPDH vergleichbaren Wert.

Der verringerte Anteil der IL-2- und TNF- α -synthetisierenden T-Zellen nach dem Beginn der immunsuppressiven Therapie war im Vergleich zum Niveau vor der Transplantation für den gesamten Zeitraum bis zur Randomisierung signifikant. Dabei waren sowohl der initiale Rückgang von der Visite vor der Transplantation zur ersten Visite danach, als auch der weitere Rückgang bis zur Visite an Tag 11 nach der Transplantation für TNF- α (alle $p < 0,001$) und für IL-2 (letzterer mit $p = 0,002$) statistisch signifikant.

Obwohl im weiteren Verlauf eine leichte, nicht signifikante, Erholung der Synthesefähigkeit nach Stimulation einsetzte, verlief diese bei beiden Zytokinen schleppend, das Ausgangsniveau wurde nicht erreicht.

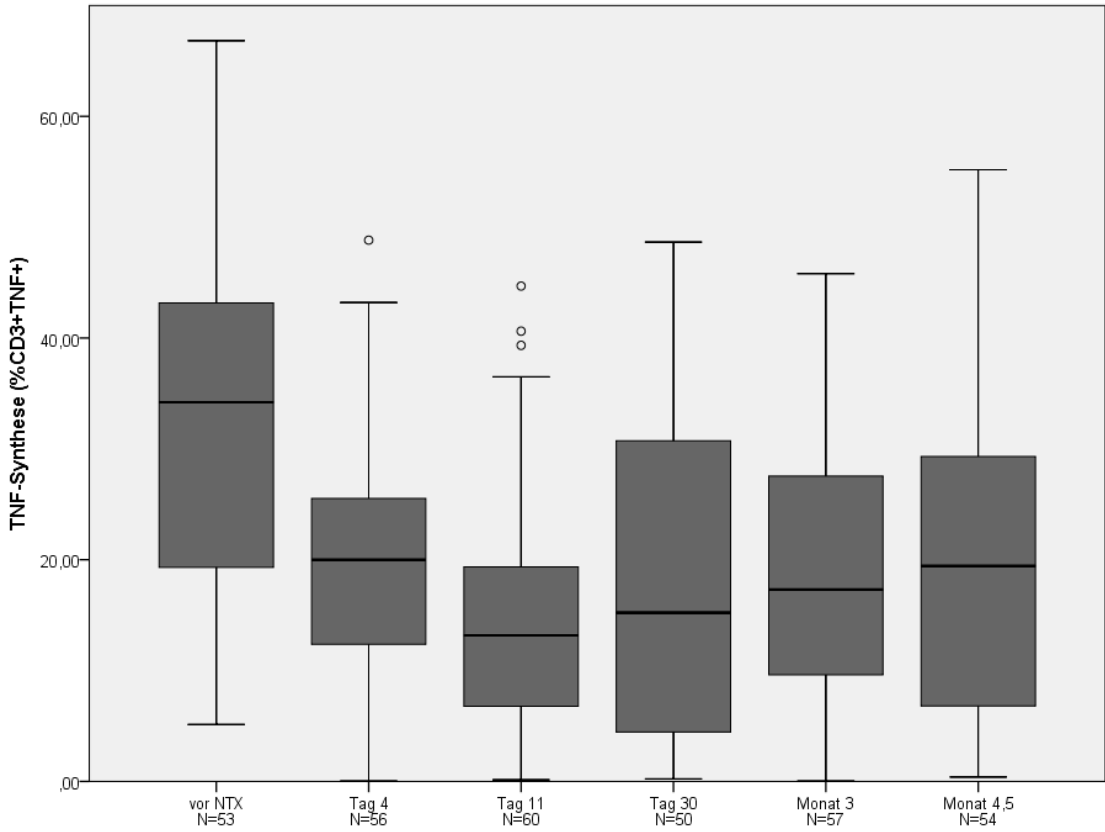


Abbildung 17: Die TNF- α -Synthese im Zeitablauf bis zur Randomisierung

6.6. Unterschiede im Verhalten der Biomarker nach der Randomisierung

6.6.1. Hemmung der Enzymaktivität: IMPDH

Die Abbildung zeigt die Verläufe der Enzymaktivität der IMPDH im Zeitablauf nach der Randomisierung in den beiden Studienarmen.

Ab diesem Zeitpunkt lässt sich im Everolimusarm eine Reduktion der IMPDH-Aktivität erkennen, in der Cyclosporin-Gruppe war eine stabile Aktivität zu verzeichnen. In beiden Studienarmen und bei der Gesamtheit der Patienten waren die Veränderungen im Zeitablauf nicht statistisch signifikant.

Zwischen den Studienarmen waren signifikante Unterschiede an der Visite unmittelbar nach der Randomisierung ($p=0,003$) und an der Visite drei Monate nach der Randomisierung ($p=0,007$) festzustellen, an der Visite an Monat sechs wurde die Signifikanz knapp verfehlt ($p=0,055$).

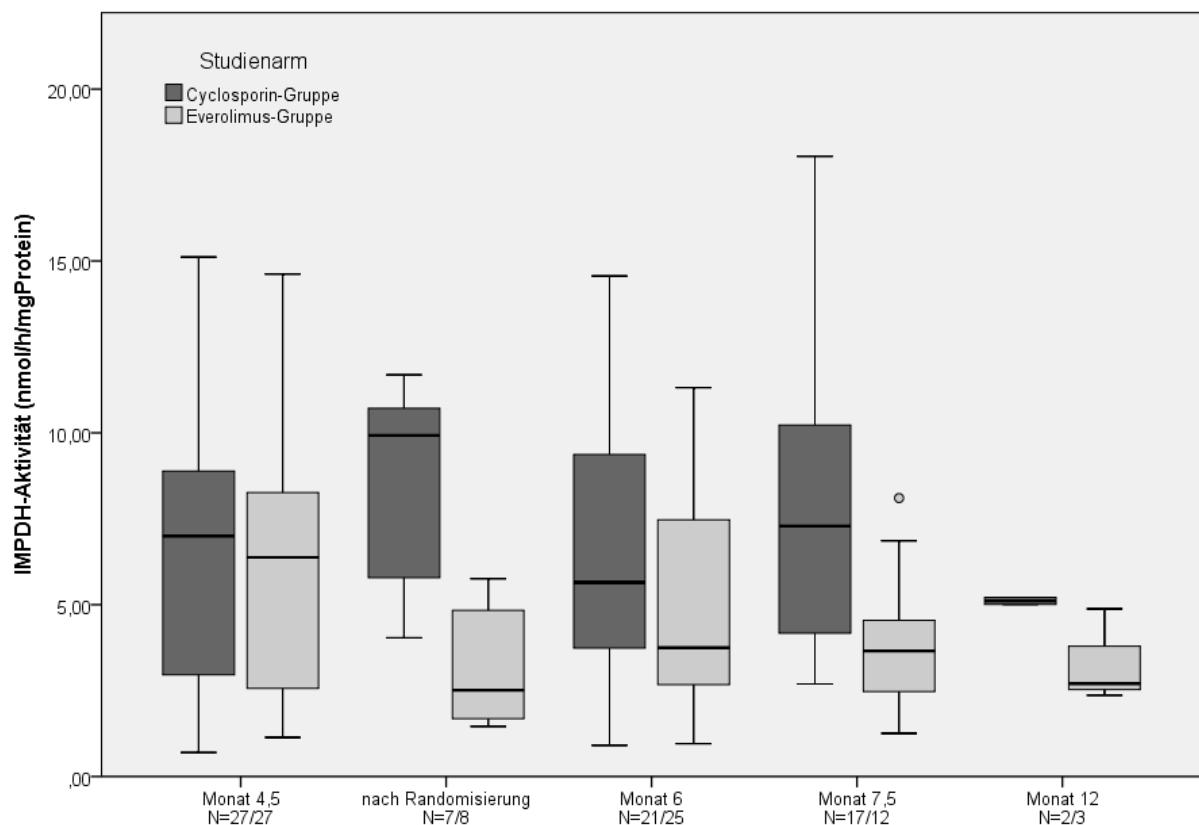


Abbildung 18: Die Aktivität der IMPDH im Zeitablauf nach der Randomisierung

6.6.2. Proliferationsrate

Auch bei der Entwicklung der Proliferationsfähigkeit der stimulierten Lymphozyten traten Unterschiede zwischen den Studienarmen auf. Während sich der Trend zur weiteren Zunahme des Anteils proliferierender T-Zellen in der Cyclosporin-Gruppe nach der Randomisierung fortsetzte, sank das Niveau in der Everolimus-Gruppe ab.

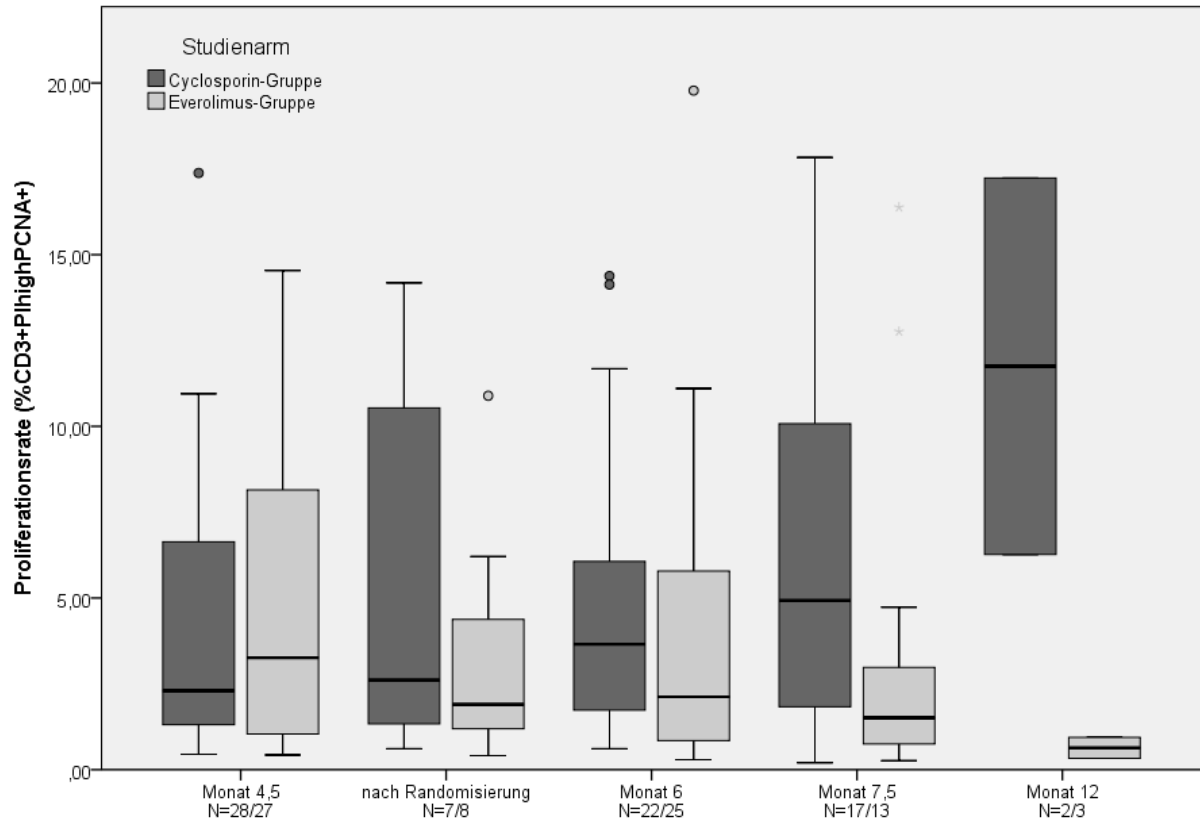


Abbildung 19: Die Proliferationsrate im Zeitablauf nach der Randomisierung

Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Visiten oder zwischen den Studienarmen ließen sich bei niedrigen Fallzahlen nicht nachweisen.

6.6.3. Oberflächenmarker: CD25 und CD71

Die Expression der Oberflächenmarker unterschied sich zwischen den beiden Studienarmen nach Randomisierung.

In der Cyclosporin-Gruppe war sowohl bei der Expression von CD25 als auch bei derjenigen von CD71 eine klare Tendenz zu im Zeitablauf höheren Werten zu verzeichnen. Beide Oberflächenmarker waren drei Monate nach der Randomisierung gegenüber dem Ausgangswert signifikant angestiegen ($p=0,005$). Danach stiegen sie bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes weiter an, bei niedrigen Fallzahlen war dies jedoch nicht signifikant.

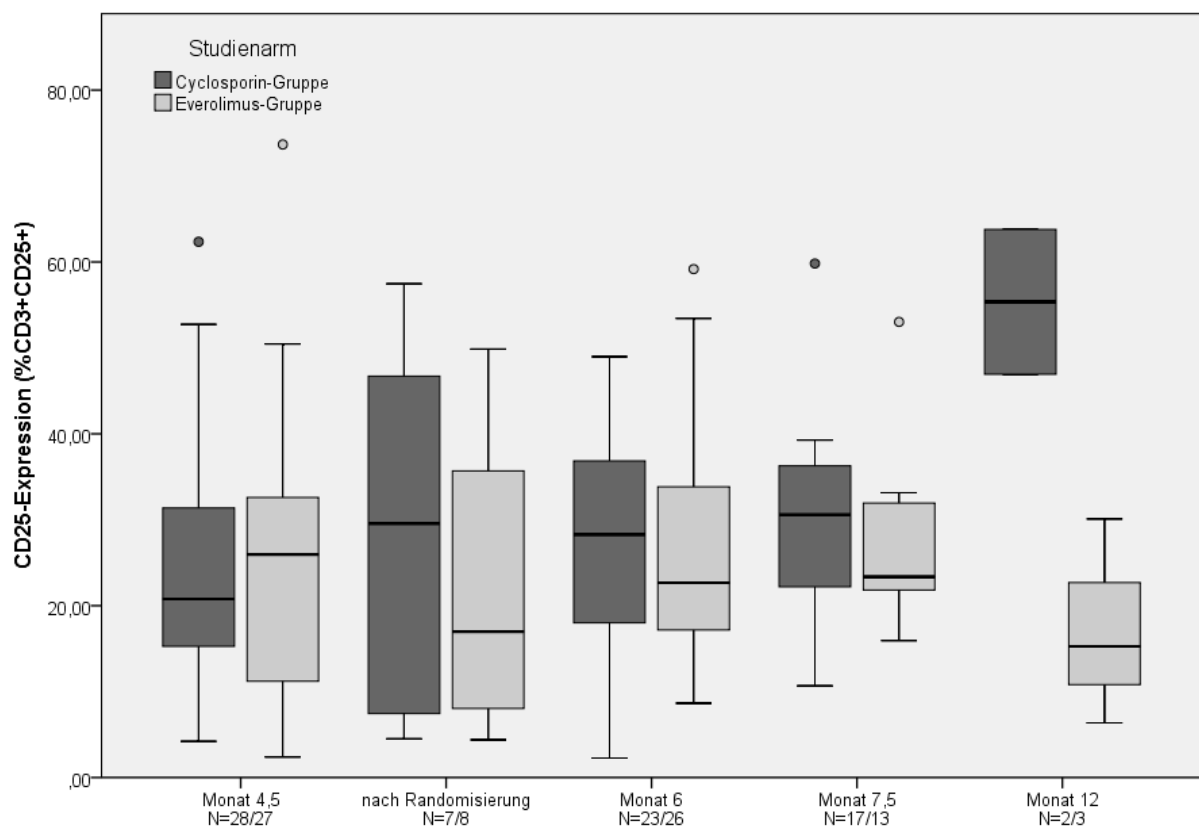


Abbildung 20: Die CD25-Expression im Zeitablauf nach der Randomisierung

In der Everolimusgruppe war dieser klare Trend zur Mehrexpression hingegen nicht auszumachen. Wie die Abbildungen verdeutlichen, wurden die Oberflächenmarker, besonders der Transferrinrezeptor CD71, unter dem mTOR-Inhibitor sogar seltener exprimiert. Statistisch signifikante Unterschiede im Zeitablauf der Visitermine bestanden nicht.

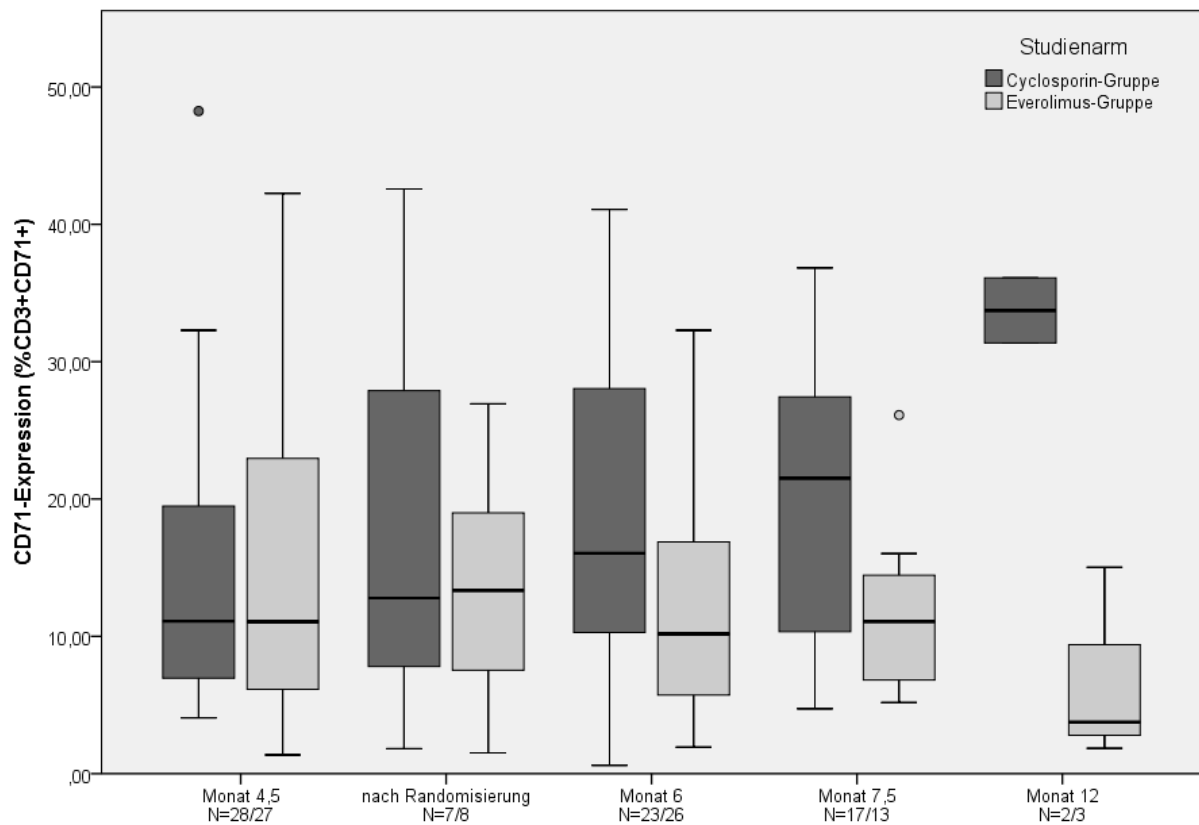


Abbildung 21: Die CD71-Expression im Zeitablauf nach der Randomisierung

Im Ergebnis der gegenläufigen Entwicklung der Oberflächenmarker ergaben sich zwischen den Studienarmen signifikante Unterschiede.

Bei der CD25-Expression war nur zum Ende des Beobachtungszeitraumes trotz niedriger Fallzahlen ein signifikanter Unterschied ($p=0,040$) zwischen den Studienarmen feststellbar. Bei der CD71-Expression waren die Unterschiede zwischen den Studienarmen nach Abschluss der Umstellung zu jedem Zeitpunkt signifikant ($p=0,007$ für den Visitertermin drei Monate nach der Randomisierung, $p=0,017$ am Ende der Studie) oder verfehlten das Niveau der Signifikanz nur knapp ($p=0,063$ sechs Monate nach Transplantation).

6.6.4. Zytokinsynthese: IL-2 und TNF- α

Die Entwicklung der Syntheseraten der Zytokine IL-2 und TNF- α nach der Randomisierung verlief weitgehend parallel.

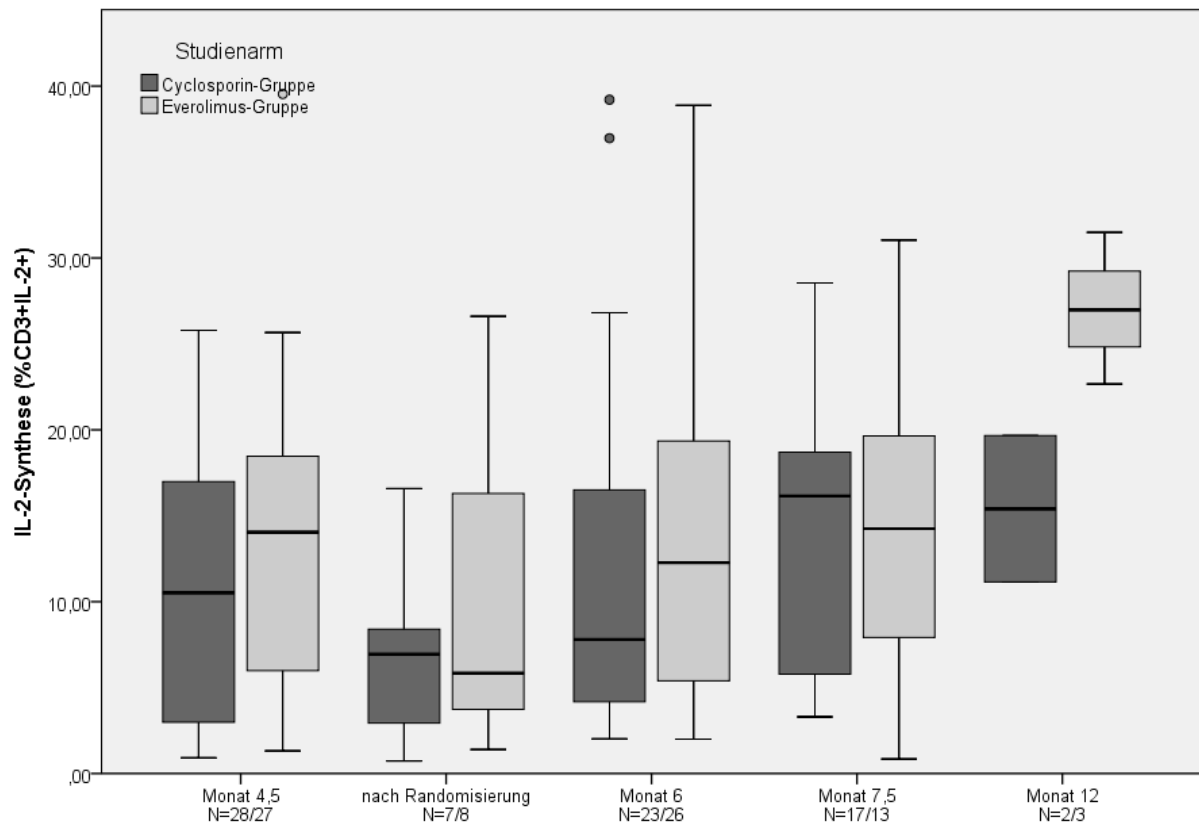


Abbildung 22: Die IL-2-Synthese im Zeitablauf nach der Randomisierung

In der Everolimusgruppe war im Zeitablauf jeweils eine Mehrproduktion an Zytokinen zu verzeichnen. Bei hoher Streuung der Werte und nur gering ausgeprägten Unterschieden im Zeitablauf war dieser Trend jedoch sowohl im Fall von IL-2 ($p=0,017$) als auch von TNF- α ($p=0,022$) nur im Vergleich des Randomidierungszeitpunktes mit dem Ende der Studie signifikant. In der Cyclosporingruppe stagnierte die Zytokinsynthese, statistisch signifikante Unterschiede im Zeitablauf waren nicht nachweisbar.

Der vor der Randomisierung begonnene Trend des langsamen Wiederanwachsens der Fähigkeit der T-Zellen zur Zytokinproduktion beschleunigte sich also in der Everolimusgruppe, während er in der Cyclosporingruppe eher abflachte.

Das Niveau der Zeit vor Beginn der immunsuppressiven Therapie wurde in beiden Gruppen innerhalb des ersten Jahres nach der Transplantation nicht wieder erreicht.

Die Unterschiede zwischen den Studienarmen waren weder bei der IL-2-Synthese noch bei der TNF- α -Synthese statistisch signifikant.

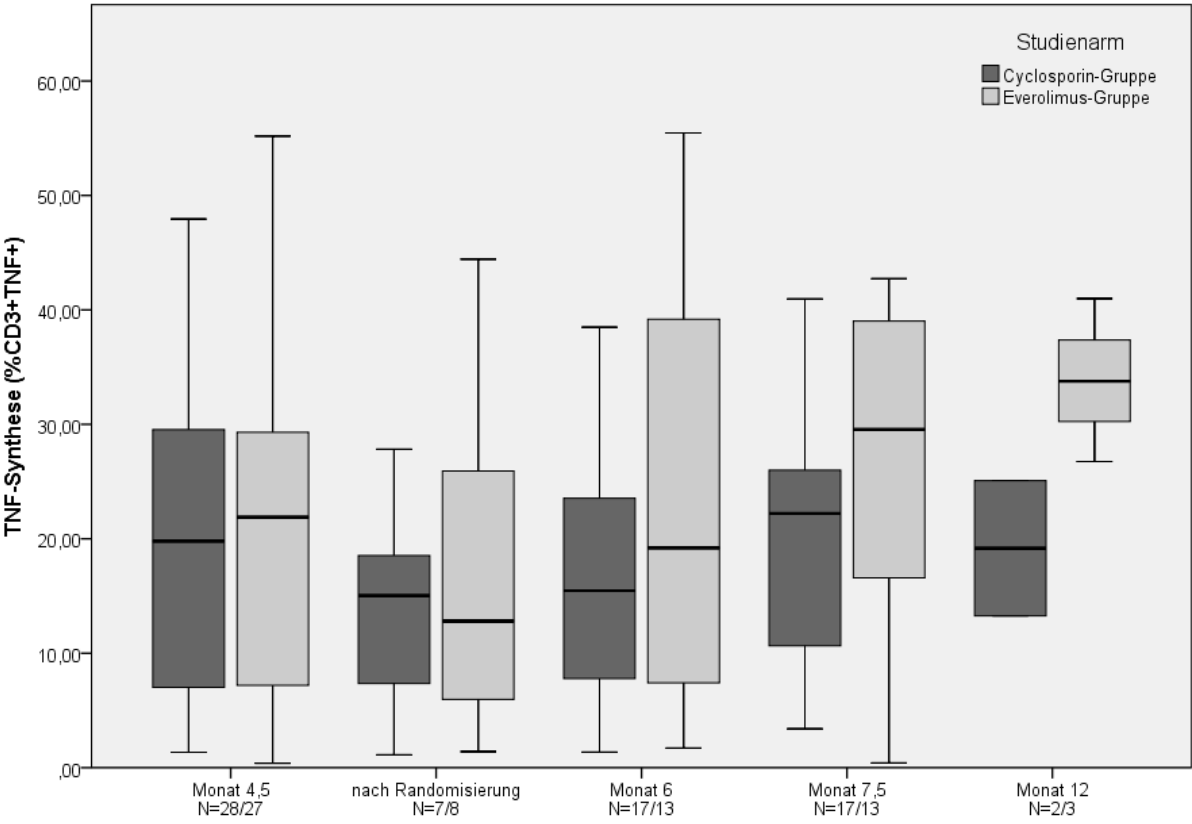


Abbildung 23: Die TNF- α -Synthese im Zeitablauf nach der Randomisierung

6.7. Vergleich der Immunsuppression zwischen den Studienarmen vor und nach der Randomisierung

In den folgenden Abbildungen werden zusammenfassend die Aktivität der untersuchten Parameter und ihre Inhibition in den einzelnen Studienarmen vor und nach der Randomisierung dargestellt. Um mögliche Unterschiede durch ein höheres Datenvolumen aufzudecken, wurden die im jeweiligen Zeitraum im jeweiligen Studienarm gemachten Beobachtungen zusammengefasst und dann miteinander verglichen.

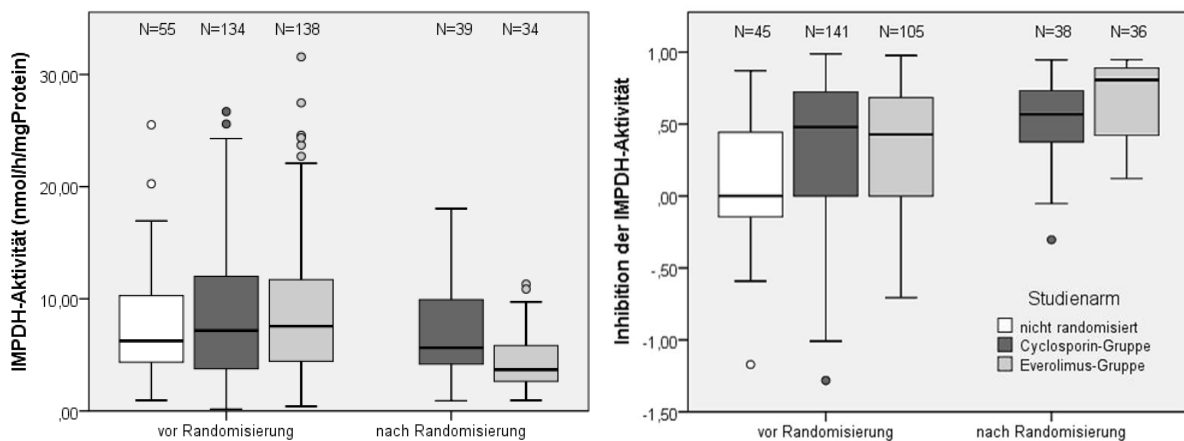


Abbildung 24: Vergleich der IMPDH-Aktivität und ihrer Hemmung in den Studienarmen

Es ist zu erkennen, dass die Aktivität der IMPDH vor der Randomisierung in allen Studienarmen ähnlich ausgeprägt, nach der Randomisierung in der Everolimusgruppe signifikant ($p=0,003$) niedriger war als in der Cyclosporin-Gruppe. Damit einhergehend war die Inhibition der IMPDH-Aktivität im Vergleich zum Vortransplantationsniveau in der Everolimusgruppe nach der Randomisierung signifikant ($p=0,011$) stärker ausgeprägt.

Die IMPDH-Aktivität der Patienten, die nicht randomisiert werden konnten, war auf einem ähnlichen Niveau wie bei den randomisierten Patienten, im Vergleich zur Aktivität vor Beginn der immunsuppressiven Therapie allerdings signifikant ($p<0,001$) weniger stark supprimiert als in den Cyclosporin- und Everolimusgruppen.

Die Proliferationsrate wies vor der Randomisierung in beiden Studienarmen und der Gruppe der nicht randomisierten Patienten vergleichbare Werte auf, nach der Randomisierung war sie in der Cyclosporin-Gruppe signifikant ($p=0,007$) höher als in der Everolimusgruppe. Parallel dazu bestand eine Tendenz zur stärkeren Inhibition in der Everolimusgruppe.

Ein signifikanter Unterschied ($p=0,013$) bestand zudem vor der Randomisierung zwischen der Hemmung der Proliferationsrate in der Cyclosporin-Gruppe und der Gruppe der später nicht randomisierten Patienten.

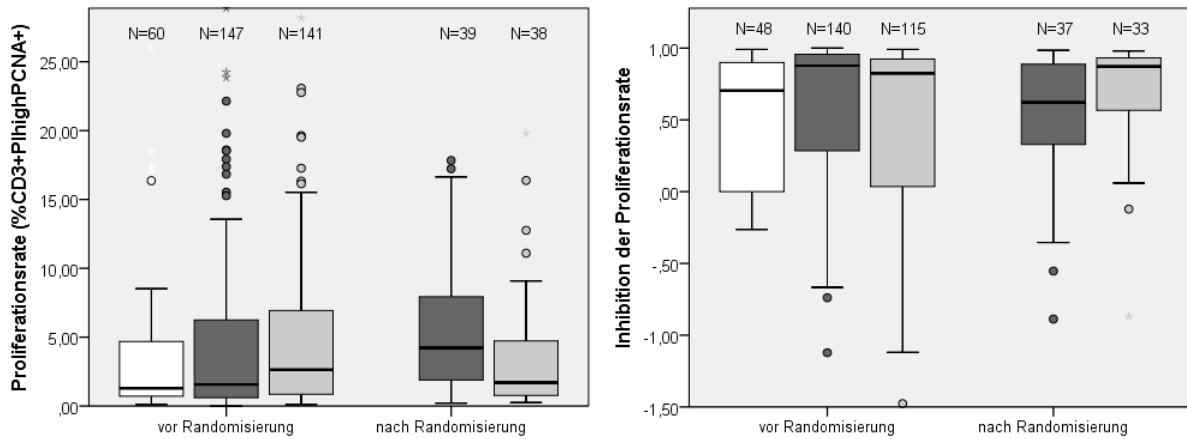


Abbildung 25: Vergleich der Proliferationsrate und ihrer Hemmung in den Studienarmen

Die Oberflächenmarker müssen einzeln betrachtet werden. Bei der CD25-Expression sind keine signifikanten Unterschiede der Aktivität oder der Hemmung zwischen den Studienarmen vor oder nach der Randomisierung nachzuweisen. Insgesamt ist aber eine geringere Inhibition nach der Randomisierung, einhergehend mit einer höheren Rate an nach Stimulation CD25-exprimierenden T-Zellen, zu beobachten.

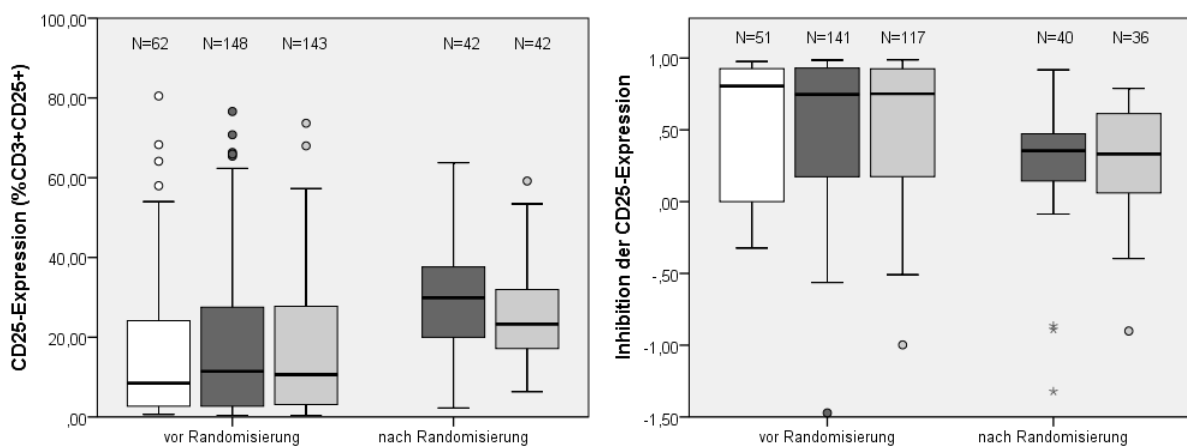


Abbildung 26: Vergleich der CD25-Expression und ihrer Hemmung in den Studienarmen

Für den Transferrinrezeptor CD71, der vor der Randomisierung in allen Gruppen in vergleichbarem Maß exprimiert worden war, lässt sich nach der Randomisierung ein deutlicher Rückgang der Inhibition in der Cyclosporin-Gruppe beobachten, der in der Everolimusgruppe nicht auftrat.

Daraus ergaben sich signifikante Unterschiede der Inhibition ($p=0,039$) und der Aktivität ($<0,001$) zwischen den beiden Studienarmen.

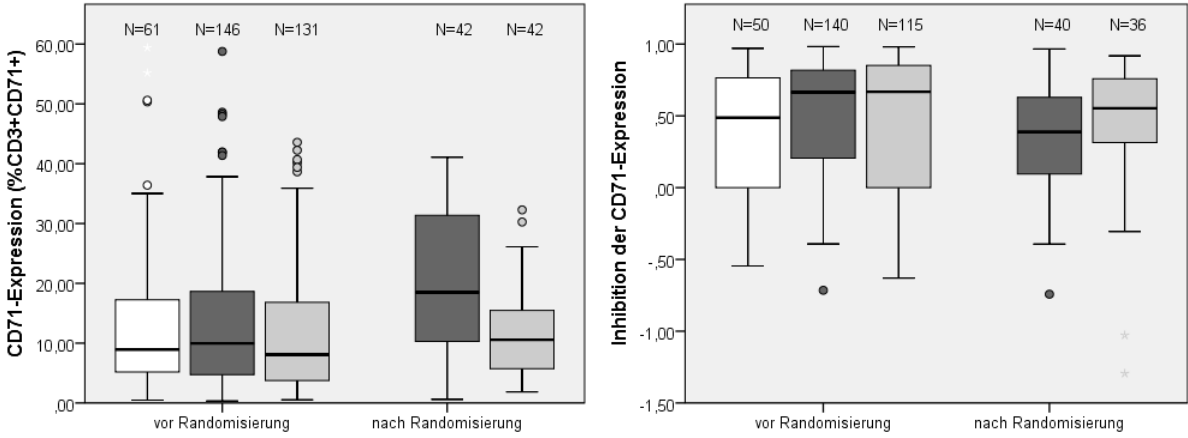
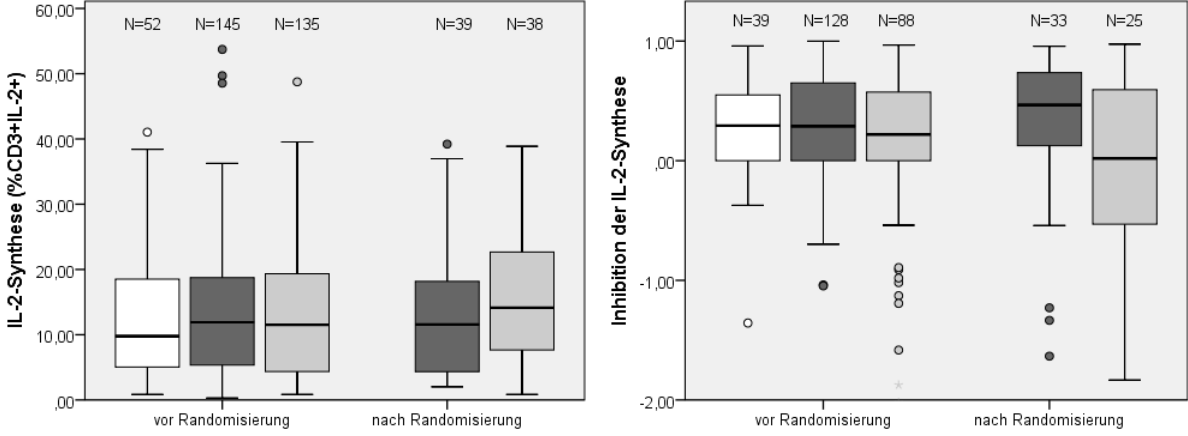


Abbildung 27: Vergleich der CD71-Expression und ihrer Hemmung in den Studienarmen

Die Cytokinsynthese und ihre Inhibition waren bis auf eine signifikant ($p=0,024$) höhere TNF- α -Synthese in der Everolimusgruppe (Tendenz bei IL-2) nach der Randomisierung in den beiden Studienarmen und bei den nicht randomisierten Patienten vergleichbar.



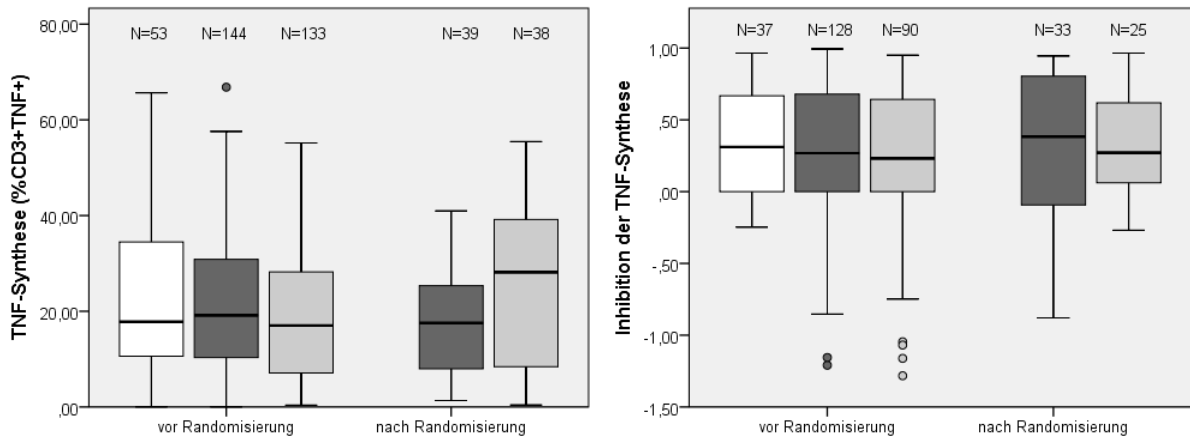


Abbildung 28: Vergleich der Cytokinsynthese (IL-2, TNF- α) und ihrer Hemmung in den Studienarmen

6.8. *Der Zusammenhang zwischen der Expression der Biomarker und dem Auftreten von Rejektionen und Infektionen*

Ein wichtiges Ziel der Bestimmung der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Parameter bestand darin, Zusammenhänge aufzudecken, zwischen der durch sie aufgezeigten Immunsuppression einerseits, und mit dieser in direktem Zusammenhang stehenden klinischen Ereignissen andererseits. Wie bereits erwähnt, handelt es sich dabei um akute Abstoßungen als Indikator für eine zu geringe und um Infektionen und Neoplasien als Indikatoren für eine zu starke Immunsuppression. Weitere mit der immunsuppressiven Therapie assoziierte unerwünschte Ereignisse, wie Nierenfunktionsstörungen, metabolische Erkrankungen, arterielle Hypertonie, Blutbildveränderungen, gastrointestinale Nebenwirkungen, Schmerzen oder Wundheilungsstörungen, wurden in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht. Da bei den untersuchten Patienten im Beobachtungszeitraum von einem Jahr nach der Transplantation keine bösartigen Neubildungen auftraten, war dieser Teil der Untersuchung nicht durchführbar. Eine längerfristig angelegte Nachbeobachtung der Patienten könnte diesbezüglich aber interessante Ergebnisse aufzeigen.

Die klinischen Ereignisse wurden für die Auswertungen anhand wichtiger Charakteristika operationalisiert: Das Auftreten biopsisch gesicherter akuter Abstoßungen (*biopsy proven acute rejection*, BPAR) wurde anhand des Schweregrades nach der Banff-Klassifikation von 2007 (18) aufgeschlüsselt in gesicherte Abstoßung (Banff Grad Ia, Ib, IIa, IIb) und *borderline*-Befund. Um den Zeitpunkt des Auftretens der Abstoßung zu berücksichtigen, wurden frühe (bis zur Randomisierung) von späten Rejektionen unterschieden.

Infektionen wurden nach ihrem zeitlichen Auftreten (während des gesamten Zeitraums, vor und nach der Randomisierung) und nach dem Schweregrad eingeteilt. Sehr schwere Infektion entsprechen Infektionen Grad 3 in den *case report files* der Zeus-Studie, schwere Infektionen entsprechen den Graden 2 und 3. Für CMV-Infektionen als typischer Ausdruck der Immunsuppression wurde eine eigene Kategorie gebildet. Zudem wurde die Zahl der Krankheitstage und Krankheitsepisoden ausgewertet.

Die Häufigkeit des Auftretens akuter Abstoßungen in den jeweiligen Studienarmen wird in den folgenden Tabellen dargestellt:

Abstoßungen		gesichert			borderline			alle Rejektionen		
	N	alle	früh	spät	alle	früh	spät	alle	früh	spät
Cyclosporin-Gruppe	31	3	2	0	12	10	4	14	12	4
Everolimus-Gruppe	29	2	1	1	5	4	1	7	5	2
nicht randomisiert	19	8	4	-	5	5	-	9	9	-
Alle Patienten	79	13	7	1	22	19	5	30	26	6
Dargestellt der Patienten mit Rejektion, N = Zahl aller Patienten pro Gruppe										

Tabelle 9: Anzahl der Patienten mit akuten Abstoßungen

Abstoßungen		gesichert			borderline			alle Rejektionen		
	N	alle	früh	spät	alle	früh	spät	alle	früh	spät
Cyclosporin-Gruppe	31	3	3	0	15	12	3	18	15	3
Everolimus-Gruppe	29	3	2	1	8	6	2	11	8	3
nicht randomisiert	19	17	17	-	2	2	-	19	19	-
Alle Patienten	79	23	22	1	25	20	5	48	42	6
Dargestellt Fallzahl der Rejektionen , N = Zahl der Patienten pro Gruppe										

Tabelle 10: Anzahl der akuten Abstoßungsepisoden

Ein signifikanter Unterschied bestand zwischen der Gruppe der nicht randomisierten und den beiden Gruppen der randomisierten Patienten wegen des gehäufteten Auftretens gesicherter Abstoßungen bei den nicht randomisierten Patienten.

Zwischen dem Cyclosporin- und dem Everolimusarm traten keine signifikanten Unterschiede im Auftreten von gesicherten und *borderline*-Rejektionen auf.

Infektionen		Patienten mit Infektionen			Episoden / Dauer		
	N	alle	früh	spät	alle	früh	spät
Cyclosporin-Gruppe	31	24	19	19	79 (53)	39 (34)	43 (52)
Everolimus-Gruppe	29	23	19	21	90 (50)	43 (48)	51 (34)
nicht randomisiert	19	7	7	-	16 (25)	16 (25)	-
Alle Patienten	79	54	45	40	185 (48)	98	94

Dargestellt Zahl der Patienten mit Infektion sowie Zahl der Episoden und Dauer (Mittelwert der Krankheitstage) der Infektionen, N = Zahl aller Patienten pro Gruppe

Tabelle 11: Anzahl der Patienten mit Infektionen, der Infektionsepisoden und Dauer der Infektionsepisoden

Zwischen den Armen bestanden keine signifikanten Unterschiede in der Zahl der Patienten mit Infektionen, der Zahl oder der Dauer der Infektionsepisoden. Die Gruppe der nicht randomisierten Patienten wurde nur in der Phase vor Randomisierung mit den anderen Gruppen verglichen.

Infektionen		Schweregrad aller Infektionen				
	N	0	1	2	3	Alle
Cyclosporin-Gruppe	31	7 (36)	55 (62)	15 (52)	2 (14)	79 (53)
Everolimus-Gruppe	29	3 (44)	62 (57)	25 (35)	0 (0)	90 (50)
nicht randomisiert	19	0 (0)	10 (17)	5 (44)	1 (3)	16 (25)
Alle Patienten	79	10 (39)	127 (54)	45 (43)	3 (10)	185 (48)

Dargestellt Zahl der Episoden und Dauer (Mittelwert der Krankheitstage) der Infektionen, N = Zahl aller Patienten pro Gruppe

Tabelle 12: Schweregrad der Infektionsepisoden

Bezüglich des Schweregrades oder der Art der Infektionen konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen dem Cyclosporin- und dem Everolimusarm festgestellt werden.

Infektionen	Infektionstyp									
	N	HWI	AWI	GI	SBI	CMV	SVI	MYK	FUO	Alle
Cyclosporin-Gruppe	31	35 (50)	15 (42)	3 (16)	10 (25)	6 (69)	1 (2)	8 (26)	1 (7)	79 (41)
Everolimus-Gruppe	29	50 (40)	24 (41)	5 (5)	1 (3)	6 (32)	2 (96)	2 (8)	0 (0)	90 (36)
nicht randomisiert	19	7 (12)	1 (13)	0 (0)	2 (26)	2 (12)	2 (135)	1 (9)	1 (2)	16 (21)
Alle Patienten	79	92 (39)	40 (40)	8 (9)	13 (22)	14 (45)	5 (82)	11 (19)	2 (5)	185 (36)
<p>Dargestellt Zahl der Episoden und Dauer (Mittelwert der Krankheitstage) der Infektionen, N = Zahl aller Patienten pro Gruppe, HWI = Harnwegsinfekt, AWI = Atemwegsinfekt, GI = gastrointestinaler Infekt, SBI = sonstiger bakterieller Infekt, CMV = Cytomegalievirus, SVI = sonstiger viraler Infekt, MYK = Mykose, FUO = Fever of unknown origin</p>										

Tabelle 13: Art und Dauer der Infektionsepisoden

6.8.1. Der Zusammenhang zwischen der IMPDH-Aktivität vor der Transplantation und der Notwendigkeit vorzeitiger Dosisreduktionen von EC-MPS

Glander (147) konnte zeigen, dass die IMPDH-Aktivität vor der Transplantation einen Prädiktor für den Zeitpunkt der ersten Dosisreduktion der Mycophenolsäurepräparate darstellt, und dass Dosisreduktionen Prädiktoren für den klinischen *outcome* sind.

Der Zusammenhang zwischen der vor der Transplantation gemessenen Aktivität der IMPDH und dem Zeitpunkt notwendiger Dosisreduktionen von EC-MPS konnte in der vorliegenden Arbeit nur teilweise nachvollzogen werden. In der folgenden Abbildung ist zwar zu erkennen, dass Patienten mit früherer Dosisreduktion eine durchschnittlich niedrigere IMPDH-Aktivität vor der Transplantation aufwiesen als Patienten mit späterer Dosisreduktion. Patienten, die während des gesamten Studienzeitraumes die volle Dosis des Präparates tolerierten, wiesen jedoch ebenfalls das ganze Spektrum der IMPDH-Aktivität auf.

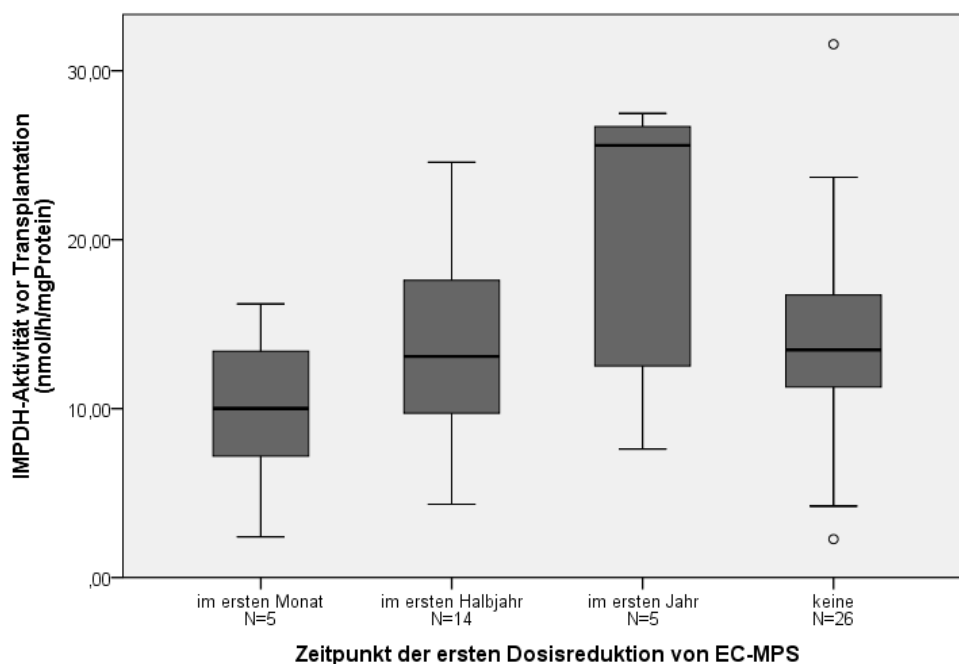


Abbildung 29: Der Zusammenhang zwischen der IMPDH-Aktivität vor der Transplantation und dem Zeitpunkt der ersten Dosisreduktion von EC-MPS

Es bestand ein Zusammenhang zwischen der Notwendigkeit von EC-MPS-Dosisreduktion und dem Auftreten von Rejektionen und Infektionen. Etwa die Hälfte der Patienten, die eine akute Abstoßung oder auch eine gesicherte akute Abstoßung aufwiesen, waren von einer Dosisreduktion im ersten Jahr nach der Transplantation betroffen, deutlich mehr als der entsprechende Wert in der gesamten Studienpopulation. Der Zeitpunkt der Abstoßungsreaktionen lag früh nach

der Transplantation: Statistisch signifikant ($p=0,031$) ist die Beobachtung, dass keiner der sechs Patienten, die eine späte Abstoßungsreaktion aufwiesen, von einer Dosisreduktion betroffen war. Infektionen traten signifikant ($p=0,029$) häufiger bei Patienten mit Dosisreduktionen auf als bei Patienten, welche über den gesamten Zeitraum mit der vollen Dosis von EC-MPS behandelt worden waren. Dieser Zusammenhang ist nachweisbar für Patienten sowohl mit früh aufgetretener ($p=0,004$), später ($p=0,042$) und schwerer Infektion ($p=0,007$). Auch war der Zeitpunkt der Dosisreduktion signifikant mit dem Auftreten früher ($p=0,034$) als auch schwerer ($p=0,011$) Infektionen vergesellschaftet.

Zwischen einer nach den Kriterien von Glander (147) erstellten Risikostratifizierung (berücksichtigt wurden ein Wert der IMPDH-Aktivität vor der Transplantation von $>8,53$ nmol/h/mg Protein der Patienten und die Notwendigkeit von Dosisreduktionen von EC-MPS) und dem Auftreten von Rejektionen oder Infektionen bestand kein signifikanter Zusammenhang.

6.8.2. Der Zusammenhang zwischen der Ausgangsaktivität der untersuchten Parameter vor der Transplantation und dem Auftreten klinischer Ereignisse

Da eine Einschätzung des immunologischen Risikoprofils eines vor der Transplantation gemessenen Parameters klinisch nützlich wäre, ist der Zusammenhang zwischen der Ausgangsaktivität der untersuchten Parameter vor Transplantation und dem Auftreten klinischer Ereignisse von besonderem Interesse.

Die folgende Abbildung zeigt für das klinische Ereignis der akuten Abstoßung, dass kein eindeutiger Unterschied zwischen den Werten der Patienten mit und ohne Rejektionsgeschehen zu erkennen ist.

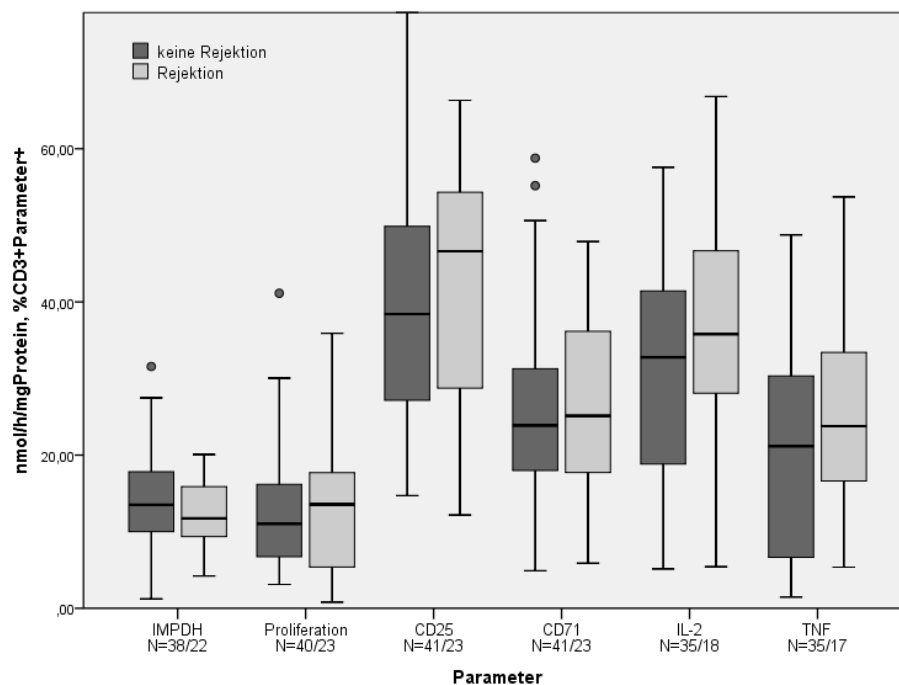


Abbildung 30: Werte der Parameter vor der Transplantation und Auftreten akuter Abstoßungen (BPAP)

Auch nach Hinzunahme der *borderline*-Befunde oder bei den *borderline*-Befunden allein ließ sich kein signifikanter Zusammenhang mit den Vortransplantationswerten nachweisen. Auch die Unterscheidung nach dem Zeitpunkt des Auftretens der Rejektion ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

Lediglich bei den Patienten, die eine späte Abstoßung entwickelten, bestand eine Tendenz für alle Parameter zu höheren Werten (signifikant für TNF- α , $p=0,038$), allerdings war die Fallzahl in dieser Patientengruppe sehr niedrig ($N=2$).

Die Analyse der Ausgangswerte in bezug auf das Auftreten von Infektionen nach der Transplantation zeigte ebenfalls nur geringe Unterschiede zwischen den Gruppen.

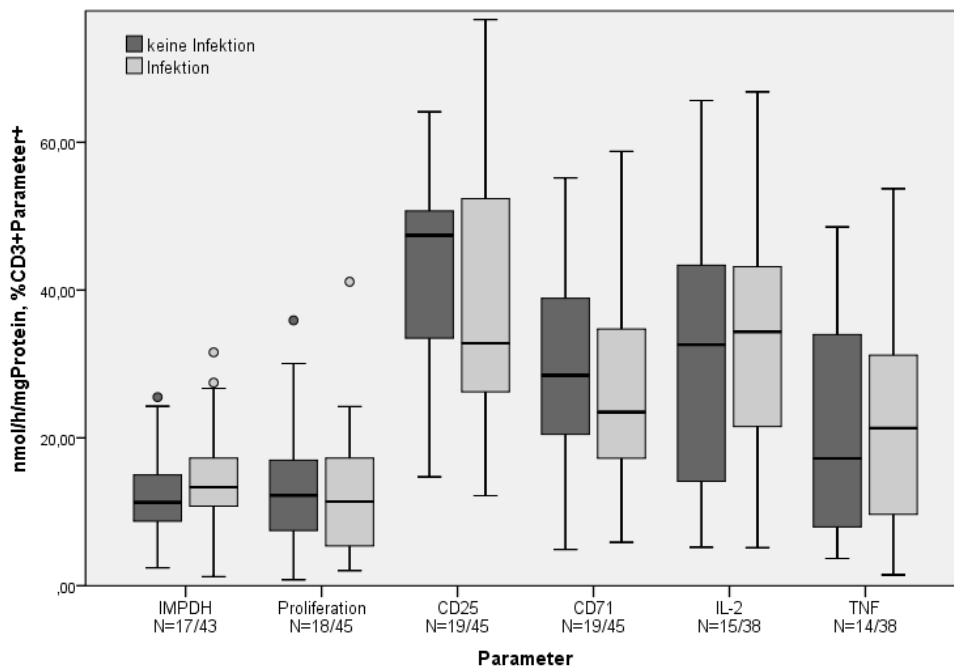


Abbildung 31: Werte der Parameter vor der Transplantation und Auftreten von Infektionen

Es ließen sich keine signifikanten Unterschiede der Vortransplantationswerte der untersuchten Parameter aufdecken zwischen den jeweils nicht betroffenen Patienten und den Gruppen der Patienten, bei denen Infektionen, frühe Infektionen, späte Infektionen oder schwere Infektionen aufgetreten waren.

In der Gruppe der Patienten, die eine sehr schwere Infektionskrankheit aufwiesen, war die IMPDH-Aktivität signifikant ($p=0,010$) höher als die mittlere Aktivität bei den Patienten ohne schwere Infektion. Die Fallzahl in der Gruppe der Patienten mit sehr schweren Infektionen war allerdings mit $N=3$ ebenfalls sehr klein.

Bei den Patienten, die im Verlauf CMV-Infektionen entwickelten, war eine signifikant niedrigere CD25-Expression zu verzeichnen ($p=0,042$), die Syntheseraten beider Zytokine waren ebenfalls deutlich erhöht, für TNF- α war der Befund annähernd signifikant ($p=0,060$).

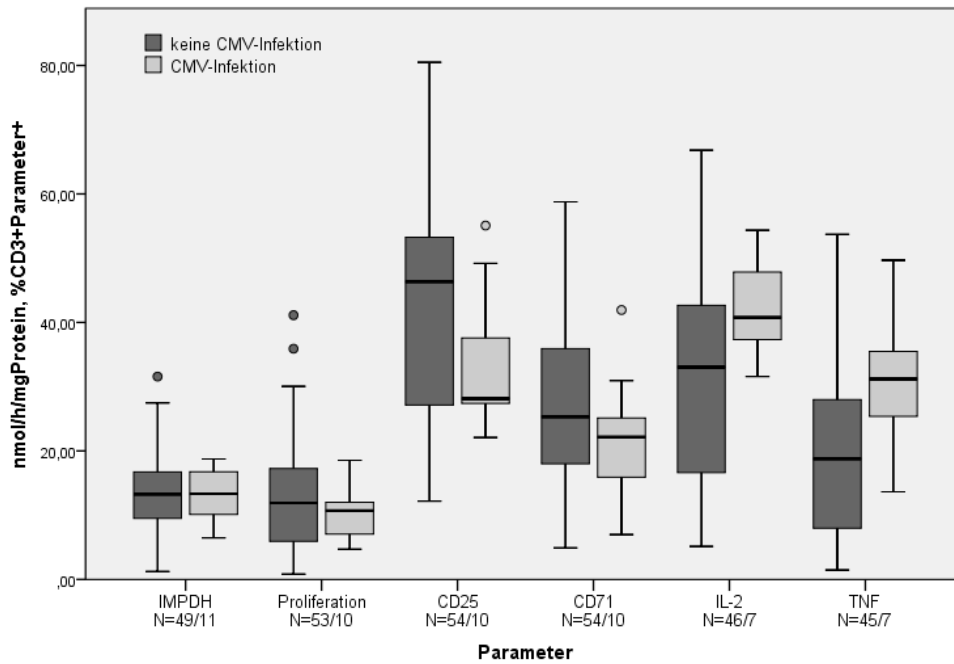


Abbildung 32: Werte der Parameter vor der Transplantation und Auftreten von CMV-Infektionen

Eine signifikante Korrelation zwischen der Anzahl der Infektionsepisoden und der Krankheitsdauer in Tagen (jeweils alle, vor und nach der Randomisierung) und den Vortransplantationswerten der untersuchten Parameter konnte ausgeschlossen werden.

6.8.3. Der Zusammenhang zwischen der maximalen Suppression der untersuchten Parameter und dem Auftreten klinischer Ereignisse

Wie im Methodenteil ausgeführt, wurden zur Suche nach einem Zusammenhang der untersuchten Parameter mit dem klinischem *outcome* weitere Variablen modelliert. Als Maß für den Erfolg der Immunsuppression wurde die maximale Suppression der untersuchten Parameter im ersten Monat nach Transplantation berechnet. Folgende Abbildung zeigt den Zusammenhang dieser Variablen mit dem Auftreten von akuten Abstoßungen nach der Transplantation.

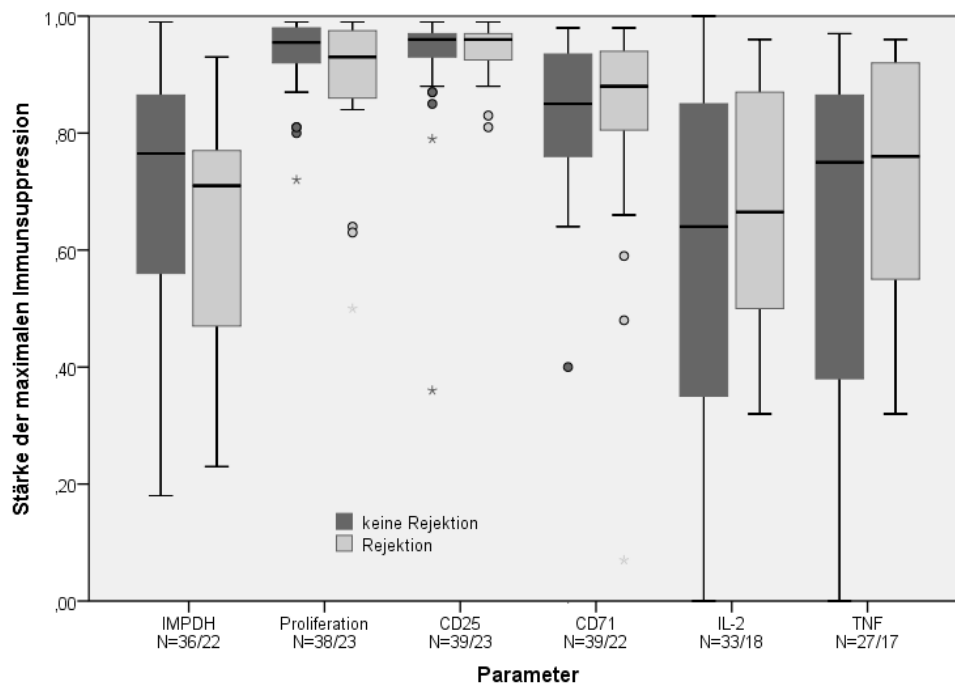


Abbildung 33: Die maximale Immunsuppression und das Auftreten von akuten Abstoßungen

Ein wesentlicher Unterschied zwischen der maximalen Immunsuppression in der Gruppe der Patienten, in denen eine Abstoßung nach der Transplantation auftrat, und der Gruppe der Patienten, bei denen keine Abstoßungen auftraten, ist bei keinem Parameter auszumachen. Ein ähnliches Bild ergab sich auch bei der Auswertung der *borderline*-Abstoßungen und nach zeitlicher Auftrennung in frühe und späte Rejektionen.

Signifikante Unterschiede in der Stärke der maximalen Immunsuppression bestanden jedoch zwischen der Gruppe der Patienten, die eine gesicherte Rejektion aufwiesen, und denjenigen, bei denen keine BPAR nachgewiesen werden konnte: Die CD25-Expression war signifikant ($p=0,032$) stärker gehemmt, für die ebenfalls stärker gehemmte Proliferationsrate ($p=0,063$) und die CD-71-Expression ($p=0,069$) wurde das Niveau der Signifikanz knapp verfehlt.

Eine Tendenz zu einer vergleichsweise stärkeren Immunsuppression zeigte sich bei Patienten, die nach der Transplantation eine Infektion entwickelten. Der Unterschied war für die CD71-Expression signifikant ($p=0,046$) und konnte bei allen untersuchten Parametern mit Ausnahme der TNF- α -Synthese beobachtet werden.

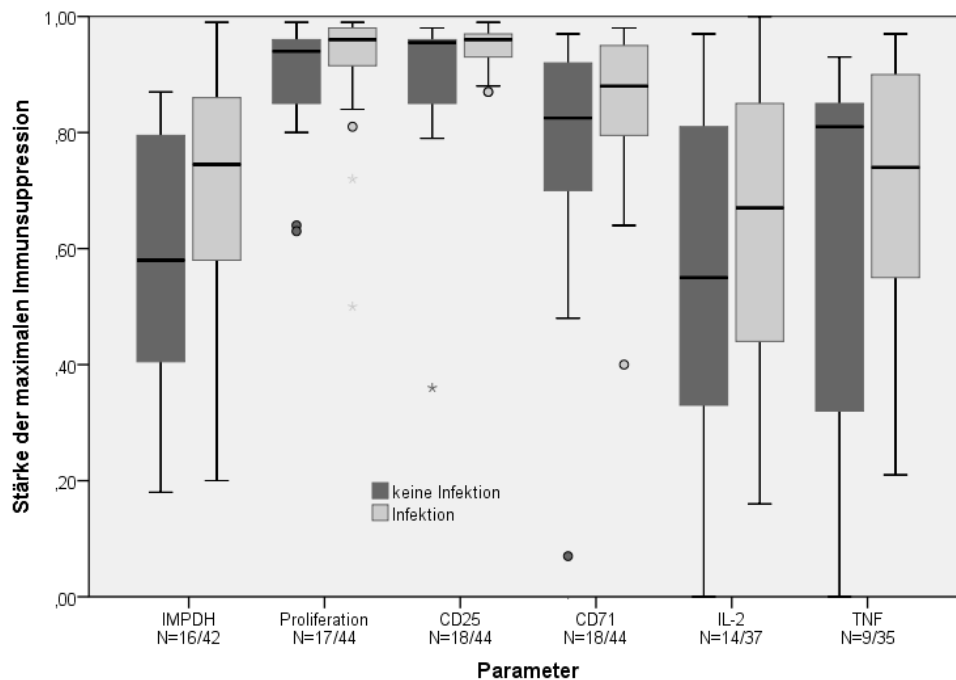


Abbildung 34: Die maximale Immunsuppression und das Auftreten von Infektionen

Bei der Betrachtung der schweren Infektionen ist die gleiche Tendenz zu beobachten, der Unterschied bei CD71 ist erneut signifikant ($p=0,032$).

Auch nach Aufschlüsselung nach dem Zeitpunkt des Auftretens der Infektion ergibt sich eine Tendenz zu einer stärkeren maximalen Immunsuppression in allen Parametern. Bei den frühen Infektionen sind die Unterschiede zwischen den Gruppen signifikant für die Proliferationsrate ($p=0,049$) und die Oberflächenmarker CD25 ($p=0,039$) und CD71 ($p=0,029$). Bei den späten Infektionen sind die Unterschiede bei der Proliferationsrate ($p=0,044$) und CD71 ($p=0,040$) signifikant.

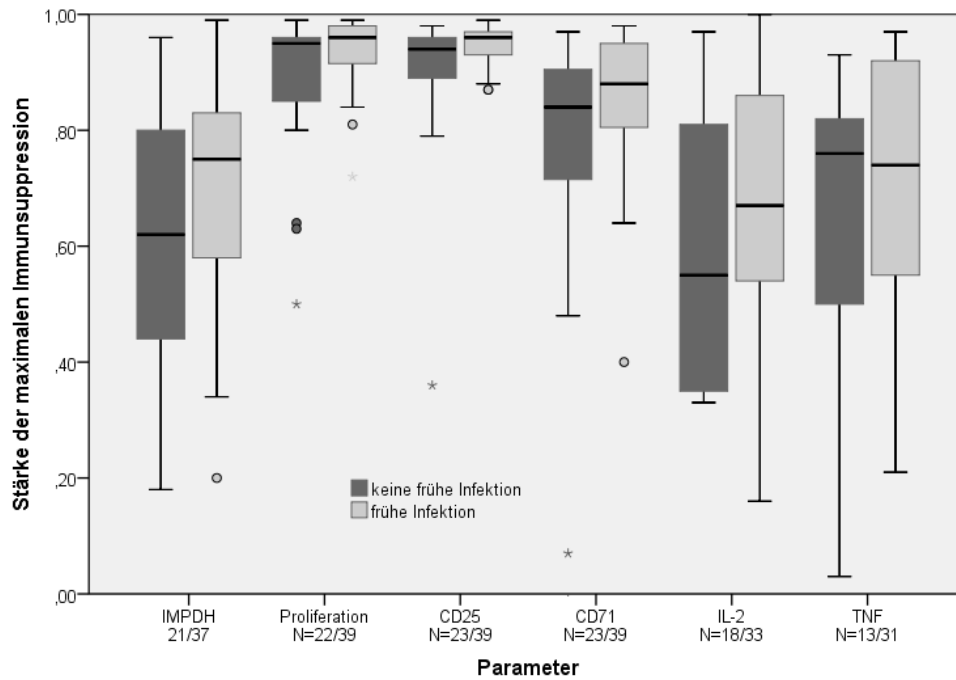


Abbildung 35: Die maximale Immunsuppression und das Auftreten von Infektionen vor der Randomisierung

Bei Patienten, bei denen im Verlauf eine CMV-Infektion diagnostiziert wurde, zeigte sich ebenfalls eine Tendenz zu einer stärkeren Immunsuppression in allen Parametern. Eine besonders starke maximale Suppression fiel bei der IMPDH-Aktivität und der Zytokinsynthese der unter einer Infektion mit dem Virus leidenden Patienten auf.

Zwischen der maximalen Suppression der Proliferationsrate ($r=0,30$, $p=0,018$), der IMPDH-Aktivität ($r=0,27$, $p=0,041$), der CD71-Expression ($r=0,25$, $p=0,049$) und der kumulativen Dauer der Infektionserkrankungen bestand jeweils ein signifikanter, jedoch nicht besonders ausgeprägter Zusammenhang. Mit der Zahl der Infektionsepisoden war kein Parameter signifikant korreliert.

6.8.4. Der Zusammenhang zwischen der kumulierten Restaktivität (AUE) der untersuchten Parameter und dem Auftreten klinischer Ereignisse

Der folgenden Abbildung ist zu entnehmen, dass sich die durchschnittliche kumulierte Restaktivität der untersuchten unspezifischen pharmakodynamischen Parameter, ausgedrückt als *area under the pharmacodynamic effect time curve* während der ersten 30 Tage nach der Transplantation (AUE₃₀), zwischen den Gruppen der Patienten mit akuten Abstoßungen und Patienten, die keine Rejektion aufwiesen, nicht wesentlich unterschied.

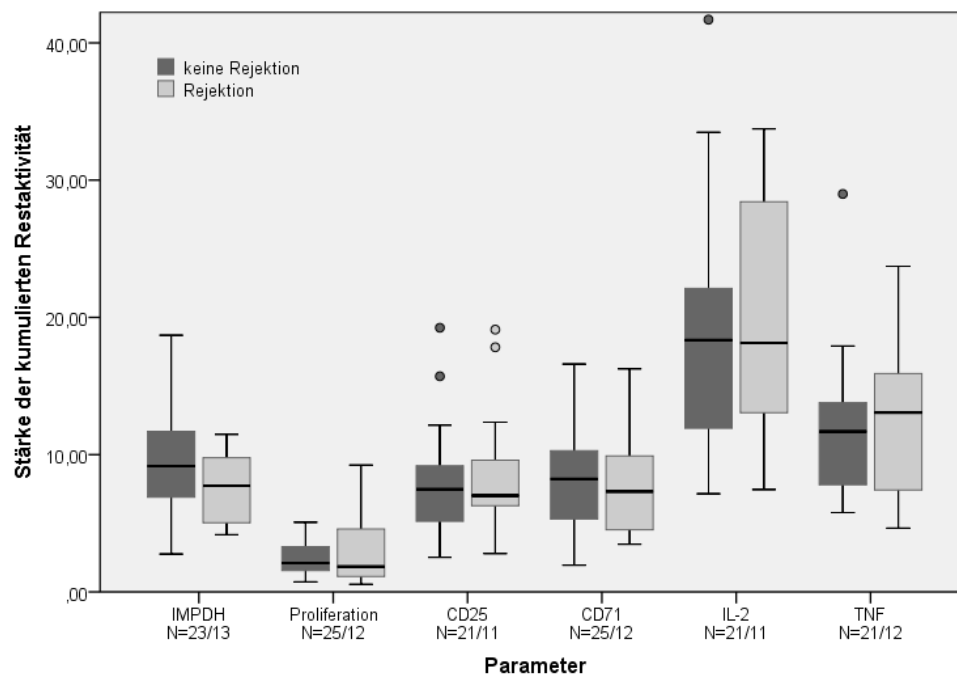


Abbildung 36: Die kumulierte Restaktivität der untersuchten Parameter im ersten Monat nach der Transplantation (AUE₃₀) und das Auftreten von akuten Abstoßungen

Ein ähnliches Bild ergab sich auch bei der Auswertung der gesicherten Abstoßungsreaktionen, der *borderline*-Abstoßungen und nach zeitlicher Auftrennung in frühe und späte Rejektionen.

In AUE, die für längere Zeiträume bestimmt wurden, war eine tendenziell niedrigere kumulierte Restaktivität der Proliferation und der Oberflächenmarkerexpression der abstoßenden Patienten zu erkennen. Deutlich erhöht war dagegen die Zytokinsynthese: bei der AUE₂₂₅ war der Unterschied der IL-2- und der TNF- α -Synthese signifikant ($p=0,018$ und $p=0,010$). Auch bei der alleinigen Betrachtung der gesicherten Abstoßungen zeigte sich eine signifikant höhere ($p=0,039$) IL-2-Synthese der abstoßenden Patienten. Bemerkenswert ist, dass bei Patienten mit frühen Abstoßungen die IL-2-Synthese vor Randomisierung (AUE₁₂₅) im Vergleich mit Patienten ohne frühe Abstoßung signifikant erhöht war ($p=0,046$), und dass die IL-2-Synthese nach der Randomisie-

rung (AUE_{nR}) ebenfalls bei Patienten mit späten Abstoßungen signifikant erhöht war ($p=0,040$). Außer während der Phase der stärksten Immunsuppression kurz nach der Transplantation ist also eine zeitliche Zuordnung der kumulierten IL-2-Synthese der T-Zellen zu den Abstoßungsreaktionen im jeweiligen Studienabschnitt möglich.

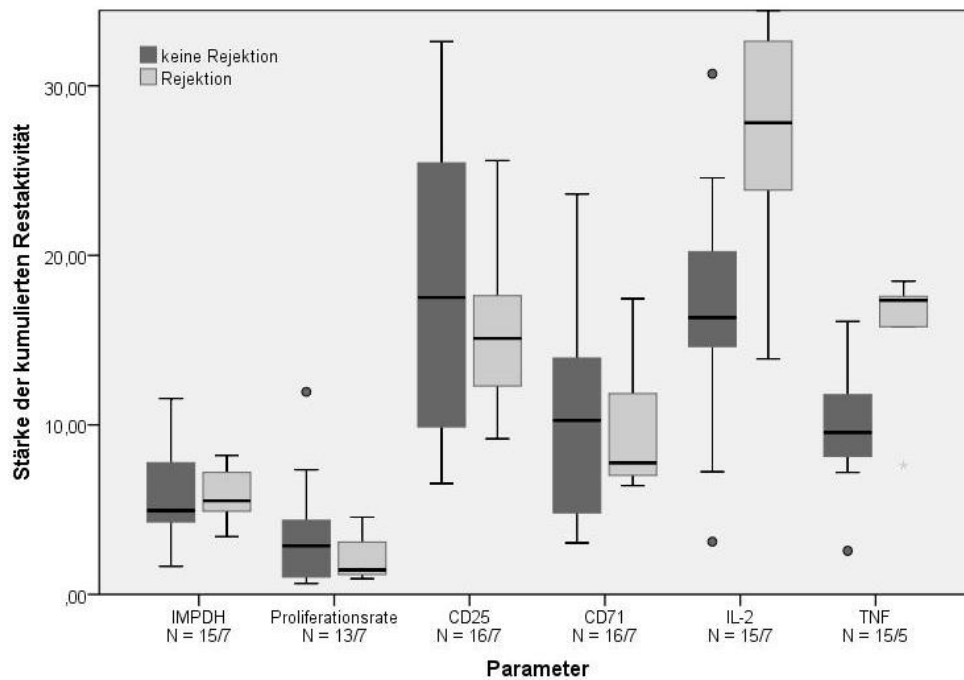


Abbildung 37: Die kumulierte Restaktivität der untersuchten Parameter nach der Transplantation (AUE_{225}) und das Auftreten von akuten Abstoßungen

Ein Trend zu einer niedrigeren kumulierten Restaktivität der untersuchten Parameter zeigte sich bei Patienten mit in den *case report files* der Zeus-Studie dokumentierten Infektionskrankungen.

Da die AUE_{225} bei Patienten ohne Infektion nicht bei allen Parametern berechenbar war, wurde die AUE_{125} dargestellt. Die Unterschiede zwischen den Gruppen waren für die CD25-Expression ($p=0,048$) und die TNF- α -Synthese ($p=0,047$) statistisch signifikant.

Eine ebenfalls signifikant niedrigere Restaktivität wurde bei Patienten mit später Infektion festgestellt ($p=0,004$ bei AUE_{125} CD25, $p=0,002$ bei AUE_{125} CD71, $p=0,046$ bei AUE_{125} TNF- α , $p=0,024$ bei AUE_{225} CD25, $p=0,046$ bei AUE_{225} CD71).

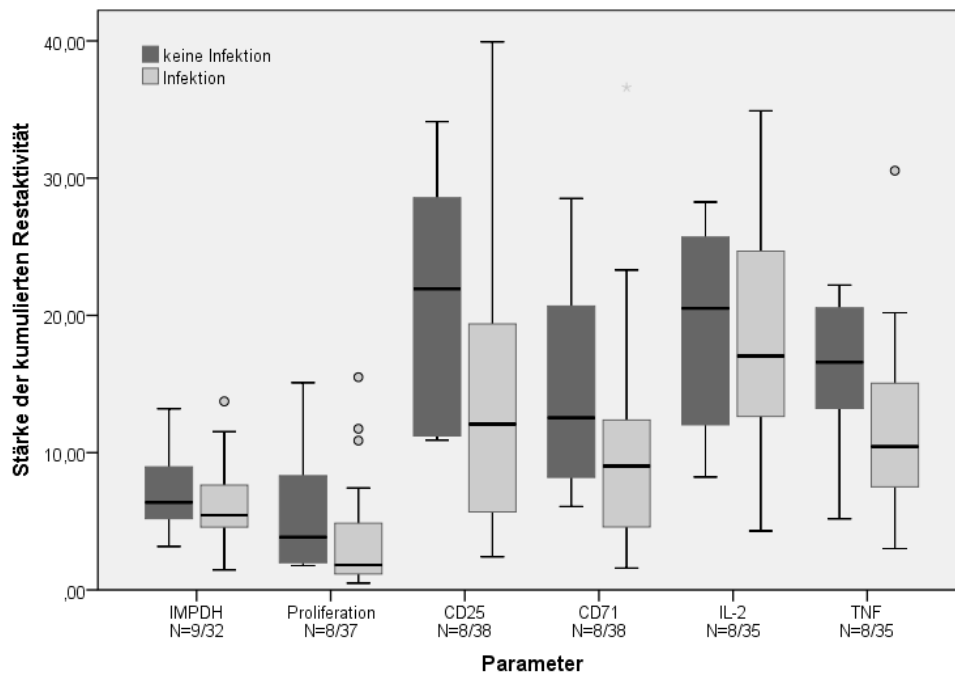


Abbildung 38: Die kumulierte Restaktivität der untersuchten Parameter bis zur Randomisierung (AUE₁₂₅) und das Auftreten von Infektionen

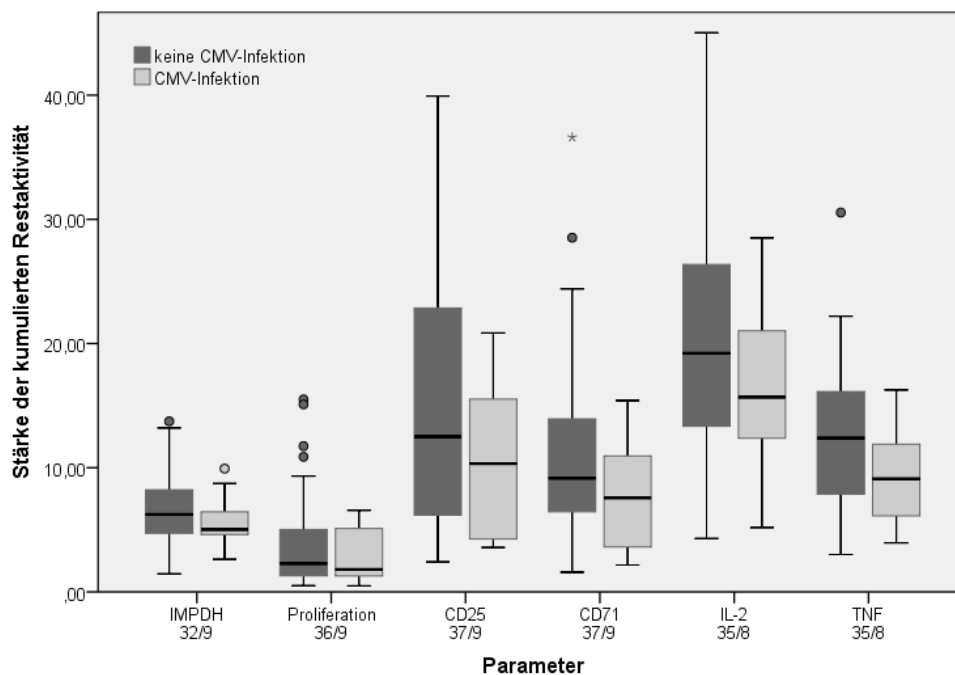


Abbildung 39: Die kumulierte Restaktivität der untersuchten Parameter bis zur Randomisierung (AUE₁₂₅) und das Auftreten von CMV-Infektionen

Patienten mit CMV-Infektion wiesen eine niedrigere Restaktivität aller untersuchten Parameter auf als Patienten, die nicht erkrankt waren. Die Unterschiede waren jedoch nicht signifikant.

Demgegenüber wiesen Patienten mit schweren Infektionen ein uneinheitliches Bild auf: einer tendenziell niedrigeren Proliferationsrate und Oberflächenmarker-Expression standen eine signifikant erhöhte IMPDH-Aktivität ($p=0,013$ bei AUE_{225}) und Zytokinsynthese gegenüber ($p=0,038$ bei AUE_{225} IL-2).

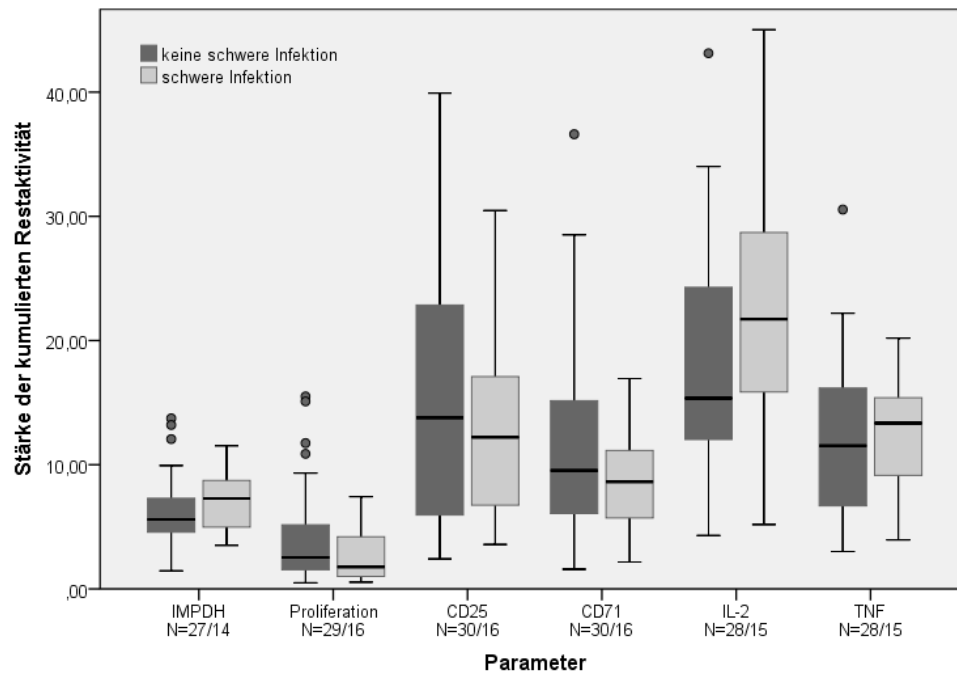


Abbildung 40: Die kumulierte Restaktivität der untersuchten Parameter bis zur Randomisierung (AUE_{125}) und das Auftreten von schweren Infektionen

Zwischen der Zahl der Infektionsepisoden nach Transplantation und der AUE_{225} der IMPDH-Aktivität bestand eine signifikante mittlere Korrelation ($r=0,57$, $p=0,005$). Auch zeigte sich eine signifikante, aber nicht sehr ausgeprägte Korrelation zwischen der Krankheitsdauer und der AUE_{125} der Proliferationsrate ($r=0,38$, $p=0,009$), der CD25-Expression ($r=0,35$, $p=0,018$) und der CD71-Expression ($r=0,31$, $p=0,039$).

6.8.5. *Der Zusammenhang zwischen der kumulierten Suppression (AAC) der untersuchten Parameter und dem Auftreten klinischer Ereignisse*

Durch die Berechnung der *Area above the curve* (AAC) wurde eine Kennzahl für den kumulierten Effekt der immunsuppressiven Therapie in einem bestimmten Zeitraum auf die untersuchten Parameter entwickelt.

Aus der folgenden Abbildung wird deutlich, dass sich kein eindeutiger Zusammenhang zwischen der Immunsuppression im ersten Monat nach der Transplantation (AAC₃₀) und dem Auftreten von akuten Abstoßungen nachweisen ließ.

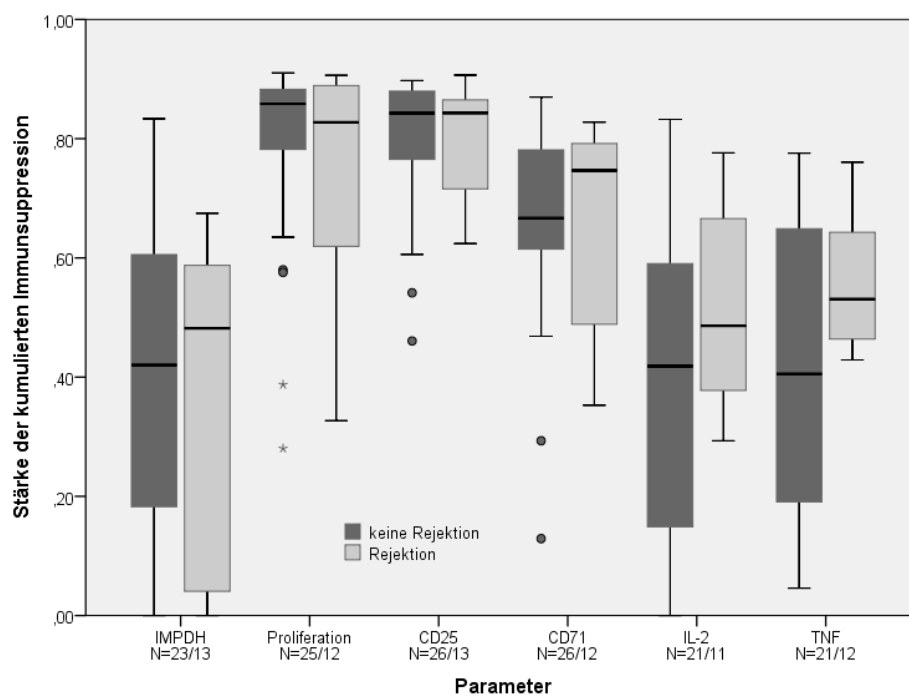


Abbildung 41: Die kumulierte Immunsuppression im ersten Monat nach der Transplantation (AAC₃₀) und das Auftreten von akuten Abstoßungen

Bei der Betrachtung der Kennzahlen längerer Zeiträume sind ebenfalls keine signifikanten Zusammenhänge mit dem Auftreten von akuten Abstoßungen, gesicherten, frühen oder späten Abstoßungen zu erkennen (AAC₁₂₅, AAC₂₂₅, AAC_{nR}), auch wenn bei der Zytokinsynthese – vor allem der IL-2-Synthese – und in geringerem Maß bei der Proliferationsrate eine Tendenz zu einer geringeren Immunsuppression bei den Patienten mit Abstoßungsreaktion besteht.

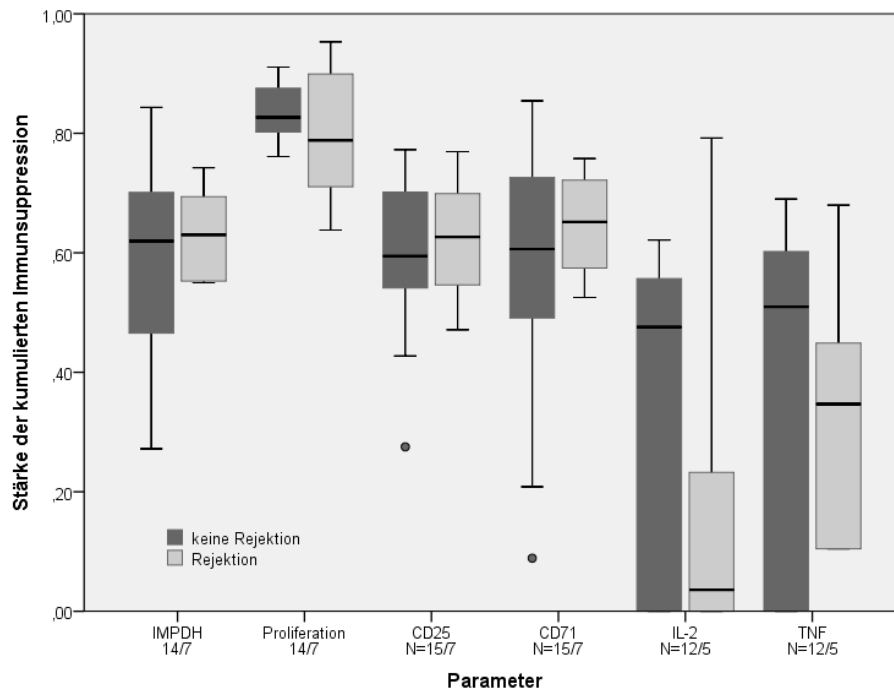


Abbildung 42: Die kumulierte Immunsuppression nach der Transplantation (AAC_{225}) und das Auftreten von akuten Abstoßungen

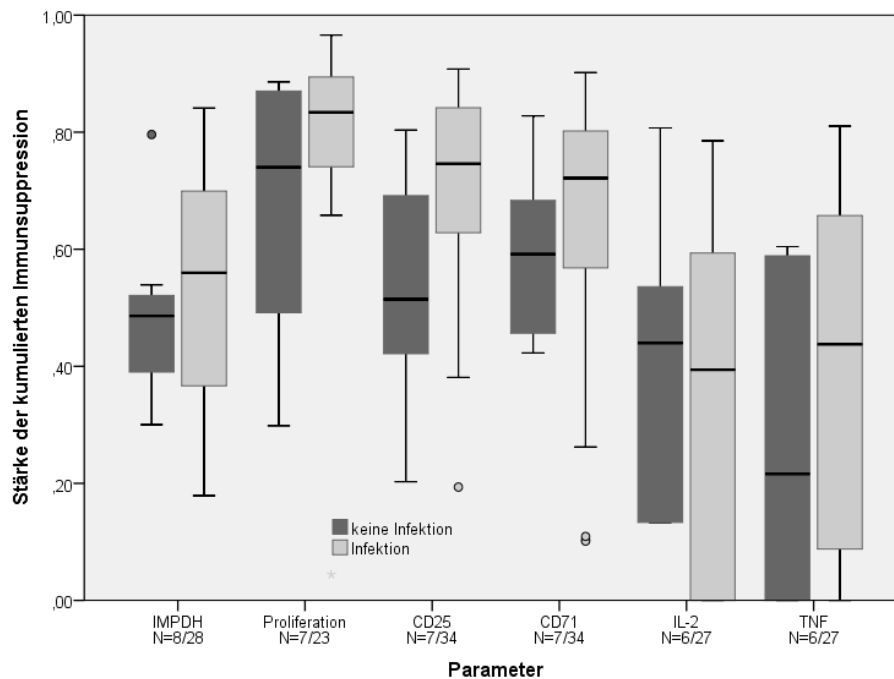


Abbildung 43: Die kumulierte Immunsuppression vor der Randomisierung (AAC_{125}) und das Auftreten von Infektionen

Eindeutiger war der Befund bei den Patienten mit Infektionen. Dargestellt wird die AAC_{125} , da die AAC_{225} wegen niedriger Fallzahlen für Patienten ohne Infektionserkrankungen nicht bei allen Parametern berechnet werden konnte.

Bei allen Parametern bis auf die IL-2-Synthese bestand ein deutlicher Trend zu einer stärkeren kumulierten Immunsuppression bei Patienten, bei denen Infektionen auftraten.

Signifikante Unterschiede einer der berechneten *areas under the curve* zwischen den Gruppen mit bzw. ohne Infektion, schwerer, früher oder später Infektion konnten nicht nachgewiesen werden.

Wie folgende Abbildung verdeutlicht, zeigten die unspezifischen pharmakodynamischen Parameter bei Patienten, die eine CMV-Infektion entwickelten, eine Tendenz zu einer stärkeren kumulierten Immunsuppression. Bei der Zytokinsynthese ist der Unterschied zwischen den Gruppen statistisch signifikant für IL-2 ($p=0,024$) und TNF- α ($p=0,008$). Bei der IMPDH-Aktivität waren keine Unterschiede festzustellen.

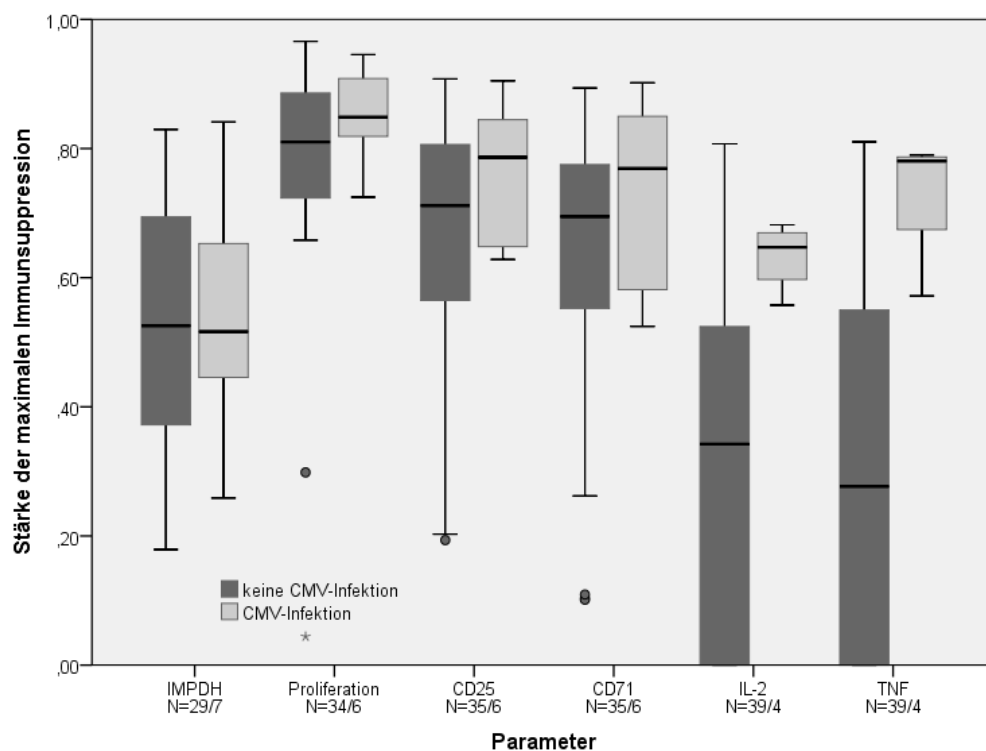


Abbildung 44: Die kumulierte Immunsuppression vor der Randomisierung (AAC_{125}) und das Auftreten von CMV-Infektionen

Zwischen der Zahl der Infektionsepisoden nach Transplantation und den AAC_{30} ($r=0,36$, $p=0,046$), AAC_{225} ($r=0,54$, $p=0,026$) und AAC_{nR} ($r=0,46$, $p=0,035$) der IL-2-Synthese bestanden signifikante mittlere Korrelationen. Auch bestand eine signifikante, aber nicht sehr ausgeprägte Korrelation zwischen der Krankheitsdauer und der AUE_{125} der CD25-Expression ($r=0,39$, $p=0,012$).

6.8.6. Die pharmakodynamischen Parameter während des Auftretens klinischer Ereignisse

In vorangehenden Abschnitten wurden die pharmakodynamischen Parameter und von ihnen abgeleitete Kennzahlen mit dem Auftreten der jeweils untersuchten *outcome*-Variablen in der Studienpopulation untersucht. Im Folgenden werden die während des Auftretens der *outcomes* Infektion und Rejektion erhobenen Werte mit den Werten der übrigen Studienvisiten verglichen.

Dabei ergaben sich für die IMPDH-Aktivität keine signifikanten Abweichungen der während einer akuten Abstoßungsperiode oder im Zeitraum einer Infektionserkrankung erhobenen Messwerte von den Normalwerten.

Während Perioden der Infektion war die IMPDH etwas stärker supprimiert, insbesondere offenbar bei schweren Erkrankungen.

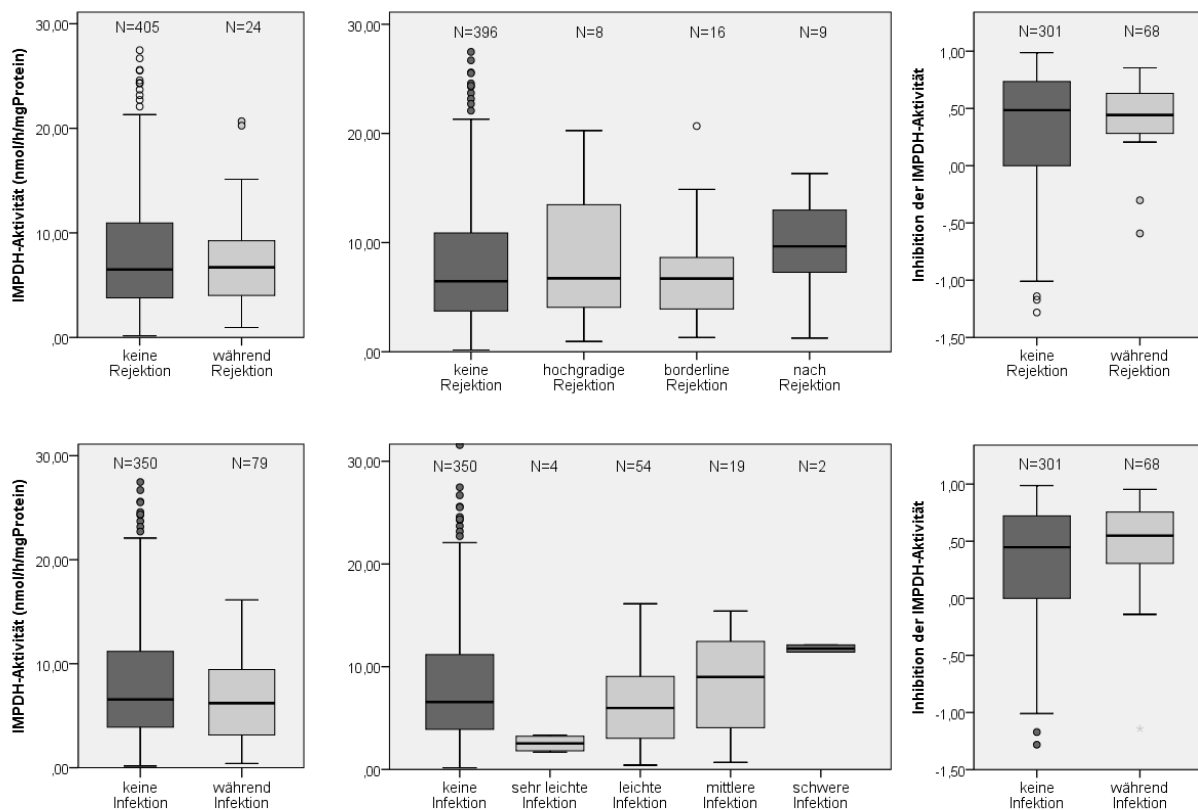


Abbildung 45: Vergleich der IMPDH-Aktivität während des Auftretens von Infektionen oder Rejektionen und ihrer Aktivität im freien Intervall

Bei der Betrachtung der Proliferationsrate fielen eine signifikant verringerte Aktivität ($p=0,023$) und signifikant stärkere Inhibition ($p=0,023$) bei den Messwerten auf, die während einer akuten Abstoßungsperiode erhoben worden waren.

Auch im Zeitraum einer Infektionserkrankung waren die Aktivität deutlich reduziert und die Inhibition verstärkt ($p=0,052$). Der Schweregrad einer Rejektion oder Infektion wirkte sich nicht aus.

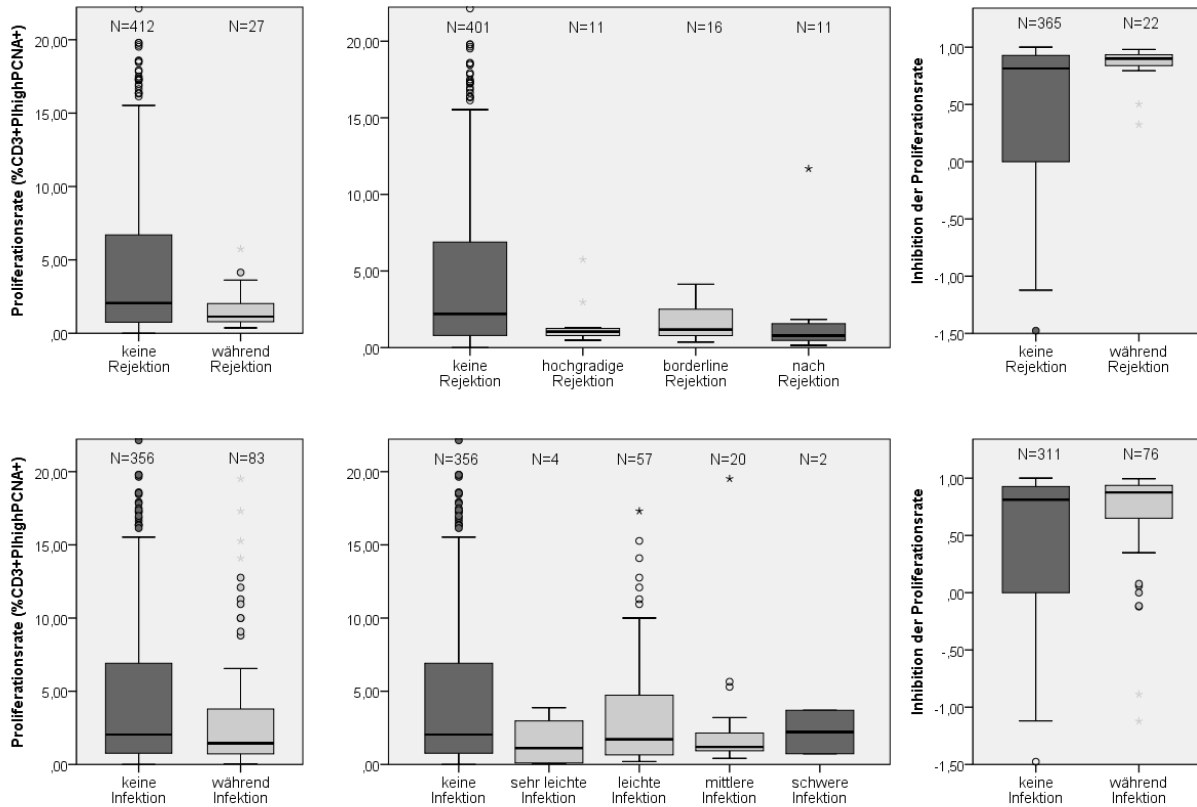


Abbildung 46: Vergleich der Proliferationsrate während des Auftretens von Infektionen oder Rejektionen und im freien Intervall

Die Expression des Oberflächenmarkers CD25 war ebenfalls während akuter Abstoßungen signifikant ($p=0,016$) reduziert, im Vergleich zu den Vortransplantationswerten fiel bei den abstoßenden Patienten zudem eine signifikant stärkere Inhibition der CD25-Expression auf ($p=0,002$). Während der Zeiträume von dokumentierten Infektionserkrankungen war ebenfalls eine deutlich reduzierte Aktivität, einhergehend mit einer deutlich stärkeren Inhibition, zu beobachten.

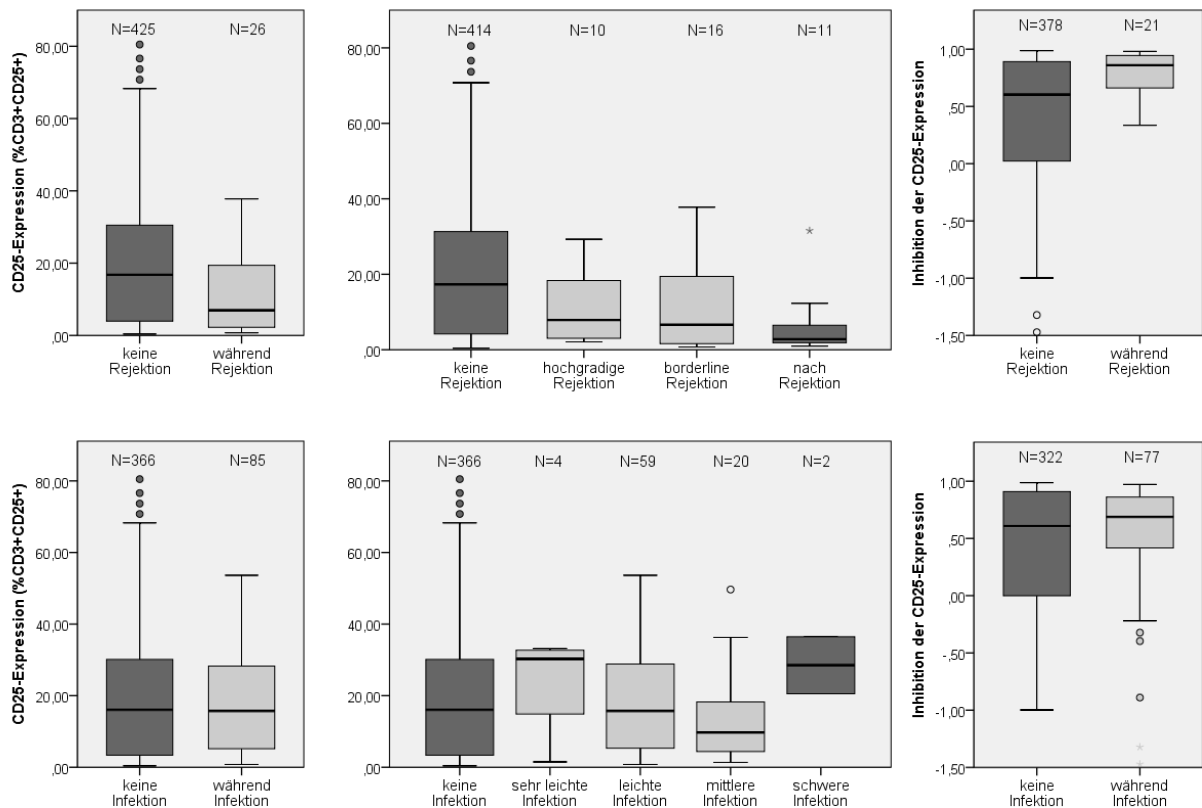
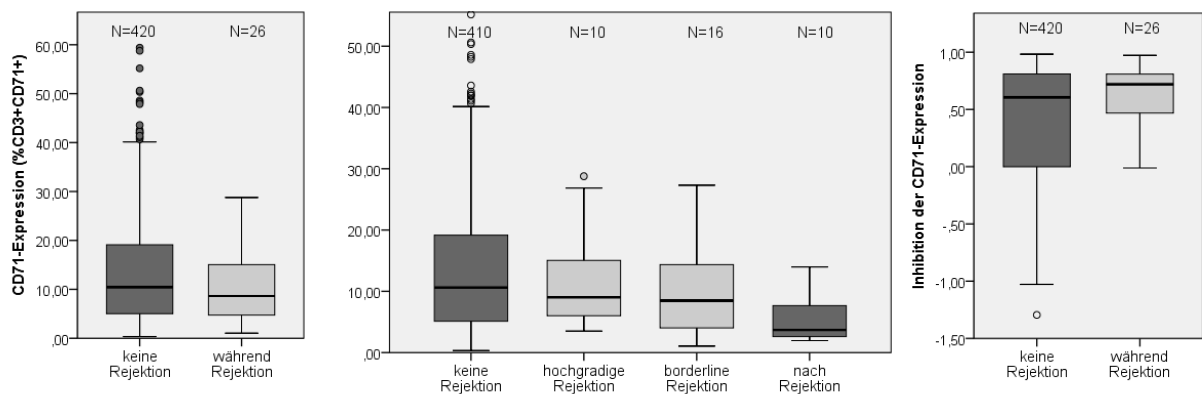


Abbildung 47: Vergleich der CD25-Expression während des Auftretens von Infektionen oder Rejektionen und im freien Intervall

Die Expression von CD71 ist ebenfalls sowohl während akuter Abstoßungen als auch während Infektionserkrankungen reduziert. Dies spiegelt sich in einer vermehrten Hemmung wieder. Im Gegensatz zu der des anderen Oberflächenmarkers CD25 reagiert die Expression von CD71 stärker auf Infektionserkrankungen als auf Rejektionen. Für die Infektionen sind die Unterschiede zwischen den Gruppen ebenso signifikant für die Aktivität ($p=0,022$) wie für die Inhibition ($p=0,043$).



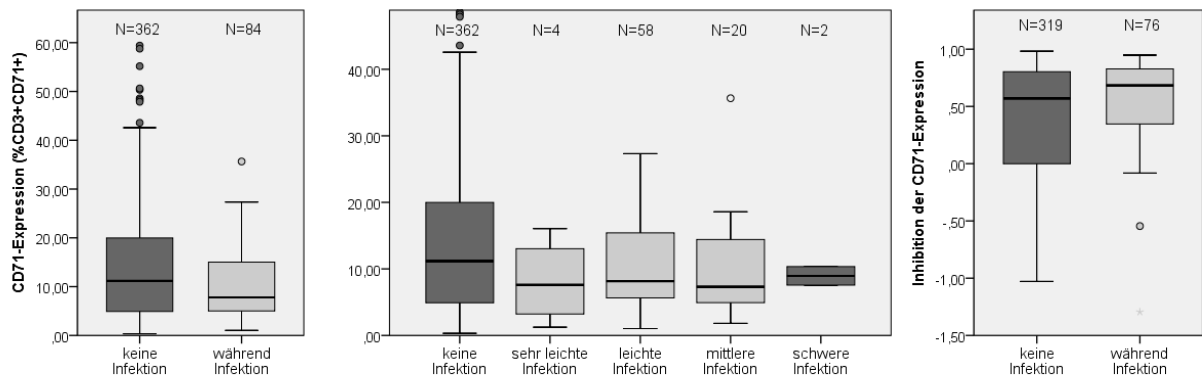


Abbildung 48: Vergleich der CD71-Expression während des Auftretens von Infektionen oder Rejektionen und im freien Intervall

Die Synthese des Zytokins IL-2 ist ebenfalls stärker mit Infektionen als mit Rejektionen assoziiert. Während einer Infektionserkrankung konnten eine signifikant niedrigere Rate IL-2-synthetisierender T-Zellen ($p=0,009$) und eine signifikant stärkere Hemmung der Vortransplantationswerte ($p<0,001$) nachgewiesen werden. Auch fallen abnehmende Syntheseraten bei zunehmender Schwere der Infektionserkrankung auf, diese Beobachtung war jedoch nicht signifikant.

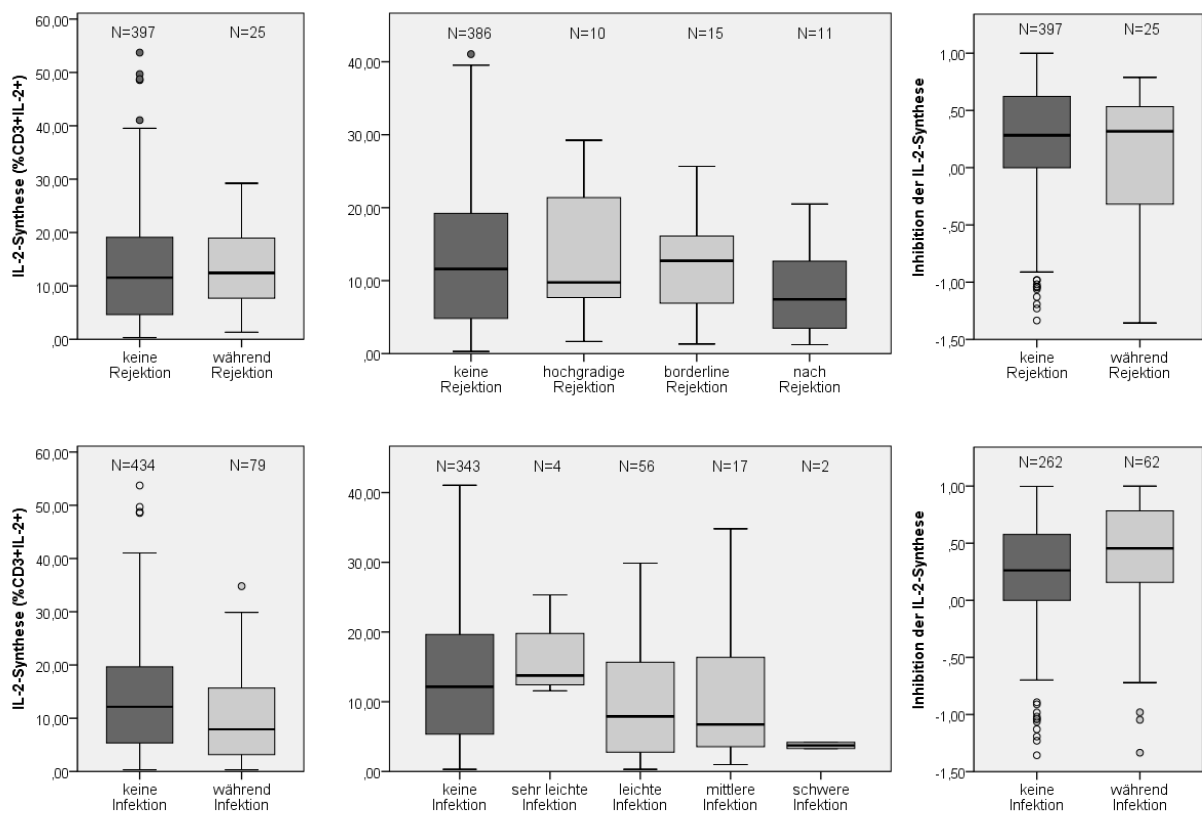


Abbildung 49: Vergleich der IL-2-Synthese während des Auftretens von Infektionen oder Rejektionen und im freien Intervall

Ähnlich wie die Synthese von IL-2 ist auch ein signifikantes Absinken der Rate der TNF- α -synthetisierenden T-Zellen während Infektionserkrankungen ($p=0,009$) zu verzeichnen. Damit einher geht eine signifikante Zunahme der Inhibition der Zytokinsynthese ($p<0,001$). Durch akute Abstoßungen wird die TNF- α -Synthese nur wenig beeinflusst.

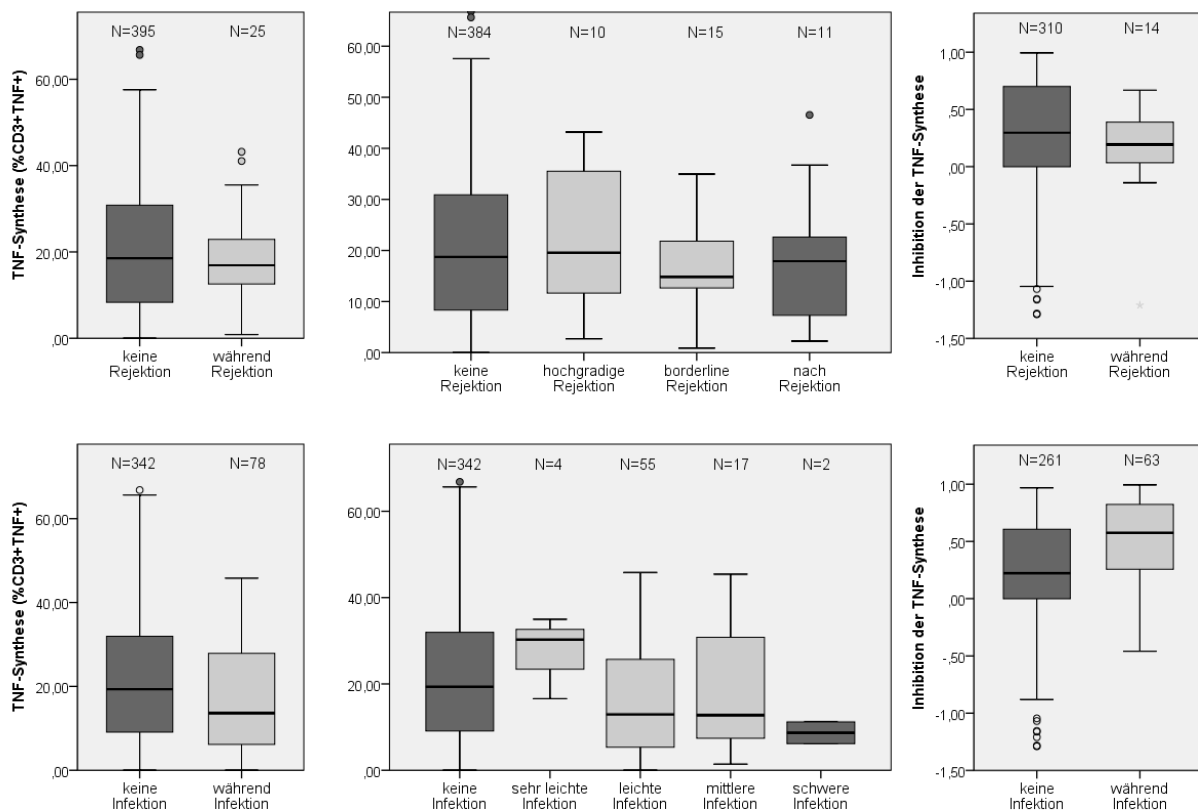


Abbildung 50: Vergleich der TNF- α -Synthese während des Auftretens von Infektionen oder Rejektionen und im freien Intervall

Die Zytokinsynthese war in der vorliegenden Untersuchung auch signifikant niedriger, während die Patienten an einer CMV-Infektion erkrankt waren ($p= 0,048$ für die IL-2-Synthese und $p=0,004$ für die IL-2-Inhibition, $p=0,002$ für die Inhibition der TNF- α -Synthese).

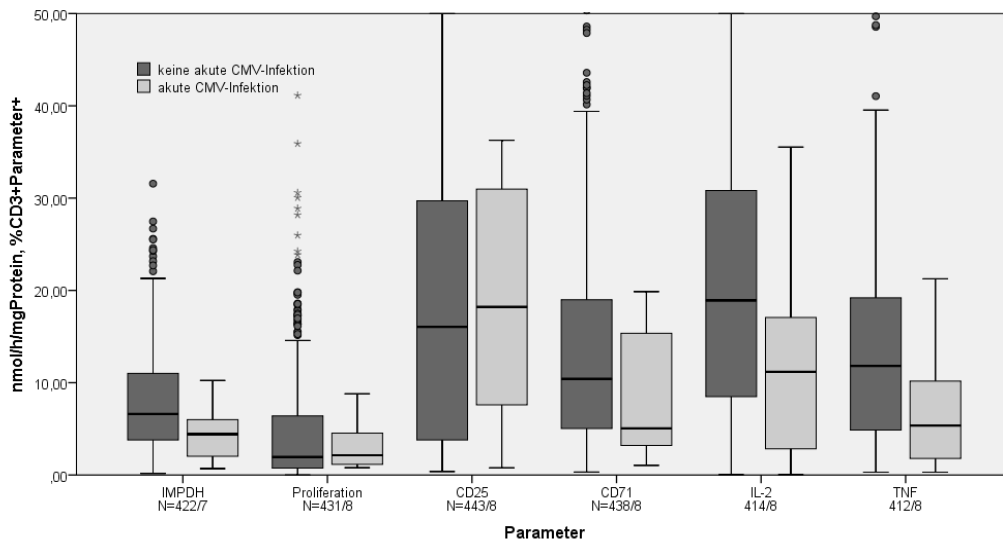


Abbildung 51: Vergleich der Aktivität der Parameter während des Auftretens von CMV- Infektionen und im freien Intervall

Unter der Hypothese, dass Rejektionen als Ausdruck der übermäßigen, Infektionen als Ausdruck einer zu niedrigen Immunsuppression aufgefasst werden können, werden die während Infektionsperioden, bei Patienten ohne klinisches Ereignis und die während akuten Abstoßungen erhobenen Parameter in den folgenden Abbildungen zusammengefasst abgebildet. Einige Messungen fielen in Phasen, in denen beide klinische Ereignisse zugleich berichtet worden waren; diese Werte wurden in der Untersuchung nicht berücksichtigt.

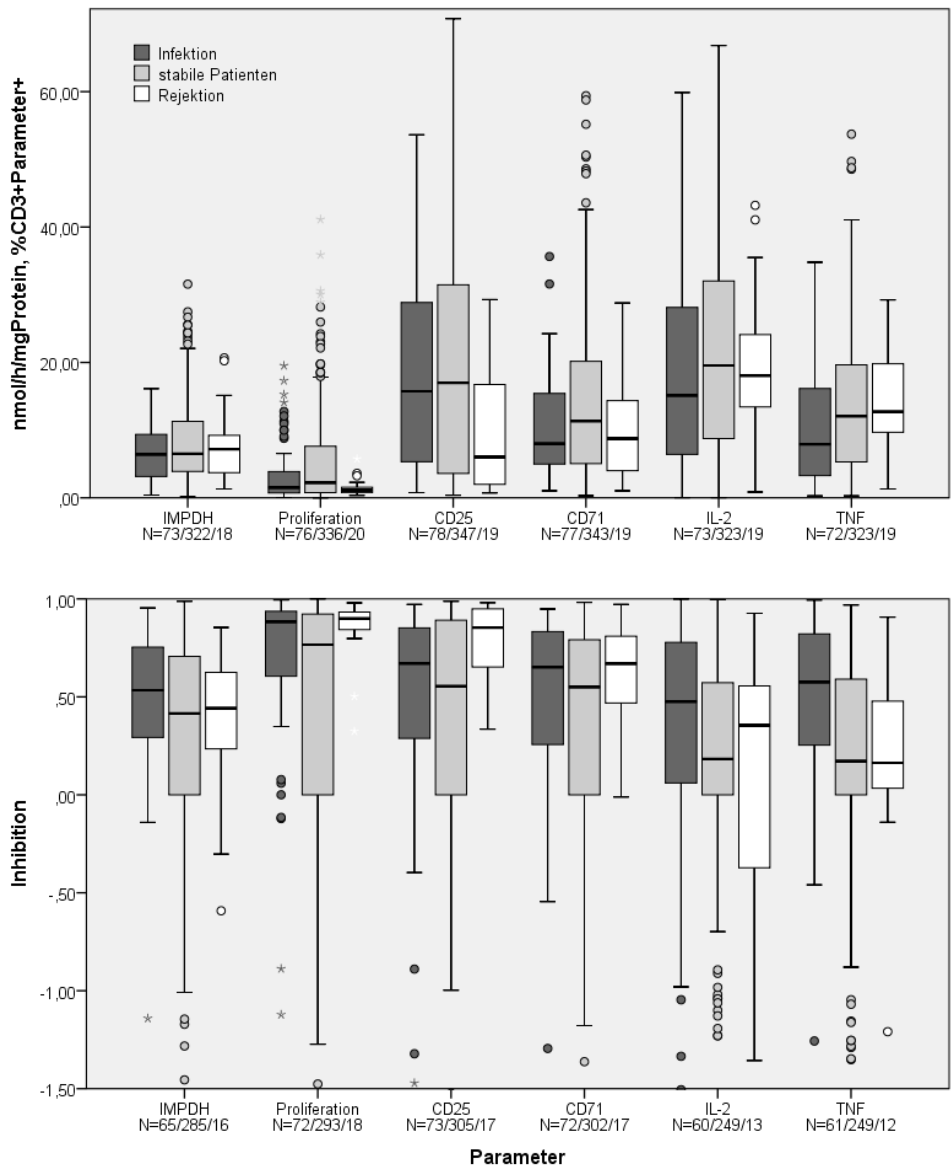


Abbildung 52: Vergleich der Aktivität und Hemmung der Parameter während Rejektionen, Infektionen und im freien Intervall

Dabei fällt auf, dass weder die Aktivität der Parameter während Infektionen, klinisch stabilen Phasen und Rejektionen, noch ihre Inhibition eine einheitliche Abfolge von zu hoher, normaler und zu niedriger Immunsuppression erkennen lassen.

6.9. Multivariate Varianzanalyse und ROC-Analyse

Wegen der besonderen klinischen Relevanz der Prätransplantationswerte als Prognosefaktoren wurde eine multivariate Varianzanalyse zur Bestimmung der klinischen Ereignisse Rejektion und Infektion (Auftreten während der gesamten Beobachtungszeit) durchgeführt. Die Faktoren Alter, Dialysedauer in Jahren, Lebendspende, Primärfunktion, *missmatch broad*, Studienarm, sowie die pharmakodynamischen Parameter vor der Transplantation wurden eingeschlossen.

Dabei konnte ein signifikanter Einfluss der IL-2-Synthese vor der Transplantation auf das *outcome* Rejektion ($p=0,042$) nachgewiesen werden. Weitere signifikante Faktoren auf das *outcome* Rejektion bestanden in Kombinationen aus den Faktoren Studienarm und Primärfunktion ($p=0,016$), sowie *missmatch broad* und Lebendspende ($p=0,034$); die Kombination Lebendspende und Studienarm hatte einen signifikanten Einfluss auf das *outcome* Infektion.

Für den Prätransplantationswert der IL-2-Synthese und die ebenfalls signifikant mit dem *outcome* Rejektion verbundenen Parameter der AUE₂₂₅ der IL-2-Synthese, sowie der maximalen Suppression der CD25-Expression und der Proliferationsrate wurden ROC-Analysen durchgeführt. Dabei ergaben sich für den Prätransplantationswert der IL-2-Synthese und die maximale Suppression der CD25-Expression wenig erfolgversprechende Werte der ROC-AUC von jeweils 0,40. Für die maximale Suppression der Proliferationsrate betrug die ROC-AUC 0,57, für die AUE₂₂₅ der IL-2-Synthese sogar 0,67.

Durch binär logistische Regression wurde für die AUE₂₂₅ der IL-2-Synthese ein cut-off-Wert von 27% CD³⁺IL-2⁺ ermittelt, der eine Sensitivität von 80% und eine Spezifität von 75% für das Auftreten von akuten Abstoßungen hatte.

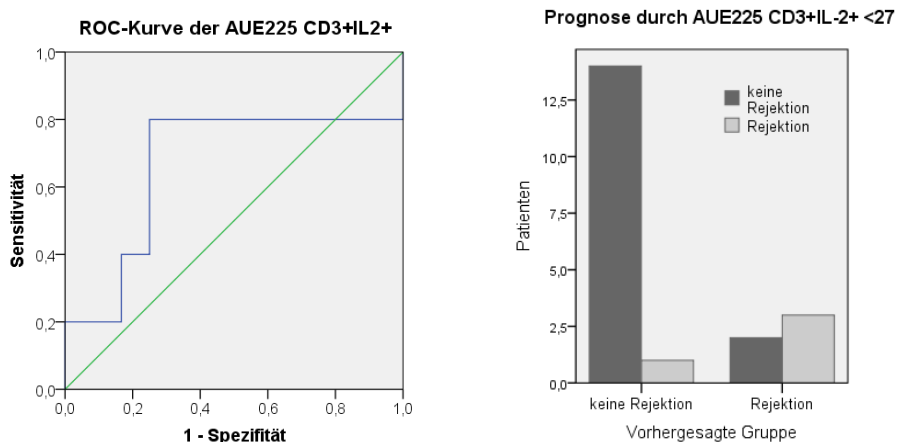


Abbildung 53: ROC-Kurve und prognostischer Wert der AUE₂₂₅CD³⁺IL²⁺

In einer multivariaten Varianzanalyse zur Bestimmung der klinischen Ereignisse Rejektion und Infektion (zum Zeitpunkt der Messung), in welcher die Faktoren Alter, Dialysedauer in Jahren, Lebendspende, Primärfunktion, *missmatch broad*, Studienarm, Dosis von Methylprednisolon und EC-MPS, sowie die Cyclosporin-Talspiegel und die pharmakodynamischen Parameter der Aktivität und der Inhibition einfließen, hatten von allen Faktoren und Covariaten lediglich die Aktivität ($p=0,025$) und die Inhibition ($p=0,037$) von CD71 einen signifikanten Einfluss auf eines der *outcomes*, eine Infektionskrankheit zum Messzeitpunkt.

Die Qualität des prädikativen Wertes der CD71-Expression wurde durch ROC-Analyse untersucht. Mit einer AUC von 0,58 für die CD71-Inhibition und 0,42 für die CD71-Expression war der Wert beider Parameter aber begrenzt.

7. *Diskussion*

7.1. *Die verwendeten Assays*

Um die immunsuppressive Therapie nach Nierentransplantation zu optimieren, sind in den letzten Jahren verschiedene Formen des „*Therapeutic drug monitoring*“ (TDM) entwickelt worden. Dabei dominieren derzeit in der klinischen Routine pharmakokinetische Verfahren (78).

Wegen der individuell sehr unterschiedlichen Verstoffwechslung der Medikamente und wegen Medikamenteninteraktionen werden pharmakokinetische Verfahren benötigt, um eine Exposition im toxischen Bereich zu vermeiden. Wegen der individuell unterschiedlichen Wirkung einer vergleichbaren Medikamentenexposition und wegen der synergistischen Effekte von Medikamentenkombinationen sind sie jedoch nicht ausreichend, weshalb keine gute Korrelation zwischen pharmakokinetischen Daten und dem *outcome* der Patienten besteht (79).

Die Suche nach Parametern, mit denen nicht nur die Anwesenheit, sondern auch die Wirkung der immunsuppressiven Medikamente im Körper des Patienten nachgewiesen und quantifiziert werden können, hat deshalb zur Etablierung einer ganzen Reihe von pharmakodynamischen Methoden geführt (87).

Vier der am besten validierten Assays, die durchflusszytometrische Bestimmung der Proliferationsrate, der Expression der Oberflächenmarker CD25 und CD71 und der Synthese der Zytokine IL-2 und TNF- α im stimulierten Vollblut, sowie der Assay zur Messung der Aktivität der IMPDH in PBMC wurden für die vorliegende Arbeit parallel eingesetzt, um ein Maximum an Informationen zu erhalten über die Effekte der immunsuppressiven Therapie mit dem CD25-Antagonisten Basiliximab, dem Calcineurininhibitor Cyclosporin A, dem mTOR-Inhibitor Everolimus, sowie von EC-MPS und Methylprednisolon, welche im Rahmen der ZEUS-Studie (135) eingesetzt wurden.

7.1.1. *Die FACS-Assays*

Die Notwendigkeit der Verwendung lymphozytenspezifischer Stimulationsverfahren in den zytometrischen Assays zur Darstellung immunsuppressiver Therapieeffekte konnte von Gummert (101) für die Proliferations- und Oberflächenmarkerassays und von Van der Berg (160) sowie Barten (123) für die Untersuchung der Zytokinsynthese aufgezeigt werden: ohne Stimulation konnten entweder keine Messwerte erhoben werden, oder die Werte sind so gering, dass jeder Nachweis ihrer Suppression an der Unschärfe der Verfahren scheitert. Im Gegensatz zu einer –

prinzipiell wünschenswerten, da realitätsnäheren – antigenspezifischen Stimulation bietet die in der vorliegenden Arbeit verwendete unspezifische Stimulation mehrere Vorteile: Erstens sind unspezifische Stimulantien im Gegensatz zu Spenderantigen jederzeit verfügbar. Zweitens ist das Verfahren zur Stimulation in allen Patienten identisch, die Reaktion auf die Stimulation also zwischen den Patienten vergleichbar. Drittens wird durch ein unspezifisches Stimulans die Gesamtheit der Lymphozyten aktiviert, wohingegen auf ein spezifisches Antigen nur einige Zellklone aktiviert werden könnten; ein messbares Ergebnis kann somit nicht mehr gewährleistet werden (161).

Die zur Verfügung stehenden unspezifischen Stimulantien aktivieren unterschiedliche intrazelluläre Signalkaskaden. Böhler konnte zeigen, dass die für die vorliegende Arbeit gewählten Stimulantien ConA und PMA/Ionomycin geeignet sind, die Proliferation und Oberflächenmarkerexpression bzw. die Zytokinsynthese anzuregen (107).

Zusammenfassend kann also festgestellt werden, dass die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Assays nicht die tatsächliche Aktivierung der Lymphozyten des Patienten messen, sondern ihre potentielle Aktivierbarkeit unter den Bedingungen der immunsuppressiven Therapie.

Das ideale Medium zur FACS-Analyse der genannten Parameter ist Vollblut. Es bietet gegenüber der Verwendung von PBMC als Untersuchungsmaterial den Vorteil der bestmöglichen Übereinstimmung mit den Bedingungen im Körper des Patienten. Auch werden ein geringeres Probenvolumen und weniger aufwendige Verfahren benötigt. Die physiologische Matrix der Blutbestandteile und somit das Gleichgewicht der Verteilung der Medikamente zwischen Bindung an Plasmaproteine und intrazellulärer Akkumulation bleibt erhalten, Auswascheffekte treten nicht auf. Damit ist Vollblut ideal zur Untersuchung der üblichen immunsuppressiven Kombinationstherapien (162).

Die Messung von Oberflächenmarkern von Lymphozyten durch FACS-Analyse ist ein etabliertes Verfahren, welches in der klinischen Routine vielfach eingesetzt wird (163).

Das Verfahren zur Bestimmung der Proliferationsrate durch den Nachweis von DNA nach Markierung mit PI, sowie der zusätzlichen Bestimmung von PCNA ist unter anderem von Barten (164) und Stalder (122) mit der klassischen Methode der Inkorporation des radioaktiven Markers [³H]TdR in die DNA verglichen worden. Beide Methoden liefern ähnliche Ergebnisse, so dass sich aufgrund der einfacheren Handhabung des Assays die in der vorliegenden Arbeit verwendete nichtradioaktive Methode durchsetzen konnte. Auch zeigte Flores, dass die Bestimmung der intrazellulären Zytokinsynthese von IL-2 und TNF- α durch das verwendete FACS-Assay Resultate erbrachte, die mit den durch Bestimmung der mRNA durch rt-PCR gewonnenen vergleichbar waren (124).

Die durchflusszytometrisch erhobenen Parameter sind als globale Marker sensitiv für ein breites Spektrum immunsuppressiver Medikamente. Dies prädestiniert sie für die Untersuchung komplexer Therapieregimes.

Besonders die Proliferationsrate der Lymphozyten wird von allen bekannten Immunsuppressiva gehemmt (161). Ähnliches kann für die Expression von Oberflächenmarkern als Gradmesser für den Aktivierungszustand der Lymphozyten gelten (99). Wegen ihrer guten Eignung sind die in der vorliegenden Arbeit gemessenen Oberflächenmarker CD25 und CD71 gut untersucht worden. CD25 stellt die α -Kette des IL-2-Rezeptors dar, die erst nach erfolgter Aktivierung der T-Zelle über den TCR und ausreichender Costimulation über CD28 für etwa eine Woche in großer Zahl exprimiert wird und sich mit der β -Kette zum hochaffinen Rezeptor für IL-2 verbindet. Neben aktivierten T-Zellen weisen auch regulatorische T-Zellen vermehrt CD25 auf (163). CD25 ist zudem die Zielstruktur von Basiliximab. Sein Nachweis kann deshalb einen spezifischen Parameter für dessen Therapieerfolg darstellen (93). Der erst nach Interaktion von CD25 mit IL-2 spät in der G₁-Phase exprimierte Transferrin-Rezeptor CD71 bezeichnet einen weiteren Meilenstein auf dem Weg zur erfolgreichen Aktivierung eines T-Zell-Klons, da ohne seine Expression und nachfolgende Internalisierung kein Übergang von der G₁-Phase in die S-, G₂- und schließlich M-Phasen der Zellteilung erfolgen und das zur Proliferation notwendige Eisen nicht aufgenommen werden kann (165). Wegen der sequentiellen Expression von CD25 und CD71 können also unterschiedliche Stadien der T-Zell-Aktivierung dargestellt werden.

Die Untersuchung der Zytokine IL-2 und TNF- α bietet zugleich mehrere Vorteile. IL-2 wird von Lymphozyten nach erfolgter Aktivierung für etwa ein bis zwei Tage vermehrt ausgeschüttet und dient als Signal 3 der T-Zell-Aktivierung der auto- und parakrinen Stimulation (5, 163).

Der Tumornekrosefaktor α schließlich ist eines der vielseitigsten Zytokine überhaupt. Er dient sowohl Lymphozyten als Comitogen, welches über den NF κ B- pathway wirkt, spielt aber auch eine besondere Rolle in der Aktivierung des angeborenen Immunsystems (163).

7.1.2. Der HPLC-Assay

Die Bestimmung der IMPDH-Aktivität in der vorliegenden Arbeit erlaubt den Vergleich der unspezifischen mit einem spezifischen pharmakodynamischen Parameter. Wegen der Wirkung der durch die Mycophenolsäure vermittelten IMPDH-Hemmung auf die Proliferationsfähigkeit der Lymphozyten ist vor allem der Vergleich mit der durchflusszytometrisch erfassten Proliferationsrate von besonderem Interesse.

Im Gegensatz zur Messung der FACS-Parameter aus stimuliertem Vollblut, kann der IMPDH-Assay ohne vorherige Stimulation durchgeführt werden. Die oben aufgeführten Vorteile von Vollblut als Untersuchungsmaterial gelten prinzipiell auch für die Untersuchung der IMPDH-Aktivität, zumal die Mycophenolsäure nur zu einem sehr geringen Anteil in den Lymphozyten nachgewiesen werden kann (138).

Wegen der durch Mycophenolsäure induzierten Enzymaktivität in Erythrozyten (168) ist es allerdings notwendig, PBMC anstelle von Vollblut als Untersuchungsmaterial zu verwenden. Den Nachteilen dieses Verfahrens und der Gefahr des Auswaschens der Mycophenolsäure aus den Lymphozyten wurden jedoch durch die Beschränkung auf ein einmaliges Waschen entgegengewirkt (132).

7.2. *Pharmakokinetik und Pharmakodynamik*

Die Pharmakokinetik von Cyclosporin A, Everolimus und EC-MPS ist gut untersucht. In Übereinstimmung mit der Literatur konnten in der vorliegenden Arbeit Korrelationen zwischen den Vortagesdosen von Cyclosporin A und EC-MPS und den Cyclosporin- und MPA-Talspiegeln aufgedeckt werden, nicht jedoch eine Korrelation zwischen der Everolimus-Vortagesdosis und dem morgendlichen Talspiegel, was durch die Metabolisierung des Medikaments erklärt werden kann (170).

Ebenfalls gut untersucht ist die Korrelation zwischen dem MPA-Spiegel und der IMPDH-Aktivität (139-141, 143-147), wobei unterschiedlich hohe Korrelationen zum Zeitpunkt der Talspiegelbestimmung ausgewiesen wurden. Die Stärke der Korrelation in der vorliegenden Untersuchung ($r=0,48$) liegt zwischen den von Glander (147) an 35 Patienten unter MMF-Therapie ($r=0,24$) und den unlängst von Stracke (171) an 24 Patienten unter EC-MPS-Therapie publizierten Werten ($r=0,67$). In der erstgenannten Untersuchung konnte Glander zudem zeigen, dass eine hohe interindividuelle Variabilität für die geringe Korrelation verantwortlich zeichnete, da intra-individuell bei mehreren Patienten eine deutlich höhere Korrelation nachgewiesen werden konnte (147).

Bemerkenswert ist, dass die Proliferationsrate noch stärker als die IMPDH-Aktivität mit dem MPA-Spiegel korreliert ist. Auch die CD71-Expression weist eine ähnlich starke Korrelation aus, etwas geringer ist die Stärke der Korrelation zwischen MPA-Spiegel und CD25-Expression. Die Korrelation der Proliferationsrate mit dem MPA-Talspiegel war in der vorliegenden Arbeit ($r=0,52$) stärker ausgeprägt als in einer vergleichbaren Untersuchung von Prémaud (172) an 10 Patienten auf der Warteliste für eine Lebertransplantation, die einmalig 1g Mycophenolat Mo-

fetil erhielten ($r=0,18$). Die Expression der Oberflächenmarker CD25 ($r=0,28$) und CD71 ($r=0,30$) war bei Prémaud stärker mit dem MPA-Spiegel korreliert als die Proliferationsrate, aber schwächer als in der vorliegenden Arbeit.

Auch Kamar (108, 146) berichtete über eine Korrelation zwischen der Proliferationsrate, der Oberflächenmarkerexpression und dem MPA-Spiegel bei 24 Patienten vor Nierentransplantation nach einmaliger Gabe von 1g Mycophenolat Mofetil. In seiner Arbeit fiel eine im Vergleich zur IMPDH-Aktivität stärkere und länger anhaltende Unterdrückung der Proliferationsrate auf. Auch beobachtete er einen Zusammenhang zwischen dem MPA-Spiegel und der Expression der Oberflächenmarker CD25 und CD71. Anders als die Hemmung der T-Zell-Proliferation, die durch die molekulare Wirkungsweise der Mycophenolsäure gut erklärbar ist, ist die Reduktion der Expression der Aktivierungsmarker CD25 und CD71 erklärungsbedürftig. Gummert (101) führte sie auf eine verminderte Glykosylierung von Proteinen der Zelloberfläche, eine verminderte G-Proteinaktivität und eine möglicherweise verringerte mRNA-Synthese durch Purindepletion nach MPA-Therapie zurück. Darüber hinaus ist insbesondere die Expression des Transferrinrezeptors CD71 eng mit der Zellproliferation assoziiert.

Böhler (107) wies *in vitro* nach, dass die Mycophenolsäure die Proliferationsrate dosisabhängig vollständig unterdrücken, die Oberflächenmarkerexpression jedoch nur abschwächen kann.

Die zusätzliche Komplexität, die mit einer Kombinationstherapie einhergeht, zeigte Barten (106) in einer *in vitro*-Untersuchung auf, in welcher er synergistische Effekte von Cyclosporin und der Mycophenolsäure nachweisen konnte. Der zusätzliche Effekt verschiedener MPA-Dosen wurde dabei schwächer, je mehr Cyclosporin eingesetzt wurde. Die Proliferationsrate wurde stärker gehemmt als die CD25-Expression. Millan (117) verglich eine Cyclosporin-Monotherapie mit einer Cyclosporin-MMF-Kombinationstherapie bei stabilen Nierentransplantierten und fand in der Gruppe mit Kombinationstherapie trotz niedrigerer Cyclosporindosen eine vergleichbare Calcineurinhemmung und eine geringere Stimulierbarkeit der IL-2-Synthese.

Eine Korrelation zwischen den MPA-Spiegeln und der Zytokinsynthese konnte nicht nachgewiesen werden, da sich die Mycophenolsäure – als Inhibitor primär der Proliferation, nicht der Aktivierung – nicht auf die Zytokinsynthese auswirkt. Auf diese Tatsache wiesen sowohl Böhler (107) bei seiner Untersuchung *in vitro* hin als auch Kamar (108) und Prémaud (172) in ihren *in vivo*-Studien. Zudem konnte Böhler (173) in einer Untersuchung der Umstellung der Therapie stabiler nierentransplantierte Patienten von MMF 1g/Tag auf die äquivalente Dosis von EC-MPS (720mg/Tag) zwar einen nicht signifikanten Anstieg der Proliferationsrate und der Oberflächenmarkerexpression, nicht jedoch eine Veränderung der Zytokinsynthese feststellen.

Die pharmakodynamischen Parameter haben nicht nur eine Korrelation zu den MPA-Spiegeln, sondern auch zu den am Vortag verabreichten EC-MPS-Dosen. Für die IMPDH-Aktivität und die CD71-Expression fällt diese Korrelation schwächer aus als die Korrelation mit dem MPA-Spiegel, bei der Proliferationsrate und der CD25-Expression stärker. Eine Erklärung könnte sein, dass die Mycophenolsäure komplexe immunsuppressive Effekte auslöst, die über die reine Hemmung der Enzymaktivität durch den zum Zeitpunkt der Bestimmung des Talspiegels noch nachweisbaren Wirkstoff hinausgehen.

Die Calcineurininhibitoren haben aufgrund ihrer molekularen Wirkung früh in der T-Zell-Aktivierung Auswirkungen auf alle untersuchten unspezifischen Parameter, nicht jedoch auf die IMPDH-Aktivität.

Die stärkste Korrelation konnte zwischen dem Cyclosporin-Talspiegel und der Expression des Oberflächenmarkers CD25, gefolgt von der Expression von CD71 festgestellt werden. Die Korrelation mit der Proliferationsrate und der IL-2-Synthese war ebenfalls hochsignifikant, aber schwächer ausgeprägt.

Noch stärkere Korrelationen konnten zwischen den Vortagesdosen und den pharmakodynamischen Parametern festgestellt werden. Bei diesen ist erneut die CD25-Expression am stärksten korreliert, gefolgt von der Proliferationsrate und der CD71-Expression. Die Zytokinsynthese ist mit der Cyclosporindosis schwächer korreliert als mit dem Cyclosporintalspiegel.

In mehreren Untersuchungen zum pharmakodynamischen Monitoring von herztransplantierten Patienten unter Calcineurininhibitortherapie konnte Barten (174-176) eine hohe Korrelation zwischen den Cyclosporindosen bzw. den Cyclosporin-C₂-Spiegeln einerseits und den zwei Stunden nach Medikamentengabe gemessenen pharmakodynamischen Parametern andererseits nachweisen. Die Korrelation zwischen den pharmakodynamischen Parametern und den zeitgleich gemessenen Cyclosporinspiegeln war höher als diejenige mit den zuvor verabreichten Cyclosporindosen. Bei 45 Herztransplantierten unter Cyclosporinmedikation war die Korrelation zwischen der Dosis und dem immunsuppressiven Effekt am stärksten ausgeprägt für die CD25-Expression, gefolgt von der Proliferationsrate und der IL-2-Synthese. Etwas geringer war die Korrelation mit der TNF- α -Synthese. Die Korrelationen der Talspiegel mit den pharmakodynamischen Parametern wurden nicht beschrieben (176).

Die Synthese von IL-2 ist als spezifischer Parameter für die Wirkung der Calcineurininhibitoren angesehen worden. In einer ganzen Reihe von Studien konnte ein Rückgang der IL-2-Produktion aktivierter T-Zellen bei mit Cyclosporin A oder Tacrolimus behandelten Patienten nachgewiesen werden (117, 118, 122, 123, 160, 166, 169). Böhler (107) konnte zeigen, dass die IL-2-Synthese in vitro durch Cyclosporin fast vollständig unterdrückt werden kann. Van den Berg (160) be-

schrrieb 1999 in seiner Untersuchung von 13 Leber- und 7 Nierentransplantierten eine signifikante Korrelation zwischen dem Cyclosporin-Talspiegel und dem Anteil IL-2-produzierender T-Helferzellen ($r=-0,74$). Weder Grinyó (167) noch Stalder (122) konnten aber eine Korrelation zwischen dem Talspiegel von Cyclosporin und der IL-2-Synthese nachweisen.

Es fällt auf, dass die Aktivierbarkeit der T-Zellen zur IL-2-Synthese am stärksten mit dem Spiegel zwei Stunden nach Medikamenteneinnahme korreliert zu sein scheint, dann mit dem Talspiegel und am schwächsten mit der Vortagesdosis. Diese Beobachtung wird von den Untersuchungen von Stein und Tkaczuk gestützt, welche die maximale Wirkung von Cyclosporin auf die IL-2-Synthese bereits zwei Stunden nach Medikamentengabe beschrieben; nach weiteren zwei Stunden ließen diese aber bereits deutlich nach (118, 177).

Zwischen den Medikamentendosen von Everolimus und den pharmakodynamischen Parametern bestand keine Korrelation. Die Everolimus-Talspiegel waren lediglich mit der Proliferationsrate signifikant, wenn auch schwach korreliert. Die Stärke der Korrelation war vergleichbar mit derjenigen von Cyclosporin, jedoch schwächer als die der Mycophenolsäure.

Dieser Befund deckt sich mit den Ergebnissen der bislang in der Literatur beschriebenen Untersuchungen und mit der Wirkungsweise von Everolimus. Als mTOR-Inhibitor greift Everolimus erst nach erfolgter Lymphozytenaktivierung in die klonale Expansion ein. Eine isolierte Auswirkung auf die Proliferationsrate ist deshalb plausibel. In vitro wies Barten (106) eine maximale Hemmung der Proliferationsrate von $83 \pm 3\%$ durch Sirolimus nach. Dieser Effekt war etwas schwächer als der Effekt von Cyclosporin ($102 \pm 5\%$). Eine Kombinationstherapie von Sirolimus und MPA wirkte ebenso synergistisch wie die Kombination von Cyclosporin A und MPA.

Für die Steroide liegen nur Dosisangaben vor. Alle Patienten erhielten initial hohe Steroiddosen, im Verlauf wurden diese in der Regel schnell auf die Erhaltungsdosis von 4mg Methylprednisolon/Tag reduziert und nur vereinzelt im Rahmen einer Stoßtherapie einer akuten Abstoßung zeitweilig wieder erhöht. Es besteht eine hohe Korrelation der Steroiddosis mit der CD25-Expression und eine mittlere Korrelation mit der Proliferationsrate und der CD71-Expression.

Böhler (107) konnte zeigen, dass Methylprednisolon in vitro die Proliferation fast vollständig, die CD71- und CD25-Expression stark, die TNF- α -Synthese wenig und die IL-2-Synthese nur minimal hemmt. Die Unterdrückung der Lymphozytenproliferation durch Prednisolon in vivo wies Ferron (100) nach.

Die zusätzliche Induktionstherapie mit Basiliximab fällt ebenso wie die hohen Steroiddosen in die erste Phase nach der Transplantation. Diese zeitliche Übereinstimmung könnte zur Erklärung der hohen Korrelation der Unterdrückung der CD25-Expression mit den Steroiddosen beitragen.

7.3. *Die Ausgangswerte vor Transplantation*

Die Werte der pharmakodynamischen Parameter bei den für die vorliegende Arbeit untersuchten Patienten bewegen sich im Rahmen der Befunde anderer Studien, die mit vergleichbaren Assays durchgeführt wurden.

Bei 40 gesunden Probanden wies Budde (150) eine IMPDH-Aktivität von $18,7 \pm 6,3$ nmol/h/mg Protein nach, in einer weiteren Untersuchung an 65 Gesunden eine Aktivität von $17,7 \pm 6,4$ nmol/h/mg Protein. Glander fand in zwei Untersuchungen (137, 148) an 60 bzw. 89 gesunden Probanden Werte von $18,4 \pm 6,2$ nmol/h/mg Protein und $15,8 \pm 6,6$ nmol/h/mg Protein. Untersuchungen von Kollektiven ausschließlich von Dialysepatienten werden in der Literatur nur spärlich berichtet. Budde (150) gibt bei 5 Dialysepatienten eine IMPDH-Aktivität von $11,7 \pm 5,2$ nmol/h/mg Protein an, Glander (148) bei 8 Dialysepatienten eine Aktivität von $11,4 \pm 4,7$ nmol/h/mg Protein. Gemischte Kollektive vor der Transplantation sind besser untersucht: Kamar (108) fand bei 24 Patienten an zwei aufeinander folgenden Tagen eine durchschnittliche IMPDH-Aktivität von 14,1 und 14,3 nmol/h/mg Protein, Glander (147) berichtet über eine Aktivität von $9,56 \pm 4,27$ nmol/h/mg Protein bei 79 Patienten. Zusammenfassend scheint bei gesunden Patienten eine tendenziell etwas höhere IMPDH-Aktivität vorzuliegen. Dies war in der vorliegenden Arbeit (bei einer geringen Fallzahl präemptiv transplantierte Patienten) nicht nachweisbar. Alle Untersuchungen berichten aber von einer großen interpersonellen Variabilität der Enzymaktivität. Die bereits in der Literatur berichteten Beobachtungen (139, 178), dass Alter und Geschlecht keine signifikante Auswirkung auf die Höhe der IMPDH-Aktivität haben, wurde bestätigt.

Eine durchschnittliche Proliferationsrate von 16,8% und $17,1 \pm 8,9\%$ konnten Böhler (169) und Canivet (179) an 85 bzw. 25 gesunden Probanden nachweisen. Auch fanden Canivet (179) und Prémaud (180) ähnliche Werte ($18,6 \pm 7,3\%$ und 16,1%) bei Patienten, die auf eine Lebertransplantation warteten.

Etwas niedrigere Proliferationsraten wurden bei Dialysepatienten gefunden. So gelang es Kamar (108), an zwei aufeinander folgenden Tagen bei 24 Probanden einen durchschnittlichen Anteil proliferierender T-Zellen von 12,3% und 12,9% festzustellen. Weitere 5 Dialysepatienten untersuchte Böhler (107) und fand eine Proliferationsrate von $14,2 \pm 8,1\%$. Im Vergleich mit 85 Gesunden erkannte Böhler (169) keinen signifikanten Unterschied in der Proliferationsrate von 28 Dialysepatienten. Auch fand sich kein Hinweis auf einen Einfluss der Dialysedauer auf die Proliferationsfähigkeit der Lymphozyten.

In der vorliegenden Untersuchung ist die Proliferationsrate der Patienten, welche vor der Transplantation dialysepflichtig waren, niedriger ($12,5 \pm 8,2\%$) als der Anteil bei den präemptiv transplantierten Patienten ($15,8 \pm 3,4\%$), der Unterschied war jedoch nicht signifikant.

Die Expression der Oberflächenmarker CD25 und CD71 ist ebenfalls bei gesunden Probanden, Dialysepatienten und Patienten, die auf eine Lebertransplantation warteten, untersucht worden. Die Lymphozyten der gesunden Probanden konnten dabei jeweils zur stärksten Expression stimuliert werden. So fand Stalder (122) eine CD25-Expression bei 58% der T-Zellen, CD71 wurde von 57% exprimiert. Canivet (109) wies einen CD25-exprimierenden T-Zell-Anteil von $56,3 \pm 15\%$ und einen CD71-exprimierenden Anteil von $41,1 \pm 16\%$ nach. Etwas geringer waren die Aktivierungsmarker in der Studie von Böhler (169) ausgeprägt (CD25-Expression 45,3%, CD71-Expression 33,1% der T-Zellen). In demselben Bereich bewegen sich die Werte der präemptiv transplantierten Patienten ($52,3 \pm 12,2\%$ für CD25 und $30,5 \pm 4\%$ für CD71) in der vorliegenden Untersuchung. Ebenfalls gut stimulierbar war die Expression der Oberflächenmarker bei Patienten, die wegen einer Hepatitis-C-Infektion auf eine Lebertransplantation warteten (CD25: $55,6 \pm 12,4\%$, CD71: $43,4 \pm 11,8\%$).

Etwas schlechter ließen sich demgegenüber die T-Zellen von Dialysepatienten und Patienten mit alkoholtoxischer Leberzirrhose zur Expression der Oberflächenmarker anregen. Für letztere berichtet Canivet (109) über Werte von $42,6 \pm 16\%$ für CD25 und $27,6 \pm 13,5\%$ für CD71. Bei Dialysepatienten fanden Kamar (108) eine CD25-Expression von 33,9% und 39,8% und Böhler (107) von $35,4 \pm 13,9\%$, für CD71 beliefen sich die Werte auf 26,5% und 18,7% sowie $21,7 \pm 10,2\%$, auch wenn Böhler 2009 berichtete, im Vergleich mit gesunden Probanden bei Dialysepatienten keine veränderte Expression der Oberflächenmarker festgestellt zu haben. In der vorliegenden Arbeit beliefen sich die Werte der dialysepflichtigen Patienten auf $40,1 \pm 16,6\%$ für die CD25- und $26,1 \pm 13\%$ für die CD71-Expression.

Böhler (169) beschrieb in seinem Vergleich von 85 gesunden Probanden mit 28 Dialysepatienten eine signifikant erhöhte IL-2-Synthese von 36,3% bei den Dialysepatienten gegenüber 19,5% bei den Gesunden. Diese deutliche Differenz ließ sich in weiteren Untersuchungen jedoch nicht bestätigen.

Kamar (108), Böhler (107), Canivet (109) und Prémaud (180) publizierten Syntheseraten für IL-2 von 32,9%, 35,3% und $29,4 \pm 8,9\%$ für Dialyse- sowie $34,2 \pm 11,9\%$ und 30,3% für leberkranke Patienten. Die IL-2-Synthese der T-Zellen von gesunden Probanden betrug in der Untersuchung von Canivet (109) demgegenüber nur $18,8 \pm 8,7\%$. Stalder (122) fand bei Gesunden eine Syntheserate von 33%. In der vorliegenden Untersuchung wurde ein etwas höherer Anteil IL-2-synthetisierender T-Zellen von $32,7 \pm 16,2\%$ bei den vor der Transplantation dialysepflichtigen

Patienten und ein etwas niedrigerer Anteil von $30,9 \pm 15,1\%$ bei den präemptiv Transplantierten festgestellt.

Ein ähnliches Bild ergibt sich für das Zytokin TNF- α . Leberkranke und Dialysepatienten scheinen eine etwas höhere Syntheserate zu haben als gesunde Probanden, die Unterschiede sind jedoch gering und bei der Unschärfe des Verfahrens und den geringen Fallzahlen statistisch nicht relevant. In der vorliegenden Arbeit betrug die TNF- α -Synthese bei den Dialysepatienten $22,8 \pm 13,3\%$, bei den präemptiv Transplantierten $18,4 \pm 9\%$. Der Befund deckt sich mit den in der Literatur berichteten Werten, Böhler (169) und Canivet (109) fanden bei Gesunden TNF- α -Syntheseraten von $23,2\%$ und $21 \pm 7,3\%$, bei Stalder (122) wird wie bei den anderen Parametern erneut ein etwas höherer Wert von 36% angegeben. Demgegenüber beliefen sich die TNF- α -Syntheseraten von Patienten auf der Warteliste für eine Lebertransplantation bei Canivet (109) auf $38,6 \pm 16\%$ und bei Prémaud auf $34,1\%$. Bei Dialysepatienten fanden Böhler (107) einen Anteil von $26,2 \pm 7,5\%$ und Kamar (108) Anteile von $21,3\%$ und $25,8\%$ TNF- α -synthetisierender T-Zellen.

Die von Böhler (169) in seiner Vergleichsstudie gesunder Probanden mit Dialysepatienten (und Nierentransplantierten) nachgewiesene signifikant erhöhte Rate IL-2-synthetisierender T-Zellen bei Dialysepatienten gegenüber den Gesunden – möglicherweise aufgrund eines T-Zell-stimulierenden Einflusses der Dialysemembranen – konnte in der vorliegenden Untersuchung nicht nachvollzogen werden. Bei sämtlichen untersuchten Parametern fanden sich in der Gruppe der präemptiv Transplantierten und der Dialysepatienten keine signifikanten Unterschiede. Auch konnte erneut nachgewiesen werden, dass es keinen Zusammenhang zwischen der Dialysedauer und der anhand der untersuchten Parameter beschriebenen Aktivierbarkeit des Immunsystems gibt.

Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass an Hepatitis C leidende Patienten eine über alle nichtspezifischen Parameter nachweisbare Erhöhung der immunologischen Aktivität aufweisen (109), ergibt sich in Zusammenschau der dargestellten Befunde eine Tendenz zu einer bei chronisch kranken etwas geringeren Proliferationsfähigkeit und Aktivierbarkeit der T-Zellen mit zugleich erhöhter Zytokinsynthese gegenüber gesunden Patienten.

Die durch den Einfluss der Geschlechtshormone auf das Immunsystem erklärten Unterschiede zwischen den Geschlechtern wirkten sich ebenfalls nicht auf die vor der Transplantation gemessenen pharmakodynamischen Parameter aus.

Nachweisbar waren jedoch ein leichter Rückgang der Proliferationsfähigkeit der Lymphozyten und der CD71-Expression, nicht jedoch der CD25-Expression oder Zytokinsynthese im höheren Alter. Das Ausmaß der Korrelation der Proliferationsrate mit dem Alter und das Signifikanzni-

veau entsprechen den bereits zuvor von Böhler nachgewiesenen. Das Nachlassen der Immunkompetenz im Alter ist umfangreich belegt, der Rückgang der Proliferationsrate als gemeinsamer Endstrecke der T-Zell-Aktivierung kann als Ausdruck dieser Tatsache angesehen werden (181). Die Beobachtung einer Assoziation einer starken Supprimierung der CD71-Expression durch Wieland (104) nach einer Nierentransplantation mit einer erhöhten Rate an Infektionen, könnte möglicherweise ebenfalls mit dem Nachlassen der Infektabwehr im Alter assoziiert sein. Die von Böhler beobachtete vermehrte CD25-Expression und Zytokinsynthese im Alter konnte nicht nachvollzogen werden.

7.4. Die Beschreibung der immunsuppressiven Therapie durch die gemessenen Parameter bis zum Zeitpunkt der Randomisierung

Die immunsuppressive Therapie mit Cyclosporin A, EC-MPS, Methylprednisolon sowie Basiliximab vor und vier Tage nach der Transplantation kann durch die verwendeten Assays adäquat abgebildet werden.

Auch wenn Stalder (182) an nephrektomierten Affen zeigen konnte, dass bereits ein chirurgischer Eingriff bis zu zwei Wochen nach der Operation immunsuppressiv wirkt (mit einem Rückgang der Lymphozytenproliferation um 55%, der Expression von CD25 um 49% und von CD71 um 29% sowie der Synthese von IL-2 um 50% und von TNF- α um 22% gegenüber den präoperativen Werten), ist die Stärke der Hemmung der untersuchten Parameter nur durch den Beginn der immunsuppressiven Therapie zu erklären.

Unmittelbar nach der Transplantation besteht die höchste Gefahr einer akuten Abstoßung. Deshalb wurden in den ersten Tagen zusätzlich zur zweifachen Basiliximab-Gabe hohe Dosen Methylprednisolon und Cyclosporin A verabreicht. Die Steroide wurden schnell ausgeschlichen, elf Tage nach der Transplantation betrug die mittlere Dosierung nur noch ein Fünftel, nach einem Monat nur noch ein Zehntel der initialen Dosis. Deutlich langsamer verlief die Reduktion von Dosis und Talspiegel von Cyclosporin. Eine Dosisreduktion von EC-MPS war laut Studienprotokoll nur bei Auftreten von Nebenwirkungen zulässig, effektiv kam es zu einem Rückgang der mittleren Dosis bis zur Randomisierung um etwa 10%.

Der kumulierte Effekt der immunsuppressiven Kombinationstherapie spiegelt sich in einem starken Rückgang der Werte der pharmakodynamischen Parameter. Die stärkste und schnellste Hemmung wurde beim Anteil proliferierender und CD25-exprimierender Lymphozyten bereits vier Tage nach der Transplantation nachgewiesen. Etwas schwächer wurden die CD71-Expression und die Zytokinsynthese gehemmt, der Zeitpunkt der maximalen Suppression war

bei diesen Parametern Visite 2 elf Tage nach der Transplantation. Im weiteren Verlauf stiegen die Werte der untersuchten unspezifischen Biomarker wieder an, erreichten aber nicht das vor der Transplantation bestehende Ausgangsniveau.

Daten zum pharmakodynamischen Monitoring *de novo*-transplantierte Patienten mit den in der vorliegenden Untersuchung eingesetzten FACS-Assays sind in der Literatur bislang nicht berichtet worden.

Es liegen aber eine Reihe von Untersuchungen zu stabilen Patienten nach Herz-, Leber-, Lungen- und Nierentransplantation vor. Eine Therapie mit Cyclosporin A und MMF wurde in fünf Studien untersucht, zwei davon wurden an Herztransplantierten durchgeführt (174, 176), eine an einem gemischten Kollektiv aus Herz- und Lungentransplantierten (183), eine an Nierentransplantierten (122) und eine an je einem Kollektiv aus Nieren- und Lebertransplantierten (107). Eine Studie untersuchte eine Therapie mit Cyclosporin Monotherapie oder einer Comedikation aus Azathioprin und/oder Methylprednisolon (175). Zur Verbreiterung der Datenbasis wurden zudem vier weitere Studien von Nierentransplantierten berücksichtigt, in denen die Patienten mit dem Calcineurininhibitor Tacrolimus zusammen mit MMF behandelt wurden (109, 169, 173, 184). In einer dieser Studien wurde die Umstellung von MMF auf EC-MPS untersucht (173).

Das größte untersuchte Kollektiv waren 45 Herztransplantierte, in zwei weiteren Studien wurden 27 Nieren- und 25 Herztransplantierte untersucht. Alle anderen Studien untersuchten höchstens 15 Patienten, fünf Kollektive waren kleiner als 5 Patienten. Die vorliegende Untersuchung dient deshalb nicht nur dazu, qualitativ neue Informationen vorzulegen, sondern verbreitert die Datenbasis zu den durchflusszytometrisch erhobenen Biomarkern erheblich.

Bei der Betrachtung von Studien, in denen Tacrolimus verabreicht wurde, sind Unterschiede zwischen den CNI zu berücksichtigen. In vitro zeigte Barten (106) die unterschiedliche Potenz der Medikamente auf. Die maximale Hemmung der Proliferationsrate, der CD25- und der CD71-Expression betragen bei Cyclosporin $102 \pm 5\%$, $98 \pm 3\%$ und $96 \pm 4\%$, bei Tacrolimus $112 \pm 6\%$, $101 \pm 4\%$ und $109 \pm 5\%$. Böhrer (107) wies zudem auf die stärkere Hemmung der Zytokinsynthese durch Tacrolimus hin. Barten (183) konnte die stärkere Potenz von Tacrolimus in vivo bestätigen. Er untersuchte mehrere pharmakodynamische Parameter an 8 Patienten, die bei unveränderten MMF-Dosen und MPA-Spiegeln von einer Cyclosporin- auf eine Tacrolimustherapie umgestellt wurden: Die Proliferationsrate blieb unverändert, die CD25-Expression war leicht rückläufig, die Zytokinsynthese ging um mehr als die Hälfte des Ausgangswertes unter Cyclosporintherapie zurück.

Bei der Betrachtung der Proliferationsrate ist der minimale nach Transplantation gemessene Wert von durchschnittlich $1,3 \pm 1,3\%$ proliferierender T-Zellen nach Stimulation identisch mit

dem von Böhler (107) berichteten Anteil von $1,3 \pm 0,8\%$. Die Studien mit mehr als 10 untersuchten Patienten berichten über Proliferationsraten von 3,5%, 5,5% und $8,4 \pm 7,7\%$ unter Tacrolimus (109,169,184) sowie 8%, 10% und 12% unter Cyclosporintherapie (174,176,175). Bis zum Zeitpunkt der Randomisierung hatte sich die Proliferationsrate der untersuchten Patienten wieder auf einen Wert von $5,5 \pm 6,6\%$ erhöht, lag also bereits wieder im unteren Bereich der unter Erhaltungstherapie beobachteten Werte. Der maximale unter Erhaltungstherapie berichtete Wert beläuft sich auf eine durchschnittliche Proliferationsrate von 12% bei 14 Herztransplantierten (183) und 8 Nierentransplantierten (122) unter Cyclosporintherapie. Dieser Wert ist nur wenig geringer, als die in der vorliegenden Untersuchung vor Beginn der immunsuppressiven Therapie beobachtete durchschnittliche Proliferationsrate.

Die in der Literatur berichteten Anteile der Expression des Oberflächenmarkers CD25 betragen mindestens 10% bei 10 Herztransplantierten unter Cyclosporintherapie (176) und maximal 36,4% bei Nierentransplantierten unter Therapie mit Tacrolimus und EC-MPS (173). Der letztgenannte Wert ist nur wenig niedriger als die in der vorliegenden Arbeit beobachtete CD25-Expressionsrate von $40,1 \pm 16,6\%$ vor Beginn der immunsuppressiven Therapie. Durch die Induktionstherapie wurde die CD25-Expression vier Tage nach der Transplantation dann auf einen Anteil von $4,4 \pm 4,6\%$ reduziert.

In den größeren Studien wurden unter Cyclosporintherapie Werte von 24%, 26% und 33% (176, 174, 175) und Werte von 30%, 31,7% und $32 \pm 17,1\%$ unter Tacrolimustherapie beschrieben. Mit $25,2 \pm 15,6\%$ bewegte sich die CD25-Expression zur Randomisierung in einem ähnlichen Bereich.

Ähnlich verhält sich die Beziehung der gemessenen zu den in der Literatur berichteten Werten bei der CD71-Expression. Der Expressionsrate von $6,9 \pm 7,0\%$ zum Zeitpunkt der maximalen Reduktion elf Tage nach der Transplantation steht ein in der Literatur berichtetes Minimum von 13,1% unter tacrolimusbasierter Erhaltungstherapie gegenüber (173). Weitere in den größeren Studien berichtete Werte belaufen sich auf 13,8%, 18,1% und $21,9 \pm 14,7\%$ unter Tacrolimus und 27% unter Cyclosporintherapie (109, 169, 184, 175). Zum Zeitpunkt der Randomisierung konnte wieder ein Anstieg der CD71-Expression auf $15 \pm 11,3\%$ beobachtet werden, deutlich niedriger als der maximale in der Literatur berichtete Wert von 28,8% unter Tacrolimus- und ebenfalls EC-MPS-Therapie (173).

Betrachtet man den Nachweis der CD25-Expression als spezifischen Marker für die Therapie mit Basiliximab, lohnt es sich, den Vergleich dieses Oberflächenmarkers mit CD71 heranzuziehen. In den Visiten während des ersten Monats nach Transplantation war die CD25-Expression signifikant stärker gehemmt als diejenige von CD71, anschließend ist eine kaum unterschiedliche

Hemmung zu verzeichnen. Da Böhler (107) bei gleicher Konzentration der verwendeten immunsuppressiven Medikamente in vitro eine jeweils stärkere Hemmung der Expression von CD71 als von CD25 nachweisen konnte, ist es höchst plausibel, den beschriebenen gegenläufigen Effekt auf den Einsatz von Basiliximab zurückzuführen, zumal bekannt ist, dass die Wirkung von Basiliximab in einem immunsuppressiven Regime mit Cyclosporin A, Mycophenolsäure und Steroiden etwa sechs Wochen anhält (32).

Im Vergleich zu der Proliferationsrate und den Oberflächenmarkern etwas verschoben ist die Beziehung der in der vorliegenden Untersuchung gemessenen zu den in der Literatur berichteten Werten.

Für die IL-2-Synthese wurde von Böhler (173) ein minimaler Anteil an T-Zellen von 9,7% unter Erhaltungstherapie mit Tacrolimus und MMF nachgewiesen. Dieser Wert ist erheblich niedriger als der durchschnittliche Anteil von $14,3 \pm 10,0\%$, der die maximale Immunsuppression im Rahmen der Zeus-Studie beschreibt. Bei den Untersuchungen, in welche mehr als 10 Patienten eingeschlossen wurden, belaufen sich die Anteile IL-2-synthetisierender T-Zellen auf 10,1%, 13,3% und $18,3 \pm 21,7\%$ unter Tacrolimusgabe (169,109,184) und 10,2%, 11,9% und 18% unter Cyclosporintherapie (176,175,174). Der bislang höchste Wert wurde von Böhler für 5 mit Cyclosporin behandelte Nierentransplantierte mit einem Median von 23,6% (4,6%-61,3%) berichtet. Mit $20 \pm 14,8\%$ ist der Anteil an IL-2-synthetisierenden T-Zellen zum Zeitpunkt der Randomisierung vergleichbar.

Die Syntheserate von TNF- α wurde durch die Induktionstherapie maximal auf den Wert von $8,3 \pm 5,7\%$ elf Tage nach der Transplantation supprimiert. Dieser ist nur wenig kleiner als der von Barten an 45 Herztransplantierten unter Cyclosporin- und MMF-Therapie beschriebene Wert von 9,5% für den Anteil TNF-synthetisierender T-Zellen. Auch stieg die TNF-Syntheserate bis zur Randomisierung nur auf $11,8 \pm 8,5\%$ an, wohingegen in der Literatur in den größeren Studien über Raten von 12% und 13,3% unter Cyclosporin (174,175) und 14,7%, 16,7% und $17,2 \pm 14,6\%$ unter Tacrolimus (169,109,184) berichtet wird. Der von Stalder (122) für Nierentransplantierte publizierte Maximalwert für die TNF- α -Synthese beträgt unter Cyclosporintherapie 25%.

Die hohen Syntheseraten unter immunsuppressiven Regimes mit Tacrolimusbeteiligung sind mit der von Barten (183) und Böhler (107) gemachten Beobachtung einer deutlich stärkeren Suppression der in T-Zellen stimulierbaren Zytokinsynthese nur schwer zu vereinbaren. Da die Zytokinsynthese einer vergleichsweise hohen interindividuellen Variation unterliegt und weniger stark gehemmt wurde als die anderen zytometrischen Parameter, kann die Unschärfe der Beobachtungen eine Erklärung für diese Diskrepanz sein.

Auch die Aktivität der IMPDH ging nach Beginn der immunsuppressiven Therapie schnell und deutlich zurück. Im Gegensatz zu den FACS-Parametern blieben die Werte anschließend jedoch dauerhaft auf einem niedrigen Niveau. Da die IMPDH-Aktivität ein spezifischer Marker für die Wirkung der Mycophenolsäure ist, kann diese Beobachtung am ehesten durch die annähernd konstante Dosierung von EC-MPS im Zeitablauf erklärt werden. Zu beachten ist dabei die bekannte Abhängigkeit des MPA-Spiegels von der Comedikation Cyclosporin A. Durch Eingriff in den enterohepatischen Kreislauf reduziert Cyclosporin bei gleichen Mycophenolsäuredosen den MPA-Spiegel und die Exposition gegenüber dem Medikament (185). Da die im Zeitablauf sinkenden Cyclosporin A-Spiegel also zu einem Anstieg der MPA-Spiegel führten, konnte das leichte Absinken der durchschnittlichen EC-MPS-Dosis mindestens kompensiert werden.

Weiterhin ist zu beachten, dass aus zahlreichen pharmakokinetischen Untersuchungen bekannt ist, dass die IMPDH-Aktivität nach Einmalgabe von MPA für mehrere Stunden stark gehemmt wird, nach 12 Stunden aber wieder den Ausgangswert erreicht (144). Bei Dauertherapie wird aber eine Hemmung der Aktivität auch zum Zeitpunkt des morgendlichen Talspiegels beobachtet. Eine Hemmung der Ausgangsaktivität von 40,2 nmol/h/mg Protein vor Transplantation auf 21,9, 20,5, 20,7 und 21,7 nmol/h/mg Protein an den Tagen 6, 21, 49 und 140 nach der Transplantation unter Therapie mit MMF, Tacrolimus und Steroiden beschrieb Sombogaard (142). Glander (89) konnte eine leichte Zunahme dieser Inhibition in den PBMC von 44 nierentransplantierten Patienten über einen Zeitraum von einem Jahr nachweisen.

Zum Zeitpunkt der ersten Visite vier Tage nach der Transplantation betrug die durchschnittliche morgendliche IMPDH-Aktivität in der vorliegenden Untersuchung $7,8 \pm 4,9$ nmol/h/mg Protein, im weiteren Verlauf sank sie weiter auf den Wert von $6,0 \pm 3,6$ nmol/h/mg Protein zum Zeitpunkt der Randomisierung ab. Damit liegt sie im Bereich der in der Literatur beschriebenen Werte. Die maximale unter immunsuppressiver Therapie beschriebene Aktivität von $13,9 \pm 4,8$ nmol/h/mg Protein findet sich unter einer milden Immunsuppression mit 720mg EC-MPS/Tag bei sieben Patienten mit IgA-Nephritis (186). Sie ist annähernd im Bereich der in der vorliegenden Untersuchung gemessenen Vortransplantationswerte. In einer Studie zur Umstellung einer Therapie mit MMF auf EC-MPS veränderte sich bei 21 stabilen Patienten nach Nierentransplantation eine basale IMPDH-Aktivität von $10,6 \pm 2,6$ nmol/h/mg Protein unter MMF unter EC-MPS kaum: zwei Wochen nach der Umstellung wurde eine Aktivität von $10,5 \pm 3,9$ nmol/h/mg Protein, nach drei Monaten von $10,0 \pm 3,8$ nmol/h/mg Protein gemessen (143). In einer ähnlichen Untersuchung zur Umstellung von 27 Nierentransplantierten berichtete Budde (144) niedrigere Werte: unter MMF betrug die IMPDH-Aktivität $8,6 \pm 4,3$ nmol/h/mg Protein, nach Umstellung auf EC-MPS ging sie sogar auf $7,0 \pm 4,6$ nmol/h/mg Protein zurück. In beiden Studien er-

hielten die Patienten als Comedikation Tacrolimus. In zwei kleineren Studien an 6 bzw. 8 Nierentransplantierten berichteten Budde (149) und Glander (148) über eine Aktivität von $9,4 \pm 3,3$ nmol/h/mg Protein und $9,2 \pm 5,1$ nmol/h/mg Protein bei Dauermedikation mit 2g MMF/Tag.

Mit den in der vorliegenden Untersuchung erhobenen Werten gut vergleichbar sind die Ergebnisse einer großen aktuellen Arbeit von Sommerer (141) zur Pharmakokinetik und -dynamik von EC-MPS. Sie fand an 65 nierentransplantierten Patienten unveränderte Aktivitäten der IMPDH von 8,5 nmol/h/mg Protein vor Medikamentengabe und 8,5 nmol/h/mg Protein zwölf Stunden später unter 1440mg EC-MPS/Tag in identischer Kombinationstherapie mit Cyclosporin, Steroiden und nach Basiliximabinduktion.

7.5. Die Beschreibung der immunsuppressiven Therapie durch die gemessenen Parameter nach der Randomisierung

Nach der Randomisierung wurde in der mit Everolimus behandelten Patientengruppe die Medikation mit Cyclosporin A ausgeschlichen. Aufgrund der bereits genannten Effekte von Cyclosporin auf die MPA-Spiegel ist von einem Ansteigen des MPA-Spiegels auszugehen (185).

Dieser Zusammenhang ist die wahrscheinliche Erklärung für die beobachtete Tendenz einer weiteren Reduktion der IMPDH-Aktivität im Zeitablauf im Everolimusarm, welche in der mit Cyclosporin behandelten Studiengruppe nicht nachweisbar war.

Vergleichsdaten der IMPDH-Aktivität unter einer immunsuppressiven Erhaltungstherapie mit Everolimus und einem Mycophenolsäurederivat liegen nicht vor. In der Aggregation der Messwerte ist ein signifikanter Unterschied zwischen den Studienarmen nach der Randomisierung zu erkennen: im Everolimusarm ist die IMPDH-Aktivität signifikant niedriger als im Cyclosporinarm. Mit durchschnittlichen Werten unter 5 nmol/h/mg Protein ist sie nach der Umstellung auf den mTOR-Inhibitor zudem deutlich stärker gehemmt als in allen vergleichbaren Studien zu einer CNI-basierten Therapie.

Die durchschnittliche Proliferationsrate zeigte nach der Randomisierung ebenfalls einen diskreten, aber nicht signifikanten Rückgang in der Everolimusgruppe, in der Cyclosporingruppe stieg sie dagegen weiter leicht an. Aggregiert ließ sich eine signifikant niedrigere Proliferationsfähigkeit der T-Zellen unter Everolimustherapie gegenüber der CNI-Therapie nachweisen.

Der Anstieg der Proliferationsrate in der Cyclosporingruppe lässt sich als Fortsetzung des vor der Randomisierung begonnenen Trends interpretieren, der durch die weitere Reduktion der Cyclosporindosen und -spiegel bedingt war.

Einer näheren Erklärung bedarf jedoch das Absinken des Anteils proliferierender T-Zellen in der Everolimusgruppe. Zwar gilt Everolimus über den Mechanismus der Blockade des mTOR als ein potenter Proliferationsinhibitor, eine stärkere Hemmung durch Everolimus als durch Cyclosporin A ist jedoch bemerkenswert. In seiner vergleichenden Untersuchung von Kombinationstherapien mit MMF und entweder Cyclosporin A oder Sirolimus konnte Barten (106) in vitro eine maximale Suppression der Proliferation unter Cyclosporin A von 100% erreichen, mit Sirolimus war hingegen nur eine Suppression von maximal 83% möglich. Allerdings war die Inhibition der Proliferationsrate mit dem mTOR-Inhibitor Sirolimus schon bei niedrigen Dosierungen effektiv, wohingegen die Wirkung von Cyclosporin A sich erst in hohen Dosierungen entfaltete. Im Rahmen der Zeus-Studie wurden Dosierung und Zielspiegel für Everolimus am oberen Rand der Dosierungsempfehlungen gewählt, um eine optimale Sicherheit des CNI-freien Studienarmes sicherzustellen (135). Somit ist die tendenziell stärkere Unterdrückung der Proliferationsrate im Everolimusarm, gemessen zum Zeitpunkt des Talspiegels, am ehesten auf eine relativ höhere Wirkung des Medikaments zurückzuführen.

Ein Teil der Erklärung der stärkeren Inhibition der Proliferationsrate im Everolimusarm könnte zudem die bereits erwähnte stärkere MPA-Exposition der Patienten darstellen.

Die Beobachtung einer im Zeitablauf zunehmenden Suppression der Proliferationsfähigkeit der Lymphozyten deckt sich mit den Befunden von Böhler (187), der nach einer täglichen fixen Gabe von Everolimus zusätzlich zu Cyclosporin und Steroiden einen kontinuierlichen Rückgang der Lymphozytenproliferation bis zum Tag 21 nach Beginn der Therapie nachweisen konnte.

Mit einem durchschnittlichen Wert von $3,6 \pm 4,6\%$ in allen Messungen nach vollständigem Ausschleichen von Cyclosporin A liegt die Proliferationsrate im Everolimusarm im unteren Bereich der in der Literatur berichteten Vergleichswerte, für die durchschnittlich gemessene Rate von $6 \pm 5,3\%$ in der Cyclosporingruppe trifft dies nicht zu.

Der Verlauf der Expression der Oberflächenmarker CD25 und CD71 ähnelte der Entwicklung der Proliferationsrate. Während die Expressionsraten im Cyclosporinarm weiter leicht anstiegen, wurde im Everolimusarm eine Tendenz zu einer stärkeren Suppression beobachtet. Während die Unterschiede bei CD25 wenig ausgeprägt waren, ergaben sich bei CD71 im Verlauf und kumuliert signifikante Unterschiede zwischen den Studienarmen.

Die Unterschiede zwischen den beiden Oberflächenmarkern können möglicherweise auf ihre unterschiedliche Stellung im molekularen Ablauf der T-Zell-Aktivierung und T-Zell-Proliferation erklärt werden. CD25 ist die α -Kette des hochaffinen IL-2-Rezeptors und wird unmittelbar nach Stimulation über den T-Zell-Rezeptor und Costimulation über CD28 exprimiert,

um das IL-2-vermittelte dritte Signal zur vollständigen Aktivierung und Einleitung der klonalen Expansion besser verarbeiten zu können. CD71 hingegen wird erst nach Beginn des Proliferationsvorgangs am Übergang der Zelle von der G₁- in die S/G₂M-Phasen der Zellteilung exprimiert; seine Expression kann somit durch die Blockade von mTOR behindert werden (45).

Dafür sprechen auch die Ergebnisse der in vitro-Untersuchungen von Barten (106). Er wies nach Sirolimusgabe eine maximale Hemmung der CD71-Expression von 90% nach (unter Cyclosporin 96%). Die maximale Inhibition der CD25-Expression durch Sirolimus war jedoch mit 75% deutlich geringer als diejenige des CNI (98%). Kombinationen von Sirolimus und MPA waren ebenso synergistisch wie Kombinationen von Cyclosporin und MPA. Eine geringere Wirkung des mTOR-Inhibitors Sirolimus auf die Expression von CD25 als auf CD71 in vitro beschreibt auch Böhler (107).

In vivo fand Barten (176) in einer Untersuchung an 10 Herztransplantierten, die von Cyclosporin auf Sirolimus umgestellt wurden, einen diskreten, aber signifikanten Anstieg der CD25-Expression bei unveränderter Proliferationsrate.

Der Rückgang der Oberflächenmarkerexpression wird am ehesten erklärt durch den Wechsel von Cyclosporin A zu einer vergleichsweise hohen Dosis des mTOR-Inhibitors Everolimus. Zudem sind auch bei der Oberflächenmarkerexpression die Effekte einer gesteigerten MPA-Exposition zu berücksichtigen.

Möglich ist aber auch, dass die Hemmung von CD71 durch den mTOR-Inhibitor stärker ausfiel, als die Hemmung von CD25. Der kumulativ gemessene Wert von durchschnittlich $11,8 \pm 7,3\%$ CD71-exprimierender T-Zellen in der Everolimusgruppe ist niedriger als jeder in der Literatur angegebene Vergleichswert, der in der Cyclosporin-Gruppe gemessene Wert von $19,7 \pm 11,4\%$ entspricht dagegen den publizierten Werten der übrigen CNI-basierten Regimes.

Die CD25-Expression unterscheidet sich weder zwischen den Studienarmen, noch heben sich die gemessenen Werte von den in der Literatur angegebenen Werten ab.

Aufgrund der zentralen Rolle der Calcineurininhibitoren für die IL-2-Synthese war ein Anstieg in der Everolimusgruppe nach Absetzen von Cyclosporin zu erwarten. In einer Arbeit, in welcher 15 Patienten unter konventioneller Immunsuppression mit Tacrolimus mit 15 Patienten verglichen worden waren, in denen die immunsuppressive Therapie nur mit MMF und Steroiden durchgeführt wurde, wies Canivet (109) eine deutlich stärkere Stimulierbarkeit der T-Zellen zur Zytokinsynthese bei den Patienten ohne (22% für IL-2, 25,5% für TNF- α) gegenüber den Patienten mit CNI (13,3% für IL-2, 16,7% für TNF- α) nach.

Zudem fand Böhler (107) für den mTOR-Inhibitor Sirolimus in vitro eine nur geringe Hemmung der Synthese von TNF- α , die IL-2-Synthese stieg mit steigender Sirolimuskonzentration sogar

an. Keine signifikanten Unterschiede in der Zytokinproduktion nach Umstellung von Cyclosporin auf Sirolimus wies Barten (176) in vivo in seiner Untersuchung herztransplantierte Patienten nach.

Obwohl in der vorliegenden Untersuchung eine Tendenz zu einer vermehrten Synthese beider untersuchter Zytokine nach der Umstellungsphase in der Everolimusgruppe zu erkennen ist, ist dieser Befund nur in bezug auf den Visitenzeitpunkt ein Jahr nach Studienbeginn signifikant, an welchem nur sehr geringe Fallzahlen erreicht wurden. In der Cyclosporin-Gruppe ist die Zytokin-synthese erwartungsgemäß im Zeitablauf unverändert. In der Aggregation aller nach Ausschleichen der Cyclosporinmedikation gewonnenen Werte lässt sich in der Everolimusgruppe eine signifikant höhere IL-2-Synthese nachweisen als in der Cyclosporin-Gruppe. Auch im Vergleich mit den bislang für die CNI-basierte Erhaltungstherapie publizierten Daten ist die durchschnittliche Syntheserate von $25,5 \pm 16,4\%$ der höchste bislang berichtete Wert.

Die TNF- α -Synthese weist keinen signifikanten Unterschied zwischen den Studienarmen auf, die bestimmten Syntheseraten beider Gruppen bewegen sich im Rahmen der in der Literatur berichteten Werte.

7.6. *Der Zusammenhang zwischen der Expression der Biomarker und dem Auftreten von Rejektionen und Infektionen*

Das Ziel aller pharmakodynamischen Verfahren ist es, Informationen bereitzustellen, welche dem Patienten einen günstigeren klinischen Verlauf nach der Transplantation ermöglichen. Deshalb ist die Frage nach dem Zusammenhang der untersuchten Parameter mit dem Auftreten klinischer Ereignisse von besonderem Interesse. In der vorliegenden Arbeit wurde der Zusammenhang mit dem Auftreten von Rejektionen als Ausdruck einer zu geringen, sowie Infektionen als Ausdruck einer zu starken Immunsuppression ausgewertet.

Ein eindeutiger Zusammenhang zwischen dem Wert eines der pharmakodynamischen Parameter vor der Transplantation und dem Auftreten eines der untersuchten klinischen Ereignisse konnte nicht nachgewiesen werden. Dies gilt ebenso für die zytometrisch erhobenen Parameter wie für die IMPDH-Aktivität.

Die höhere IMPDH-Aktivität bei Patienten, die im Verlauf schwere Infektionen erlitten, ist bei der geringen Fallzahl und der hohen interpersonellen Variabilität der IMPDH-Aktivität trotz statistischer Signifikanz vorsichtig zu bewerten.

In der Literatur ist die Evidenz für eine Korrelation der IMPDH-Aktivität vor der Transplantation mit dem Auftreten von Rejektionen oder Infektionen gering.

Glander (147) teilte anhand der IMPDH-Aktivität vor der und der Notwendigkeit von MMF-Dosisreduktionen nach der Transplantation retrospektiv 48 Nierentransplantierte in Risikoklassen ein. Anschließend fand sie ein signifikant erhöhtes Risiko für Abstoßungen bei Patienten, die beide Kriterien erfüllten. Diese Ergebnisse konnten anhand der Daten der vorliegenden Untersuchung nicht reproduziert werden, auch wenn die Patienten, bei denen eine Dosisreduktion notwendig war, signifikant häufiger Infektionserkrankungen aufwiesen.

Sombogaard (89, 142) gelang es mehrfach nicht, einen Zusammenhang zwischen der IMPDH-Aktivität vor Transplantation und dem Auftreten von akuten Abstoßungen herzustellen; die Menge der nachweisbaren IMPDH-mRNA war allerdings bei Patienten mit akuter Abstoßung erhöht.

Der von Glander (147) nachgewiesene Zusammenhang zwischen der Höhe der IMPDH-Aktivität vor der Transplantation und dem Zeitpunkt notwendiger Dosisreduktionen von MMF wurde bestätigt. Allerdings wiesen Patienten, die keine Dosisreduktion benötigten, ebenfalls die gesamte Bandbreite der gemessenen IMPDH-Aktivität auf.

Zum Zusammenhang der vor der Transplantation erhobenen Werte der durchflusszytometrisch bestimmten Parameter mit klinischen *outcomes* gibt es in der Literatur fast keine vergleichbaren Informationen.

Millan (194) veröffentlichte unlängst eine Publikation, in welcher die Stimulierbarkeit der Synthese von IL-2 und IFN- γ in den T-Zellen von 47 Patienten vor *de novo*- Lebertransplantation unter Tacrolimus und Steroid mit oder ohne MMF mit dem klinischen *outcome* der akuten Abstoßung verknüpft wurde. Die 9 Patienten, welche eine akute Abstoßung entwickelten, hatten vor der Transplantation eine etwas niedrigere IL-2-Synthese in den CD4⁺CD69⁺-T-Zellen als die nicht betroffenen Patienten. Signifikant niedriger war allerdings der Anteil der CD8⁺CD69⁺-T-Zellen, die IL-2 und IFN- γ synthetisierten. Für die Subgruppe der IFN- γ -produzierenden CD8⁺-Zellen konnte sogar ein *cut-off*-Wert definiert werden, welcher eine Sensitivität von 75% und eine Spezifität von 82% hatte.

Bereits zuvor hatte Boleslawski (125) eine signifikant erhöhte IL-2-Synthese in CD8⁺-T-Zellen vor der Transplantation bei Patienten, die nach Lebertransplantation eine akute Abstoßung entwickelten, nachweisen können.

In der vorliegenden Untersuchung wurde die Zugehörigkeit der T-Zellen zu den Helfer- und zytotoxischen Zellen nicht unterschieden. Für die Gesamtheit der T-Zellen ließ sich kein signifikanter Unterschied nachweisen zwischen den Patienten, die eine Rejektion entwickelten, und denen, die abstoßungsfrei blieben. Lediglich in der multivariaten Analyse konnte ein Einfluss der IL-2-Synthese vor der Transplantation auf das *outcome* der Rejektion aufgezeigt werden.

Messungen der IMPDH-Aktivität nach der Transplantation konnten einen deutlichen Zusammenhang mit gastrointestinalen Nebenwirkungen nachweisen (104,141,171), weniger eindeutig waren die Ergebnisse jedoch in bezug auf Rejektionen.

Chiarelli (188) fand in einer Untersuchung an 55 Nierentransplantierten einen gegenüber den nicht abstoßenden Vergleichspatienten signifikant erhöhten Wert der basalen IMPDH-Aktivität bei 5 Patienten während einer Episode von BPAR. Dieses Ergebnis konnte er jedoch in einer Folgeuntersuchung (189) an 44 ebenfalls nierentransplantierten Patienten nicht mehr bestätigen.

Sombogaard (190) wies an Tag 6 nach der Transplantation bei Patienten mit akuter Abstoßung eine deutlich höhere AUC der IMPDH-Aktivität nach als bei Patienten ohne Rejektion. Die basale Aktivität war allerdings nicht erhöht. Ebenfalls eine erhöhte AUC_{0-4h} der IMPDH-Aktivität konnte Raggi bei 17 Nierentransplantierten mit BPAR gegenüber 35 Vergleichspatienten nachweisen. Unterschiede der basalen Aktivität wurden nicht berichtet. Auch Wieland (104) fand sieben und 21 Tage nach der Nierentransplantation bei 35 Patienten weder einen Zusammenhang

zwischen BPAR und der basalen IMPDH-Aktivität, noch der Aktivität zwei Stunden nach der Gabe von EC-MPS.

Auf der Basis dieser Vorbefunde ist es nicht verwunderlich, dass sich in der vorliegenden Arbeit ebenfalls keine Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen der IMPDH-Aktivität und akuten Abstoßungen ergaben.

Bei Infektionserkrankungen besteht eine Tendenz zu einer stärkeren Inhibition und niedrigeren Aktivität der IMPDH, bei schweren Infektionen sind allerdings eine Erhöhung der Aktivität und Verringerung der Hemmung nachweisbar. Eine Erklärung dafür könnte die im Studienprotokoll zugelassene – und im Fall einer schweren Erkrankung von den verantwortlichen Ärzten wahrscheinlich durchgeführte – Verringerung der EC-MPS-Dosis bei Diagnose einer Infektionskrankheit als inakzeptabler MPA-Nebenwirkung darstellen. Die Daten belegen, dass dementsprechend Dosisreduktionen bei Patienten mit Infektionserkrankungen häufiger durchgeführt wurden.

Die während einer Infektion erhobenen Befunde weisen trotz hoher Fallzahlen nur diskrete Unterschiede zu den im infektionsfreien Intervall erhobenen Befunden aus.

Zum Zusammenhang der nach der Transplantation erhobenen Werte der FACS-Parameter mit klinischen *outcomes* sind einige bemerkenswerte Beobachtungen gemacht worden.

Im Tierversuch wies Gummert (192) mit den in dieser Untersuchung verwendeten Assays an 8 herztransplantierten Ratten unter MMF-Therapie eine hohe Korrelation zwischen der AUE_{0-24h} der Proliferationsrate und der CD25-Expression (jeweils $r=0,89$) und dem histologischen Schweregrad der Rejektion nach. Die entsprechenden Korrelationen der PD-Werte vor Medikamenteneinnahme waren deutlich niedriger: Sie betragen $r=0,46$ für die Proliferationsrate und $r=0,52$ für die CD25-Expression.

In ähnlichen Versuchsanordnungen konnte Klupp (102) an 24 Ratten eine hohe Korrelation zwischen der morgendlichen Expression von CD71 ($r=0,86$) sowie der Proliferationsrate ($r=0,66$) und einem Rejektionsscore nachweisen. Die entsprechenden Korrelationen waren vergleichbar mit derjenigen des MPA-Talspiegels ($r=0,70$), aber höher als bei der CD25-Expression ($r=0,37$). Für die AUE_{0-24h} wurden für die Proliferationsrate, CD71 und CD25 noch höhere Werte erreicht ($r=0,85$, $r=0,81$, $r=0,64$), diese lagen zudem deutlich über der Korrelation der AUC_{0-24h} der Mycophenolsäure mit dem histologischen Score der Rejektion.

Barten (193) wies ebenfalls an 24 Ratten eine hohe Korrelation der AUE_{0-24h} der CD25- und CD71-Expression sowie der Proliferationsrate ($r=0,87$, $r=0,82$ und $r=0,75$) und der Korrelation der AUC_{0-24h} der Mycophenolsäure ($r=0,83$) mit einem histologischen Rejektionsscore nach. Die

Korrelation mit den morgendlichen Werten der pharmakodynamischen Parameter wird nicht berichtet, die Korrelation mit dem MPA-Talspiegel war deutlich niedriger ($r=0,57$).

Diese Tierversuche legen die Vermutung nahe, dass sich akute Abstoßungsreaktionen in den T-Zellen des peripheren Blutes widerspiegeln und durch die durchflusszytometrische Bestimmung von Proliferation und Aktivierungsmarkern nach Stimulation nachgewiesen werden können. Sie zeigen aber auch, dass dazu überaus aufwendige Prozeduren notwendig sind, da die durch multiple Messungen bestimmten AUE offenbar deutlich besser mit histologischen Rejektionscores korrelieren als die Talspiegel. Zudem konnten die genannten Abstoßungsstudien durch die Begrenzung auf kurze Zeiträume und die besondere Konstellation des Tierversuchs eine sehr hohe Informationsdichte erzielen.

Daten zu der Korrelation zwischen den FACS-Parametern und Rejektionen oder Infektionen in klinischen Studien gibt es kaum. Für die Oberflächenmarker berichten Wieland und Shipkova (104) von einer signifikant stärkeren Hemmung der CD71-Expression bei 35 Patienten 21 Tage nach der Nierentransplantation bei Patienten, die an einer Infektionskrankheit litten. Für die Expression von CD25 in dieser Studie waren keine Unterschiede nachweisbar, insgesamt wurde der Parameter aber wegen Abweichungen im Stimulationsverfahren deutlich niedriger ausgeprägt, so dass der Befund nur bedingt vergleichbar ist.

Für die Zytokinsynthese fand Millan (194) in ihrer bereits erwähnten Arbeit eine deutlich reduzierte Inhibition der IL-2-Synthese sowohl in $CD4^+CD69^+$ -Helferzellen, als auch in $CD8^+CD69^+$ -zytotoxischen T-Zellen bei Patienten, die eine akute Abstoßung aufwiesen. Bereits zuvor hatte Akoglu (126) bei 66 Lebertransplantierten für die zytotoxischen T-Zellen eine gute Korrelation ($r=0,81$) zwischen der IL-2-Synthese und einem Abstoßungsscore nachweisen können.

Einen Assay zum Nachweis der NFAT-regulierten Genexpression (Bestimmung der mRNA von IL-2, IFN- γ und GM-CSF durch rt-PCR) zum spezifischen pharmakodynamischen Monitoring der Therapie mit CNI publizierte die Arbeitsgruppe um Sommerer und Giese. Ihnen gelang es in einer Reihe von Arbeiten, eine signifikant stärkere Hemmung der NFAT-regulierten Genexpression in Patienten, die Infektionen oder Malignome nach Transplantation entwickelten, nachzuweisen (92).

Auch publizierte die Gruppe um Kowalski (128) ein Verfahren zum Nachweis der intrazellulären ATP-Produktion in $CD4^+$ -T-Zellen nach Stimulation, welches als einziges pharmakodynamisches Assay eine offizielle Zulassung durch die amerikanischen Gesundheitsbehörden erhielt. In einer Metaanalyse aus zehn Beobachtungsstudien gelang es Kowalski, an 504 Transplantierten nachzuweisen, dass Patienten mit akuter Abstoßung signifikant mehr ATP synthetisierten als die stabilen Patienten. Bei diesen wurde wiederum signifikant mehr intrazelluläres

ATP nachgewiesen als bei Patienten, die während der Untersuchung an einer Infektionserkrankung litten (129). Die daraufhin definierten Bereiche einer zu hohen, adäquaten oder zu niedrigen Immunsuppression erwiesen sich in der klinischen Anwendung als nicht umsetzbar. Eine Vielzahl an Arbeiten belegt die klare Korrelation mit Infektionen nach Transplantation. Die Aussagekraft bezüglich Abstoßungsreaktionen ist jedoch umstritten (196). Daraufhin ist eine Überlegenheit des Assays gegenüber herkömmlichen Möglichkeiten des Infektnachweises, wie CRP oder Leukozytenzahl, angezweifelt worden (197).

In der vorliegenden Arbeit wurden die zytometrisch erhobenen pharmakodynamischen Parameter umfassend auf Korrelationen mit den klinischen *outcomes* Rejektion und Infektion untersucht. Dabei wurde den Vorteilen der AUE-Bestimmung gegenüber einmaliger Messung bei der Korrelation mit den Rejectionsscores im Tiermodell Rechnung getragen, indem aus den Werten zum Zeitpunkt des Talspiegels AUE gebildet wurden. Zudem wurde das Konzept durch Berechnung der „*areas above the curve*“ (AAC) zur Bestimmung der kumulierten immunsuppressiven Last erweitert. Schließlich wurden Werte, die während Infektionserkrankungen oder Episoden akuter Abstoßung erhoben worden waren, mit den im freien Intervall erhobenen Werten verglichen.

Im Einklang mit den aktuellen Befunden von Millan stellte sich die stimulierte IL-2-Synthese der CD4⁺-T-Zellen als prognostisch wertvollster pharmakodynamischer Parameter für die akuten Abstoßungen heraus.

Durch die Bestimmung der AUE₂₂₅ der IL-2-Synthese konnte bei einem cut-off von 27 eine vergleichbare Sensitivität und Spezifität erreicht werden, wie Millan für den Vortransplantationswert der CD8⁺CD69⁺-IFN- γ ⁺-T-Zellen berichtete. Der Nachteil der AUE₂₂₅ besteht in der deutlich aufwendigeren Bestimmung und der Verfügbarkeit erst zu einem Zeitpunkt nach der üblichen Manifestation akuter Abstoßungen. Die AUE₃₀ der IL-2-Synthese war bei abstoßenden Patienten nicht signifikant unterschiedlich.

Auch ist der Befund einer zeitlichen Zuordnung der kumulierten IL-2-Synthese der T-Zellen zu den Abstoßungsreaktionen im jeweiligen Studienabschnitt nur schwer mit der Beobachtung kaum von den Messwerten im freien Intervall abweichender IL-2-Syntheseraten während einer akuten Abstoßungsreaktion zu vereinbaren.

Für die Expression des Oberflächenmarkers CD71 hatten bereits Wieland und Shipkova einen Bezug zum Auftreten von Infektionen publiziert. Auch in der vorliegenden Arbeit konnte eine signifikant niedrigere Rate der CD71-Expression eine deutlich stärkere Hemmung der Vortransplantationswerte während der Dauer einer Infektionserkrankung nachgewiesen werden. Zudem

zeigen die abgeleiteten Parameter der maximalen Suppression, der AUE und der AAC vielfach einen signifikanten Zusammenhang der CD71-Expression mit dem *outcome* der Infektion.

7.7. *Limitationen der vorliegenden Arbeit*

Die vorliegende Arbeit hat klare Limitationen. Zunächst müssen die Limitationen der eingesetzten Assays benannt werden. Die Stimulation durch Zugabe mitogener Substanzen unter Laborbedingungen ist artifiziell und entspricht den Bedingungen *in vivo* nur annäherungsweise.

Weiterhin erschwert die große Variabilität vor allem der durchflusszytometrischen der Assays die statistische Auswertung erheblich. Einen Teil der Variabilität mag die Messung durch Doktoranden erklären, eine routiniertere Durchführung der Assays durch medizinisch-technische Assistenten wäre für weitere Arbeiten zu erwägen.

Fehlgeschlagene Messungen und organisatorische Probleme erzeugten einen lückenhaften Datensatz, was sich vor allem bei der Berechnung der *areas under the curve* als problematisch erwies.

Beklagenswert ist auch das sehr reduzierte Datenvolumen in der zweiten Studienphase: Weder im Zeitraum der Randomisierung, noch am Ende des Beobachtungszeitraums stehen ausreichend Daten zur Verfügung, um eine valide Auswertung durchführen zu können.

Auch die Dokumentation der klinischen Ereignisse Infektion und Rejektion ist möglicherweise unpräzise. Die Auswertung der Daten legt den Verdacht nahe, dass oftmals bereits vor der biopischen Sicherung einer akuten Abstoßungsreaktion immunsuppressiv therapiert, nicht jedoch exakt in der ausgewerteten T-base-Transplantationsdatenbank der Charité dokumentiert wurde.

Die Konzeption der Studie ist eher auf die Beantwortung der Frage nach den Unterschieden der Everolimus- im Vergleich zur Cyclosporintherapie ausgelegt. Die Frage nach dem Zusammenhang der pharmakodynamischen Parameter mit dem klinischen *outcome* ist schwer zu beantworten, da die Studientermine vorab festgelegt worden waren und nur zufällig mit dem Auftreten von Infektionen oder Rejektionen einhergingen. Zusätzliche Messungen wurden nicht durchgeführt.

Vor dem Hintergrund der ermutigenden Ergebnisse von Millan (194) ist retrospektiv zu bedauern, dass nicht nach CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen unterschieden wurde. Auch wäre die Bestimmung von IFN- γ möglicherweise aufschlussreicher gewesen als die Messung der TNF- α -Synthese.

Schließlich wäre eine zusätzliche Bestimmung der pharmakodynamischen Parameter zum Zeitpunkt der stärksten Wirkung der immunsuppressiven Medikamente eventuell der alleinigen Bestimmung vor Medikamenteneinnahme vorzuziehen gewesen.

8. *Literaturverzeichnis*

1. Frei U, Schober-Halstenberg H-J, Nierenersatztherapie in Deutschland. Bericht über Dialysebehandlung und Nierentransplantation in Deutschland 2006/2007. Berlin, Deutschland: 2008
2. Eurotransplant International Foundation, ed. by Oosterlee A, Rahmel A, Annual Report 2011, am 06.12.2012 abrufbar unter www.eurotransplant.org/cms/mediaobject.php?file=ar_2011.pdf
3. Ott U, Steiner T, Schubert J, et al. Update Nephrologie: Nierentransplantation. Med Klin 2007; 102: 219-229
4. Wolfe RA, Ashby VB, 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 1999; 341: 1725-1730
5. Wood, K, Goto R. Mechanisms of Rejection: Current Perspectives. Transplantation 2012; 93: 1-10
6. Sherman LA, Chattopadhyay S. The molecular basis of allorecognition. Annu Rev Immunol 1993; 11: 385-402
7. Afzali B, Lechler RI, Hernandez-Fuentes MP. Allorecognition and the alloresponse: clinical implications. Tissue antigens 2007; 69: 545-556
8. Nankivell BJ, Alexander SI. Rejection of the Kidney Allograft. N Engl J Med 2010; 363: 1451-1462
9. Terasaki PI. A personal perspective: 100-year history of the humoral theory of transplantation. Transplantation 2012; 93: 751-756
10. Halloran PF. Immunosuppressive drugs for kidney transplantation. N Engl J Med 2004; 351: 2715-2729
11. Brook M, Wood K, Jones N. The impact of memory T cells on rejection and Tolerance. Transplantation 2006; 82: 1-9
12. Nel A. T-cell activation through the antigen receptor. Part 1: Signaling components, signaling pathways, and signal integration at the T-cell antigen receptor synapse. J Allergy Clin Immunol 2002; 109: 758-770
13. Kiefer F, Vogel WF, Arnold R. Signal transduction and co-stimulatory pathways. Transplant Immunology 2002; 9: 69-82

14. Van Kooten C, Lombardi G, Geldermann KA, et al. Dendritic cells as a tool to induce transplantation tolerance: Obstacles and opportunities. *Transplantation* 2011; 91: 2-7
15. Suchin EJ, Langmuir PB, Palmer E, et al. Quantifying the frequency of alloreactive T cells in vivo: new answers to an old question. *J Immunol* 2001; 166: 973-981
16. Safina N, Afzali B, Atalar K, et al. T-cell alloimmunity and chronic allograft dysfunction. *Kidney Int* 2010; 78: 2-12
17. Halloran PF. T Cell Mediated Rejection of Kidney Transplants: A personal viewpoint. *Am J Transplant* 2010; 10: 1126-1134
18. Solez K, Colvin RB, Racusen LC, et al. Banff 07 classification of renal allograft pathology: updates and future directions. *Am J Transplant* 2008; 4: 753-760
19. Mengel M, Sis B, Haas M, et al. Banff 2011 Meeting Report: New Concepts in Antibody mediated Rejection. *Am J Transplant* 2012; 12: 563-570
20. Nankivell BJ, Kuypers DR. Diagnosis and prevention of chronic kidney allograft loss. *Lancet* 2011; 378: 1428-1437
21. Sellarés J, de Freitas DG, Mengel M, et al. Understanding the Causes of Kidney Transplant Failure: The Dominant Role of Antibody-Mediated Rejection and Nonadherence. *Am J Transplant* 2012; 12: 388-399.
22. Terasaki PI, Cai J. Human Leukocyte Antigen Antibodies and Chronic Rejection: From Association to Causation. *Transplantation* 2008; 86: 377-383
23. Clipstone NA, Crabtree GR. Identification of calcineurin as a key signalling enzyme in T-lymphocyte activation. *Nature* 1992; 357: 695-697
24. Webster AC, Woodroffe RC, Taylor RS, et al. Tacrolimus versus ciclosporin as primary immunosuppression for kidney transplant recipients: meta-analysis and meta-regression of randomised trial data. *BMJ* 2005; 331: 810-821
25. Ransom JT. Mechanism of action of mycophenolate mofetil. *Ther Drug Monit* 1995; 17: 681-684.
26. Chon WJ, Josephson MA. Leflunomide in renal transplantation. *Expert Rev Clin Immunol* 2011; 3: 273-281
27. Kirken RA, Wang YL. Molecular Actions of Sirolimus: Sirolimus and mTor, *Transplantation Proceedings* 2003; 35: 227S-230S
28. Geissler EK, Schlitt HJ. The potential benefits of rapamycin on renal function, tolerance, fibrosis, and malignancy following transplantation. *Kidney Int* 2010; 78: 1075-1079
29. Adcock IM, Barnes PJ. Molecular mechanisms of corticosteroid resistance. *Chest* 2008; 134: 394-401

30. Pascual J. Steroid avoidance or withdrawal in kidney transplantation. *Curr Opin Organ Transplant* 2011; 16: 600-605
31. Vincenti F, Larsen C, Durrbach A, et al. Costimulation blockade with Belatacept in renal transplantation. *N Engl J Med* 2005; 353: 770-781
32. Webster AC, Playford EG, Higgins G, et al. Interleukin 2 receptor antagonists for kidney transplant recipients. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2004, Issue 1. Art. No.: CD003897. DOI: 10.1002/14651858.CD003897.pub2.
33. Arias M, Campistol JM, Vincenti F. Evolving trends in induction therapy. *Transplantation Reviews* 2009; 23: 94-102
34. Fehr T, Gaspert A. Antibody-mediated kidney allograft rejection: therapeutic options and their experimental rationale. *Transpl Int* 2012; 25: 623-632
35. Sadaka B, Alloway RR, Shields AR, et al. Proteasome inhibition for antibody-mediated allograft rejection. *Semin Hematol* 2012; 49: 263-269
36. Wojciechowski D, Vincenti F. Targeting JAK3 in kidney transplantation: current status and future options. *Curr Opin Organ Transplant* 2011; 16: 614-619
37. Historischer Abriss auf den Webseiten von Eurotransplant und des United Network for Organ sharing, am 18.12.2012 abrufbar unter <http://www.eurotransplant.org/cms/index.php?page=history> sowie <http://www.unos.org/donation/index.php?topic=history>
38. Terasaki PI. A Personal Perspective: 100-Year History of the Humoral Theory of Transplantation. *Transplantation* 2012; 93: 751-756
39. Calne R, Alexandre GP, Murray JE. A study of the effects of drugs in prolonged survival of homologous renal transplantation in dogs. *Ann NY Acad Sci* 1962; 99: 743
40. Murray JE, Tilney NL, Wilson, RE. Renal transplantation: a twenty-five year experience. *Ann. Surg* 1976; 184: 565-573
41. Brendel W, Pichlmayr R. Heterologous antilymphocytic sera in the immune suppression of organ transplantations. *Dtsch Med Wochenschr* 1967; 92: 549-556.
42. Calne R, Cyclosporine as a Milestone in Immunosuppression, *Transplant Proc* 2004; 36 (Suppl 2S), 13S-15S
43. The Tricontinental Mycophenolate Mofetil Renal Transplantation Study Group. A blinded, randomized clinical trial of mycophenolate mofetil for the prevention of acute rejection in cadaveric renal transplantation. *Transplantation* 1996; 61: 1029-1037
44. Granger DK. Enteric-coated mycophenolate sodium: results of two pivotal global multicenter trials. *Transplant Proc* 2001: 3241-3244

45. Sehgal SN. Sirolimus: its discovery, biological properties, and mechanisms of action. *Transplant Proc* 2003, 35: 7-14
46. Kahan BD, Kaplan B, Lorber MI, et al. RAD in de novo renal transplantation: comparison of three doses on the incidence and severity of acute rejection. *Transplantation* 2001; 71: 1400-1406
47. Grinyó JM, Budde K, Citterio F, et al. Belatacept utilization recommendations: an expert position. *Expert Opin Drug Saf* 2013;12: 111-122
48. Hariharan S, Johnson CP, Bresnahan BA, et al. Improved graft survival after renal transplantation in the United States, 1988 to 1996. *N Engl J Med* 2000; 342: 605-612
49. Wolfe RA, Merion RM, Roys EC, et al. Trends in Organ Donation and Transplantation in the United States, 1998–2007. *Am J Transplant* 2009; 9: 869-878
50. Lamb KE, Lodhi S, Meier-Kriesche HU. Long-Term Renal Allograft Survival in the United States: A Critical Reappraisal. *Am J Transplant* 2011; 11: 450-462
51. Nashan B. Is acute rejection the key predictor for long-term outcomes after renal transplantation when comparing calcineurin inhibitors? *Transplant Rev* 2009; 23: 47-52
52. Solez K, Racusen LC. The Banff classification revisited. *Kidney Int* 2012; doi: 10.1038/ki.2012.395. [Epub ahead of print]
53. Gaston RS. Our evolving understanding of late kidney allograft failure. *Curr Opin Organ Transplant* 2011; 16: 594-599
54. Tait BD, Süsal C, Gebel HM, Nickerson PW, et al. Consensus Guidelines on the Testing and Clinical Management Issues Associated With HLA and Non-HLA Antibodies in Transplantation. *Transplantation* 2013; 95: 19-47
55. Halloran PF, de Freitas DG, Einecke G, et al. An Integrated View of Molecular Changes, Histopathology and Outcomes in Kidney Transplants. *Am J Transplant* 2010; 10: 2223-2230
56. Smith RN, Colvin RB. Chronic alloantibody mediated rejection. *Semin Immunol* 2012; 24: 115-121.
57. Butler JA, Roderick P, Mullee M, et al. Frequency and impact of nonadherence to immunosuppressants after renal transplantation: a systematic review. *Transplantation* 2004; 77: 769-776
58. Naesens M, Kuypers DR, Sarwal M. Calcineurin inhibitor nephrotoxicity. *Clin J Am Soc Nephrol* 2009; 4: 481-508
59. Ojo AO, Held PJ, Port FK, et al. Chronic renal failure after transplantation of a nonrenal organ. *N Engl J Med* 2003; 349: 931-940

60. El-Zoghby ZM, Stegall MD, Lager DJ, et al. Identifying specific causes of kidney allograft loss. *Am J Transplant*. 2009; 9: 527-535
61. Dikdan GS, Mora-Esteves C, Koneru B. Review of randomized clinical trials of donor management and organ preservation in deceased donors: opportunities and issues. *Transplantation* 2012; 94: 425-441
62. Djamali A, Kendzioriski C, Brazy PC, et al. Disease progression and outcomes in chronic kidney disease and renal transplantation. *Kidney Int* 2003; 64: 1800-1807
63. Magee CC, Pascual M. Update in Renal Transplantation, *Arch Intern Med* 2004; 164: 1373-1388
64. Liefeldt L, Budde K. Risk factors for cardiovascular disease in renal transplant recipients and strategies to minimize risk. *Transpl Int* 2010; 23: 1191-1204
65. Casey MJ, Meier-Kriesche HU. Calcineurin inhibitors in kidney transplantation: friend or foe? *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2011; 20: 610-615.
66. Pascual J. Steroid avoidance or withdrawal in kidney transplantation. *Curr Opin Organ Transplant*. 2011; 16: 600-605
67. Penn I. Cancers complicating organ transplantation. *N Engl J Med* 1990; 323: 1767-1769
68. Engels EA, Pfeiffer RM, Fraumeni JF, et al. Spectrum of Cancer Risk Among US Solid Organ Transplant Recipients. *JAMA* 2011, 306: 1891-1901
69. Fishman JA, Rubin RH. Infection in organ-transplant recipients, *N Engl J Med* 1998; 338: 1741-1751
70. Sachs DH, Sykes M, Kawai T, Cosimi AB. Immuno-intervention for the induction of transplantation tolerance through mixed chimerism. *Semin Immunol* 2011; 23: 165-73
71. Larsen CP, Knechtle SJ, Adams A, et al. A New Look at Blockade of T-cell Costimulation: A Therapeutic Strategy for Long-term Maintenance Immunosuppression. *Am J Transplant* 2006; 6: 876-883
72. Wood KJ, Bushell A, Hester J. Regulatory immune cells in transplantation. *Nat Rev Immunol* 2012; 12: 417-430
73. Sprangers B, Kuypers DR, Vanrenterghem Y. Immunosuppression: does one regimen fit all? *Transplantation* 2011; 92: 251-261
74. Budde K, Giessing M, Liefeldt L, et al., Moderne Immunsuppression nach Nierentransplantation. Standard oder maßgeschneidert? *Urologe* 2006; 45: 9-17
75. Bestard O, Campistol JM, Morales JM. Advances in immunosuppression for kidney transplantation: new strategies for preserving kidney function and reducing cardiovascular risk. *Nefrologia* 2012; 32: 374-384

76. Webber A, Hirose R, Vincenti F. Novel Strategies in Immunosuppression: Issues in Perspective. *Transplantation* 2011; 91: 1057-1064
77. Kahan BD. *Frontiers in Immunosuppression*. *Transplant Proc* 2011; 43: 822-825
78. Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Transplant Work Group. KDIGO clinical practice guideline for the care of kidney transplant recipients. *Am J Transplant* 2009; 9 Suppl 3: 1-155
79. Budde K, Glander P. Pharmacokinetic principles of immunosuppressive drugs. *Ann Transplant* 2008; 13: 5-10
80. Kuypers DR, Le Meur Y, Cantarovich M, et al. Consensus report on therapeutic drug monitoring of mycophenolic acid in solid organ transplantation. *Clin J Am Soc Nephrol* 2010; 5: 341-358
81. Oellerich M, Hon MD, Armstrong VW. The Role of Therapeutic Drug Monitoring in Individualizing Immunosuppressive Drug Therapy: Recent Developments. *Ther Drug Monit* 2006; 28: 720-725
82. Knight SR, Morris PJ. The clinical benefits of cyclosporine C2-level monitoring: a systematic review. *Transplantation* 2007; 83: 1525-1535
83. Klupp J, Holt DW, Van Gelder T, How pharmacokinetic and pharmacodynamic drug monitoring can improve outcome in solid organ transplant recipients, *Transplant Immunology* 2002; 9: 211-214
84. Biomarkers Definitions Working Group. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther* 2001; 69: 89-95
85. Wieland E, Shipkova M, Oellerich M. Biomarkers in transplantation medicine: guide to the next level in immunosuppressive therapy. *Clin Chim Acta* 2012; 413: 1309
86. Bestard O, Cruzado JM, la Franquesa M, et al. Biomarkers in renal transplantation. *Curr Opin Organ Transplant* 2010;15: 467-473
87. Wieland E, Olbricht CJ, Süsal C, et al. Biomarkers as a Tool for Management of Immunosuppression in Transplant Patients. *Ther Drug Monit* 2010; 32: 560-572
88. Glander P, Budde K. Target Enzyme Activity as a Biomarker for Immunosuppression. *Ther Drug Monit* 2010; 32: 257-260
89. Glander P, Hambach P, Liefeldt L, et al. Inosine 5'-monophosphate dehydrogenase activity as a biomarker in the field of transplantation. *Clin Chim Acta* 2012; 413: 1391-1397
90. Yano I. Pharmacodynamic Monitoring of Calcineurin Phosphatase Activity in Transplant Patients Treated with Calcineurin Inhibitors. *Drug Metab Pharmacokinet* 2008; 23: 150-157

91. Hartmann B. p70S6 kinase phosphorylation for pharmacodynamic monitoring. *Clin Chim Acta* 2012; 413: 1387-1390
92. Sommerer C, Meuer S, Zeier M, Giese T. Calcineurin inhibitors and NFAT-regulated gene expression. *Clin Chim Acta* 2012; 413: 1379-1386
93. Kovarik JM, Offner G, Broyer M, et al. A rational dosing algorithm for basiliximab (Simulect) in pediatric renal transplantation based on pharmacokinetic-dynamic evaluations. *Transplantation* 2002;74: 966-971
94. Tkaczuk J, Yu CL, Baksh S, et al., Effect of anti-IL-2Ralpha antibody on IL-2-induced Jak/STAT signaling, *Am J Transplant* 2002; 2: 31-40
95. Vafadari R, Weimar W, Baan CC. Phosphospecific flow cytometry for pharmacodynamic drug monitoring: analysis of the JAK-STAT signaling pathway. *Clin Chim Acta* 2012; 413: 1398-1405
96. Vafadari R, Quaedackers ME, Kho MM, et al. Pharmacodynamic analysis of tofacitinib and basiliximab in kidney allograft recipients. *Transplantation* 2012; 94: 465-472
97. Buchler M, Thibault G, al Najjar A, et al. Monitoring of ATG therapy by flow cytometry and lymphocyte counts in renal transplantation. *Transplant Proc* 1996; 28: 2817-2818
98. Ducloux D, Bamoulid J, Courivaud C, et al. Thymic function, anti-thymocytes globulins, and cancer after renal transplantation. *Transpl Immunol* 2011; 25: 56-60
99. Shipkova M, Wieland E. Surface markers of lymphocyte activation and markers of cell proliferation. *Clin Chim Acta* 2012; 413: 1338-1349
100. Ferron GM, Jusko WJ. Species- and Gender-Related Differences in Cyclosporine/Prednisolone/Sirolimus Interactions in Whole Blood Lymphocyte Proliferation Assays. *J Pharmacol Ther* 1998; 286: 191-200
101. Gummert JF, Barten MJ, Sherwood SW, et al. Pharmacodynamics of immunosuppression by mycophenolic acid: inhibition of both lymphocyte proliferation and activation correlates with pharmacokinetics. *J Pharmacol Exp Ther* 1999; 29: 1100-1112
102. Klupp J, van Gelder T, Dambrin C, et al. Sustained Suppression of Peripheral Blood Immune Functions by Treatment With Mycophenolate Mofetil Correlates With Reduced Severity of Cardiac Allograft Rejection. *J Heart Lung Transplant* 2004; 23: 334-351
103. Dambrin C, Klupp J, Birsan T, et al. Sirolimus (rapamycin) monotherapy prevents graft vascular disease in nonhuman primate recipients of orthotopic aortic allografts. *Circulation* 2003; 107: 2369-2374

104. Wieland E, Shipkova M, Martius Y, et al. Association between pharmacodynamic biomarkers and clinical events in the early phase after kidney transplantation: a single-center pilot study. *Ther Drug Monit* 2011; 33: 341-349
105. Niwa M, Miwa Y, Kuzuya T, et al. Stimulation index for PCNA mRNA in peripheral blood as immune function monitoring after renal transplantation. *Transplantation* 2009; 87: 1411-1414
106. Barten MJ, Dhein S, Chang H, et al. Assessment of immunosuppressive drug interactions: inhibition of lymphocyte function in peripheral human blood. *J Immunol Methods* 2003; 283: 99-114
107. 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; 29: 77-86
108. 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; 4: 936-942
109. Canivet C, Böhler T, Galvani S, et al. T-Cell Function in Maintenance Renal Transplant Patients Receiving Mycophenolate Mofetil and Steroids With or Without Tacrolimus. *Transplant Proc* 2008; 40: 3422-3423
110. Sindhi R, Allaert J, Gladding D, et al. Modeling individual variation in biomarker response to combination immunosuppression with stimulated lymphocyte responses - potential clinical implications. *J Immunol Methods* 2003; 272: 257-272
111. Berry V, Magill A, Yost M, Janosky J, Sindhi R. Individualizing combination of two anti-proliferative immunosuppressants with pharmacodynamic modeling of stimulated lymphocyte responses. *Cytometry A* 2006; 69: 95-103
112. He X, Smeets RL, Koenen HJ, et al. Mycophenolic acid-mediated suppression of human CD4+ T cells: more than mere guanine nucleotide deprivation. *Am J Transplant* 2011; 11: 439-449
113. Süsal C, Opez G. Posttransplant sCD30 as a biomarker to predict kidney graft outcome. . *Clin Chim Acta* 2012; 413: 1350-1353
114. Brunet M. Cytokines as predictive biomarkers of alloreactivity. *Clin Chim Acta* 2012; 413: 1354-1358
115. Andersson J, Nagy S, Groth CG, et al. Effects of FK506 and cyclosporin A on cytokine production studied in vitro at a single-cell level. *Immunology* 1992; 75: 136-142

116. Kimball PM, Radovancevic B, Isom T, et al. The paradox of cytokine monitoring – predictor of immunologic activity as well as immunologic silence following cardiac transplantation. *Transplantation* 1996; 61: 909-915
117. Millan O, Brunet M, Campistol JM, et al. Pharmacodynamic Approach to Immunosuppressive Therapies Using Calcineurin Inhibitors and Mycophenolate Mofetil. *Clinical Chemistry* 2003; 49: 1891-1899
118. Stein CM, Murray JJ, Wood AJJ. Inhibition of stimulated interleukin-2 production in whole blood: a practical measure of cyclosporine effect. *Clin Chem* 1999; 45: 1477-1484
119. Härtel C, Fricke L, Schuhmacher N, et al. Delayed cytokine mRNA expression kinetics after T-lymphocyte costimulation: a quantitative measure of the efficacy of cyclosporin based immunosuppression. *Clin Chem* 2002; 48: 2225-2231
120. Rostaing L, Tkaczuk J, Durand M, et al. Kinetics of intracytoplasmic Th1 and Th2 cytokine production assessed by flow cytometry following in vitro activation of peripheral blood mononuclear cells. *Cytometry* 1999; 35: 318-328
121. Tkaczuk J, Rostaing L, Puyoo O, et al. Flow cytometry detection of intracytoplasmic cytokines after Neoral or sirolimus intake is an informative tool for monitoring in vivo immunosuppressive efficacy in renal transplant recipients. *Transplant Proc* 1998; 30: 2400
122. Stalder M, Birsan T, Holm B, et al. Quantification of immunosuppression by flow cytometry in stable renal transplant recipients. *Ther Drug Monit* 2003; 25: 22-27
123. Barten MJ, Rahmel A, Bocsi J, et al. Cytokine Analysis to Predict Immunosuppression. *Cytometry* 2006, 69A, Part A: 155-157
124. Flores MG, Zhang S, Ha A, et al. In vitro evaluation of the effects of candidate immunosuppressive drugs: flow cytometry and quantitative real-time PCR as two independent and correlated read-outs, *J Immunol Methods* 2004; 289: 123-135
125. Boleslawski E, Conti F, Sanquer S, et al. Defective inhibition of peripheral CD8+ T cell IL-2 production by anti-calcineurin drugs during acute liver allograft rejection. *Transplantation* 2004; 77: 1815-1820
126. Akoglu B, Kriener S, Martens S, et al. Interleukin-2 in CD8+ T cells correlates with Banff score during organ rejection in liver transplant recipients. *Clin Exp Med* 2009; 9: 259-262
127. Millán O, Benitez C, Guillen D. Biomarkers of immunosuppression status in liver transplant recipients undergoing weaning of immunosuppressive. *Ther Clin Immunol* 2010; 137: 337-346

128. Kowalski R, Post D, Schneider MC, Britz J, et al. Immune cell function testing: an adjunct to therapeutic drug monitoring in transplant patient management. *Clin Transplant* 2003; 17: 77-88
129. Kowalski RJ, Post DR, Mannon RB, Sebastian A, et al. Assessing relative risks of infection and rejection: a meta-analysis using an immune function assay. *Transplantation* 2006; 82: 663-668
130. Huskey J, Gralla J, Wiseman AC. Single time point immune function assay (ImmuKnow) testing does not aid in the prediction of future opportunistic infections or acute rejection. *Clin J Am Soc Nephrol* 2011; 6: 423-429
131. Millán O, Sánchez-Fueyo A, Rimola A, et al. Is the intracellular ATP concentration of CD4+ T-Cells a predictive biomarker of immune status in stable transplant recipients? *Transplantation* 2009; 88: 78-84.
132. Israeli M, Ben-Gal T, Yaari V, et al. Optimizing individualized therapy of heart transplantation recipients through non-invasive longitudinal immune monitoring. *Transplantation* 2010; 89: 968-976
133. Kobashigawa JA, Kiyosaki KK, Patel JK, et al. Benefit of immune monitoring in heart transplant patients using ATP production in activated lymphocytes. *J Heart Lung Transplant* 2010; 29: 504-508
134. Husain S, Raza K, Pilewski J, et al. Experience with immune monitoring in lung transplant recipients: correlation of low immune function with infection. *Transplantation* 2009; 87: 1852-1857
135. Budde K, Becker T, Arns W, et al. Everolimus-based, calcineurin-inhibitor-free regimen in recipients of de-novo kidney transplants: an open-label, randomised, controlled trial. *Lancet* 2011; 377: 837-847
136. Snyder L, Kirkland J, Dolan J. *Introduction to Modern Liquid Chromatography*, 3rd edition. New Jersey, USA: John Wiley & Sons, 2010
137. Glander P, Braun KP, Hambach P, et al. Non-radioactive determination of inosine 5'-monophosphate dehydrogenase (IMPDH) in peripheral mononuclear cells. *Clin Biochem* 2001; 34: 543-549
138. Glander P, Sombogaard F, Budde K, et al. Improved Assay for the Nonradioactive Determination of Inosine 5'-Monophosphate Dehydrogenase Activity in Peripheral Blood Mononuclear Cells. *Ther Drug Monit* 2009; 31: 351-359

139. Rother A, Glander P, Vitt E, et al. Inosine monophosphate dehydrogenase activity in paediatrics: age-related regulation and response to mycophenolic acid. *Eur J Clin Pharmacol* 2012, 68: 913-922
140. Glander P, Sommerer C, Arns W, et al. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of intensified versus Standard Dosing of Mycophenolate Sodium in Renal Transplant Patients. *Clin J Am Soc Nephrol* 2010; 5: 503-511
141. Sommerer C, Müller-Krebs S, Schaier M, et al. Pharmacokinetic and pharmacodynamic analysis of enteric-coated mycophenolate sodium: limited sampling strategies and clinical outcome in renal transplant patients. *Br J Clin Pharmacol* 2010; 69: 346-357
142. Sombogaard F, Peeters AM, Baan CC, et al. Inosine monophosphate dehydrogenase messenger RNA expression is correlated to clinical outcomes in mycophenolate mofetil-treated transplant patients, whereas inosine monophosphate dehydrogenase activity is not. *Ther Drug Monit* 2009; 31:549-556
143. Budde K, Glander P, Kramer BK, et al. Conversion from mycophenolate mofetil to enteric-coated mycophenolate sodium and mycophenolate mofetil in maintenance renal transplant recipients receiving tacrolimus: clinical, pharmacokinetic and pharmacodynamic outcomes. *Transplantation* 2007; 83: 417-424
144. Budde K, Bauer S, Hambach P, et al. Pharmacokinetic and pharmacodynamic comparison of enteric coated mycophenolate sodium and mycophenolate mofetil in maintenance renal transplant patients. *Am J Transplant* 2007, 7: 888-898
145. Czock D, Rasche FM, Carius A, et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of mycophenolic acid after enteric-coated mycophenolate versus mycophenolate mofetil in patients with progressive IgA nephritis. *J Clin Pharmacol* 2007; 47: 850-859
146. Kamar N, Glander P, Nolting J, et al. Effect of Mycophenolate Mofetil Monotherapy on T-Cell Functions and Inosine Monophosphate Dehydrogenase Activity in Patients Undergoing a Kidney Transplantation. *Transplant Proc* 2007; 39: 2292-2294
147. Glander P, Hambach P, Braun KP, et al. Pre-Transplant inosine monophosphate dehydrogenase activity is Associated with Clinical Outcome after Renal Transplantation. *Am J Transplantation* 2004; 4: 2045-2051
148. Glander P, Hambach P, Braun KP, et al. Effect of mycophenolate mofetil on IMP dehydrogenase after the first dose and after long-term treatment in renal transplant recipients. *Int J Clin Pharmacol Ther* 2003; 41: 470-476
149. Budde K, Braun KP, Glander P, et al. Pharmacodynamic monitoring of mycophenolate mofetil in stable renal allograft recipients. *Transplant Proc* 2002; 34: 1748-1750

150. Budde K, Glander P, Bauer S, et al. Pharmacodynamic monitoring of mycophenolate mofetil. *Clin Chem Lab Med* 2000; 38: 1213-1216
151. Luttmann W, Bratke K, Küpper M, et al. *Der Experimentator Immunologie*, 3. Auflage. Heidelberg, Deutschland: Spektrum Akademischer Verlag, 2009
152. Truneh A, Albert F, Goldstein P, et al. Early steps of lymphocyte activation bypassed by synergy between calcium ionophores and phorbol ester. *Nature* 1985; 313: 318-320
153. Dutton RW. Inhibitory and stimulatory effects of concanavalin A on the response of mouse spleen cell suspensions to antigen. Characterization of the inhibitory cell activity. *J Exp Med* 1972; 136: 1445
154. Kilpatrick DC. Mechanisms and assessment of lectin-mediated mitogenesis. *Mol Biotechnol* 1999; 11: 55-65
155. Fujiwara T, Oda K, Yokota S, et al. Brefeldin A causes disassembly of the Golgi complex and accumulation of secretory proteins in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 1988; 263: 18545-18552
156. Komada H, Nakabayashi H, Hara M, et al. Early calcium signaling and calcium requirements for the IL-2 receptor expression and IL-2 production in stimulated lymphocytes. *Cell Immunol* 1996; 173: 215-220
157. Jacob MC, Favre M, Bensa JC. Membrane Cell Permeabilisation with Saponin and multiparametric Analysis by Flow Cytometry. *Cytometry* 1991, 12: 550-558
158. Celis JE, Madsen P, Celis A, et al. Cyclin (PCNA, auxiliary protein of DNA polymerase S) is a central component of the pathway(s) leading to DNA replication and cell division. *FEBS Lett* 1987; 220: 1-7
159. Barten MJ, Van Gelder T, Gummert JF, et al. Pharmacodynamics of mycophenolate mofetil after heart transplantation: new mechanisms of action and correlations with histologic severity of graft rejection, *Am J Transpl* 2002; 2: 719-732
160. Van den Berg AP, Twilhaar WN, Mesander G, et al. Quantitation of immunosuppression by flow cytometric measurement of the capacity of T cells for interleukin-2 production. *Transplantation* 1998; 65: 318-321
161. Millan O, Urtasun N, Brunet M. Biomarkers of the immunomodulatory effect of immunosuppressive drugs in transplant recipients. *Transplant Rev* 2009; 23: 120-128
162. Dambrin C, Klupp J, Morris RE. Pharmacodynamics of immunosuppressive drugs. *Curr Opin Immunol* 2000; 12: 557-562
163. Delves PJ, Martin SJ, Burton DR, et al. *Roitt's Essential Immunology*, 12th edition. Chichester, United Kingdom: Wiley Blackwell 2011

164. Barten MJ, Gummert JF, van Gelder T, et al. Flow cytometric quantitation of calcium-dependent and -independent mitogen-stimulation of T cell functions in whole blood: inhibition by immunosuppressive drugs in vitro. *J Immunol Methods* 2001; 253: 95-112
165. Neckers LM. Regulation of transferrin receptor expression and control of cell growth. *Pathobiology* 1991; 59: 11-18
166. Ahmed M, Venkataraman R, Logar AJ, et al. Quantitation of immunosuppression by tacrolimus using flow cytometric analysis of interleukin-2 and interferon-gamma inhibition in CD8(-) and CD8(+) peripheral blood T cells. *Ther Drug Monit* 2001; 23: 354-362
167. Grinyo JM, Cruzado JM, Millan O, et al. Low-dose cyclosporine with mycophenolate mofetil induces similar calcineurin activity and cytokine inhibition as does standard-dose cyclosporine in stable renal allografts. *Transplantation* 2004; 78: 1400-1403
168. Oellerich M, Barten MJ, Armstrong VW. Biomarkers: the link between therapeutic drug monitoring and pharmacodynamics. *Ther Drug Monit* 2006; 28: 35-38
169. Böhler T, Canivet C, Le Nguyen PN, et al. Cytokines correlate with age in healthy volunteers, dialysis patients and kidney-transplant patients. *Cytokine* 2009; 45: 169-173
170. Goirand F, Royer B, Hulin A, et al. Level of evidence for therapeutic drug monitoring of everolimus. *Therapie* 2011; 66: 57-61
171. Stracke S, Shipkova M, Mayer J, et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of mycophenolate sodium (EC-MPS) co-administered with cyclosporine in the early-phase post-kidney transplantation. *Clin Transplant* 2012; 26: 57-66
172. Prémaud A, Rousseau A, Johnson G, et al. Inhibition of T-cell activation and proliferation by mycophenolic acid in patients awaiting liver transplantation: PK/PD relationships. *Pharmacol Res* 2011; 63: 432-438
173. Böhler T, Canivet C, Galvani S, et al. Pharmacodynamic monitoring of the conversion from mycophenolate mofetil to enteric coated mycophenolate sodium in stable kidney-allograft recipients. *Int Immunopharmacol* 2008; 8: 769-773
174. Barten MJ, Rahmel A, Garbade J, et al. C0h/C2h Monitoring of the Pharmacodynamics of Cyclosporin Plus Mycophenolate Mofetil in Human Heart Transplant Recipients. *Transplant Proc* 2005; 37: 1360-1361
175. Barten MJ, Rahmel A, Boldt A, et al. Pharmacodynamic monitoring of the immunosuppressive therapy in patients after heart transplantation: Whole blood flow cytometric analysis of lymphocyte function. *Comput Biol Med* 2007; 37: 1367-1373
176. Barten MJ, Tarnok A, Garbade J, et al. Pharmacodynamics of T-cell function for monitoring immunosuppression. *Cell Prolif* 2007; 40: 50-63

177. Tkaczuk J, Rostaing L, Puyoo O, et al. Flow cytometry detection of intracytoplasmic cytokines after Neoral or sirolimus intake is an informative tool for monitoring in vivo immunosuppressive efficacy in renal transplant recipients. *Transplant Proc* 1998; 30: 2400-2401
178. Budde K, Glander P, Braun KP, et al. Pharmacodynamic Monitoring of Mycophenolate Mofetil in Renal Allograft Recipients. *Transplant Proc* 2001; 33: 3313-3315
179. Canivet C, Böhler T, Galvani S, et al. In vitro mitogen-stimulated T-cells from hepatitis C virus-positive liver transplantation candidates, increases T-cell activation markers and T-cell proliferation. *Transpl Immunol* 2008; 19: 112-119
180. Prémaud A, Rousseau A, Johnson G, et al. Inhibition of T-cell activation and proliferation by mycophenolic acid in patients awaiting liver transplantation: PK/PD relationships. *Pharmacol Res* 2011; 63: 432-438
181. Lee N, Shin MS, Kang I. T-cell biology in aging, with a focus on lung disease. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2012; 67: 254-263
182. Stalder M, Birsan T, Hausen B, et al. Immunosuppressive effects of surgery assessed by flow cytometry in nonhuman primates after nephrectomy. *Transplant International* 2005; 18: 1158-1165
183. Barten MJ, Rahmel A, Garbade J. Pharmacodynamic Monitoring of the Conversion of Cyclosporine to Tacrolimus in Heart and Lung Transplant Recipients. *Transplantation Proceedings* 2005; 37: 4532-4534
184. Canivet C, Rostaing L, Galvani S, et al. Polyoma BK virus-associated nephropathy in kidney-transplant patients: Effects of leflunomide on T-cell functions and disease outcome. *Int Immunopharmacol* 2009; 9:1131-1136
185. De Jonge H, Naesens M, Kuypers DR. New insights into the pharmacokinetics and pharmacodynamics of the calcineurin inhibitors and mycophenolic acid: possible consequences for therapeutic drug monitoring in solid organ transplantation. *Ther Drug Monit* 2009; 31: 416-435
186. Czock D, Rasche FM, Carius A, et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of mycophenolic acid after enteric-coated mycophenolate versus mycophenolate mofetil in patients with progressive IgA nephritis. *J Clin Pharmacol* 2007; 47: 850-859
187. Böhler T, Waiser J, Lichter S, et al. Pharmacodynamic effects of everolimus on anti-CD3 antibody-stimulated T-lymphocyte proliferation and interleukin-10 synthesis in stable kidney-transplant patients. *Cytokine* 2008; 42: 306-311

188. Chiarelli LR, Molinaro M, Libetta C, et al. Inosine monophosphate dehydrogenase variability in renal transplant patients on long-term mycophenolate mofetil therapy. *Br J Clin Pharmacol* 2010; 69: 38-50
189. Molinaro M, Chiarelli LR, Biancone L, et al. Monitoring of Inosine Monophosphate Dehydrogenase Activity and Expression during early period of a Mycophenolate Mofetil Therapy in de novo renal transplant patients. *Drug Metab Pharmacokinet* 2012 Aug 14. [Epub ahead of print]
190. Sombogaard F, Mathot RAA, Glander P, et al. IMPDH activity on day 6 after kidney transplantation is significantly related to the risk of acute rejection in MMF treated patients. *Ann Transplant* 2008; 13 (Sup 1): ICID: 869634 (Abstract)
191. Raggi MC, Siebert SB, Steimer W, et al. Customized mycophenolate dosing based on measuring inosine-monophosphate dehydrogenase activity significantly improves patients' outcomes after renal transplantation. *Transplantation* 2010; 90: 1536-1541
192. Gummert JF, Barten MJ, van Gelder T, et al. Pharmacodynamics of mycophenolic acid in heart allograft recipients: correlation of lymphocyte proliferation and activation with pharmacokinetics and graft histology. *Transplantation* 2000; 70: 1038-1049
193. Barten MJ, Van Gelder T, Gummert JF, et al. Pharmacodynamics of mycophenolate mofetil after heart transplantation: new mechanisms of action and correlations with histologic severity of graft rejection. *Am J Transpl* 2002; 2: 719-732
194. Millán O, Rafael-Valdivia L, Torrademé E, et al. Intracellular IFN- γ and IL-2 expression monitoring as surrogate markers of the risk of acute rejection and personal drug response in de novo liver transplant recipients. *Cytokine* 2012; doi:pii: S1 043-4666(12)00761-2. 10.1016/j.cyto.2012.10.026. [Epub ahead of print]
195. Giese T, Zeier M, Schemmer P, et al. Monitoring of NFAT-regulated gene expression in the peripheral blood of allograft recipients: a novel perspective toward individually optimized drug doses of cyclosporine A. *Transplantation* 2004; 77: 339-344
196. Israeli M, Klein T, Brandhorst G, et al. Confronting the challenge: individualized immune monitoring after organ transplantation using the cellular immune function assay. *Clin Chim Acta* 2012; 413: 17-18
197. Budde K, Matz M, Dürr M, et al. Biomarkers of over-immunosuppression. *Clin Pharmacol Ther* 2011; 90: 316-322

9. *Abkürzungsverzeichnis*

ABMR	Antibody Mediated Rejection
AMP	Adenosinmonophosphat
ATG	Antithymozytenglobulin
APC	Antigen präsentierende Zelle
AP-1	Activator Protein 1
ATP	Adenosintriphosphat
AUC	Area Under the Curve
BPAR	Biopsy Proven Acute Rejection
BrdU	Bromodeoxyuridine
CAD	Chronic Allograft Dysfunction
CAN	Chronic Allograft Nephropathy
CD	Cluster of differentiation
CMV	Zytomegalievirus
CNI	Calcineurininhibitor(en)
DAMPs	Damage-Associated Molecular Patterns
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic acid
DSA	Donor Specific Antibodies
EC-MPS	Enteric coated Mycophenolate Sodium
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay
EtOH	Ethanol
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorter
FCS	Fetal Calf Serum
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FSC	Forward scatter
GM-CSF	Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor
HLA	Human Leucocyte Antigen
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IFTA	Interstitielle Fibrose und Tubuläre Atrophie
IMP	Inosin 5'-Monophosphat

IMPDH	Inosin 5'-Monophosphat Dehydrogenase
KCl	Kaliumchlorid
K/DOQI	Kidney Disease Outcomes Quality Initiative
KHCO ₃	Kaliumhydrogencarbonat
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
MeOH	Methanol
MHC	Major Histocompatibility Complex
MMF	Mycophenolat Mofetil
mTOR	mammalian Target Of Rapamycin
NAD ⁺	Nicotinamidadeninucleotid
NFAT	Nuclear Factor of Activated T-cells
NFκB	Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells
NH ₄ Cl	Ammoniumchlorid
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells
PBS	Phosphate buffered saline
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin Chlorophyll Protein
PI	Propidium Iodid
PMA	Phorbol 12-Myristat 13-Acetat
PRR	Pathogen-Associated Pattern Recognition Receptor
RNAse	Ribonuklease
ROC	Receiver Operating Curve
RP-HPLC	Reversed Phase – High Performance Liquid Chromatography
rpm	rounds per minute
rt-PCR	reverse transcription Polymerase Chain Reaction
SSC	Sidescatter
TBAS	Tetra-n-butylammonium-Hydrogensulfat
TCMR	T-Cell Mediated Rejection
v/v	volume to volume
XMP	Xanthosin 5'-Monophosphat

10. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Fallzahl der berechneten Variablen	45
Tabelle 2:	Demographische Daten der in die Studie eingeschlossen Patienten	48
Tabelle 3:	Vortagesdosis von Cyclosporin A	49
Tabelle 4:	Vortagesdosis von Everolimus	49
Tabelle 5:	Vortagesdosis der Mycophenolsäure	50
Tabelle 6:	Vortagesdosis von Methylprednisolon	50
Tabelle 7:	Talspiegel der Immunsuppressiva am Untersuchungstag	51
Tabelle 8:	Deskriptive Statistik der Ausgangswerte vor Transplantation	60
Tabelle 9:	Anzahl der Patienten mit akuten Abstoßungen	79
Tabelle 10:	Anzahl der akuten Abstoßungsepisoden	79
Tabelle 11:	Anzahl der Patienten mit Infektionen, der Infektionsepisoden und Dauer der Infektionsepisoden	80
Tabelle 12:	Schweregrad der Infektionsepisoden	80
Tabelle 13:	Art und Dauer der Infektionsepisoden	81

11. *Abbildungsverzeichnis*

Abbildung 1:	Immunsuppressiva der Zeus-Studie	16
Abbildung 2:	Verhältnis von Cyclosporin A- und Everolimus-Vortagesdosis und -Talspiegel	51
Abbildung 3:	Verhältnis von EC-MPS-Vortagesdosis und MPA-Talspiegel	52
Abbildung 4:	Verhältnis der pharmakodynamischen Parameter zum Cyclosporin A-Talspiegel	53
Abbildung 5:	Verhältnis der pharmakodynamischen Parameter zum Everolimus-Talspiegel	55
Abbildung 6:	Verhältnis der pharmakodynamischen Parameter zum MPA-Talspiegel	56
Abbildung 7:	Verhältnis der pharmakodynamischen Parameter zur Methylprednisolon-Vortagesdosis	57
Abbildung 8:	Verhältnis der Synthese der beiden untersuchten Cytokine und der Expression der beiden untersuchten Oberflächenmarker zueinander	58
Abbildung 9:	Verhältnis der CD25-Expression und der IMPDH-Aktivität zur Proliferationsrate	58
Abbildung 10:	Die Ausgangswerte der untersuchten Parameter vor der Transplantation	59
Abbildung 11:	Die Aktivität der IMPDH im Zeitablauf bis zur Randomisierung	61
Abbildung 12:	Die Proliferationsrate im Zeitablauf bis zur Randomisierung	62
Abbildung 13:	Die CD25-Expression im Zeitablauf bis zur Randomisierung	63
Abbildung 14:	Die CD71-Expression im Zeitablauf bis zur Randomisierung	64
Abbildung 15:	Vergleich der Expression der Oberflächenmarker CD25 und CD71 bis zur Randomisierung	65
Abbildung 16:	Die IL-2-Synthese im Zeitablauf bis zur Randomisierung	66
Abbildung 17:	Die TNF- α -Synthese im Zeitablauf bis zur Randomisierung	67
Abbildung 18:	Die Aktivität der IMPDH im Zeitablauf nach der Randomisierung	68
Abbildung 19:	Die Proliferationsrate im Zeitablauf nach der Randomisierung	69
Abbildung 20:	Die CD25-Expression im Zeitablauf nach der Randomisierung	70
Abbildung 21:	Die CD71-Expression im Zeitablauf nach der Randomisierung	71
Abbildung 22:	Die IL-2-Synthese im Zeitablauf nach der Randomisierung	72
Abbildung 23:	Die TNF- α -Synthese im Zeitablauf nach der Randomisierung	73
Abbildung 24:	Vergleich der IMPDH-Aktivität und ihrer Hemmung in den Studienarmen	74
Abbildung 25:	Vergleich der Proliferationsrate und ihrer Hemmung in den Studienarmen	75
Abbildung 26:	Vergleich der CD25-Expression und ihrer Hemmung in den Studienarmen	75
Abbildung 27:	Vergleich der CD71-Expression und ihrer Hemmung in den Studienarmen	76
Abbildung 28:	Vergleich der Cytokinsynthese (IL-2, TNF- α) und ihrer Hemmung in den Studienarmen	77
Abbildung 29:	Der Zusammenhang zwischen der IMPDH-Aktivität vor der Transplantation und dem Zeitpunkt der ersten Dosisreduktion von EC-MPS	82
Abbildung 30:	Werte der Parameter vor der Transplantation und Auftreten akuter Abstoßungen (BPAR)	84
Abbildung 31:	Werte der Parameter vor der Transplantation und Auftreten von Infektionen	85
Abbildung 32:	Werte der Parameter vor der Transplantation und Auftreten von CMV-Infektionen	86
Abbildung 33:	Die maximale Immunsuppression und das Auftreten von akuten Abstoßungen	87
Abbildung 34:	Die maximale Immunsuppression und das Auftreten von Infektionen	88

Abbildung 35:	Die maximale Immunsuppression und das Auftreten von Infektionen vor der Randomisierung	89
Abbildung 36:	Die kumulierte Restaktivität der untersuchten Parameter im ersten Monat nach der Transplantation (AUE ₃₀) und das Auftreten von akuten Abstoßungen	90
Abbildung 37:	Die kumulierte Restaktivität der untersuchten Parameter nach der Transplantation (AUE ₂₂₅) und das Auftreten von akuten Abstoßungen	91
Abbildung 38:	Die kumulierte Restaktivität der untersuchten Parameter bis zur Randomisierung (AUE ₁₂₅) und das Auftreten von Infektionen	92
Abbildung 39:	Die kumulierte Restaktivität der untersuchten Parameter bis zur Randomisierung (AUE ₁₂₅) und das Auftreten von CMV-Infektionen	92
Abbildung 40:	Die kumulierte Restaktivität der untersuchten Parameter bis zur Randomisierung (AUE ₁₂₅) und das Auftreten von schweren Infektionen	93
Abbildung 41:	Die kumulierte Immunsuppression im ersten Monat nach der Transplantation (AAC ₃₀) und das Auftreten von akuten Abstoßungen	94
Abbildung 42:	Die kumulierte Immunsuppression nach der Transplantation (AAC ₂₂₅) und das Auftreten von akuten Abstoßungen	95
Abbildung 43:	Die kumulierte Immunsuppression vor der Randomisierung (AAC ₁₂₅) und das Auftreten von Infektionen	95
Abbildung 44:	Die kumulierte Immunsuppression vor der Randomisierung (AAC ₁₂₅) und das Auftreten von CMV-Infektionen	96
Abbildung 45:	Vergleich der IMPDH-Aktivität während des Auftretens von Infektionen oder Rejektionen und ihrer Aktivität im freien Intervall	97
Abbildung 46:	Vergleich der Proliferationsrate während des Auftretens von Infektionen oder Rejektionen und im freien Intervall	98
Abbildung 47:	Vergleich der CD25-Expression während des Auftretens von Infektionen oder Rejektionen und im freien Intervall	99
Abbildung 48:	Vergleich der CD71-Expression während des Auftretens von Infektionen oder Rejektionen und im freien Intervall	100
Abbildung 49:	Vergleich der IL-2-Synthese während des Auftretens von Infektionen oder Rejektionen und im freien Intervall	100
Abbildung 50:	Vergleich der TNF- α -Synthese während des Auftretens von Infektionen oder Rejektionen und im freien Intervall	101
Abbildung 51:	Vergleich der Aktivität der Parameter während des Auftretens von CMV-Infektionen und im freien Intervall	102
Abbildung 52:	Vergleich der Aktivität und Hemmung der Parameter während Rejektionen, Infektionen und im freien Intervall	103
Abbildung 53:	ROC-Kurve und prognostischer Wert der AUE ₂₂₅ CD3 ⁺ IL2 ⁺	104

12. Danksagung

In erster Linie gilt mein Dank meiner Familie, die mir stets geduldig, hilfreich und motivierend zur Seite stand.

Weiterhin bin ich meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Klemens Budde zu Dank verpflichtet, der mir dieses Thema zur Verfügung stellte und mir damit die Möglichkeit gab, meinem besonderen Interesse an klinisch orientierter, immunologischer Forschung nachzugehen.

Ich danke dem Betreuer meiner Doktorarbeit, Diplom-Ingenieur Jochen Nolting, der mir die Methodik näherbrachte und bei der Durchsicht der Arbeit stets sachdienliche, inhaltliche Kritik und Vorschläge äußerte.

Auch danke ich Frau Dr. rer. nat. Petra Glander, dem Labor-Team Christine Lorkowski, Mareen Matz, Pia Hambach und Marco Mai sowie den Mit-Doktoranden Marcel Naik, Anke Godemann und Katrin Beth, die für eine angenehme Arbeitsatmosphäre sorgten und mit denen der literarische Austausch und die inhaltliche Diskussion produktiv waren.

13. Lebenslauf

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

14. Selbständigkeitserklärung

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Niels Gauer, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Pharmakodynamisches Monitoring immunsuppressiver Therapie nach Nierentransplantation“ 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.

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

Datum

Unterschrift