

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

DISSERTATION

Untersuchung pharmakodynamischer Biomarker
bei Patienten nach einer Nierentransplantation

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité
Universitätsmedizin Berlin

von

Marcel Naik

aus Berlin

Gutachter: 1. K. Budde

2. K. Miller

3. I. Hauser

Datum der Promotion: 03.06.2012

Inhaltsverzeichnis

Datum der Promotion: 03.06.2012	2
Inhaltsverzeichnis.....	i
Abkürzungsverzeichnis.....	1
1. Einleitung	2
1.1 Nierenfunktion und terminales Nierenversagen	2
1.2 Epidemiologische und gesundheitsökonomische Aspekte der Nierentransplantation	2
1.3 Immunsystem.....	4
1.3.1 Allgemeine Grundlagen	4
1.3.2 Antigenpräsentation und MHC-Komplex	5
1.3.3 T-Zell-Aktivierung	6
1.3.4 Immunsystem und Transplantatabstoßung	8
1.4 Immunsuppressiva	9
1.4.1 Wirkungen und Nebenwirkungen immunsuppressiver Medikamente	11
1.4.2 Wirkung und Nebenwirkung moderner immunsuppressiver Kombinationstherapie.....	14
1.5 Therapeutisches Drug Monitoring	15
1.5.1 Pharmakokinetik.....	16
1.5.2 Pharmakodynamik.....	17
1.6 Fragestellung	18

2. Materialien und Methoden	20
2.1 Studienaufbau	20
2.1.1 Ein- und Ausschlusskriterien	20
2.1.2 Studienablauf und –medikation	21
2.2 Materialien.....	22
2.2.1 Reagenzien	22
2.2.1.1 Kulturmedium und Zusätze	22
2.2.1.2 Chemikalien	22
2.2.1.3 Stimulantien	23
2.2.1.4 Antikörper	23
2.2.2 Geräte	24
2.2.3 Software	24
2.3 Puffer und Lösungen	25
2.4 Methodik.....	26
2.4.1 Allgemeines zur Methodik	26
2.4.2 Methodik im Detail	28
2.4.2.1 Detektion intrazellulärer Zytokine in T-Lymphozyten	28
2.4.2.2 Detektion von Oberflächenrezeptoren auf T-Lymphozyten	29
2.4.2.3 Messung der lymphozytären Proliferationsrate.....	30
2.4.2.4 IMPDH-Aktivitätsbestimmung	31
2.5 Datenauswertung	32
2.5.1 pharmakodynamische Daten	32
2.5.2 Klinische Daten.....	32
2.5.3 Statistische Auswertung	33

3 Ergebnisse	34
3.1 Demographie.....	34
3.2 Pharmakokinetische Parameter	37
3.2.1 PK-Dosierungen und Blutkonzentrationen.....	37
3.2.2 PK-Korrelationen	38
3.3 Pharmakodynamische Parameter	40
3.3.1 IMPDH-Aktivität	40
3.3.2 Expression intrazellulärer Zytokine in T-Lymphozyten	41
3.3.3 Expression von Oberflächenaktivierungsmarkern auf T-Zellen ..	43
3.3.4 Lymphozytäre Proliferationsrate	45
3.3.5 PD-Korrelationen	46
3.3.6 PK- und PD-Korrelationen	47
3.4 Laborwerte	50
3.4.1 Kreatinin	50
3.4.2 Rote Blutbildparameter	51
3.4.3 Leukozyten und Thrombozyten	54
3.4.4 Proteinurie	56
3.4.4 Glukosekonzentration.....	57
3.4.5 Fettprofil	58
3.5 Nebenwirkungen und Biomarker	61
3.5.1 Gruppeneinteilung	61
3.5.2 Häufigkeit der Vorerkrankungen und unerwünschten Ereignisse	62
3.5.3 Auftreten der Nebenwirkungen über den Studienzeitraum	64
3.5.4 Biomarker in Bezug auf später vorhandene Nebenwirkungen....	68

4. Diskussion	69
4.1 Biomarker-Verlauf bis zur Randomisation	69
4.2 Vergleich des studienarmabhängigen Biomarker-Verlaufs	73
4.3 Korrelation der erhobenen Biomarker	75
4.4 Korrelation zwischen PK und PD	76
4.5 studienarmabhängige Nebenwirkungen und laborchemische Veränderungen	77
4.6 Biomarker-Expression als Indiz für konsekutive Nebenwirkungen	79
4.7 Limitationen der Studie	80
5. Schlussfolgerung	82
6. Literaturverzeichnis	83
7. Anhang	98
7.1 Zusammenfassung.....	98
7.2 Summary.....	100
7.3 Tabellenverzeichnis	102
7.4 Abbildungsverzeichnis.....	103
7.5 Lebenslauf.....	104
8. Publikationen	106
9. Selbstständigkeitserklärung	107
10. Danksagung	108

Abkürzungsverzeichnis

AMP	Adenosinmonophosphat
CD3	T-Zellrezeptor
CD25	Alpha-Untereinheit des IL-2-Rezeptors
CD71	Transferrinrezeptor
CNI	Calcineurininhibitor
ConA	Concanavalin A
CyA	Cyclosporin
EC-MPS	enteric-coated Mycophenolsäure
Evl	Everolimus
FACS	Durchflusszytometer (Fluorescence activated cell sorting)
FADD	Fas-assoziiertes Protein mit Todesdomäne
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	Vorwärtsstreulichtdetektor (forward scatter)
IL-2	Interleukin-2
IMPDH	Inosinmonophosphatdehydrogenase
KHCO ₃	Kaliumhydrogencarbonat
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
MMF	Mycophenolat Mofetil
MPA	Mycophenolsäure
mTOR	mammalian target of Rapamycin
N	Fallzahl
Na ₂ -EDTA	Dinatrium-Ethylendiamintetraacetat
NFAT	Nuclear Factor of activated T-cells
NFκB	Nuclear Factor kappa B
NH ₄ Cl	Ammoniumchlorid
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (phosphate buffered saline)
PCNA	proliferating cell nuclear antigen
PE	Phycoerythrobilin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-Protein-Komplex
PI	Propidiumiodid
PMA	12-Phorbol-13-Myristat-Acetat
RAS	Rat-Sarkoma Proteinfamilie
SSC	Seitwärtsstreulichtdetektor (side scatter)
TNF-α	Tumornekrosefaktor-Alpha
TRAF	Tumornekrosefaktor-Rezeptor assoziierte Faktoren
XMP	Xanthosinmonophosphat

1. Einleitung

„Jetzt geht's an die Nieren“

1.1 Nierenfunktion und terminales Nierenversagen

Die Nieren regulieren den Wasser-, Säure-Basen- und Elektrolythaushalt des Körpers. Sie stimulieren durch Hormone die Bildung von Erythrozyten (Erythropoetin), beeinflussen den Blutdruck (Renin-Angiotensin-Aldosteron-System) und den Knochenaufbau (1,25-Dihydrocholecalciferol/Vit-D3) (1,2). Als Folge eines Nierenversagens (akut oder chronisch) kommt es somit schnell zur arteriellen Hypertonie, Ödemen und Elektrolytstörungen (1,2). Wenn das Nierenversagen über eine längere Zeit besteht, entstehen zusätzlich eine renale Anämie und Osteopathie (1,2). Das terminale Nierenversagen ist durch einen fortgeschrittenen dauerhaften Funktionsverlust (glomeruläre Filtrationsrate unter 15ml/min) und Zeichen der Urämie gekennzeichnet und erfordert neben medikamentöser Behandlung der hormonellen Störungen die Anwendung einer Nierenersatztherapie zum Ausgleich der Wasser-, Säure-Basen- und Elektrolytstörungen (1,2). Außerdem ist das kardiovaskuläre Risiko dieser Patienten deutlich erhöht (3-6). Ende 2006 befanden sich in Deutschland 91.718 Patienten in einer Nierenersatztherapie (6). In den Vereinigten Staaten von Amerika haben im Jahr 2006 506.256 Patienten mit terminalem Nierenversagen gelebt und 110.854 Patienten mit einer Nierenersatztherapie begonnen (5). In den vergangenen 10 Jahren hat der jährliche Zuwachs von Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz in Deutschland durchschnittlich etwa 5% (Inzidenz) bzw. 4% (Prävalenz) betragen (6). Glomerulonephritiden und Diabetes mellitus stellen mit je 23% die Hauptursachen des terminalen Nierenversagens dar (6). Zur Nierenersatztherapie gehört neben verschiedenen Dialyseverfahren die Nierentransplantation (5,7). Diese ist die Therapie der Wahl bei Patienten mit terminalem Nierenversagen (8,9).

1.2 Epidemiologische und gesundheitsökonomische Aspekte der Nierentransplantation

Es gibt weltweit große Unterschiede in der Häufigkeit der Nierentransplantation (10). Im Jahr 2006 sind in Deutschland 2.776 Nieren transplantiert worden (6). Die durchschnittliche Wartezeit auf eine Spenderniere betrug 40 Monate (Median 30 Monate) (6). 2.824 von insgesamt 8.473 Patienten wurden 2006 neu auf die Transplantati-

onswarteliste aufgenommen (6). In den USA befanden sich im gleichen Jahr etwa 46.000 Patienten auf der Warteliste bei etwa 18.000 im gleichen Zeitraum durchgeführten Transplantationen (5). Die Nachfrage an Organen übersteigt somit das Angebot bei weitem (5,6). Strategien, um das Organangebot zu verbessern, beinhalten Öffentlichkeitsarbeit zur Organspende, erweiterte Organspenderkriterien (erweitertes Altersspektrum und Spender mit Grunderkrankungen), zunehmend Lebendspenden nicht-verwandter Personen, Personen mit ABO-Inkompatibilität und Crossover-Transplantationen (11,12).

Diabetes mellitus (34%), vaskuläre Nephropathien (24%) sowie Glomerulonephritiden (13%) sind die häufigsten Grunderkrankungen, die 2006 in Deutschland zum Beginn einer Nierenersatztherapie geführt haben (6). Diabetes mellitus und vaskuläre Nephropathien gewinnen ätiologisch aufgrund der zunehmenden Lebenserwartung und der damit verbundenen Zunahme der Komorbidität mit Diabetes bzw. Hypertonie zunehmend an Bedeutung (6). Das Alter der Nierentransplantatempfänger liegt im Median bei 51 Jahren und jenes der Patienten mit Nierenersatztherapie bei 66 Jahren (6).

Die Dialyse stellt für viele Patienten eine psychische und physische Belastung sowie eine Einschränkung der Lebensqualität dar (7). Außerdem erhöht eine verlängerte Dialysedauer die Mortalitätsrate von Patienten auf der Warteliste und verschlechtert das Überleben des Patienten und ggf. des gespendeten Transplantats (3,8,13). Daher wird im Idealfall eine Transplantation präemptiv, d. h. vor Dialysebeginn (z. B. durch Lebendspende) durchgeführt (12).

Die Kosten liegen pro Lebensjahr je nach eingesetztem Dialyseverfahren bei etwa 50.000 bis 80.000 US\$ (14). Dagegen sind die Kosten der Nierentransplantation aufgrund verbesserter Immunsuppression rückläufig und belaufen sich auf etwa 10.000 US\$ pro Lebensjahr (14). Im Jahr 2006 sind in den USA 33,5 Milliarden US\$ für die Behandlung chronischer Nierenerkrankungen ausgegeben worden (5). Auf die Nierenersatztherapie sind somit im Jahr 2006 6,4% der staatlichen Gesundheitsversicherung (Medicare) entfallen (5). Die Nierentransplantation ist das kostengünstigste Verfahren der Nierenersatztherapien, da sie die Mortalität senkt und die Lebensqualität im Vergleich mit der Dialyse steigert (8,15). Die Kosten einer Nierentransplantation sind verglichen mit der Dialyse bereits nach zwei Jahren amortisiert (16).

1.3 Immunsystem

Murray et al. haben im Jahr 1954 die erste langfristig erfolgreiche Nierentransplantation an eineiigen Zwillingen durchgeführt (17-20). Aufgrund genetischer Übereinstimmung bedurfte der Empfänger keiner Immunsuppression. Patienten mit geringer Übereinstimmung benötigen eine lebenslange Immunsuppression. Mit der Einführung von Azathioprin 1960 wurde dies erstmals langfristig möglich. Mit der Einführung des Anti-Thymozyten-Globulins 1966 sank die Rate der akuten Abstoßungen, die häufig zum Tod geführt haben (11,21). Das Wissen um die Funktionsweise des Immunsystems und dadurch verbesserte immunsuppressive Medikamente haben dazu beigetragen, dass heutzutage die Überlebensrate im ersten Jahr nach Transplantation bei über 90% liegt (11,21).

1.3.1 Allgemeine Grundlagen

Das Immunsystem des Menschen erkennt und entfernt für den Körper gefährliche Mikroorganismen, Krebszellen und Gifte. Es wird in ein angeborenes (inertes) und ein erworbenes (adaptives) Immunsystem unterteilt (22). Beide Teile besitzen Immunzellen und lösliche (humorale) Bestandteile. Makrophagen, dendritische Zellen und Granulozyten, natürliche Killerzellen (jeweils inertes Immunsystem) sowie Lymphozyten, T-Killerzellen (adaptives Immunsystem) bilden die zelluläre Abwehr (22). Die humoralen Bestandteile bestehen u.a. aus dem Komplementsystem (inertes Immunsystem) und Antikörpern (adaptives Immunsystem) (22).

Inertes Immunsystem

Die Immunzellen, Makrophagen, dendritische Zellen und Granulozyten, erkennen eindringende Bakterien anhand ubiquitär vorkommender Strukturen auf der Zellmembran (22). Als Phagozytose bezeichnet man den auf die Erkennung des Mikroorganismus folgenden Vorgang, indem die Immunzelle seine Zellmembran um den Fremdkörper stülpt und ihn in sich aufnimmt (22). Die Fusion dieser Zellmembraneinstülpung (Phagosom) mit einem Lysosom führt zur Bildung des Phagolysosoms, aus dem Fragmente der aufgenommenen Zelle als Endprodukt hervorgehen (22).

Das Komplementsystem besteht aus mehreren sich gegenseitig aktivierenden Proteinen (22). Diese Komplementkaskade wird durch unspezifische bakterielle Oberflächenmerkmale oder Antikörper aktiviert (22). Am Ende dieser Kaskade formiert sich der Membran-attackierende Komplex, der die Zellmembran des Fremdkörpers durch

Porenbildung zerstört (22). In dieser Kaskade entstandene Nebenprodukte wirken auf Immunzellen anziehend und steigern deren Phagozytosegeschwindigkeit (22).

Adaptives Immunsystem

Antikörper sind Proteine, die von Plasmazellen des adaptiven Immunsystems hergestellt werden (22). Antikörper bestehen aus einer konstanten Region, die Komplementfaktoren aktiviert und Makrophagen die Phagozytose erleichtert, und einer variablen Region, die an eine spezifische Oberflächenstruktur eines Erregers bindet (22). Diese Oberflächenstruktur wird als Antigen (*Antikörper generierend*) bezeichnet und ist für jeden Erreger spezifisch (22). Antikörper markieren den Erreger für Immunzellen und verlangsamen dessen Ausbreitung (22).

Die Lymphozyten werden je nach Ausreifungsort der naiven Zellen in T-Lymphozyten (Thymus) oder B-Lymphozyten (Knochenmark) unterschieden (22). B-Lymphozyten differenzieren sich zur Plasmazelle aus und produzieren dann Antikörper (22). Eine Plasmazelle kann jeweils nur einen spezifischen Typ Antikörper produzieren (22).

T-Lymphozyten werden weiter in T-Killerzellen ($CD8^+$) und T-Helferzellen ($CD4^+$) unterschieden. T-Killerzellen eliminieren von Viren befallene Körperzellen oder Krebszellen. T-Helferzellen differenzieren sich bei der Aktivierung entweder in T_H1 - oder T_H2 -Zellen aus. Erstgenannte modulieren die zelluläre Abwehr, letztere aktivieren B-Zellen und führen zu einer humoralen Abwehr (22).

1.3.2 Antigenpräsentation und MHC-Komplex

Die Aktivierung der T-Lymphozyten erfolgt mittels Antigenpräsentation z.B. durch dendritische Zellen und Makrophagen, die daher auch als antigenpräsentierende Zellen (APC) bezeichnet werden. Durch Phagozytose sind Antigenfragmente entstanden, die eine weitere Phagozytose verhindern und eine Migration der prä-APC vom Entzündungsort in den lokalen Lymphknoten bewirken. Auf dem Weg dorthin werden verschiedene Oberflächenrezeptoren auf der Zellmembran exprimiert, wodurch die dendritische Zelle oder Makrophage zur APC ausreift. Die Antigenfragmente werden über auf der Zellmembran befindliche MHC-II-Rezeptoren der APC den T-Lymphozyten präsentiert (22,23).

Die MHC-Rezeptoren (Haupthistokompatibilitätskomplex) sind Oberflächenmoleküle auf der Zellmembran, die die individuelle immunologisch-genetische Identität festlegen (22). Die Gene des MHC sind hochvariabel, sodass gute Übereinstimmungen

sehr selten sind (22). Sie haben auf der extrazellulären Seite eine Vertiefung, in der Proteine präsentiert werden (22). Unterschieden werden MHC-Klasse-I-Rezeptoren, die von allen kernhaltigen Zellen des Körpers exprimiert werden, und MHC-Klasse-II-Rezeptoren, die ausschließlich von APC gebildet werden (22). Der MHC-Klasse-I-Rezeptor dient der Präsentation zelleigener Proteine, die das Immunsystem zur Identifizierung einer Zelle als körpereigen benötigt (22). Bei Mutationen oder viralem Befall sind die präsentierten zelleigenen Proteine so verändert, sodass T-Killerzellen oder natürliche Killerzellen (NK-Zellen) diese Zelle als fremd erkennen und beseitigen (22). Die MHC-Klasse-II-Rezeptoren werden mit Antigenfragmenten eines zuvor phagozytierten Fremdkörpers beladen (22). Der T-Zell-Rezeptor (CD3) an T-Lymphozyten bindet an den MHC-Klasse-II-Rezeptor (22). Der variable CD3-Teil auf der Zellaußenseite ist ebenfalls spezifisch für ein einziges Antigen (22). Wenn das präsentierte Antigen in den CD3 passt, werden unterschiedliche Signaltransduktionswege aktiviert, die in der Aktivierung der T-Zelle mit darauf folgender Gentranskription im Zellkern enden (22).

1.3.3 T-Zell-Aktivierung

Drei Signale müssen zur Aktivierung der naiven, noch nicht aktivierten T-Zelle vorhanden sein (siehe Abbildung 1 aus (23)). Fehlt ein einziges dieser Signale ist die T-Zelle dauerhaft anerg, nicht aktivierbar (22-24). Das erste Signal besteht in der Antigenpräsentation durch die APC mit dem zu diesem Antigen passenden CD3 (23). Dies bewirkt eine strukturelle Umwandlung von weiteren Adhäsionsmolekülen, die zu einer dauerhaften Bindung zwischen T-Zelle und APC führen (nicht in Abbildung 1 dargestellt) (22). Zur dauerhaften Aktivierung der T-Zelle wird ein zweites co-stimulatorisches Signal benötigt: Dies erfolgt z. B. durch Fusion zwischen CD28-Rezeptoren der T-Zelle und den CD80/CD86-Rezeptoren der APC (22-24). Daneben gibt es noch weitere, bislang nicht vollständig aufgeklärte, kostimulatorische Signalwege, an denen vermutlich auch TNF- α beteiligt ist (24). Beide Signale zusammen aktivieren drei intrazelluläre Signalübertragungswege: Den Calcium-Calcineurin-Weg, den RAS/Mitogen-aktivierten-Proteinkinase-Weg und den Protein-Kinase-C/Nuclear-Factor- κ -B-Weg (23,25,26). Diese drei Wege führen zur Sekretion von Zytokinen und zur Expression verschiedener Zellmembranrezeptoren (23). Zu diesen gehört die Alpha-Untereinheit des IL-2-Rezeptors (CD25), die die Affinität dieses Rezeptors für IL-2 deutlich verbessert (22).

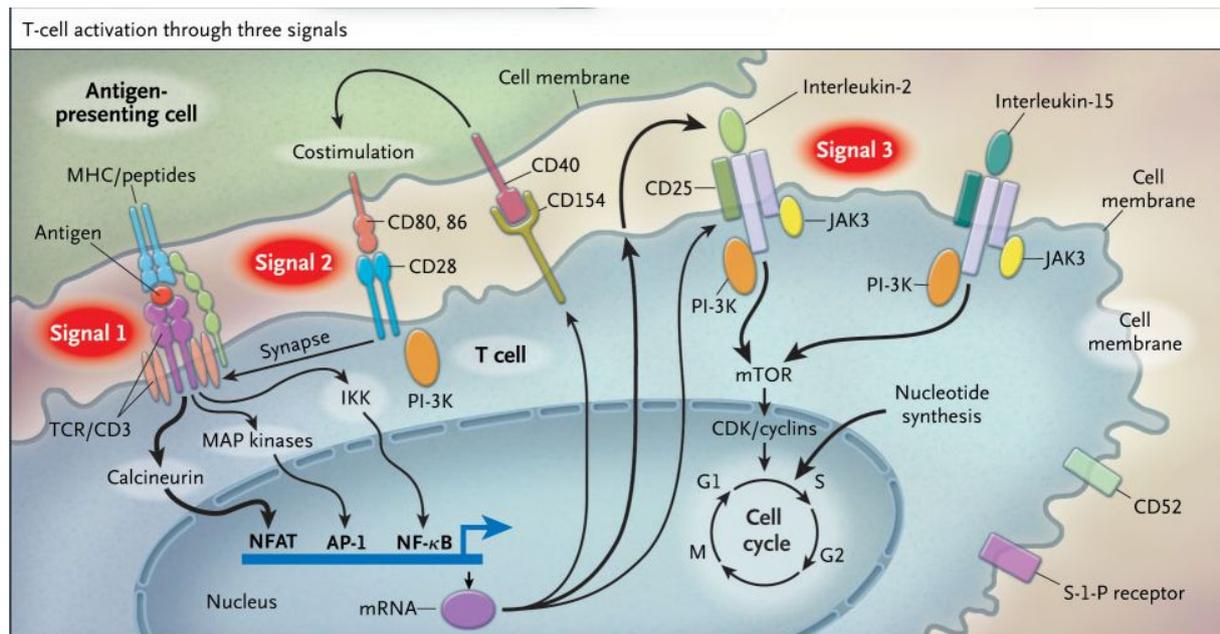


Abb. 1 aus (23): T-Zell-Aktivierung durch drei Signale

Nach Fusion des T-Zellrezeptors (CD3) mit dem MHC-II-Rezeptor der APC (Signal 1) werden Transkriptionsfaktoren aktiviert, die durch ein kostimulatorisches Signal (Signal 2) das Signal 1 verstärken. Die autokrine IL-2-Stimulation führt zum Signal 3, das ein Voranschreiten der T-Zelle im Zellzyklus bewirkt.

Zytokine sind Botenstoffe, die die Aktivität und den Stoffwechsel anderer Zellen beeinflussen (22). Das Zytokin Interleukin-2 (IL-2) wird aus der Zelle sezerniert und bindet extrazellulär an den IL-2-Rezeptor, autokrine Stimulation. Das Zytokin TNF- α aktiviert über den TNF-Rezeptor-1 intrazelluläre Signalwege, die unter anderem den „Nuclear Factor κ B“ (NF κ B) und Jun N-terminale Kinase aktivieren (27-29). Diese schützen die T-Zelle vor einer Apoptose, programmiertem Zelltod (27-29). Der IL-2-Rezeptor aktiviert über die Enzyme Januskinase und PI-3-Kinase das Enzym mammalian target of Rapamycin (mTOR) (23,30). Dies führt als drittes Signal zum Voranschreiten der T-Lymphozyten im Zellzyklus, indem es die Produktion Cyclin abhängiger Kinasen (CDK) aktiviert (22,23).

Der Zellzyklus wird in vier Phasen eingeteilt: Aus einer Ruhephase, G₀-Phase, treten die naiven Lymphozyten in die G₁-Phase. Das Erbgut liegt in der Form von Ein-Chromatid-Chromosomen vor. In der daran anschließenden Synthese-Phase (S-Phase) wird eine Kopie des vorhandenen Erbguts erstellt. In der G₂-Phase liegt das Erbgut in Form von Zwei-Chromatid-Chromosomen vor. In der Mitose-Phase teilt sich schließlich die Zelle. Das Erbgut wird durch verschiedene enzymatische Kontrollpunkte in der G₁- bzw. G₂-Phase auf Fehler überprüft, um Mutationen zu erkennen

und ggf. zu beheben. Diese Kontrollpunkte bilden CDK, die durch den IL-2-/mTOR-Weg aktiviert werden und den Übergang von der G₁- zur S-Phase des Zellzyklus regulieren (22,31). Weiterhin aktiviert mTOR über die p70S6-Kinase das proliferating cell nuclear antigen (PCNA), eine weitere CDK (31,32). Dieses wird vor allem in der S-Phase exprimiert und ist für die DNA-Reparatur essentiell (32,33). Man unterteilt die DNA-Basen anhand ihrer Struktur in die Purine, Adenin und Guanin, und die Pyrimidine, Cytosin und Thymin. Lymphozyten können Guanin nur auf dem de-novo-Syntheseweg bilden, da sie keine Enzyme des alternativen „Salvage“-Wegs besitzen (9,34). Das für diesen Stoffwechselweg geschwindigkeitsbegrenzende Enzym ist die Inosinmonophosphatdehydrogenase (IMPDH) (34,35). Diese spaltet Inosinmonophosphat in Xanthosinmonophosphat (XMP). Ein weiteres wichtiges Enzym für die Purinsynthese ist die Ribonukleotid-Reduktase (36). Dies benötigt für seine Funktion Eisen (37). Infolge niedriger intrazellulärer Eisenspeicher zerfallen iron-response-element-Bindeproteine und geben dadurch die mRNA für die Synthese des Transferinrezeptors, CD71 frei (38). Dieser transportiert Eisen durch die Zellmembran und deckt damit den Eisenbedarf der proliferierenden Zelle (37).

1.3.4 Immunsystem und Transplantatabstoßung

Der MHC-Komplex auf dem Spenderorgan kann eine deutliche immunologische Reaktion verursachen, die als Abstoßung bezeichnet wird (22). Andere Nicht-MHC-Komplexe können dies in schwächerer Ausprägung ebenfalls hervorrufen (23). Diese schwächeren Abstoßungen können durch immunsuppressive Medikamente günstig beeinflusst werden (23). Bei Übereinstimmung des MHC-Komplexes von Spender und Empfänger ist die Prognose einer erfolgreichen Transplantation verbessert (23). Es werden drei verschiedene Formen der Abstoßungsreaktion unterschieden: Hyperakute Abstoßung, akute Abstoßung und die chronische Transplantat Nephropathie.

Die hyperakute Abstoßung erfolgt in den ersten Minuten und Stunden nach der Transplantation (22). Diese Form ist humoral und beruht auf bereits vorhandenen Antikörpern, die von aktivierten B-Zellen und Plasmazellen stammen und die der Patient in seinem Leben zuvor gebildet hat (22). Diese Antikörper sind meist gegen auf Endothel vorkommende Blutgruppenantigene gerichtet. Die Antikörper binden an das Endothel des Transplantats und verursachen eine Aktivierung des Komplementsys-

tems, wodurch Endothelschäden und somit Blutgerinnsel im Gewebe entstehen (22). Die Durchblutung des Organs vermindert sich und führt zum Organversagen (22).

Die akute Abstoßung tritt Tage bis Wochen nach Transplantation auf. Sie beruht auf Aktivierung naiver T-Zellen und/oder humoralen Mechanismen mit Antikörperproduktion (22). Zum Einen aktivieren Spender-APC die Immunzellen direkt, da deren MHC-II-Rezeptoren von der T-Zelle als fremd erkannt werden, zum Anderen aktivieren Empfänger-APC naive T-Zellen durch Präsentation von Antigenen des Transplantats (22). T-Killer-Zellen können ihrerseits die MHC-Komplexe im Gewebe erkennen und dort eine Apoptose einleiten (22).

Die chronische Transplantat Nephropathie (CAN) tritt nach langer Zeit auf. Diese beinhaltet einerseits immunologische Vorgänge (chronische Abstoßung), die meist durch T-Zellen, manchmal auch B-Zellen, vermittelt sind, und nichtimmunologische Faktoren („chronisches Transplantatversagen“) (22). Man vermutet Faktoren wie Alter, MHC-Inkompatibilität, Ischämie-Reperusionszeit und Auftreten akuter Abstoßung oder Infektionen sowie nephrotoxische Nebenwirkungen von Medikamenten, besonders der Calcineurin-Inhibitoren (CNI) (39-41).

Das Abstoßungsrisiko nimmt mit zunehmender Dauer seit Transplantation ab (23). So beträgt die Abstoßungshäufigkeit in den ersten sechs Monaten nach Transplantation etwa 10-15% und danach weniger als 5% pro Jahr (42). Als Gründe für das abnehmende Abstoßungsrisiko spielen Anpassungsvorgänge eine wichtige Rolle (23). Einige Wochen nach der Transplantation sind die Immunzellen des Spenders verschwunden (23). Eine kontinuierliche Präsentation von Spender-Antigenen ohne kostimulatorisches Signal und die Unterdrückung der immunologischen Vorgänge durch Immunsuppressiva können zu einer T-Zell-Anergie führen (23,43). Diese zeichnet sich durch eine verminderte Tyrosinkinase-Aktivität, geringere Calcium-Mobilisierung (Signal 1) und reduzierte Reaktionsfähigkeit auf IL-2 (Signal 3) aus (23,43). Es wird vermutet, dass regulatorische T-Zellen die immunologische Antwort auf Spenderantigene unterdrücken (23,44). Die immunsuppressive Erhaltungstherapie setzt die Aktivierbarkeit des Immunsystems weiter herab, wobei durch Adaptionsvorgänge weniger Immunsuppressiva im Langzeitverlauf benötigt werden (23).

1.4 Immunsuppressiva

Da eine dauerhafte Toleranz des Immunsystems gegenüber dem Transplantat bisher nicht erreicht wurde, werden Medikamente gegeben, die durch eine Unterdrückung

des Immunsystems eine Abstoßung verhindern sollen (23). Zur Hemmung und Modulation des Immunsystems stehen unterschiedliche Medikamente zur Verfügung: Neuere moderne und selektivere Immunsuppressiva vermögen das Immunsystem stärker und gezielter zu beeinflussen als ältere, die in größerem Maße auch andere Zellen beeinflusst haben. Dadurch vermag man die immunsuppressive Therapie immer gezielter auf individuelle Bedürfnisse und Risiken abzustimmen (9,30,45,46).

Die heute verwendeten Immunsuppressiva haben unterschiedliche Wirkmechanismen (siehe Abbildung 2 aus (23)): Einige zerstören Lymphozyten, verändern ihr Migrationsverhalten oder hemmen Enzyme in den Aktivierungswegen (23,46). Neben der erwünschten Unterdrückung des Immunsystems im Hinblick auf eine drohende Abstoßungsreaktion, entsteht daraus auch eine unerwünschte Immunschwäche, die zu erhöhter Infektionsneigung und zu einem erhöhten Tumorrisiko führt (23,46).

Darüber hinaus wirken die Immunsuppressiva auch auf andere nichtimmunologische Zellen, wodurch Nebenwirkungen auftreten, die meist eine Dosisabhängigkeit aufweisen (23,46). Diese Nebenwirkungen umfassen beispielsweise kardiovaskuläre Risikofaktoren wie Diabetes mellitus, Hypertonie und Hyperlipidämie und im Falle der Calcineurin-Inhibitoren auch eine Nephrotoxizität (23,46).

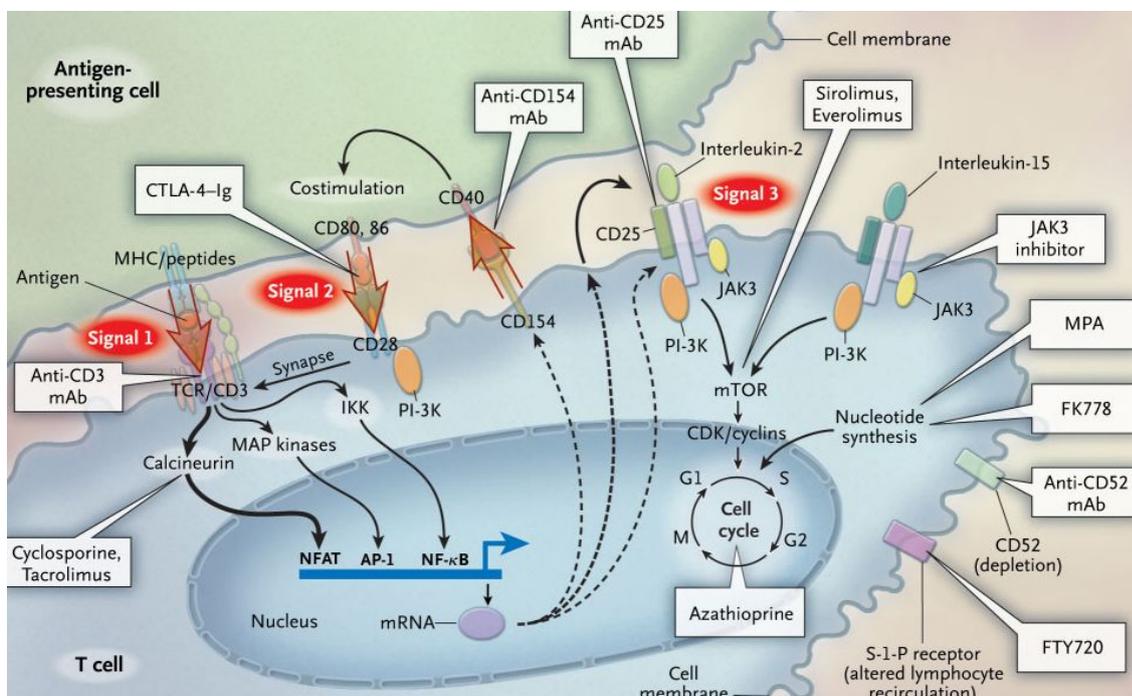


Abb. 2 aus (23): Angriffsorte unterschiedlicher Immunsuppressiva

MPA: Mycophenolsäure

1.4.1 Wirkungen und Nebenwirkungen immunsuppressiver Medikamente

Glukokortikoide

Die immunsuppressive Wirkung der Glukokortikoide ist seit langem bekannt (47). Sie beruht auf einer unspezifischen Hemmung der Entzündungsreaktion (22,46). Im Endothel kommt es zu einer Verminderung von Adhäsionsmolekülen auf Gefäßwänden, wodurch die Einwanderung von Entzündungszellen reduziert wird (22,46). Die Phagozytose, Antigenaufnahme und -präsentation von APC wird ebenso vermindert wie die Zytokinproduktion in APC und T-Lymphozyten (22,46). Nur in hohen Dosen wird auch die Antikörperproduktion der B-Zellen reduziert (46). Die Bildung von Prostaglandin-, Leukotrien- und Plättchenaktivierendem Faktor wird durch Hemmung der Cyclooxygenase reduziert (46). Die synthetisch hergestellten Glukokortikoide besitzen je nach molekularer Struktur eine unterschiedliche Bindungsfähigkeit zum Glukokortikoidrezeptor (46). Die Halbwertszeit ist durch zusätzliche Seitenketten verlängert (46). Zu den häufigsten Nebenwirkungen zählen Gewichtszunahme, cushingoide Fazies, Wundheilungsstörungen, Diabetes mellitus, Hyperlipidämie, Hypertonie, Osteoporose und ein Katarakt (9,46,47).

Azathioprin

Azathioprin und dessen Vorläufer 6-Mercaptopurin fanden in den 60 Jahren große Verbreitung in der Transplantationsmedizin (47). Azathioprin wird gut im Darm resorbiert und in der Leber zu 6-Mercaptopurin umgewandelt (22,46). Dies ist der aktive Metabolit, der zu einer Hemmung der Purinsynthese führt (46). Die Purinsynthese ist eine Voraussetzung für die Zellteilung. Es wirkt daher als Antimetabolit auf besonders stark proliferierende Gewebe (46). 6-Mercaptopurin wird in der Niere durch Xanthinoxidase inaktiviert und über den Urin ausgeschieden (46). Die Nebenwirkungen bestehen in einer Unterdrückung der Blutbildung, Hautausschlägen, Fieber, Übelkeit und Erbrechen (22,46). Leberfunktionsstörungen und Ikterus treten selten auf (46). Die Dosierung ist abhängig von der individuellen Verstoffwechslung (46). Bei etwa 0,3% der Menschen ist aufgrund einer Mutation im Thiopurinmethyltransferase-Gen eine verstärkte Myelosuppression unter der Therapie von Azathioprin zu erwarten, da diese das Azathioprin schneller verstoffwechseln (46). Seit der Einführung der Mycophenolsäure ist Azathioprin in der Transplantationsmedizin nur noch Immunsuppressivum zweiter Wahl (9,23,47).

Mycophenolsäure

Die Mycophenolsäure hemmt die Inosinmonophosphat-Dehydrogenase (IMPDH), die in zwei Isoformen existiert: IMPDH-1 ist in allen Geweben, IMPDH-2 nur in proliferierenden Lymphozyten vorhanden (35). Wie bereits erwähnt ist dieses Enzym essentiell für die Proliferation der Lymphozyten, da diesen im Gegensatz zu anderen Zellen der „Salvage“-Weg fehlt (34,35). Lymphozyten werden somit selektiver und stärker gehemmt als andere Zellen (35). Mycophenolat Mofetil und Enteric coated Mycophenolsäure (EC-MPS) sind unterschiedliche Darreichungsformen der Mycophenolsäure (MPA), die im Magen und Darm als Mycophenolsäure aufgenommen werden. MPA hemmt die IMPDH-2 stärker als die IMPDH-1 und trägt so zur selektiven Wirkung bei (48,49). Zu den Nebenwirkungen gehören gastrointestinale Beschwerden wie Durchfall, hämatologische wie Anämie und Leukopenie, Haarausfall und Infektionen (46).

Calcineurin-Inhibitoren

Calcineurin-Inhibitoren (CNI) hemmen die Calcineurin-Aktivität (23,46). Bei der Markteinführung Anfang der 80er Jahre kam es zu einer deutlichen Reduktion der Abstoßungsraten, wodurch sich die Einjahres-Überlebensrate des Transplantats von etwa 60-65% auf 80% verbesserte (21,50,51). Allerdings zeigte sich auch eine starke Nephrotoxizität (21). Durch die Calcineurin-Aktivitätshemmung wird die Weiterleitung von Signal 1 der T-Zell-Aktivierung blockiert (23). Die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NFAT und NFκB wird gehemmt und somit die Zytokinsynthese von IL-2 und TNF-α vermindert (46,52). Die Vertreter dieser Gruppe sind Cyclosporin A (CyA) und Tacrolimus (46).

CyA wird zu etwa 20-50% im Darm aufgenommen und v.a. in der Leber über Cytochrom-P450 verstoffwechselt, was eine Vielzahl an Arzneimittelinteraktionen verursacht (46). Die Ausscheidung erfolgt über die Galle (46). Es ist fettlöslich und bildet einen Komplex mit Cyclophilin, der Calcineurin hemmt (22,46). Die Antigenpräsentation an sich wird nicht unterdrückt (46). CyA führt zu einer vermehrten Bildung von TGF-β, das das Tumorwachstum und Metastasierungsverhalten beeinflusst und möglicherweise an der Ausbildung der Fibrose bei der chronischen Allograft Nephropathie beteiligt ist (39,46). Zu weiteren möglichen Nebenwirkungen zählt das Auftreten einer Hypertonie, -glykämie, -lipidämie, -kaliämie, Lebertoxizität, Zahnfleischwucherungen und Ausprägung eines Hirsutismus (9,23,46).

Tacrolimus (FK-506) bildet mit dem FK-506-Bindeprotein (syn. FK-Bindeprotein 12) einen Komplex, der die Calcineurin-Aktivität etwa 10 bis 100-fach stärker als CyA

hemmt (23,46). Die Aufnahme, der Abbau und die Ausscheidung von Tacrolimus ist dem von CyA sehr ähnlich (9,46). Auch die Nebenwirkungen sind ähnlich. So zeigt sich ebenfalls eine verstärkte Hypertonie und Hyperglykämie (9,46). Im Gegensatz zu CyA stehen bei Tacrolimus Neurotoxizität und gastrointestinale Beschwerden im Vordergrund (9,46). CNI weisen eine nierenschädigende Wirkung auf (21,46,53).

Proliferationssignal -Inhibitoren

Die mammalian-target-of-Rapamycin-Inhibitoren (mTOR-I), zu denen Sirolimus und Everolimus gehören, sind Mitte der 1990er eingeführt worden (46). Sie binden wie Tacrolimus an das FK-506-Bindeprotein, blockieren jedoch nicht die Calcineurin-Aktivität sondern das Enzym mammalian-target-of-Rapamycin (mTOR). Dies ist für das Signal 3 der T-Zell-Aktivierung bedeutsam (23,31,54). Die Signalwege zum Zellwachstum und zur Zellteilung durch Nährstoffe, hormonale Wachstumsfaktoren (Insulin-like-Growth-Factor-1) und Zellenergie (ATP) sind über den mTOR-Weg miteinander verbunden (54-56). Neben dem Einsatz in der Transplantationsmedizin wird es in der Kardiologie als Bestandteil medikamentös beschichteter Stents und in der Onkologie zur Therapie des Nierenzellkarzinoms verwendet (9,54,57,58). Hyperlipidämie, Wundheilungsstörungen, Anämie, Leuko- und Thrombozytopenie sind die häufigsten Nebenwirkungen (9,47,54,59-61). In Kombination mit Cyclosporin erhöhen mTOR-I das Risiko nephrotoxischer Nebenwirkungen (9,23). Normalerweise blockiert mTOR das „Insulin Rezeptor Substrat“, durch das es aktiviert wird (56). Eine Insulinresistenz tritt jedoch nicht auf bzw. wird vermindert (56). Die Rolle der mTOR-I bzgl. ihrer Diabetogenität wird diskutiert (56).

Antikörper

Antikörper werden in depletierende und nicht depletierende Antikörper unterteilt (23,46). OKT3 ist ein monoklonaler depletierender Antikörper gegen CD3, der von Mäusen hergestellt wird. Er bindet an humanes CD3 und verursacht eine massive Zytokinfreisetzung, die eine Zerstörung der T-Zellen bewirkt (46). Bei mehrfacher Anwendung kann der Effekt durch die Produktion neutralisierender Antikörper aufgehoben werden (46).

Basiliximab und Daclizumab sind nicht depletierende Antikörper, die den CD25-Rezeptor blockieren (46). Da dieser überwiegend auf aktivierten T-Zellen gefunden wird, werden naive T-Zellen und Gedächtniszellen nicht beeinflusst (23,46). Sie werden prophylaktisch gegen Rejektionen gegeben und zeigen in klinischen Studien keine messbaren Nebenwirkungen (62).

1.4.2 Wirkung und Nebenwirkung moderner immunsuppressiver Kombinationstherapie

Angepasst an das immunologische Risiko wird derzeit meist eine Dreifach-Kombination als Dauerimmunsuppression bestehend aus Glukokortikoiden, einem Calcineurin-Inhibitor (CyA oder Tacrolimus) und einem antiproliferativen Medikament (MPA, m-TOR-I oder Azathioprin) eingesetzt (5,6,9,23,63). Bei hohem Rejektionsrisiko wird perioperativ ein Antikörper (Basiliximab oder Antithymozytenglobulin) zu dieser Dreifach-Kombination hinzugegeben (2). Eine initiale immunsuppressive Vierfach-Kombination ist erforderlich, um die Dosierungen einzelner Medikamente, insbesondere der Steroide und CNI, zu verringern und damit das Auftreten von Nebenwirkungen und chronischem Transplantatversagen zu minimieren (23,40,64). Nach einer Induktionstherapie in hoher Dosierung in den ersten Monaten nach der Transplantation wird anschließend eine immunsuppressive Dauertherapie dieser Dreifach-Kombination in niedrigerer Dosierung fortgesetzt (9,23).

Durch die modernen Immunsuppressiva werden die meisten akuten Rejektionen gut beherrscht und das Langzeitüberleben nach der Transplantation hat sich stetig verbessert (9,21). Das Transplantat-Einjahresüberleben liegt heute unter der Dreifach-Therapie bei Leichenspendernieren bei ca. 90% und bei Lebendspendernieren bei ca. 95% (5).

Neben der vermehrten Infektanfälligkeit bzw. der langfristigen Tumorentstehung infolge einer Überimmunsuppression rücken zunehmend die nichtimmunologischen Nebenwirkungen der Immunsuppressiva in den Vordergrund. Die nichtimmunologischen Nebenwirkungen der immunsuppressiven Therapie umfassen u. a. neben kardiovaskulären Risikofaktoren wie der Hyperlipidämie (CNI, mTOR-I, Kortikoide), arteriellen Hypertonie und Hyperglykämie (jeweils CNI, Kortikoide) auch hämatologische Nebenwirkungen wie Anämie, Leukopenie und Thrombozytopenie (jeweils MPA, mTOR-I) sowie Wundheilungsstörungen (mTOR-I, Kortikoide), Durchfall und Haarverlust (jeweils MPA, Tacrolimus), Osteoporose (CNI, Kortikoide), Zahnfleischwucherungen (CyA), Proteinurie (mTOR-I) und die Nephrotoxizität (CNI) (23,46). Aufgrund dieser vielfältigen Nebenwirkungen ist eine engmaschige klinische Überwachung und die Kontrolle laborchemischer Parameter wie Cholesterin (Gesamt, HDL, LDL), Triglyzeride, dem Blutbild (Erythrozyten, Leukozyten, Thrombozyten, Hämoglobingehalt, MCV, MCH, MCHC, Retikulozyten), der Proteinmenge im Urin und des Kreatininwertes notwendig (63).

Die Haupttodesursache der Patienten mit funktionierendem Nierentransplantat ist auf kardiovaskuläre Ereignisse zurückzuführen (5,6). Die Hälfte aller Spendernieren ist wegen des chronischen Transplantatversagens 12 bzw. 25 Jahre nach der Transplantation von Leichen- bzw. Lebendnieren funktionslos (5). Das chronische Transplantatversagen ist eine der Hauptursachen für den Funktionsverlust der Spenderniere (39,41). Die Nephrotoxizität der CNI wird als ein wichtiger Faktor in dessen Entstehung angesehen (39). Der CNI-Einsatz deutet sich als ein Risikofaktor für die Entstehung eines terminalen Nierenversagens bei nicht-renal Transplantierten an, das je nach transplantiertem Organ in 7-21% auftritt (65). Nierentransplantierte Patienten, die im Jahr 2006 in den USA erneut eine Nierenersatztherapie, Dialyse oder Retransplantation, begannen, besaßen ihr Spenderorgan im Durchschnitt nur 6 Jahre (Median 8 Jahre) (5). Im selben Jahr mussten in Deutschland 800 Nierentransplantierte (3,1%) erneut eine Dialyse beginnen (6).

Da die Gefahr der akuten Abstoßung im ersten Halbjahr nach der Transplantation am größten ist, werden sämtliche Immunsuppressiva in diesem Zeitraum in höherer Dosis gegeben, weil sich diese zur Minimierung der akuten Abstoßung besonders bewährt haben (21,23,50,51,63,66). Aufgrund ihrer Toxizität beschäftigen sich schon seit vielen Jahren Studien mit der Reduktion oder vollständigen Elimination von CNI, um das Langzeitüberleben des Transplantats und des Patienten zu verlängern (66-71). Erste Versuche zur Elimination der CNI waren nicht so erfolgreich. Eine initiale Therapie mit CNI und anschließender Umstellung auf CNI-freie Regime nach Jahren waren ebenfalls wenig erfolgreich. Vollständig CNI-freie Kombinationen wurden ebenfalls mit wechselndem Erfolg in einigen Studien erprobt (66,67,72,73).

1.5 Therapeutisches Drug Monitoring

Ein bedeutendes Ziel der Transplantationsmedizin ist die Verbesserung des Langzeitüberlebens (21,51). Dazu wäre es wichtig die dosisabhängigen Nebenwirkungen immunsuppressiver Medikamente, die das kardiovaskuläre Risiko und die Nephrotoxizität erhöhen, zu minimieren. Bei der Gratwanderung zwischen einer Unterimmunsuppression mit zunehmender Abstoßungsgefahr einerseits, und einer Überimmunsuppression mit stärkeren Nebenwirkungen andererseits, ist eine intensive Überwachung der Therapie unentbehrlich (42,50,74). Zur Überwachung und Steuerung der Therapie sind derzeit zwei pharmakologische Prinzipien denkbar: Pharmakokinetik und Pharmakodynamik (46).

1.5.1 Pharmakokinetik

Die Pharmakokinetik (Auswirkungen des Körpers auf das Medikament) beschreibt die Verteilung eines Medikaments im Körper, Aufnahme, Aktivierung und Verstoffwechslung, und dessen Ausscheidung (46). Anhand der Konzentration des Immunsuppressivums im Blut zu definierten Zeitpunkten wird die Applikationsdosis angepasst, um die Konzentration in einem therapeutischen Bereich zu halten (42,51). Im Idealfall ist dieser Bereich durch eine erhöhte Inzidenz an Rejektionen nach unten bzw. medikamentenspezifische Nebenwirkungen nach oben begrenzt (42).

Neben der Bestimmung des Talspiegels, der unmittelbaren Medikamentenkonzentration vor Tabletteneinnahme, im Blut können auch zusätzliche Messungen zwei Stunden nach Einnahme oder in weiteren Intervallen durchgeführt werden, um die Exposition, anhand der „Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve“ gemessen, abzuschätzen und eine bessere Korrelation zwischen Applikationsdosis und Konzentration zu erzielen (75). Dieses Vorgehen ist jedoch wegen der hohen Anzahl an Messungen und pünktlichen Blutentnahmen im klinischen Alltag wenig praktikabel.

Derzeit wird die CyA-Exposition durch Messung der Talspiegel überwacht und die Dosis entsprechend angepasst (63). So lässt beispielsweise die CyA-Talkonzentration keine Rückschlüsse auf die Calcineurinaktivität zu (76). Folglich erleiden einige Patienten trotz normaler CyA-Serumkonzentrationen Infektionen als Zeichen einer Überimmunsuppression und andere Patienten erleiden bei gleicher Blutspiegelkonzentration eine Transplantatabstoßung infolge einer Unterimmunsuppression, die durch individuell unterschiedliche Calcineurinaktivität bedingt sein könnte (77,78).

Darüberhinaus gibt es einige methodische Probleme dieses Vorgehens (42): So muss der Zusammenhang zwischen Medikamentenkonzentration und Dosiskurve dauerhaft gleichbleibend gut bestehen. Die enterale Absorption variiert jedoch einerseits interindividuell und andererseits über die Zeit, sodass die Korrelation nicht für alle Medikamente gleichermaßen gegeben ist. Weiterhin ist der therapeutische Bereich nicht starr, sondern verändert sich mit der Zeit, da das Risiko einer akuten Abstoßung im zeitlichen Verlauf abnimmt. Synergistische Effekte von Kombinationstherapien tragen ebenfalls zu einer Verminderung akuter Abstoßungen und Zunahme von Toxizitäten bei. Weiterhin beeinflussen individuelle Spender- bzw. Empfängerfaktoren wie Alter, MHC-Inkompatibilität, ethnische Zugehörigkeit, Leber- und Nierenfunktion das therapeutische Fenster (42).

Die Pharmakokinetik liefert somit zwar Informationen über die pharmakologischen Serumkonzentrationen, trifft jedoch keine Aussagen über das Wirkungsmaß der Immunsuppressiva.

1.5.2 Pharmakodynamik

Die Pharmakodynamik (Wirkung von Medikamenten auf den Körper) bietet einen Lösungsansatz dazu (46,79). Die pharmakodynamischen Verfahren messen die Medikamentenwirkung auf die therapeutisch beeinflussten Immunzellen.

Enzyme und Rezeptoren, die direkt oder indirekt durch ein spezifisches Immunsuppressivum beeinflusst werden, eignen sich ebenso für die Evaluation der pharmakologischen Wirkung wie Produkte von Stoffwechselwegen, die von einem oder mehreren immunsuppressiven Medikamenten beeinflusst werden (80-82). Die Messung von spezifischen Enzymen und Rezeptoren ermöglicht Rückschlüsse auf die Wirkung eines bestimmten Immunsuppressivums (80-82). So spiegelt die Calcineurinnaktivität die CyA-Wirkung wieder (76,83). Die Expressionshemmung der Zytokine IL-2 und TNF- α sowie des Oberflächenaktivierungsmarkers CD25 sind ebenfalls abhängig von der CyA-Konzentration (84). Die Wirkung der Mycophenolsäure kann durch die IMPDH-Aktivität gemessen werden (34,81,82).

Die Messung der Zytokinexpression, die Expression von Zellmembranrezeptoren oder die Lymphozytenproliferationsrate lassen eine Beurteilung der gemeinsamen Wirkung von immunsuppressiven Kombinationstherapien auf unterschiedlichen Ebenen der immunologischen Funktion zu (80,82).

Durchflusszytometrische Verfahren zur Messung der Lymphozytenproliferationsrate, Expression von Oberflächenaktivierungsmolekülen und Zytokinsekretion wurden bereits im Rattenmodell und bei Primaten angewendet (85-91). Die verwendete Methodik wurde in unserer Arbeitsgruppe in humanem Vollblut in vitro weiterentwickelt und validiert (85).

1.6 Fragestellung

Da die Nierentransplantation die Therapie der Wahl bei terminalem Nierenversagen ist, die eine lebenslange immunsuppressive Therapie erfordert, ist es von großer Wichtigkeit, die Nebenwirkungen der Therapie so gering wie möglich zu halten. Dies soll die Langzeitprognose für Patient und Transplantat optimieren. Um die Nebenwirkungen zu minimieren, werden verschiedene immunsuppressive Medikamente mit unterschiedlichen Nebenwirkungsprofilen kombiniert, wobei durch synergistische Effekte die Dosis jedes einzelnen Medikamentes reduziert werden kann. Dadurch fallen unter Umständen die spezifischen Nebenwirkungen (z.B. CNI-Nephrotoxizität) jedes einzelnen Immunsuppressivums geringer aus.

Die Medikamentenkonzentration jedes einzelnen Medikamentes in einer Kombinationstherapie wird anhand der Talspiegelkonzentration im Blut im jeweiligen therapeutischen Fenster gehalten. Diese Methodik lässt Rückschlüsse auf die Wirkungsstärke nur durch Vergleich mit empirischen Werten zu. Dies kann nicht ausschließen, dass im Einzelfall Nebenwirkungen durch Über- oder Unterimmunsuppression auftreten. Pharmakodynamische Messungen sollen einen besseren Aufschluss über die individuelle Stärke der immunsuppressiven Wirkung eines Medikaments bzw. einer Kombinationstherapie aus CyA, EC-MPS und Prednisolon geben.

Ziel dieser Arbeit ist es, mittels neu etablierter pharmakodynamischer Methoden explorativ Veränderungen der Biomarker an einem größeren de novo nierentransplantierten Patientenkollektiv zu untersuchen. Zur Beantwortung dieser Fragen wurden im Rahmen einer Substudie zur Zeus-Studie für jeden Patienten an unserem Zentrum über einen Zeitraum von 12 Monaten verschiedene pharmakodynamische Parameter (IL-2, TNF- α , CD25, CD71, lymphozytäre Proliferationsrate) durchflusszytometrisch gemessen (92). Außerdem wurden parallel von jedem Patienten die IMPDH-Aktivität, klinische Nebenwirkungen und laborchemische Veränderungen in diesem Zeitraum erfasst. Rejektionen und Infektionen wurden für diese Dissertation nicht analysiert.

Begleitend zu einer klinischen Studie, in der ein Teil der Patienten 4½ Monate nach Transplantation von einer CNI-haltigen auf eine CNI-freie immunsuppressive Kombinationstherapie randomisiert wurde, wurden folgende Fragen untersucht:

1. Wie werden die erhobenen pharmakodynamischen Parameter (IL-2, TNF- α , CD25, CD71, lymphozytäre Proliferationsrate und IMPDH) durch die immunsuppressive Kombinationstherapie beeinflusst?

2. Verhalten sich diese Biomarker in beiden Studienarmen nach Randomisierung unterschiedlich?
3. Wie sind die Zusammenhänge der erhobenen pharmakodynamischen Parameter in der Kombinationstherapie zueinander?
4. Sind Abhängigkeiten zwischen den Dosen der Immunsuppressiva, sowie deren Medikamentenkonzentrationen im Blut und deren PD-Werten (Biomarker-Messungen) unter diesen Kombinationstherapien erkennbar?
5. Treten klinische Nebenwirkungen oder laborchemische Veränderungen je nach Studiengruppe unterschiedlich häufig auf?
6. Gibt es eine Beziehung zwischen den PD-Werten und diesen klinischen Nebenwirkungen bzw. laborchemischen Veränderungen?

2. Materialien und Methoden

2.1 Studienaufbau

2.1.1 Ein- und Ausschlusskriterien

Die vorliegende pharmakodynamische Studie ist eine Substudie zur ZEUS-Studie (92). Die Studie und die Substudie sind von der Ethikkommission der Charite genehmigt worden. Alle Probanden geben nach vorheriger Information über die Studie ihr freies schriftliches Einverständnis zur Hauptstudie und zur vorliegenden Substudie. In die ZEUS-Studie werden Patienten mit einer de novo Nierentransplantation der Niere im Alter von 18 bis 65 Jahren eingeschlossen. Sofern das erste Organ nicht innerhalb von 12 Monaten aufgrund einer Abstoßungsreaktion verloren wurde, werden auch Retransplantationen eingeschlossen. Eine Schwangerschaft wird bei Studienbeginn durch einen β -HCG-Test ausgeschlossen. Die Spenderorgane sind Blutgruppen-kompatibel von Lebend- oder Totspendern im Alter von 5-65 Jahren.

Ausgeschlossen werden Patienten mit einem hohen immunologischen Risiko (Panel-reaktive Antikörper >25%), Transplantate mit einer kalten Ischämiezeit von über 30 Stunden, HIV, aktiver Hepatitis B oder C, unkontrollierbarem Diabetes mellitus oder Begleitinfektionen, Drogen- Medikamenten- oder Alkoholabusus, Leberzirrhose, schweren psychischen Erkrankungen, Allergie gegen die Studienmedikation, Makrolidantibiotika oder Laktose, schweren Diarrhöen, Erbrechen, Malabsorptionssyndromen des oberen Verdauungstraktes oder aktivem peptischen Ulkus. Laborchemisch ist zu Studienbeginn eine Thrombopenie (<75/nl), eine Leukopenie (<2,5/nl) und eine schwere Lebererkrankung (GOT bzw. GPT über doppelter Normwertgrenze) ausgeschlossen worden.

Zum Randomisierungszeitpunkt (Monat 4½ = Tag 135 nach Transplantation) werden weitere Ein- und Ausschlusskriterien für eine Randomisierung überprüft. Die immunsuppressive Kombinationstherapie muss CyA (Sandimmun® Optoral) und Kortikosteroide beinhalten sowie EC-MPS (Myfortic®) von mindestens 720mg/d. Der Kreatinin-Wert muss unter 3,0mg/dl liegen.

Die Ausschlusskriterien zur Randomisation sind ein Transplantatverlust, ein von der Studienmedikation abweichendes immunsuppressives Regime, eine höhergradige Rejektion (>BANFF II) bzw. mehrfache akute steroidresistente Rejektionen, Blutbildveränderungen (Thombozytopenie <75/nl, Hämoglobin <6mg/dl, Leukopenie <2,5/nl oder Neutropenie <1,5/nl), schwere Lebererkrankungen oder erhöhte Leberwerte

(AST, ALT oder Bilirubin über der dreifachen Norm), eine Proteinurie (>1g/d), Dialysepflichtigkeit zum Randomisationszeitpunkt, schwere Infektionen oder schwere Nebenwirkungen oder Komplikationen aufgrund der immunsuppressiven Therapie. Die Vorerkrankungen und schweren Nebenwirkungen werden in den Studienprotokollen erfasst (92).

2.1.2 Studienablauf und –medikation

Abbildung 3 skizziert den Studienablauf. Zwei Stunden vor der Nierentransplantation erhalten die Patienten eine Induktionstherapie mit Basiliximab 20mg i. v. und vier Tage nach der Transplantation eine zweite Dosis von 20mg. Alle Patienten bekommen eine immunsuppressive Kombinationstherapie. Diese besteht aus CyA, 1440mg/d EC-MPS und zentrumsabhängig mindestens 5mg/d Methylprednisolon. Die EC-MPS Dosis kann im Verlauf reduziert werden. Die CyA-Dosierung wird durch die CyA-Konzentration im Blut unmittelbar vor Einnahme (Talspiegelkonzentration) gesteuert und beträgt im Zeitraum nach Transplantation bis Monat 4½, Monat 4½ bis 6 bzw. Monat 6 bis 12 150-220ng/ml, 120-180ng/ml bzw. 100-150ng/ml. Die CyA-Konzentration zwei Stunden nach Einnahme soll 1100-1400ng/ml (Monat 1), 950-1300ng/ml (Monat 2), 800-1200ng/ml (Monat 3), 700-1000ng/ml (Monat 6) bzw. 500-800 ng/ml (Monat 12).

Zum Zeitpunkt Monat 4½ (Tag 135) werden die Patienten in die Cyclosporin-Gruppe oder die Everolimus-Gruppe randomisiert. Unter Beibehaltung der immunsuppressiven Komedikation bestehend aus mindestens 720mg/d EC-MPS und mindestens 5mg/d Methylprednisolon wird in der Everolimus-Gruppe von Cyclosporin in aus-

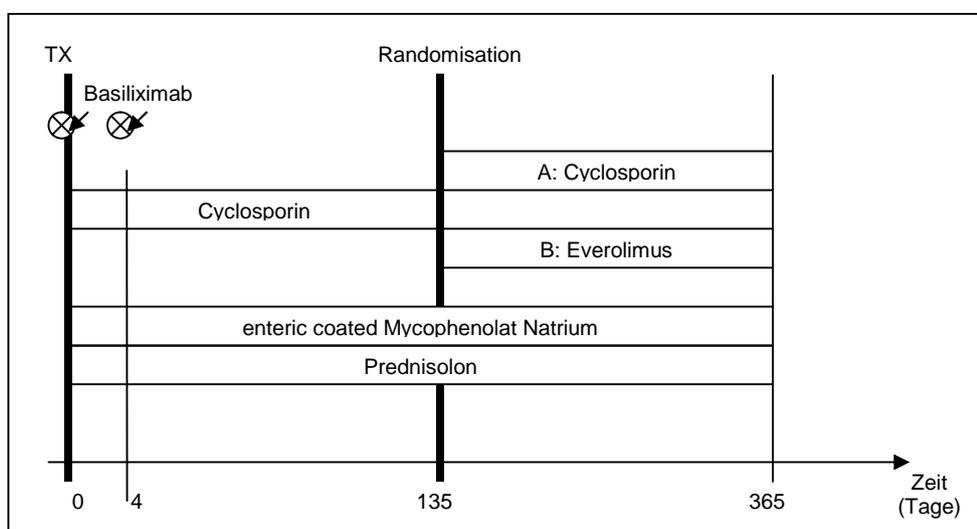


Abb. 3: Schema über Studienmedikation im Studienzeitraum

schleichender Dosierung binnen 4 Wochen auf Everolimus umgestellt. Dazu wird die CyA-Dosis halbiert und 1,5mg Everolimus (Certican®) gegeben. Liegt der Everolimus-Spiegel über 3ng/ml, wird die CyA-Dosis erneut halbiert. Sofern der Evl-Spiegel über 8ng/ml liegt, wird die Everolimus-Dosis beibehalten, sonst auf 3mg verdoppelt. Liegt der Everolimus-Spiegel unter 3ng/ml wird die CyA-Dosis beibehalten und die Everolimus-Dosis verdoppelt. Nach erneuter Überprüfung wird das CyA abgesetzt, sofern die Everolimus-Konzentration über 6ng/ml beträgt. Dabei wird die laufende Dosierung beibehalten. Wenn die Everolimus-Konzentration unter 6ng/ml liegt, wird die Everolimus-Dosis auf 3mg bzw. 4,5mg gesteigert. Angestrebt wird eine Everolimus-Talspiegelkonzentration im Blut von 6-10ng/ml.

Zu folgenden Zeitpunkten werden pharmakodynamische Messungen durchgeführt: Vor der Transplantation (Tag 0), nach der Transplantation an Tag 4, 11, an Monat 1, 3, 4½, 6, 7½ und 12. Die Messungen beinhalten folgende Biomarker: IMPDH-Aktivität, IL-2, TNF- α , CD25, CD71 und die lymphozytäre Proliferationsrate definiert durch die Expression von proliferating cell nuclear antigen (PCNA^{high}) und den Propidium Iodid-Gehalt (PI^{high}). Folgende routinemäßig kontrollierten Laborparameter sind ebenfalls verwendet worden: Kreatininwert, kleines Blutbild (Thrombo-, Erythro- und Leukozytenzahl, Hämoglobingehalt, mittleres korpuläres Hämoglobin bzw. Volumen), Proteinkonzentration im Urin, Fettprofil (Triglyzeride, Gesamt-, HDL- und LDL-Cholesterin) sowie die Glukosekonzentration (nüchtern) im Serum.

2.2 Materialien

2.2.1 Reagenzien

2.2.1.1 Kulturmedium und Zusätze

L-Glutamin, Biochrom AG

Penicillin, Biochrom AG

Streptomycin, Biochrom AG

RPMI-1640, Biochrom AG

2.2.1.2 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
GolgiPlug (Brefeldin A + Dimethylsulfoxid), Becton Dickinson
Inosinmonophosphat, Sigma
IntraPrep (Lösung 1 mit Formaldehyd, Lösung 2 mit Saponin), Beckman Coulter
Kaliumhydrogencarbonat (KHCO₃), Merck
Kaliumhydrogenphosphat (KH₂PO₄), Merck
Methanol, J.T. Baker
Nicotinamidadenindinucleotid, Sigma
Phosphatgepufferte Kochsalzlösung ohne Calcium/Magnesium, PAA Laboratories
Propidium-Iodid (PI), 1g/l, Sigma
Ribonuklease A, Sigma
Saponin, Sigma
Tetra-N-Butylammoniumhydrogensulfat, Merck
Xanthosinmonophosphat, Sigma
Destilliertes Wasser

2.2.1.3 Stimulantien

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

2.2.1.4 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

2.2.2 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, Becton Dickinson

HPLC-Gerät, Shimadzu LC-2010 mit UV-VIS Detektor (Wellenlänge 256nm)

Chromatographiesäule ProntoSIL AQ C18 (Partikelgröße 3µm, 3mm x 150mm), Birschhoff Chromatographie

Elektrische Pipettierhilfe, Accu-Jet, Sigma

Multipette, Eppendorf

Vortexmixer, Scientific Industries

2.2.3 Software

MS Word, Microsoft

MS Excel, Microsoft

MS Access, Microsoft

Cellquest Pro, Becton Dickinson

Class VP Software, Shimadzu

Reference Manager, Version 10

SPSS/PASW für Windows, Version 16 bzw. 18

Transplantationsdatenbank „T-Base“

2.3 Puffer und Lösungen

Ionomycin Stamm- und Arbeitslösung

Die Stammlösung, aus 500µg Ionomycin gelöst in 1000µl Ethanol, wird bis zum Gebrauch aliquotiert und bei -20°C im Tiefkühlfach gelagert.

Zur Herstellung der Arbeitslösung wird das Aliquot aufgetaut. 10µl Stammlösung werden mit 123µl steriler phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) vermischt.

Phorbol-12-Myristat-13-Acetat Stamm- und Arbeitslösung

Die Stammlösung, aus 100µg PMA gelöst in 1000µl DMSO, wird bis zum Gebrauch aliquotiert und bei -20°C im Tiefkühlfach gelagert.

Das Aliquot wird vor Gebrauch aufgetaut. 10µl Stammlösung werden mit 1323µl sterilem PBS vermischt.

GolgiPlug Stamm- und Arbeitslösung

Die gebrauchsfertig gelieferte Lösung, bestehend aus 10% Brefeldin A und 90% Dimethylsulfoxid wird auf 10µl aliquotiert und bei 4°C im Kühlschrank gelagert. Vor Gebrauch werden 90µl PBS ins 10µl GolgiPlug Aliquot gegeben.

Concanavalin A Stammlösung

3mg ConA werden in 3ml RPMI gelöst, zu je 100µl aliquotiert und bis zur Verwendung im Tiefkühlfach bei -20°C gelagert.

RPMI-1640

RPMI-1640 wird mit 2mM L-Glutamin, 100U/ml Penicillin und 100µg/ml Streptomycin versetzt. Das Nährmedium lagert maximal 30 Tage bei 4°C im Kühlschrank.

Lysierungspuffer

Zur Herstellung des gebrauchsfertigen Lysierungspuffers werden zunächst zwei Stammlösungen hergestellt, die maximal 4 Wochen getrennt voneinander bei Raumtemperatur gelagert werden. Die erste Stammlösung besteht aus 8,29g NH₄Cl und 37,2g Na₂-EDTA, die in 1l destilliertem Wasser aufgelöst werden. Die zweite Stammlösung besteht aus 0,1ml KHCO₃ gelöst in 100ml destilliertem Wasser. 100ml der ersten Stammlösung und 1ml der zweiten Stammlösung ergeben unter Zugabe von 43ml destilliertem Wasser den gebrauchsfertigen Lysierungspuffer, der innerhalb von 6 Stunden verbraucht worden ist. Die finalen Konzentrationen betragen 5,76g/l NH₄Cl, 25,8mg/l Na₂-EDTA, 0,69g/l KHCO₃.

Formalin-Lösungen

Für die 1%-ige (v/v) Formalinlösung werden 5ml Formalin in 495ml PBS gegeben.

Für die 0,5%-ige (v/v) Formalinlösung werden entsprechend 497,5ml PBS mit 2,5ml Formalin vermischt. Beide Lösungen werden im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt.

Permeabilisierungspuffer

50mg Saponin werden in 49,5ml PBS und 500µl fetalem Kälberserum gelöst. Die fertige Lösung wird zu 1000µl aliquotiert und bei -20°C gelagert.

RNAse A

20mg RNAse A werden in einem Reaktionsgefäß mit 200µl H₂O gelöst. Diese Lösung wird auf 99°C für 10 Minuten erhitzt, um möglicherweise enthaltene DNase zu inaktivieren. Nach Abkühlung werden 1800µl PBS hinzugegeben. Die Lösung wird in Aliquots à 100µl bei -20°C gelagert.

Propidiumiodid-Lösung

Eine 1%-ige (v/v) Lösung wurde durch Zugabe von 0,5ml gebrauchsfertig gelieferter PI-Lösung in 49,5ml PBS in einem 50ml Falcon Tube hergestellt. Diese Lösung wird lichtgeschützt im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt.

2.4 Methodik

2.4.1 Allgemeines zur Methodik

Die verwendeten Verfahren sind von unserer Arbeitsgruppe publiziert worden. Die IMPDH-Aktivitätsmessung in mononukleären Zellen des peripheren Bluts (PBMC) ist von Glander et al. 2010 publiziert worden (93). Der IMPDH-Assay gliedert sich in Zellisolation, Inkubation und Messung mit Hochleistungsflüssigkeitschromatografie (HPLC). Die FACS-Methodik ist von Böhler et al. 2007 publiziert worden (85) und wurde zur Messung von:

- intrazellulären Zytokinen (IL-2, TNF-α) in T-Zellen (→ 2.4.2),
- Oberflächenrezeptoren (CD25, CD71) auf T-Zellen (→ 2.4.3) und der
- lymphozytären Proliferationsrate (PCNA^{high}/PI^{high}) (→ 2.4.4) verwendet.

Diese FACS-Assays sind in Stimulation, Färbung und Messung gegliedert und werden aus Vollblut getestet (85,94,95). Das Vollblut wird mit Stimulantien versetzt und in den Brutschrank gestellt. Bei einer Inkubationszeit von 72 Stunden ist das Nährmedium RPMI1640 hinzugegeben worden. Die Verwendung von Vollblutassays bie-

tet gegenüber Verfahren mit Zellisolaten einige Vorteile: Zum Einen ist die benötigte Blutmenge um ein vielfaches kleiner als bei Zellisoliationsverfahren, zum Anderen sind die Zellen den Medikamenten weiter ausgesetzt und können nicht partiell durch Isolationsverfahren verloren gehen (82,96,97). Die bestehenden Interaktionen zwischen Zellen und Medikament bzw. anderen Zellen bleiben erhalten (82,96,97). Rostaing et al. haben gezeigt, dass eine Stimulation zur Detektion von intrazellulären Zytokinen unabdingbar ist (98).

Die Färbung bestimmter zellulärer Zielstrukturen erfolgt durch Antikörper, an denen Fluoreszenzfarbstoffe gebunden sind. Je nach Lage dieser Zielstrukturen werden die Zellen ggf. zuvor permeabilisiert.

Messung erfolgt unmittelbar im Anschluss an die Färbung. Die Messung im Durchflusszytometer wird mit der Software „Cellquest Pro“ durchgeführt. Die Probenflüssigkeit wird durch einen Luftüberdruck aufs Polystyren-Röhrchen in die Probenaufnahme des Zytometers gepresst. Von dort passieren die enthaltenen Zellen einzeln einen Argonlaserstrahl (Wellenlänge 488nm) in einem laminaren Strom eine Messkammer. Die Zellkörper und inneren Zellbestandteile reflektieren und streuen das Laserlicht. Vorwärtsgestreutes Licht repräsentiert die Zellgröße, seitwärtsgestreutes Licht zeigt die Stärke der Zellgranularität an. Das Licht beider Streuungen wird im Vorwärts- bzw. Seitwärtsdetektor registriert. Der Argonlaser regt außerdem Fluoreszenzfarbstoffe an, die an den Antikörpern konjugiert sind. Die Wellenlänge und Intensität des emittierten und absorbierten Lichts unterscheidet sich je nach verwendetem Fluoreszenzfarbstoff. Die eingesetzten Fluoreszenzfarbstoffe Propidium Iodid (PI), Fluorescein-Isothiocyanat (FITC), Phycoerythrin (PE) und Peridin-Chlorophyll-Protein (PerCP) senden Licht auf einer individuellen Wellenlänge im orange-roten (PI 617nm), grünen (FITC 521nm), orange-gelben (PE 575nm) oder roten (PerCP 670nm) Farbspektrum aus. Neben der Wellenlänge werden die Signaldauer (W) und die Änderung der Signalstärke (H) über den gemessenen Zeitraum des emittierten Lichts im Gerät registriert. Der Flächeninhalt (A) wird aus der Signaldauer und Signalstärke errechnet. Aus diesen Messgrößen (Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht, Signaldauer- und intensität des emittierten Lichts) können die Zellen anhand ihrer Größe, Granularität und angefärbten Eigenschaft typisiert werden (99).

Die Daten werden mit der Software „Cellquest Pro“ analysiert. Es gibt für jeden FACS-Assay eine eigene Messmaske, mit deren Hilfe als Nutzerschnittstelle sämtliche Proben gemessen werden. Jede Zelle nimmt entsprechend ihrer gemessenen

Größen- und Granularitätsparameter einen klar definierten Punkt eines Punktdiagramms (Dotplots) ein, sodass Lymphozyten eindeutig von anderen Leukozyten abgrenzbar sind. Die Lymphozytenpopulation wird eingegrenzt und ihren angefärbten Eigenschaften entsprechend weitergehend analysiert (→ 2.4.2.3, 2.4.3.3 und 2.4.4.3).

2.4.2 Methodik im Detail

2.4.2.1 Detektion intrazellulärer Zytokine in T-Lymphozyten

Zur Detektion intrazellulärer Zytokine IL-2 und TNF- α werden 96 μ l Lithium-Heparin-Vollblut mit jeweils 2 μ l der Ionomycin- und PMA-Arbeitslösung zur mitogenen Stimulation in ein 5ml Polypropylen-Röhrchen versetzt. Es wird auf eine zügige Arbeitgeschwindigkeit geachtet, um den zersetzenden Einfluss von Licht geringzuhalten. Die finale Konzentration beträgt 15ng PMA bzw. 750ng Ionomycin pro 1ml Blut (99). Die Kombination aus Ionomycin und PMA stimuliert die Zytokinsekretion durch Freisetzung von Calcium, verstärkt die Wirkung von IL-2 und aktiviert die Proteinkinase-C (98,100,101). Außerdem wird auch die Synthese von TNF- α angeregt und NFkB aktiviert, das die Synthese von IL-2 ebenfalls positiv stimuliert (102-104).

Nach gründlicher Durchmischung werden die Proben für 30 Minuten zur Inkubation in einen Brutschrank gestellt (bei 37°C, 5% CO₂, humid). Danach wird 1 μ l Brefeldin A enthaltende GolgiPlug-Arbeitslösung hinzugegeben und gründlich gevortext. Die finale Konzentration von Brefeldin A beträgt 1ng/ml Blut. Das Brefeldin A verhindert eine Fusion der Golgi-Vesikel mit der Zellmembran und führt so zu einer Akkumulation von Zytokinen (105,106). Die Proben werden dann unter denselben Bedingungen weitere vier Stunden inkubiert.

Im Anschluss werden 50 μ l Blut aus dem Polypropylen-Röhrchen in ein Polystyren-Röhrchen mit 2 μ l Anti-CD3-Antikörper-PerCP überführt, anschließend gevortext und für 15 Minuten bei Raumtemperatur in Dunkelheit inkubiert. Nach Zugabe von 100 μ l IntraPrep-1-Lösung (enthält 5,5% Formaldehyd) wird die Inkubation im Dunkeln für 15 Minuten fortgesetzt. Das Formaldehyd fixiert die Zelle durch Methylierung von Enzymen und hemmt dadurch die weitere Proteinbiosynthese (107). Die Probe wird mit 4ml PBS gewaschen und mit 210g bei Raumtemperatur 6 Minuten herunterzentrifugiert. Der Überstand wird bis zum Pellet abgesaugt. Das Pellet wird gründlich maschinell durchmischt und mit 100 μ l IntraPrep-2-Lösung (enthält Saponin) versetzt.

Das Saponin permeabilisiert die Zellmembran und ebnet den Weg für die intrazelluläre Färbung mit Antikörpern. Die Probe wird vorsichtig geschüttelt. Es schließt sich eine Inkubation für 5 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln an. Danach werden jeweils 2µl Anti-TNF- α -FITC- und Anti-IL-2-PE-Antikörper hinzugegeben. Die Proben inkubieren wie zuvor für weitere 15 Minuten, werden dann mit 4ml PBS gewaschen und mit 210g bei Raumtemperatur 6 Minuten herunterzentrifugiert. Der Überstand wird abgesaugt. Das Pellet wird in 500µl 0,5%-iger Formalin-Lösung resuspendiert. Die Lymphozytenpopulation wird dem PerCP-Signal entsprechend in CD3-positive und CD3-negative Lymphozyten unterschieden. Die CD3-positiven T-Zellen werden selektiert und anhand des FITC- (TNF- α) und PE-Signals (IL-2) analysiert. Die IL-2 bzw. TNF- α -positiven T-Lymphozyten werden gezählt und in Relation zu allen erfassten CD3-positiven Lymphozyten gesetzt. Der Messwert ist somit der prozentuale Anteil IL-2 bzw. TNF- α -positiver T-Lymphozyten. Es werden 3000 CD3-positive Lymphozyten gemessen.

2.4.2.2 Detektion von Oberflächenrezeptoren auf T-Lymphozyten

Die Stimulation erfolgt beim Proliferations- und Oberflächenrezeptorassay gleichermaßen: 1800µl RPMI-1640 werden in einen Well einer 24-Well Platte gegeben und mit 200µl heparinisiertem Vollblut versetzt. Zur Stimulation werden 15µl ConA in dieses Gemisch gegeben. Die finale Konzentration von ConA beträgt 7,5µg/ml. ConA ist ein Stimulanz, das zur einer Quervernetzung des CD3-Rezeptors führt und so die Proteinkinase-C aktiviert (85). Es setzt intrazelluläres Calcium frei und führt zu einer vermehrten IL-2-Synthese und CD25-Expression (34). Die T-Zell-Aktivierung wird somit nachgeahmt. Die 24-Well Platte wird für 72 Stunden bei 37°C, 5% CO₂, in humidem Klima inkubiert.

Zur Detektion der Oberflächenaktivierungsmarker CD25 und CD71 werden 100µl einer Antikörper-Arbeitslösung bestehend aus 100µl 3%-igem FCS in PBS und jeweils 2µl Anti-CD3-Antikörper-PerCP, Anti-CD25-Antikörper-FITC und Anti-CD71-Antikörper-PE in ein 15ml Falcon Tube gegeben. Nach gründlicher Durchmischung der inkubierten Zellen im Well werden 400µl des Blut-RPMI-Gemisches in das Falcon Tube hinzugegeben. Nach 30-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur in Dunkelheit, werden Erythrozyten durch Zugabe von 10ml Lysierungspuffer für 5-10 Minuten lysiert. Nachdem die Lösung aufgeklart ist, wird sie bei 477g und Raumtemperatur für 8 Minuten herunterzentrifugiert. Der Überstand wird abgesaugt. Die Proben werden mit 4ml PBS gewaschen und bei Raumtemperatur 6 Minuten mit 477g zentrifugiert.

giert. Nach erneutem Absaugen werden die Proben in 500µl 1%-igem Formalin resuspendiert. Die Probenflüssigkeit wird gevortext und zur Messung in 5ml Polystyren-Röhrchen überführt.

Anhand des FSC und SSC werden die Lymphozyten eingegrenzt und in CD3-positive und -negative unterschieden. Durch Detektion der Fluorochromsignale von FITC und von PE werden die CD25- bzw. CD71-positiven Lymphozyten gezählt. Die Anzahl wird ins Verhältnis zu allen CD3-positiven Lymphozyten gesetzt, sodass der Messwert den Anteil CD25- bzw. CD71-positiver T-Lymphozyten wiedergibt. Nach 5000 erfassten Lymphozyten endet die Messung.

2.4.2.3 Messung der lymphozytären Proliferationsrate

Die Stimulation wird, wie bei den Oberflächenantigenen beschrieben, durchgeführt und für die Färbung wird dasselbe Blut-RPMI-Gemisch verwendet.

800µl werden aus der 24-Well Platte in ein 15ml Falcon Tube überführt. Durch Zugabe von 10ml Lysierungspuffer für 5-10 Minuten werden die Erythrozyten lysiert. Nachdem die Röhrchen wieder aufgeklart sind, werden sie bei 477g und Raumtemperatur für 8 Minuten herunterzentrifugiert. Nach Waschen mit 4ml PBS und erneuter Zentrifugation (477g, Raumtemperatur, 6 Minuten) werden die Zellen mit 1000µl 1%-igem Formalin in PBS für 5 Minuten auf Eis fixiert, mit 2ml PBS gewaschen und bei 477g in Raumtemperatur für 6 Minuten zentrifugiert. Anschließend wird die Probe mit 2000µl Methanol für 10 Minuten auf Eis gestellt. In der Zwischenzeit wird eine Arbeitslösung bestehend aus 107µl Perm Buffer, 10µl RNase, 5µl Propidium Iodid und 2,5µl Anti-PCNA-Antikörper-FITC hergestellt. Das Propidium Iodid interkaliert mit der DNA. Nach erneutem Waschen der Proben mit 4ml PBS werden 125µl dieser Lösung hinzugefügt. Die Proben werden lichtgeschützt für 30 Minuten ins 37°C warme Wasserbad gestellt. Nach Zugabe von 4ml PBS und erneuter Waschung werden die Proben mit 500µl 1%-iger Propidium Iodid Lösung in PBS resuspendiert. Die Proben werden bis zur Messung im Dunkeln gelagert.

Aufgrund der Granularität und Zellgröße werden die Lymphozyten eingegrenzt. Da die Lymphozyten auch zusammengeballt den Argonlaser passieren können, wird die Signaldauer und Signalstärke des PI-Signals detektiert, um einzelne von zusammengeballten Zellen zu unterscheiden. Das Propidium Iodid reichert sich intrazellulär entsprechend des Zell-DNA-Gehaltes an. Einzelne Zellen zeigen im Gegensatz zu zusammengeballten Zellen ein relativ konstantes Verhältnis zwischen Signalstärke und Signaldauer. Zellen, die dieses Verhältnis einhalten, werden als einzelne Zellen an-

gesehen und für die Messung eingegrenzt. Als proliferierend werden alle Zellen gewertet, die nicht in der G₀-Phase sind. Die Einordnung in die Proliferationsphase der Mitose erfolgt aufgrund der PCNA-Expression. Als proliferierende Lymphozyten werden somit alle Zellen angesehen, die sowohl einzeln den Argonlaser (PI^{high}) passiert haben, als auch eine hohe PCNA-Expression (PCNA^{high}) gezeigt haben (42,79,108-110). Die Probe eines gesunden Blutspenders wird als erstes gemessen, um das Nicht-Doubletten-Fenster richtig abzugrenzen. Nach 3000 Nicht-Doubletten endet die Messung.

2.4.2.4 IMPDH-Aktivitätsbestimmung

Der IMPDH-Assay ist von der Arbeitsgruppe Glander entwickelt, validiert und optimiert worden (93). Die IMPDH-Aktivität in peripheren mononukleären Zellen (PBMC) wird aus Lithium-Heparin-Blut bestimmt. Dazu werden 2,5ml Blut mit 2,5ml PBS in ein Ficoll-Paque-Röhrchen gegeben und mit 1200g bei Raumtemperatur für 20 Minuten herunterzentrifugiert. Die PBMC sind aus dem Röhrchen entfernt und mit 5ml PBS gewaschen worden (10 Minuten, 1200g, 4°C). Das Pellet ist mit 250µl kaltem (4°C) Wasser in HPLC-Reinheitsqualität lysiert und bei -80°C eingefroren worden.

Für die Inkubation wird das Lysat aufgetaut und von den unlöslichen Zellresten durch Zentrifugation bei 1000g für 2 Minuten befreit. 50µl Lysat sind mit 130µl eines Inkubationspuffers (1mmol/l Inosinmonophosphat, 0,5mmol/l Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid, 40mmol/l Natriumdihydrogenphosphat und 100mmol/l Kaliumchlorid, pH 7,4) in einem 1,5ml Microtube für 150 Minuten auf einem Thermomixer mit 800rpm bei 37°C inkubiert worden. Während der Inkubationszeit wird der Puffer von der IMPDH umgesetzt. Diese Reaktion ist durch Zugabe von 20µl Perchlorsäure (4mol/l), Schütteln und Eiskühlung beendet worden. Die ausgefallenen Proteine sind durch Zentrifugation (5 Minuten, maximale Umdrehungszahl) entfernt worden. 170µl des Überstands sind mit 10µl Kaliumcarbonat (5mmol/l) vermischt worden. Die Probe ist für mindestens 30 Minuten bei -80°C eingefroren worden. Nach Auftauen und Zentrifugation ist der Überstand in HPLC-Probenröhrchen überführt worden.

Die HPLC-Analyse ist mit einem Shimadzu LC-2010-Gerät mit einem integrierten UV-VIS-Detektor (Wellenlänge 256nm) durchgeführt worden. Die Hochleistungsflüssigkeitschromatografie dient zur Trennung und Mengenbestimmung in Flüssigkeiten befindlicher Substanzen. Dabei durchläuft ein Elutionsmittel mit der Probenflüssigkeit zusammen eine Trennsäule, die die stationäre Phase enthält. Je nach Polarität der mobilen (Elutionsmittel) bzw. stationären (in der Trennsäule befindlichen) Phase ist

diese HPLC eine Normal oder Umkehr-HPLC. Die verwendete lipophile Trennsäule ist eine ProntoSIL-AQ-C18 (Partikelgröße 3µm, 3mm innerer Durchmesser x 150mm) gewesen. Die Daten sind mit der Software „Class VP“ erhoben worden. Je nach Wechselwirkung zwischen der Probe und der stationären Phase verbleiben zu untersuchende Probenbestandteile eine unterschiedliche Zeit in der Elutionsflüssigkeit. Bei isokratischen Trennungen bleibt das Elutionsmittel während der gesamten Dauer in derselben Konzentration. Das verwendete polare Elutionsmittel besteht aus einer Lösung mit 6 Teilen Methanol und 94 Teilen eines Puffers, der 50mmol/l Kaliumhydrogenphosphat und 7mmol/l Tetra-N-Butylammoniumhydrogensulfat (pH 5,5), einer Ionenpaarreagenz. Zur Analyse sind 5µl der Probe in die Trennsäule injiziert worden. Die Temperatur der Trennsäule beträgt 40°C. Die Durchlaufzeit beträgt bei einer Flussrate von 1ml/min 25 Minuten (isokratisch). Es werden die Konzentrationen von Xanthosinmonophosphat und AMP bestimmt. Die AMP-Bestimmung dient der Normalisierung auf den Zellgehalt der Probe.

2.5 Datenauswertung

Die Proben müssen möglichst um den vorgesehenen Messtermin eingegangen sein. Die Daten wurden verwendet, sofern sie weniger als zwei Tage von den Messpunkten vor Tag 30 bzw. weniger als acht Tage von den späteren Messzeitpunkten abgewichen sind. Wenn beide Studiengruppen an einem Messzeitpunkt jeweils weniger als zehn Patienten enthielten, wurde dieser nicht aufgeführt.

2.5.1 pharmakodynamische Daten

Die Biomarker-Expression, die IMPDH-Aktivität und die relative Hemmung sind nach folgenden Formeln berechnet worden:

$$\%Expression = (\text{Anzahl aller positiv detektierten Ereignisse} : \text{Anzahl aller Ereignisse}) * 100$$

$$\text{IMPDH-Aktivität} = (\text{Konzentration XMP} * 10^6) : (\text{Inkubationszeit} * \text{Konzentration AMP})$$

$$\text{Relative Hemmung} = (\text{Median Biomarker} : \text{Median Biomarker vor Transplantation}) * 100$$

Die erhobenen FACS- und IMPDH-Daten werden nach Überprüfung auf technische Fehlmessungen im Datenbankprogramm MS Access gesammelt. Diese Datenbank wird mit der Transplantationsdatenbank „T-Base“ verknüpft.

2.5.2 Klinische Daten

Laborwerte und Transplantationsdaten werden zu jeder Visite in der Datenbank der Charité für Transplantationspatienten („T-Base“) erfasst. Unterschiedliche Schreib-

weisen der Laborparameterbezeichnungen und Werteinheiten werden vereinheitlicht und in eine Labordatenbank überführt. Diese Datenbank wird mit den pharmakodynamischen Daten anhand der Patientenummer und des Messdatums verknüpft. Die erfassten Nebenwirkungen werden aus den Studienordnern in die Datenbank übertragen. Rejektionen und Infektionen wurden für diese Dissertation nicht ausgewertet.

2.5.3 Statistische Auswertung

Die Daten werden mit der Statistik-Software SPSS, Version 16 bzw. PASW, Version 18 statistisch analysiert. Je nach Skalenniveau der Daten werden unterschiedliche statistische Tests zur Überprüfung der Signifikanz angewendet: Nominalskalierte Daten werden mithilfe des Chi²-Tests, nicht normalverteilte metrische Daten innerhalb einer Gruppe zu unterschiedlichen Messzeitpunkten durch den Wilcoxon-Test, Daten zwischen den Studiengruppen zu einem Messzeitpunkt durch den Mann-Whitney-U-Test auf Signifikanz überprüft. Ein Signifikanzniveau kleiner 5% muss erreicht werden, um als statistisch signifikant angesehen zu werden. Alle Korrelationen werden durch den Spearman-Rho-Rangkorrelationskoeffizienten ermittelt.

Der zeitliche Verlauf laborchemischer Parameter ist als Boxplot gruppiert nach Studiengruppen im gesamten Studienzeitraum dargestellt worden. Wenn beide Studiengruppen an einem Messzeitpunkt weniger als zehn Patienten enthielten, wurde dieser nicht aufgeführt.

Alle Nebenwirkungen und Vorerkrankungen werden auf ihre Häufigkeit untersucht. Die Nebenwirkungen, von denen ein Zusammenhang mit den gemessenen Biomarkern von uns vermutet wird, werden auf ihre zeitliche Verteilung seit dem Transplantationszeitpunkt untersucht. Dazu wird die Zeit zwischen der Transplantation und dem ersten Auftreten der entsprechenden Nebenwirkung bestimmt und eine Hazard-Kurve erstellt. Sofern ein zeitlich gehäuftes Auftreten vorliegt, wird der letzte Messzeitpunkt der Biomarker-Expression vor dieser zeitlichen Häufung zur getrennten Analyse verwendet. Patienten, die zu diesem Zeitpunkt die zu untersuchende Nebenwirkung zeigten, werden aus der Analyse ausgeschlossen. Somit wird die Biomarker-Expression zwischen Patienten mit und Patienten ohne Nebenwirkung am Messzeitpunkt vor dem Eintreten dieser Nebenwirkung verglichen.

3 Ergebnisse

3.1 Demographie

Es wurden 86 Patienten an den Standorten Campus Mitte (CCM, N=50) und Campus Virchow-Klinikum (CVK, N=36) der Charité-Universitätsmedizin Berlin in die Studie eingeschlossen. Abbildung 4 zeigt die Fallzahlen im Studienzeitraum. Bis zum Studienende hatten 13 Patienten (4 CCM, 9 CVK) ihr Einverständnis widerrufen. Die Daten dieser Patienten wurden in der vorliegenden Studie nicht berücksichtigt. 15 Patienten sind aus der Studie ausgeschlossen worden: Umstellung der Immunsuppression (N=9), Proteinurie bei Randomisierung (N=2) bzw. verspätete Randomisierung (N=3) und Transplantatverlust (N=1). Sofern die Patienten vor der Randomisation ausgeschlossen worden sind, wurden sie im Arm „Nicht-Randomisierte“ erfasst, alle anderen wurden bis zum Ausscheiden in ihrem jeweiligen Randomisationsarm geführt. Somit gab es drei Gruppen: Cyclosporin (CyA, N=33), Everolimus (Evl, N=30) und „Nicht-Randomisierte“ (N=10).

Die demografischen Daten der Transplantatspender bzw. –empfänger sind Tabelle 1 bzw. 2 zu entnehmen. Tabelle 3 zeigt die Anzahl der HLA-Unterschiede in den Studiengruppen, im Mittelwert betragen diese 2,8 („Nicht-Randomisierte“), 2,97 (CyA) und 2,7 (Evl). Die Gruppe der „Nicht-Randomisierte“ ist im Folgenden mangels erhobener Daten nicht weiter aufgeführt.

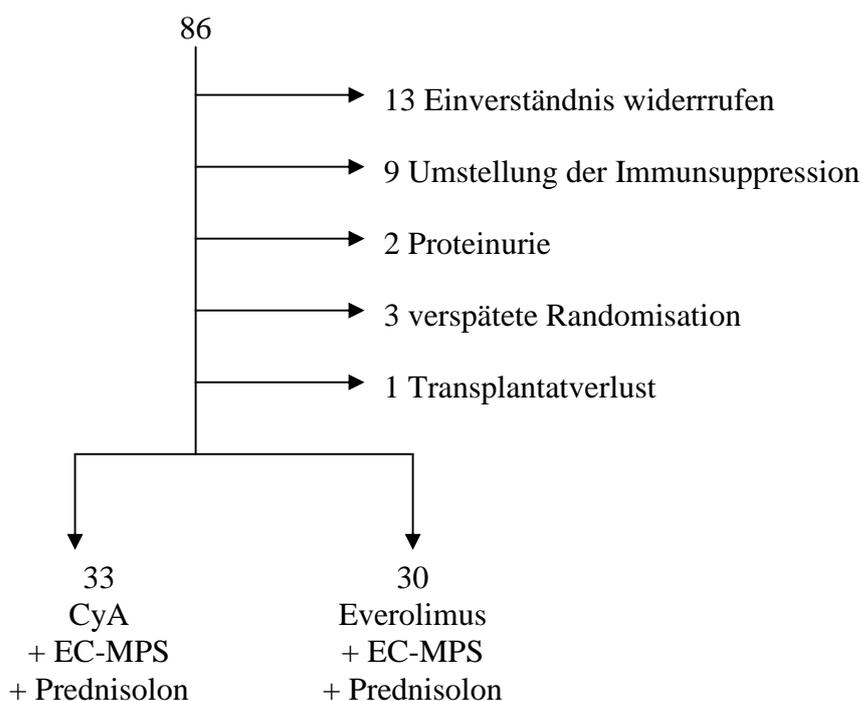


Abb. 4: Fließdiagramm der Studienpopulation

Tab. 1: Demografische Daten der Transplantatspender

	„Nicht-Randomisierte“	Cyclosporin	Everolimus	Gesamt
Anzahl	10 (13,7%)	33 (45,2%)	30 (41,1%)	73 (100%)
männliche Spender	5 (50%)	19 (57,6%)	14 (46,7%)	38 (52,1%)
Spenderalter (Jahre)	45,3 ± 15,3	48,2± 11,1	45,9 ± 12	46,9 ± 12
Todesursache				
Zerebrale Ischämie	-	6 (18,2%)	5 (16,7%)	11 (15,1%)
Intrazerebrale Blutung	4 (40%)	3 (9,1%)	5 (16,7%)	12 (16,4%)
Intrakranielle Blutung	-	2 (6,1%)	-	2 (2,7%)
Schädel-Hirn-Trauma	1 (10%)	5 (15,2%)	4 (13,3%)	10 (13,7%)
Subarachnoidalblutung	2 (20%)	6 (18,2%)	5 (16,7%)	13 (17,8%)
Andere	-	-	2 (6,7%)	2 (2,7%)
Lebendspende	3 (30%)	11 (33,3%)	9 (30%)	23 (31,5%)
davon nicht verwandt	1 (10%)	2 (6,1%)	2 (6,7%)	5 (6,9%)

Alle metrischen Daten als Mittelwert ± Standardabweichung.

Tab. 2: Demografische Daten der Transplantierten bei Studieneinschluss

	„Nicht-Randomisierte“	Cyclosporin	Everolimus	Gesamt
Anzahl	10 (13,7%)	33 (45,2%)	30 (41,1%)	73 (100%)
davon Campus Mitte	3 (30%)	23 (69,7%)	20 (66,7%)	46 (63%)
männliche Empfänger	4 (40%)	17 (51,5%)	19 (63,3%)	40 (54,8%)
Zweittransplantation	1 (10%)	2 (6,1%)	1 (3,3%)	4 (5,5%)
Alter (Jahre)	46,3 ± 9	46 ± 11	46,1 ± 11,3	46 ± 10,7
Transplantatdaten				
vorhandene Primärfunktion	5 (50%)	25 (75,8%)	22 (75,9%)	52 (71,2%)
kalte Ischämiezeit (h)	10,5 ± 5,7	9,2 ± 6	10 ± 6,5	9,7 ± 6,1
Gem. Ischämiezeit (min)	42,8 ± 20	46 ± 18,2	47,7 ± 17,8	46,2 ± 18,1
warme Ischämiezeit (min)	4,7 ± 11,5	3,3 ± 13,2	0,44 ± 0,8	2,3 ± 9,6
Dialyседaten				
Hämodialyse	9 (90%)	29 (87,9%)	23 (76,7%)	61 (83,6%)
Ambulante Peritonealdialyse	1 (10%)	1 (3%)	4 (13,3%)	6 (8,2%)
Keine Dialyse	-	3 (9,1%)	3 (10%)	5 (8,2%)
Dialyседauer (Jahre)	6,1 ± 5,2	5,2 ± 3,1	3,7 ± 2,9	4,7 ± 3,4
Grunderkrankung				
Glomerulonephritis	4 (40%)	15 (45,5%)	11 (36,7%)	30 (41,1%)
Diabetische Nephropathie	1 (10%)	2 (6,1%)	-	3 (4,1%)
Zystenniere	2 (20%)	7 (21,2%)	3 (10%)	12 (16,4%)
vaskuläre Nephropathie	-	2 (6,1%)	2 (6,7%)	4 (5,5%)
Unbekannt	-	3 (9,1%)	1 (3,3%)	4 (5,5%)
Systemerkrankungen	-	1 (3%)	4 (13,3%)	5 (6,8%)
Interstitielle Nephritis	-	-	1 (3,3%)	1 (1,4%)
Urol. Erkrankungen	1 (10%)	2 (6,1%)	8 (26,7%)	11 (15,1%)
Andere	2 (20%)	1 (3%)	-	3 (4,1%)

Alle metrischen Daten als Mittelwert ± Standardabweichung.

Tab. 3: HLA-Mismatches in den Studiengruppen

	„Nicht-Randomisiert“	Cyclosporin	Everolimus	Gesamt
Keine	1 (10%)	3 (9,1%)	6 (20%)	10 (13,7 %)
1	1 (10%)	-	1 (3,3%)	2 (2,7%)
2	2 (20%)	10 (30,3%)	3 (10%)	15 (20,5%)
3	2 (20%)	9 (27,3%)	11 (36,7%)	22 (30,1%)
4	3 (20%)	7 (21,2%)	4 (13,4%)	14 (19,2%)
5	1 (10%)	1 (3%)	5 (16,7%)	7 (9,6%)
6	-	3 (9,1%)	-	3 (4,1%)

3.2 Pharmakokinetische Parameter

3.2.1 PK-Dosierungen und Blutkonzentrationen

Die durchschnittlichen Talspiegelkonzentrationen und jeweilige durchschnittliche Vortagesdosis der Immunsuppressiva im Studienzeitraum sind in Tabelle 4 aufgeführt. Die immunsuppressive Komedikation zeigt keinen signifikanten Unterschied zwischen den Studienarmen zum jeweiligen Messzeitpunkt.

Tab. 4: pharmakokinetische Daten beider Studiengruppen im Studienzeitraum

		Tage nach Transplantation						
		4	11	30	90	135	180	225
CyA								
CyA	T	159±50	229±80	183±61	143±40	137±54	117±38	113±22
	N	29	19	24	24	28	24	25
	D	519±146	475±112	333±79	259±78	238±65	227±65	214±54
	N	30	30	29	29	31	30	30
EC-MPS	D	1440±0	1428±66	1428±67	1378±194	1324±269	1278±322	1206±370
	N	30	30	29	29	31	30	30
Pred	D	75±40	53±62	17±7	7±3	5±3	4±0	4±1
	N	30	30	29	29	31	30	30
Evl								
CyA	T	175±62	257±69	178±75	132±33	148±78	-	-
	N	25	21	22	24	23	0	0
	D	536±174	483±137	337±94	266±52	243±57	-	-
	N	27	29	29	27	27	0	0
Evl	T	-	-	-	-	-	7±5	6±2
	N	-	-	-	-	-	24	20
	D	-	-	-	-	-	2,9±1,2	2,7±1,2
	N	0	0	0	0	0	27	27
EC-MPS*	D	1440±0	1403±147	1366±295	1293±287	1253±378	1213±333	1160±336
	N	28	29	29	27	27	27	27
Pred	D	85±33	36±9	36±90	7±3	5±2	4±0	4±0
	N	28	29	29	27	27	27	27

CyA: Cyclosporin A, Evl: Everolimus, Pred: Methylprednisolon, EC-MPS: enteric coated Mycophenolat-Natrium, T: Talspiegelkonzentration im Blut in ng/ml, D: Dosis in mg/d, N: Fallzahl, Mittelwert ± Standardabweichung

* Die Datenmenge der Talspiegelkonzentrationen zu den einzelnen Zeitpunkten ist ungenügend und daher nicht aufgeführt. **Dezimalstelle**

3.2.2 PK-Korrelationen

Die Abbildung 5 zeigt den Zusammenhang zwischen der CyA-Talspiegelkonzentration aller Patienten zum Zeitpunkt der Einnahme und die entsprechenden Vortagesdosierungen. Die CyA-Vortagesdosis zeigt einen signifikanten, schwachen Zusammenhang mit der Talspiegelkonzentration (Spearman $r^2=0,294$, $p<0,001$, $N=390$). Zwischen der Everolimus-Dosis am Vortag und dessen Talspiegel besteht wie in Abbildung 6 dargestellt kein signifikanter Zusammenhang (Spearman, $r^2=0,001$, $p=0,174$, $N=76$). Die Korrelation zwischen Mycophenolat-Dosis und der Talspiegelkonzentration ist wie in Abbildung 7 aufgetragen signifikant und nicht ausgeprägt (Spearman, $r^2=0,052$, $p=0,003$, $N=67$).

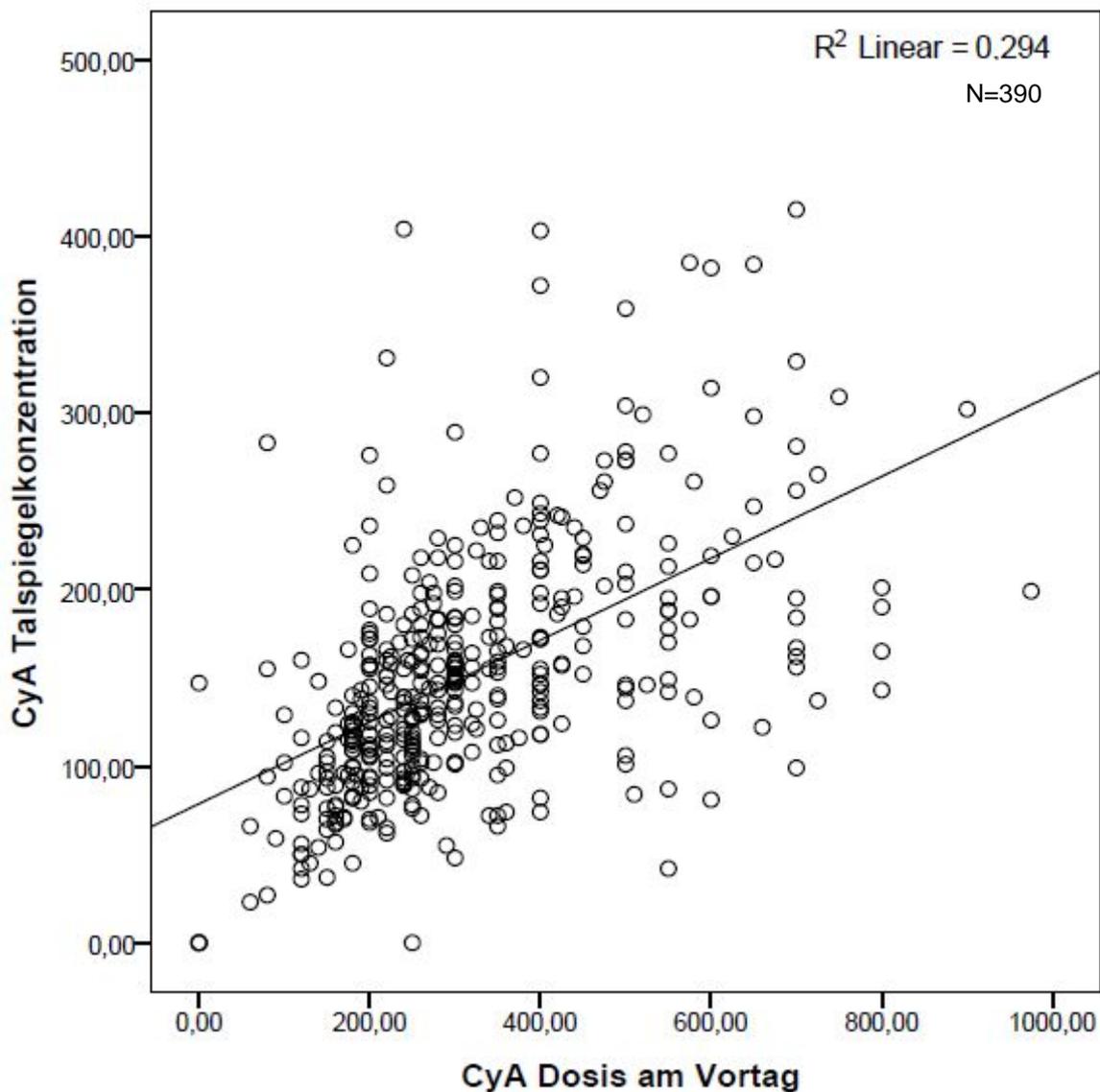


Abb. 5: CyA-Vortagesdosis in mg und -Talspiegelkonzentration in ng/ml

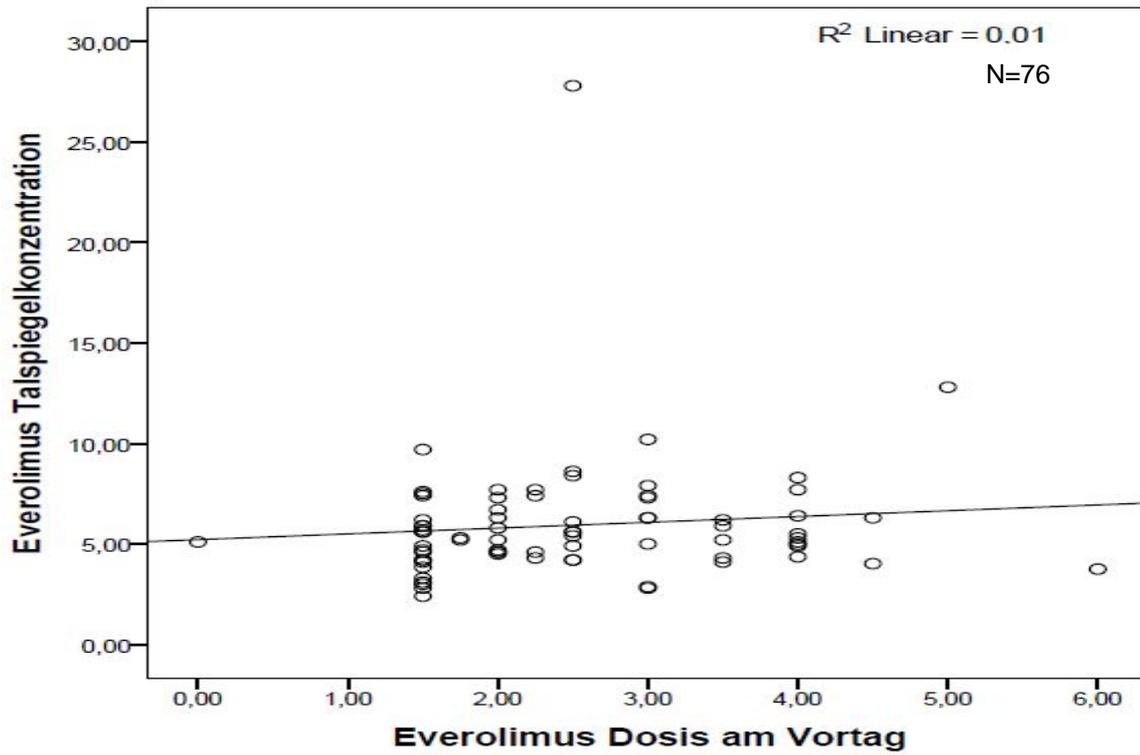


Abb. 6: Evi-Vortagesdosis in mg und -Talspiegelkonzentration in ng/ml

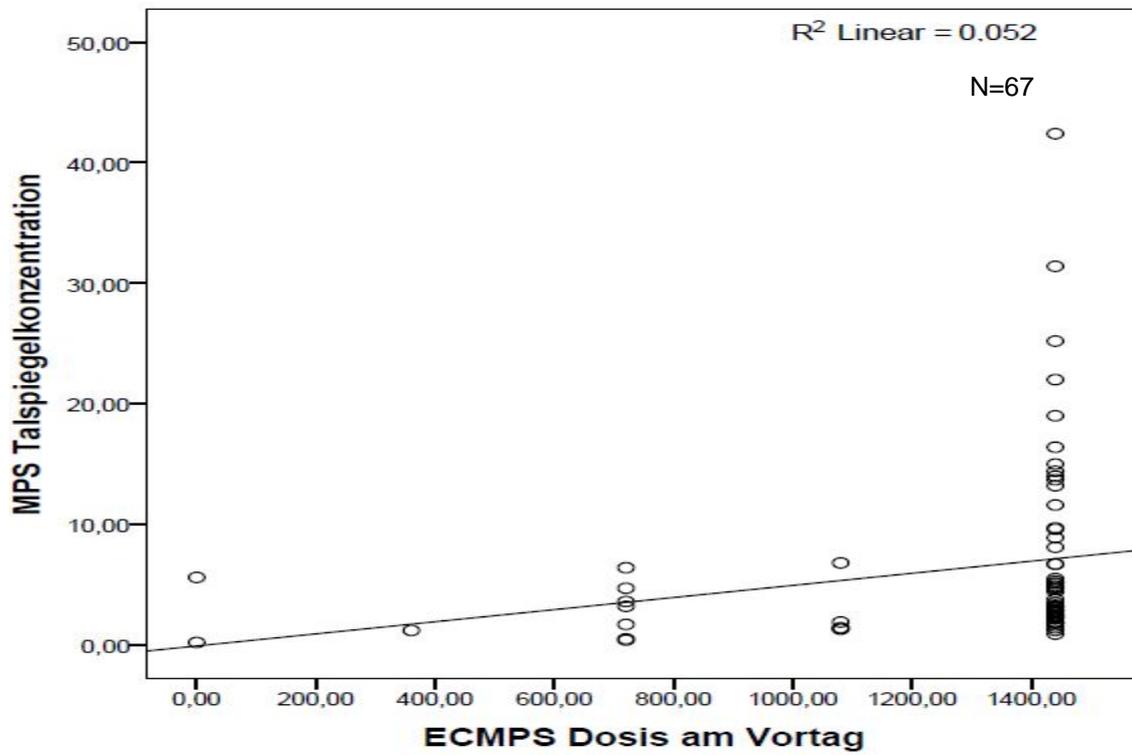


Abb. 7: EC-MPS-Vortagesdosis in mg und MPA-Talspiegelkonzentration in ng/ml

3.3 Pharmakodynamische Parameter

3.3.1 IMPDH-Aktivität

In Abbildung 8 ist der zeitliche Verlauf der IMPDH-Aktivität dargestellt. Die IMPDH-Aktivität fällt von $92,2 \mu\text{mol s}^{-1} \text{mol AMP}^{-1}$ auf $47,1 \mu\text{mol s}^{-1} \text{mol AMP}^{-1}$ (50% des Ausgangswerts) an Tag 11 signifikant ab ($p=0,002$) und bleibt bis zur Randomisation in diesem Aktivitätslevel. Vor Randomisation besteht kein signifikanter Unterschied der IMPDH-Aktivität zwischen den späteren Gruppen.

Nach der Randomisation liegt die IMPDH-Aktivität in der Everolimus-Gruppe tendenziell unter der CyA-Gruppe. Dieser Unterschied ist an Tag 225 signifikant ($25,3 \mu\text{mol s}^{-1} \text{mol AMP}^{-1}$ vs. $53,9 \mu\text{mol s}^{-1} \text{mol AMP}^{-1}$, $p=0,014$).

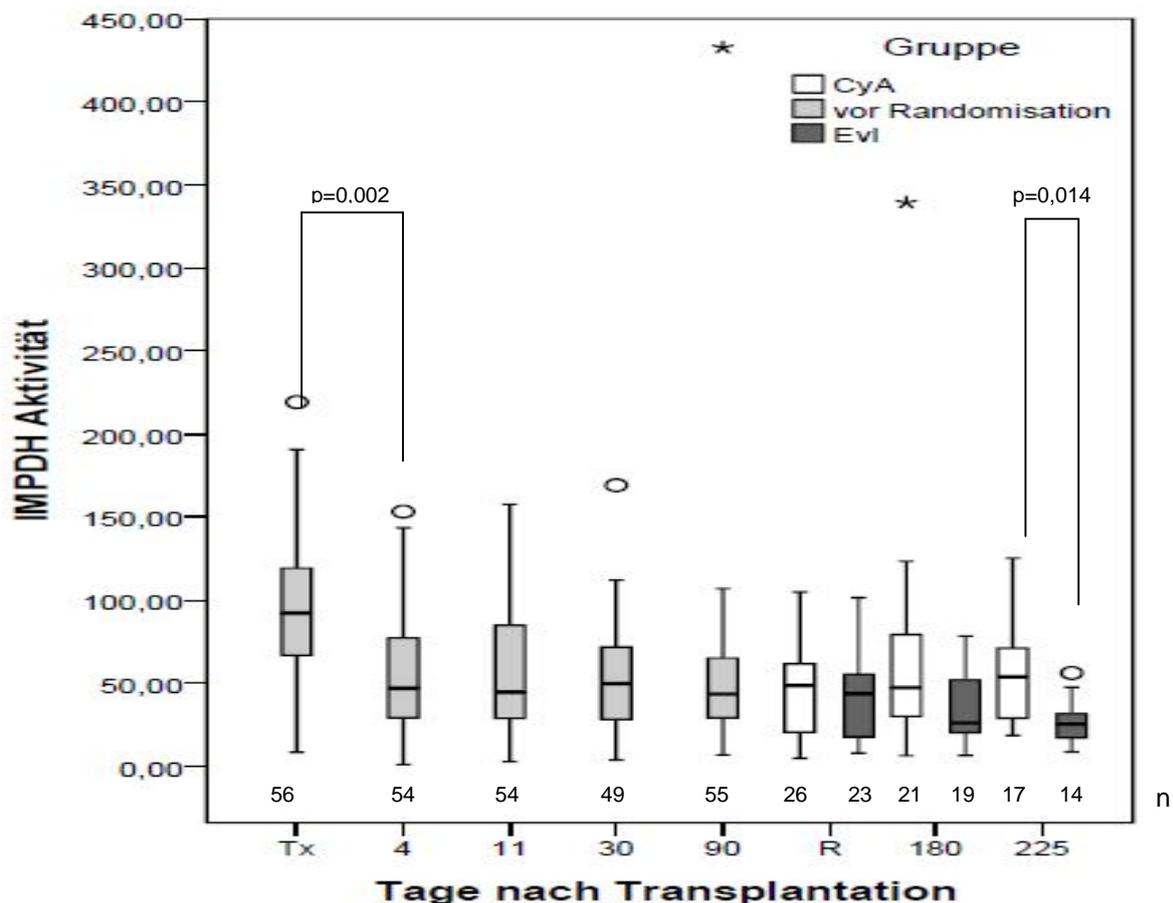


Abb. 8: IMPDH-Aktivität in $\mu\text{mol s}^{-1} \text{mol AMP}^{-1}$ im Studienzeitraum.

Alle Patienten (hellgrau) vom Transplantationstag (TX) bis zur Randomisation (R), danach Cyclosporin-Gruppe (weiß), Everolimus-Gruppe (dunkelgrau), *: $p < 0,001$, n=Fallzahl

3.3.2 Expression intrazellulärer Zytokine in T-Lymphozyten

Die Expression von Interleukin-2 (IL-2) in T-Zellen ist in Abbildung 9 als prozentualer Anteil IL-2 exprimierender T-Lymphozyten im Studienzeitraum wiedergegeben. Die IL-2-Expression nimmt von 33,9% bis zum darauffolgenden Untersuchungstag 4 nach Transplantation signifikant um 42% auf 19,5% ab ($p=0,001$) und erreicht mit 11,6% (34,2% des Ausgangswerts) das relative Minimum an Tag 11. Danach steigt die IL-2-Expression bis zur Randomisation auf 19,8% (58,4% des Ausgangswerts). Dieser Anstieg zum Tag 135 ist signifikant ($p=0,046$). Vor Randomisation besteht kein signifikanter Unterschied bzgl. der IL-2-Expression zwischen den Gruppen.

Nach der Randomisation steigt die IL-2-Expression in der CyA- bzw. Evi-Gruppe auf 22,2% bzw. 29,6% (65,5% bzw. 87,3% des Ausgangswerts) an Tag 225 an ohne das Signifikanzniveau zu erreichen ($p=0,24$).

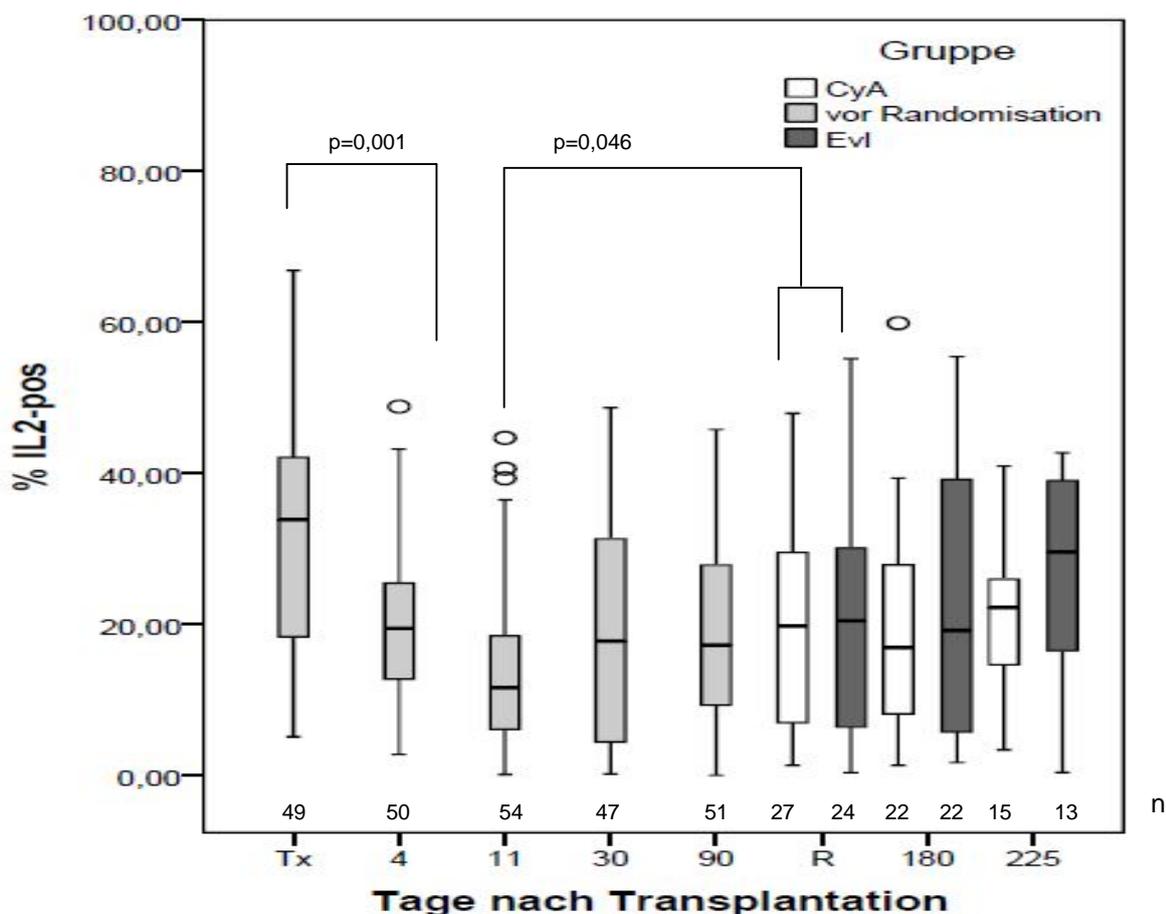


Abb. 9: prozentualer Anteil IL-2-positiver T-Zellen im Studienzeitraum.

Alle Patienten (hellgrau) vom Transplantationstag (TX) bis zur Randomisation (R), danach Cyclosporin-Gruppe (weiß), Everolimus-Gruppe (dunkelgrau), n=Fallzahl

Die Expression von Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α) in T-Zellen ist in Abbildung 10 als prozentualer Anteil TNF- α exprimierender T-Lymphozyten im Studienzeitraum wiedergegeben. Die TNF- α -Expression nimmt signifikant ($p=0,002$) von einem Ausgangswert von 21,2% um 28% auf 15,4% an Tag 4 ab und erreicht an Tag 11 mit 7,5% (35% des Ausgangswertes) das relative Minimum. Bis zum Randomisationstag steigt sie auf 10,6% (50% des Ausgangswertes). Dieser Anstieg zum Tag 90 bzw. 135 ist signifikant ($p=0,0025$ bzw. $p=0,0011$). Vor Randomisation besteht kein signifikanter Expressionsunterschied zwischen den Gruppen.

Nach der Randomisation steigt die TNF- α -Expression bis Tag 225 auf 14,3% (67,5% des Ausgangswertes) in der Evl- und 16,2% (76,4% des Ausgangswertes) in der CyA-Gruppe. Dieser Unterschied zwischen den Gruppen ist nicht signifikant ($p=0,4$).

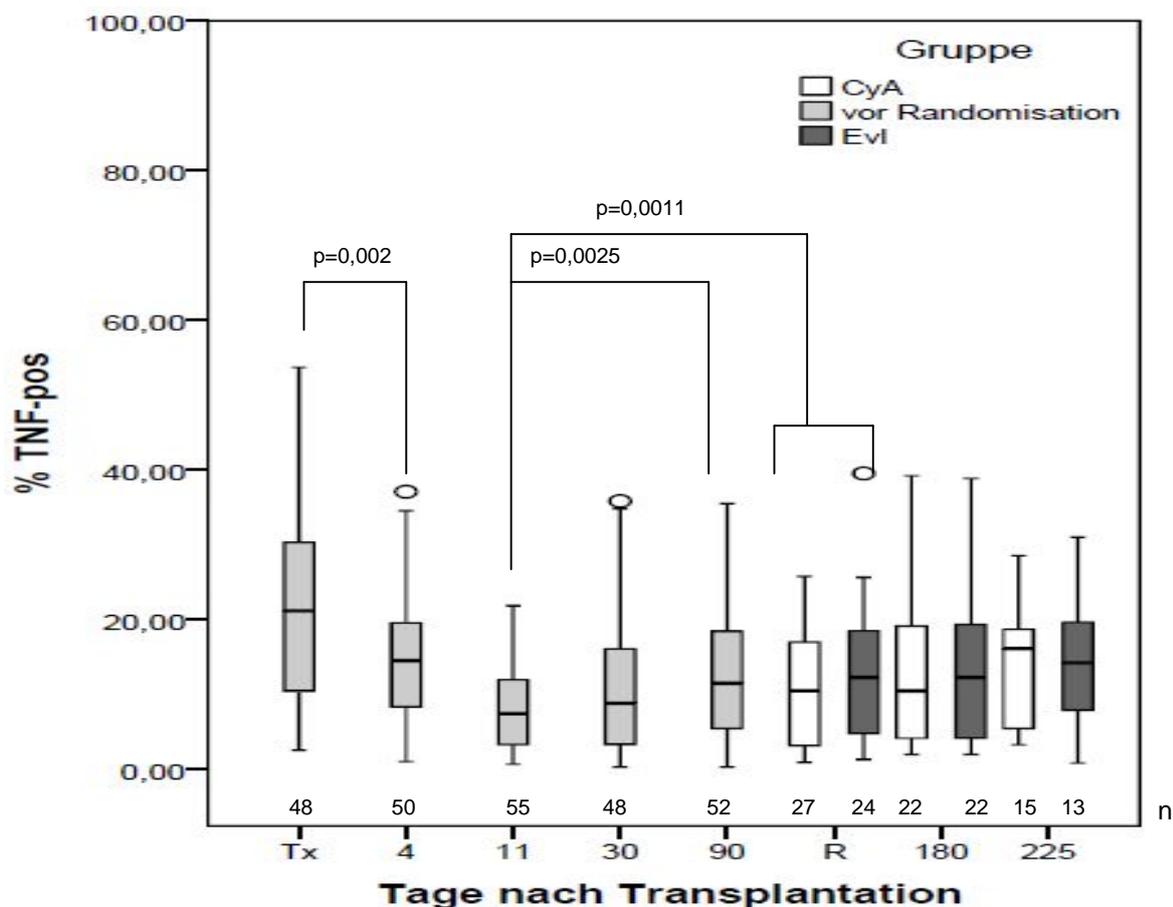


Abb. 10: prozentualer Anteil TNF- α -positiver T-Zellen im Studienzeitraum

Alle Patienten (hellgrau) vom Transplantationstag (TX) bis zur Randomisation (R), danach Cyclosporin-Gruppe (weiß), Everolimus-Gruppe (dunkelgrau), n=Fallzahl

3.3.3 Expression von Oberflächenaktivierungsmarkern auf T-Zellen

Die CD25-Expression auf T-Zellen ist als prozentualer Anteil CD25 exprimierender T-Lymphozyten im Studienzeitraum in Abbildung 11 dargestellt. Nach signifikanter Reduktion der CD25-Expression um 94% von 45,7% auf 2,7% bis Tag 11 ($p < 0,001$) steigt diese bis zur Randomisation auf 21,3% (46,6% des Ausgangswertes) an. Dieser Anstieg zum Tag 90 bzw. 135 ist signifikant (jeweils $p < 0,001$). Es gibt keine signifikanten Unterschiede zwischen den späteren Gruppen vor Randomisation.

Nach der Randomisation steigt die CD25-Expression auf 29,2% (63,9% des Ausgangswertes) in der CyA- und 23,3% (51% des Ausgangswertes) in der Evl-Gruppe an Tag 225. Der Unterschied zwischen den Gruppen ist nach der Randomisation nicht signifikant ($p = 0,266$).

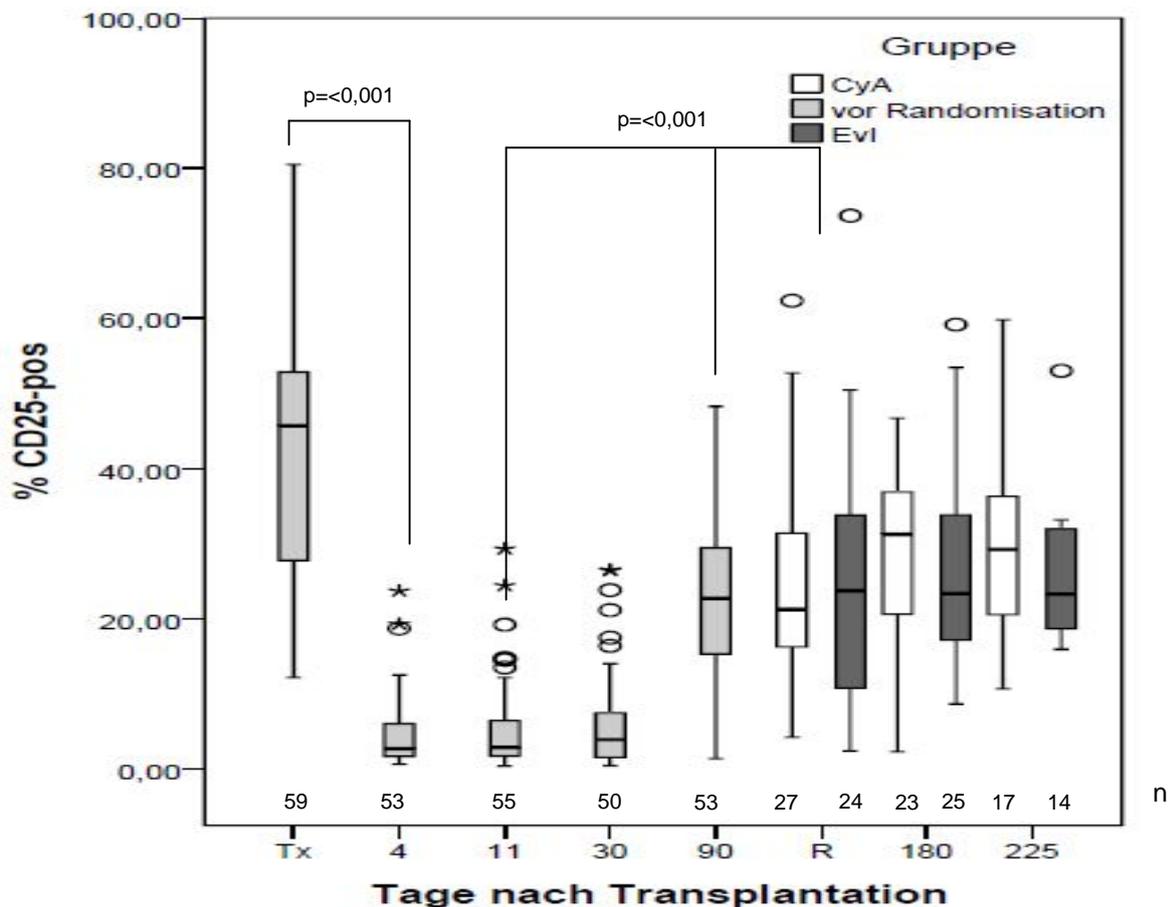


Abb. 11: prozentualer Anteil CD25-positiver T-Zellen im Studienzeitraum.

Alle Patienten (hellgrau) vom Transplantationstag (TX) bis zur Randomisation (R), danach Cyclosporin-Gruppe (weiß), Everolimus-Gruppe (dunkelgrau), n=Fallzahl

Die CD71-Expression auf T-Zellen ist als prozentualer Anteil CD71 exprimierender T-Lymphozyten im Studienzeitraum in Abbildung 12 dargestellt. Die CD71-Expression fällt signifikant ($p < 0,001$) um 79% von 25,3% vor Transplantation auf 5,4% bis zum Tag 11 nach Transplantation und steigt bis zum Randomisationszeitpunkt auf 12,2% (48% des Ausgangswerts). Der Anstieg von Tag 11 zu Tag 90 bzw. 135 ist signifikant (jeweils $p < 0,001$). Vor der Randomisation bestehen keine signifikanten Expressionsunterschiede zwischen den späteren Gruppen.

Nach der Randomisation steigt die CD71-Expression in der CyA-Gruppe auf 18,2% bzw. 21,3% (72 bzw. 84% des Ausgangswertes) Tag 180 bzw. 225 an. Die Evl-Gruppe zeigt eine CD71-Expression von 10,6% bzw. 11,8% (41,9% bzw. 46,6% des Ausgangswertes) an diesen Tagen. Diese Unterschiede zwischen den Gruppen an Tag 180 bzw. 225 sind signifikant ($p = 0,041$ bzw. $p = 0,026$).

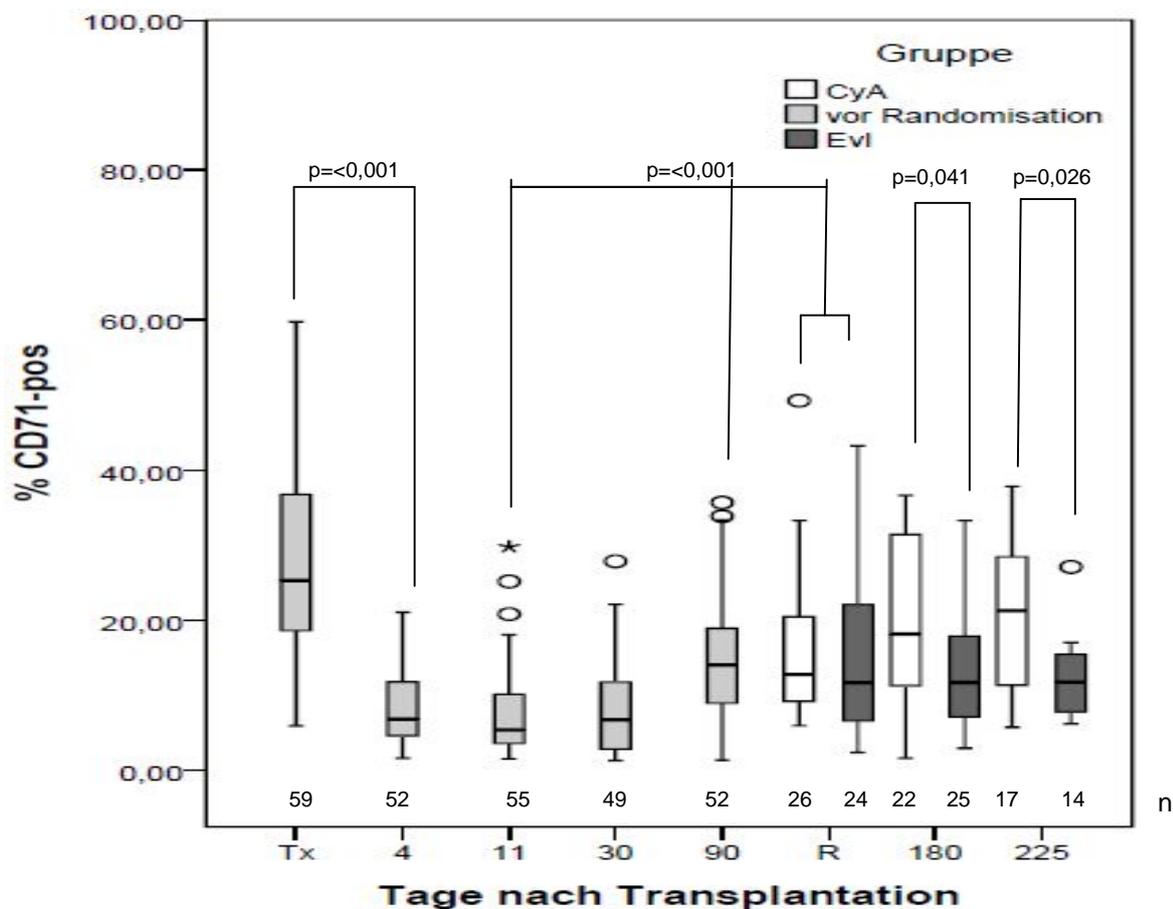


Abb. 12: prozentualer Anteil CD71-positiver T-Zellen im Studienzeitraum.

Alle Patienten (hellgrau) vom Transplantationstag (TX) bis zur Randomisation (R), danach Cyclosporin-Gruppe (weiß), Everolimus-Gruppe (dunkelgrau), n=Fallzahl

3.3.4 Lymphozytäre Proliferationsrate

Der zeitliche Verlauf der lymphozytären Proliferationsrate ist in Abbildung 13 dargestellt. Der Anteil proliferierender Lymphozyten fällt signifikant von 11,9% um 94% des Vortransplantationswertes auf 0,7% bis Tag 11 ab ($p < 0,0001$) und steigt bis zur Randomisierung wieder auf 3,1% (26% des Ausgangswertes). Der Anstieg von Tag 11 zu Tag 135 ist signifikant ($p < 0,001$). Vor Randomisation besteht kein signifikanter Proliferationsunterschied zwischen den späteren Gruppen.

Nach der Randomisation steigt der Proliferationsanteil an Tag 225 in der Cyclosporin-Gruppe auf 4,9% (41% des Ausgangswertes), wohingegen die Proliferation in der Everolimus-Gruppe auf 1,6% (13% des Ausgangswertes) sinkt. Der Unterschied zwischen den Gruppen ist nicht signifikant ($p = 0,074$).

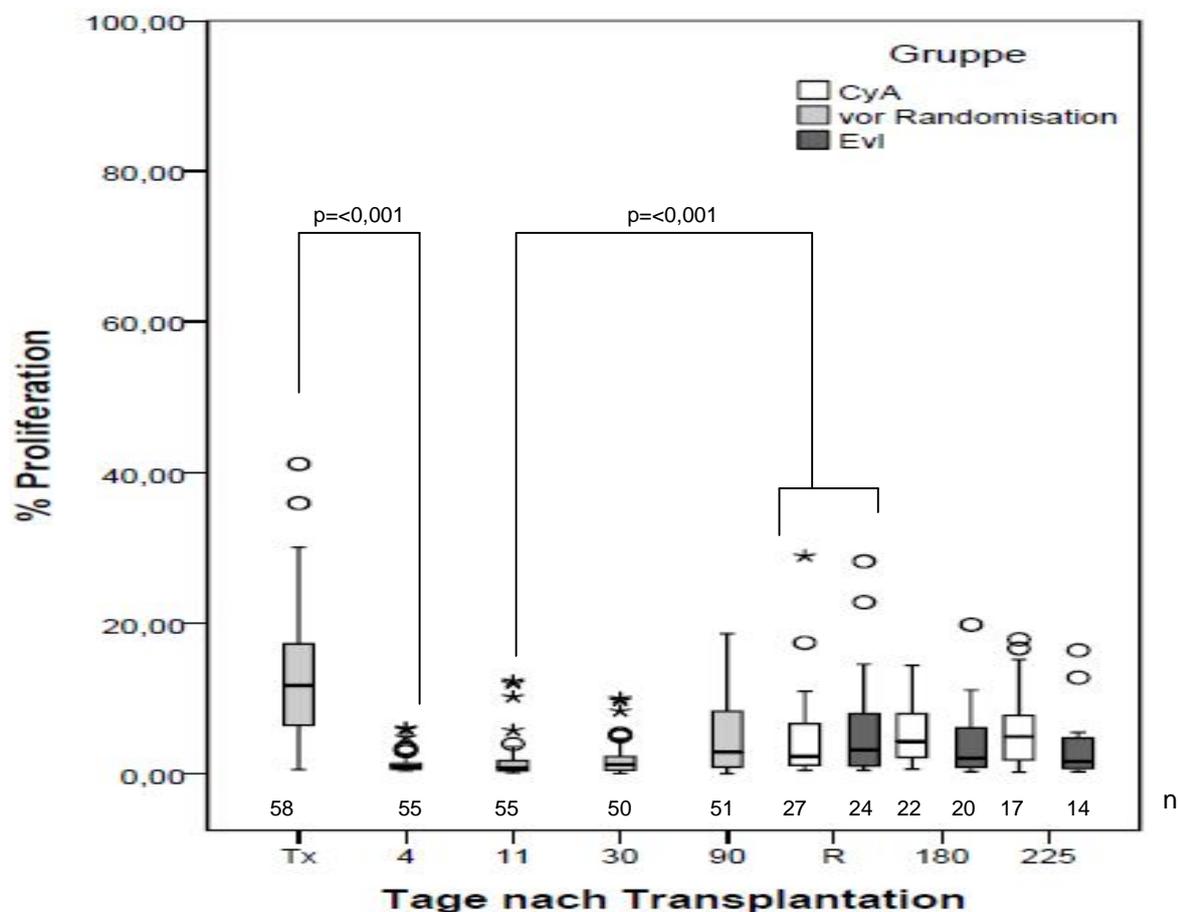


Abb. 13: prozentualer Anteil proliferierender Lymphozyten im Studienzeitraum

Alle Patienten (hellgrau) vom Transplantationstag (TX) bis zur Randomisation (R), danach Cyclosporin-Gruppe (weiß), Everolimus-Gruppe (dunkelgrau), n=Fallzahl

3.3.5 PD-Korrelationen

Tabelle 5 zeigt die linearen Korrelationen der einzelnen PD-Parameter im Studienzeitraum untereinander. Die Zytokine IL-2 und TNF- α , die Aktivierungsmarker CD25 und CD71 sowie die lymphozytäre Proliferationsrate mit beiden Oberflächenaktivierungsmarkern weisen signifikante ($p < 0,001$) und starke bis mäßige Korrelationen ($r^2 = 0,752$, $r^2 = 0,689$, $r^2 = 0,513$ bzw. $r^2 = 0,489$) zueinander auf. Die IMPDH-Aktivität zeigt zu keinem anderen der erhobenen PD-Parameter einen starken linearen Zusammenhang, einzig die Proliferation korreliert schlecht ($r^2 = 0,114$) mit der IMPDH.

Tab. 5: Korrelation der PD-Parameter untereinander

		r^2	p^*	N
IL-2	TNF- α	0,752	<0,001	437
CD25	CD71	0,689	<0,001	458
CD25	Proliferation	0,513	<0,001	448
CD71	Proliferation	0,489	<0,001	443
IL-2	CD25	0,075	<0,001	425
IL-2	CD71	0,048	<0,001	421
IL-2	Proliferation	0,057	<0,001	414
IL-2	IMPDH	0,01	0,049	403
TNF- α	CD25	0,097	<0,001	429
TNF- α	CD71	0,078	<0,001	424
TNF- α	Proliferation	0,074	<0,001	417
TNF- α	IMPDH	0,008	0,064	406
CD25	IMPDH	0,035	<0,001	431
CD71	IMDPH	0,075	<0,001	426
Proliferation	IMPDH	0,114	<0,001	420

*=Spearman, r^2 :Determinationskoeffizient, N: Fallzahl

3.3.6 PK- und PD-Korrelationen

Die Tabelle 6 gibt die Korrelation der PD-Parameter mit der Tagesdosis am Vortag bzw. der Blutkonzentration der entsprechenden Immunsuppressiva vor der Randomisation wieder.

Die IMPDH-Aktivität und die IL-2- und TNF- α -Expression zeigen keinen linearen Zusammenhang zu den Vortagesdosierungen von CyA, EC-MPS und Prednison bzw. zur CyA- und MPA-Talspiegelkonzentration.

Die Expression der Oberflächenaktivierungsmarker CD25 und CD71 sowie die lymphozytäre Proliferationsrate zeigen einen signifikanten linearen Zusammenhang zu allen pharmakokinetischen Parametern. So korreliert die Cyclosporin-Vortagesdosis mäßig ($r^2=0,327$) mit der prozentualen CD25-Expression. Die EC-MPS-Vortagesdosis und dessen Medikamentenspiegel korreliert mäßig ($r^2=0,353$ bzw. $r^2=0,347$) mit der CD25-Expression bzw. Proliferationsrate. Die Prednisolon-Vortagesdosis zeigt einen guten bis mäßigen ($r^2=0,494$ bis $r^2=0,319$) linearen Zusammenhang mit der CD25- und CD71-Expression bzw. der lymphozytären Proliferationsrate.

Tab. 6: Korrelation zwischen pharmakokinetischen und pharmakodynamischen Parametern vor Randomisation

	CyA-Vortagesdosis			EC-MPS-Vortagesdosis			Pred-Vortagesdosis			CyA-Talspiegelkonzentration			MPA-Talspiegelkonzentration		
	r^2	p	N	r^2	p	N	r^2	p	N	r^2	p	N	r^2	p	N
IL-2	0,057	*	270	0,106	*	271	0,066	*	271	0,106	*	193	0,018	0,583	19
TNF- α	0,042	0,001	272	0,084	*	273	0,046	*	273	0,104	*	195	0,04	0,409	19
CD25	0,327	*	288	0,353	*	290	0,494	*	290	0,128	*	201	0,384	0,004	20
CD71	0,186	*	285	0,283	*	287	0,319	*	287	0,122	*	198	0,402	0,003	20
Proli	0,238	*	287	0,347	*	289	0,329	*	289	0,033	0,010	204	0,082	0,220	20
IMPDH	0,017	0,026	285	0,137	*	287	0,051	*	287	0	0,867	202	0,097	0,193	19

Proli: Proliferationsrate, CyA: Cyclosporin, EC-MPS: enteric coated Mycophenolat-Natrium, Pred: Prednisolon, r^2 : Determinationskoeffizient, * $p < 0,001$ (Pearson/Spearman), N: Anzahl der Messpaare

Tabelle 7 zeigt die Korrelationen nach der Randomisation in der CyA-Gruppe zwischen den pharmakokinetischen und pharmakodynamischen Parametern. Die IL-2- und TNF- α -Expression zeigen keinen linearen Zusammenhang zu den Vortagesdosierungen von CyA, EC-MPS und Prednison bzw. zur CyA- und MPA-Talspiegelkonzentration.

Die CD71- und CD25-Expression bzw. lymphozytäre Proliferationsrate korrelieren signifikant ($p < 0,001$) und gut ($0,835$, $r^2 = 0,599$, jeweils $N = 12$ bzw. $r^2 = 0,839$, $N = 13$) mit der MPA-Talspiegelkonzentration.

Die IMPDH-Aktivität zeigt einen signifikanten ($p = 0,001$, $N = 13$) und guten ($r^2 = 0,645$) Zusammenhang mit der MPA-Talspiegelkonzentration.

Tab. 7: Korrelation zwischen pharmakokinetischen und pharmakodynamischen Parametern in der CyA-Gruppe

	CyA-Vortagesdosis			EC-MPS-Vortagesdosis			Pred-Vortagesdosis		
	r^2	p	N	r^2	p	N	r^2	p	N
IL-2	0,014	0,260	91	0,012	0,300	91	0,030	0,103	91
TNF- α	0,016	0,231	91	0	0,995	91	0,085	0,005	91
CD25	0,044	0,039	98	0,009	0,362	98	0,109	0,001	98
CD71	0,012	0,293	96	0,012	0,293	96	0,085	0,004	96
Proli	0,059	0,018	96	0,017	0,209	96	0,104	0,001	96
IMPDH	0,011	0,303	94	0	0,936	94	0,001	0,782	94
	CyA-Talspiegelkonzentration			MPA-Talspiegelkonzentration					
	r^2	p	N	r^2	p	N			
IL-2	0,006	0,493	86	0,071	0,455	10			
TNF- α	0,016	0,243	86	0,082	0,424	10			
CD25	0,070	0,010	93	0,599	0,003	12			
CD71	0,063	0,017	91	0,835	*	12			
Proli	0,112	0,001	91	0,839	*	13			
IMPDH	0,003	0,610	90	0,645	0,001	13			

Proli: Proliferationsrate, CyA: Cyclosporin, EC-MPS: enteric coated Mycophenolat-Natrium, Pred: Prednisolon, r^2 : Determinationskoeffizient, * $p < 0,001$ (Pearson/Spearman), N: Anzahl der Messpaare

In Tabelle 8 ist der Zusammenhang zwischen den pharmakokinetischen und pharmakodynamischen Parametern nach Randomisation in der Evi-Gruppe dargestellt. Die Expression der Zytokine IL-2 und TNF- α sowie der Oberflächenaktivierungsmarker CD25 und CD71 zeigen keinen signifikanten Zusammenhang zu den Vortagesdosierungen von CyA, EC-MPS und Prednison bzw. zur CyA- und MPA-Talspiegelkonzentration.

Die lymphozytäre Proliferationsrate zeigt eine signifikante ($p=0,003$) mäßige Korrelation mit der MPA-Talspiegelkonzentration.

Die IMPDH-Aktivität zeigt keinen linearen Zusammenhang erhobenen zu den pharmakokinetischen Parametern.

Tab. 8: Korrelation zwischen pharmakokinetischen und pharmakodynamischen Parametern in der Evi-Gruppe

	Evi-Vortagesdosis			EC-MPS-Vortagesdosis			Pred-Vortagesdosis		
	r ²	p	N	r ²	p	N	r ²	p	N
IL-2	0,013	0,449	48	0,094	0,003	92	0,037	0,065	92
TNF- α	0,017	0,374	48	0,056	0,024	92	0,032	0,090	92
CD25	0	0,879	52	0,067	0,013	92	0,159	*	92
CD71	0,004	0,649	52	0,120	0,001	92	0,125	0,001	92
Proli	0	0,936	48	0,187	*	88	0,044	0,051	88
IMPDH	0,014	0,451	44	0,170	*	84	0,010	0,365	84
	Evi-Talspiegelkonzentration			MPA-Talspiegelkonzentration					
	r ²	p	N	r ²	p	N			
IL-2	0,005	0,589	58	0,007	0,717	22			
TNF- α	0,030	0,198	58	0,007	0,710	22			
CD25	0	0,899	61	0,037	0,379	23			
CD71	0,038	0,135	61	0,172	0,049	23			
Proli	0,072	0,040	59	0,359	0,003	23			
IMPDH	0,019	0,326	53	0,197	0,038	22			

Proli: Proliferationsrate, CyA: Cyclosporin, Evi: Everolimus, EC-MPS: enteric coated Mycophenolat-Natrium,

Pred: Prednisolon, r²: Determinationskoeffizient, * $p<0,001$ (Pearson/Spearman), N: Anzahl der Messpaare

3.4 Laborwerte

3.4.1 Kreatinin

Die Kreatininkonzentration im Serum fällt wie in Abbildung 14 dargestellt nach der Transplantation signifikant ab ($p < 0,001$) und bleibt niedrig. Die Unterschiede der Kreatininwerte zwischen den Studiengruppen sind vor der Randomisation nicht signifikant. Nach der Randomisation ist die Kreatininkonzentration im Evl-Arm an Tag 180 und Tag 365 signifikant niedriger als im CyA-Arm ($1,25 \pm 0,49$ vs. $1,59 \pm 0,60$ bzw. $1,57 \pm 0,75$ vs. $1,22 \pm 0,22$).

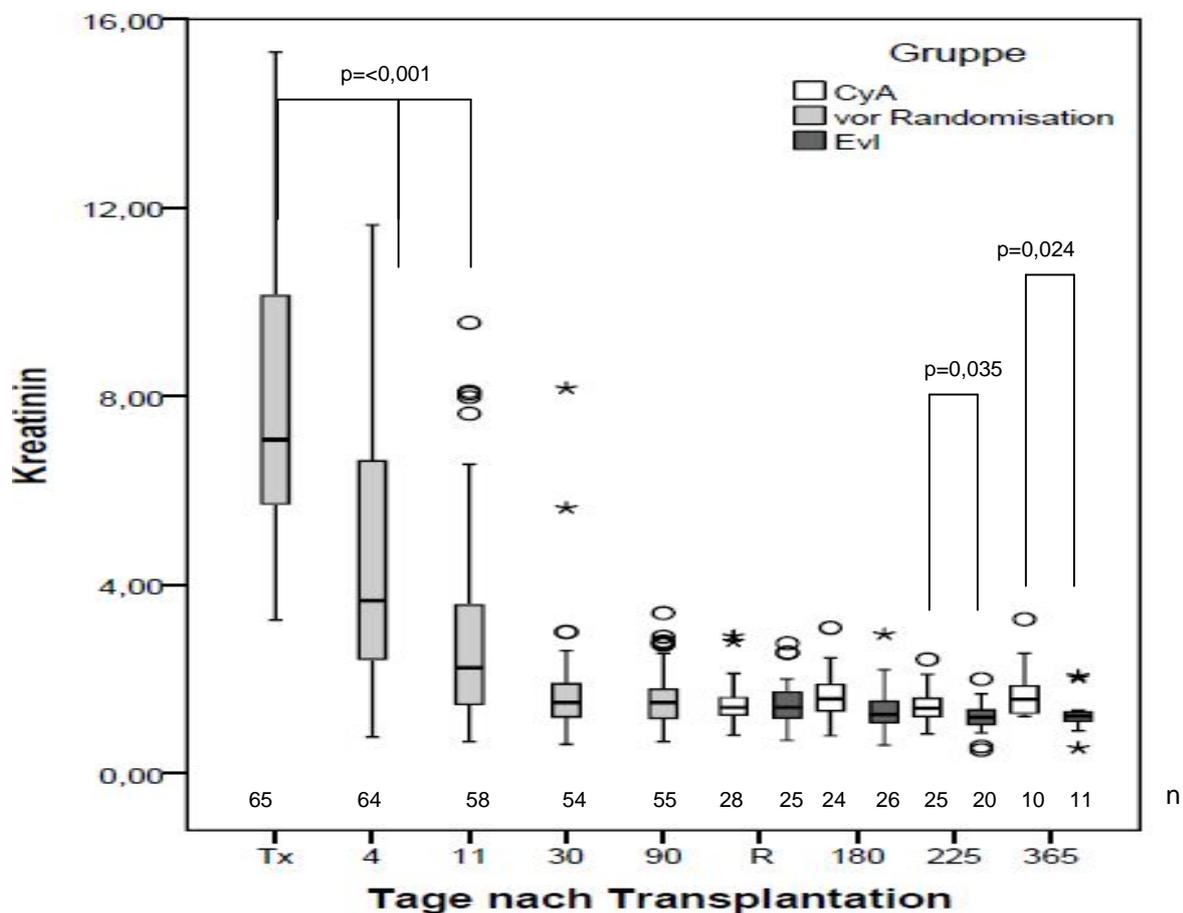


Abb. 14: Kreatinin im Serum [mg/dl] im Studienzeitraum

Alle Patienten (hellgrau) vom Transplantationstag (Tx) bis zur Randomisation (R), danach Cyclosporin-Gruppe (weiß), Everolimus-Gruppe (dunkelgrau), n=Fallzahl

3.4.2 Rote Blutbildparameter

In der Abbildung 15 und 16 ist der Verlauf der Erythrozyten- bzw. Hämoglobinkonzentration über den Studienzeitraum im jeweiligen Studienarm aufgezeigt.

Die Anzahl der Erythrozyten und die Hämoglobinmenge fallen unmittelbar nach der Transplantation in beiden Gruppen ab. Bis zur Randomisation steigen die Werte in beiden Gruppen auf das Ausgangsniveau. Signifikante Unterschiede bestehen zwischen den späteren Studienarmen in diesem Zeitraum nicht.

Die Hämoglobinmenge steigt nach der Randomisation im CyA-Arm minimal an und fällt leicht im Evl-Arm. Dieser Unterschied zwischen den Gruppen ist nicht signifikant.

Nach der Randomisation steigt die Erythrozytenzahl bis Tag 365 im Evl-Arm, in der CyA-Gruppe bleibt diese konstant. Dieser Unterschied einer größeren Erythrozytenzahl im Evl-Arm gegenüber dem CyA-Arm ist bei kleiner Fallzahl signifikant ($p=0,02$).

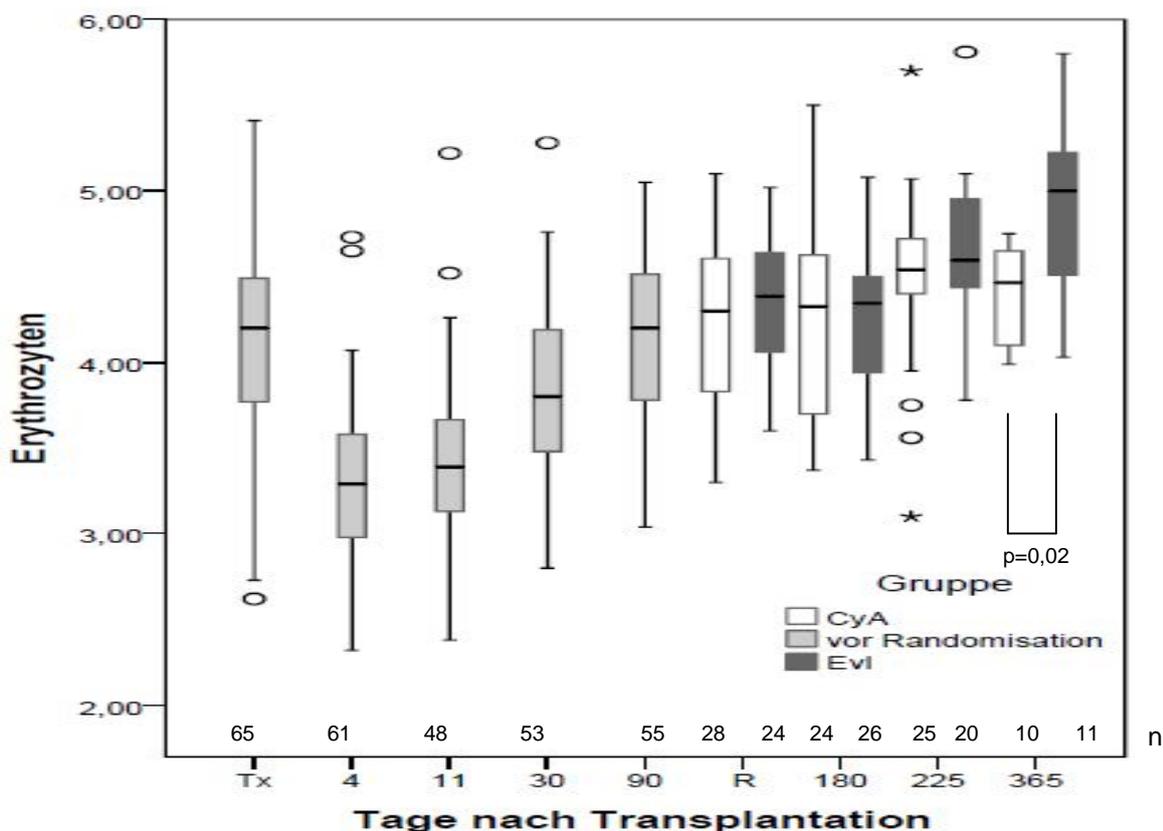


Abb. 15: Erythrozytenzahl [n/l] im Studienzeitraum

Alle Patienten (hellgrau) vom Transplantationstag (TX) bis zur Randomisation (R), danach Cyclosporin-Gruppe (weiß), Everolimus-Gruppe (dunkelgrau), n=Fallzahl

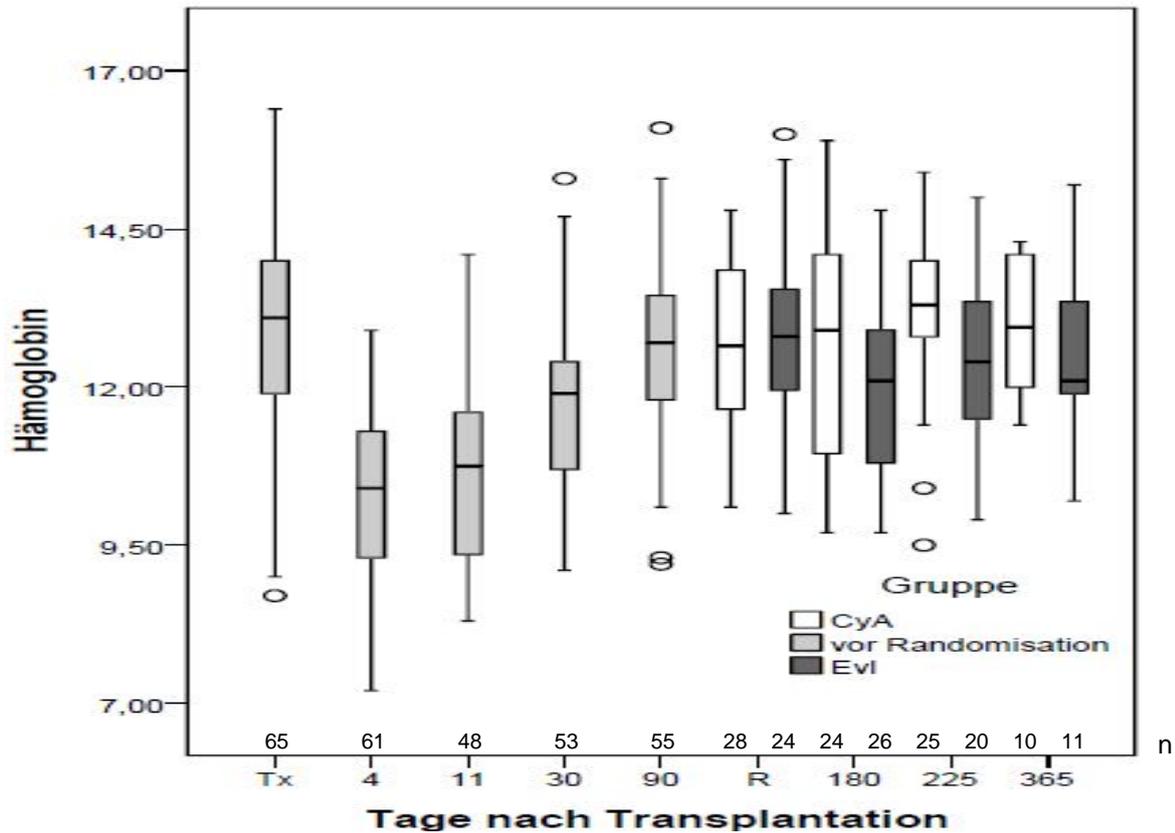


Abb. 16: Hämoglobinkonzentration [mg/dl] im Studienzeitraum

Alle Patienten (hellgrau) vom Transplantationstag (TX) bis zur Randomisation (R), danach Cyclosporin-Gruppe (weiß), Everolimus-Gruppe (dunkelgrau), n=Fallzahl

Der Verlauf des mittleren korpuskulären Volumens (MCV) und des mittleren Hämoglobingehalts der Erythrozyten (MCH) ist in Abbildung 17 A bzw. B im Vergleich zwischen den Studiengruppen dargestellt.

Beide Laborparameter sind in der Evi-Gruppe niedriger als in der CyA-Gruppe. Der Unterschied zwischen den Gruppen ist an Tag 180 für MCV signifikant.

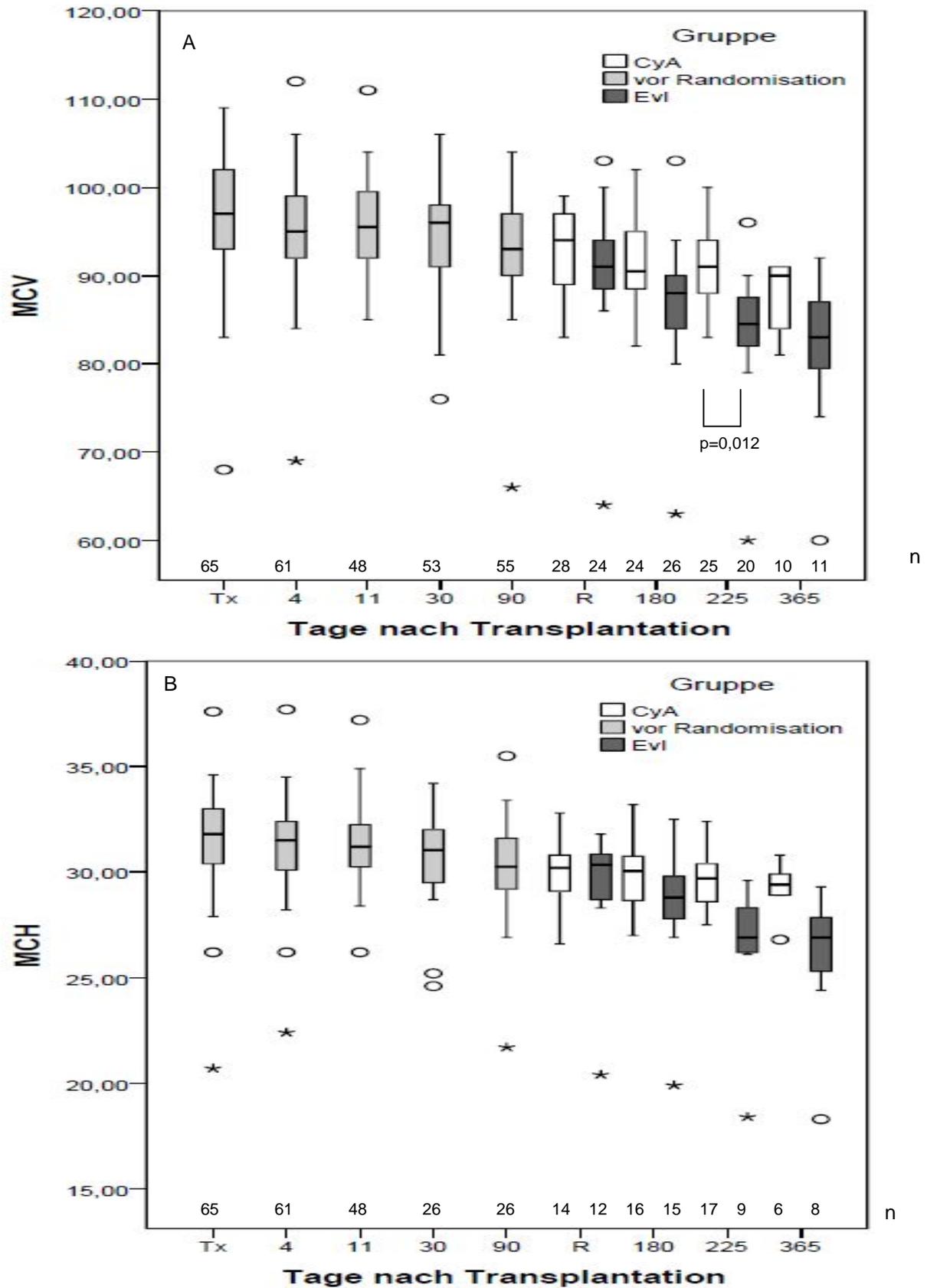


Abb. 17: mittleres korpuskuläres Volumen (MCV) [fl] (A) und mittlerer korpuskulärer Hämoglobingehalt [pg] (MCH) (B) im Studienzeitraum

Alle Patienten (hellgrau) vom Transplantationstag (TX) bis zur Randomisation (R), danach Cyclosporin-Gruppe (weiß), Everolimus-Gruppe (dunkelgrau), n=Fallzahl

3.4.3 Leukozyten und Thrombozyten

Die Abbildung 18 bzw. 19 zeigen die Leuko- bzw. Thrombozytenzahl im Studienzeitraum in den Studiengruppen. Die Leukozytenzahl steigt nach der Transplantation an. Zum Randomisationszeitpunkt sind die Leukozytenzahlen in den Gruppen auf gleichem Niveau. Die Leukozytenzahlen steigen in der CyA-Gruppe danach weiter an. In der Evl-Gruppe fallen diese nach Randomisation ab und unterschreiten an Tag 365 den Ausgangswert. Dieser Unterschied zwischen den Gruppen am Tag 365 ist signifikant.

Die Thrombozytenzahl fällt postoperativ bis Tag 4 ab und steigt an Tag 11 auf den Ausgangswert an. Nach der Randomisation sind die Thrombozytenzahlen in beiden Armen konstant und zeigen keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Gruppen.

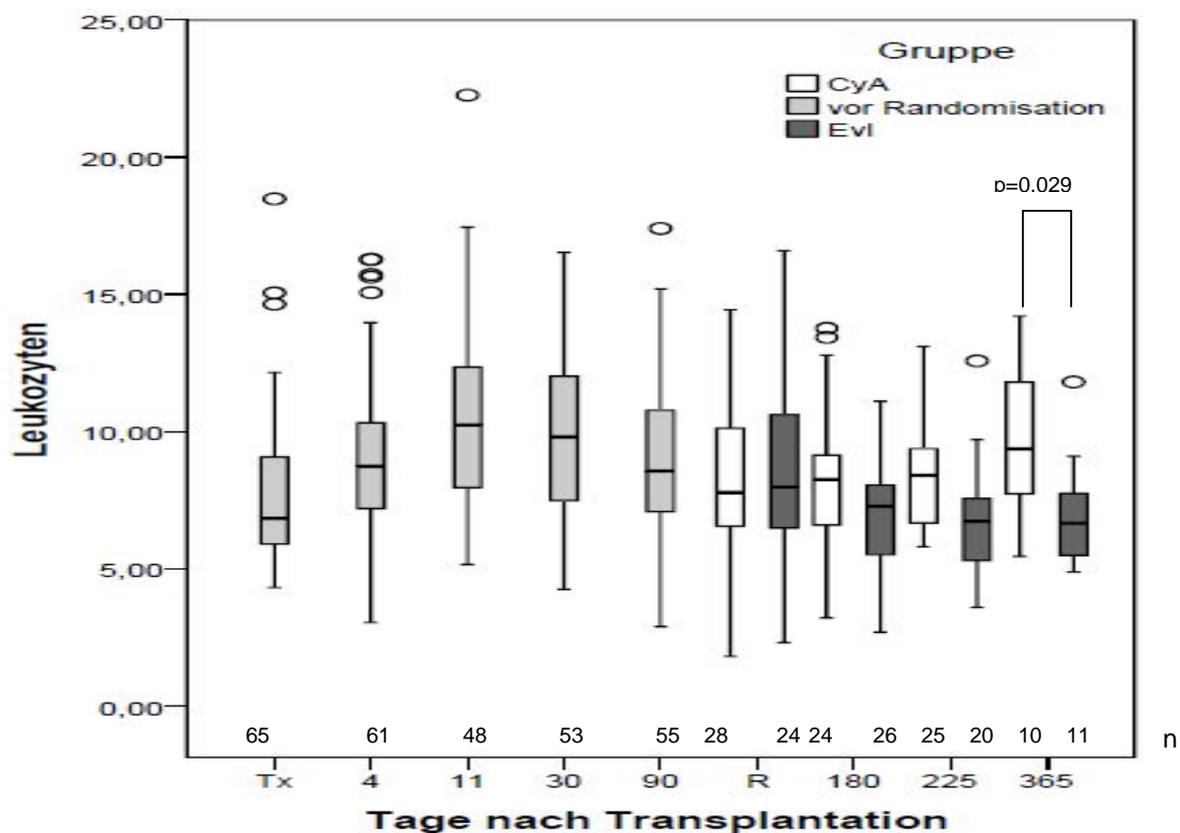


Abb. 18: Leukozytenzahl [n] im Studienzeitraum

Alle Patienten (hellgrau) vom Transplantationstag (TX) bis zur Randomisation (R), danach Cyclosporin-Gruppe (weiß), Everolimus-Gruppe (dunkelgrau), n=Fallzahl

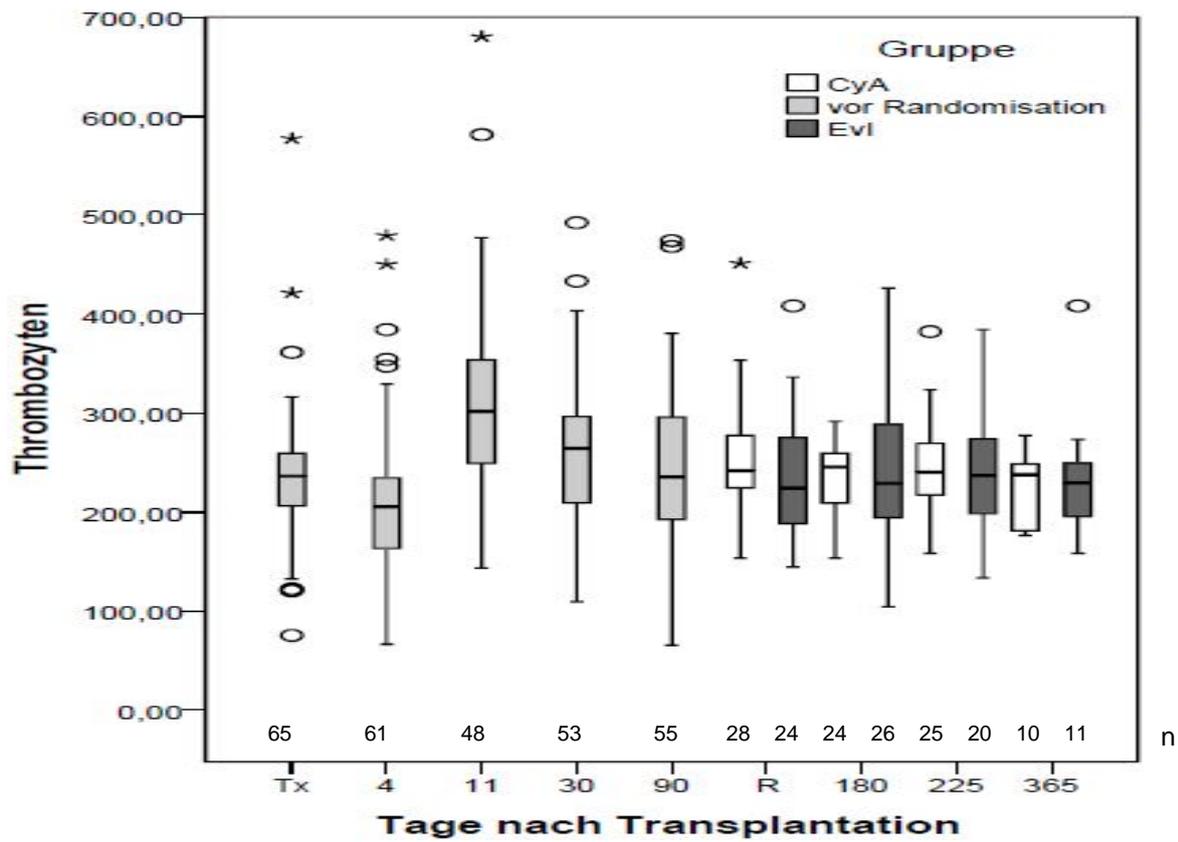


Abb. 19: Thrombozytenanzahl [n/l] im Studienzeitraum

Alle Patienten (hellgrau) vom Transplantationstag (TX) bis zur Randomisation (R), danach Cyclosporin-Gruppe (weiß), Everolimus-Gruppe (dunkelgrau), n=Fallzahl

3.4.4 Proteinurie

Die Abbildung 20 zeigt die Proteinkonzentration im Urin (mg/l). Diese sinkt zwischen Transplantation und Randomisation. Nach der Randomisation bleibt sie im CyA-Arm konstant und steigt im Evl-Arm an. Nach der Randomisation ist sie an Tag 180 im Evl-Arm signifikant höher als im CyA-Arm ($p=0,042$). Am Tag 365 ist dies nicht signifikant ($p=0,056$).

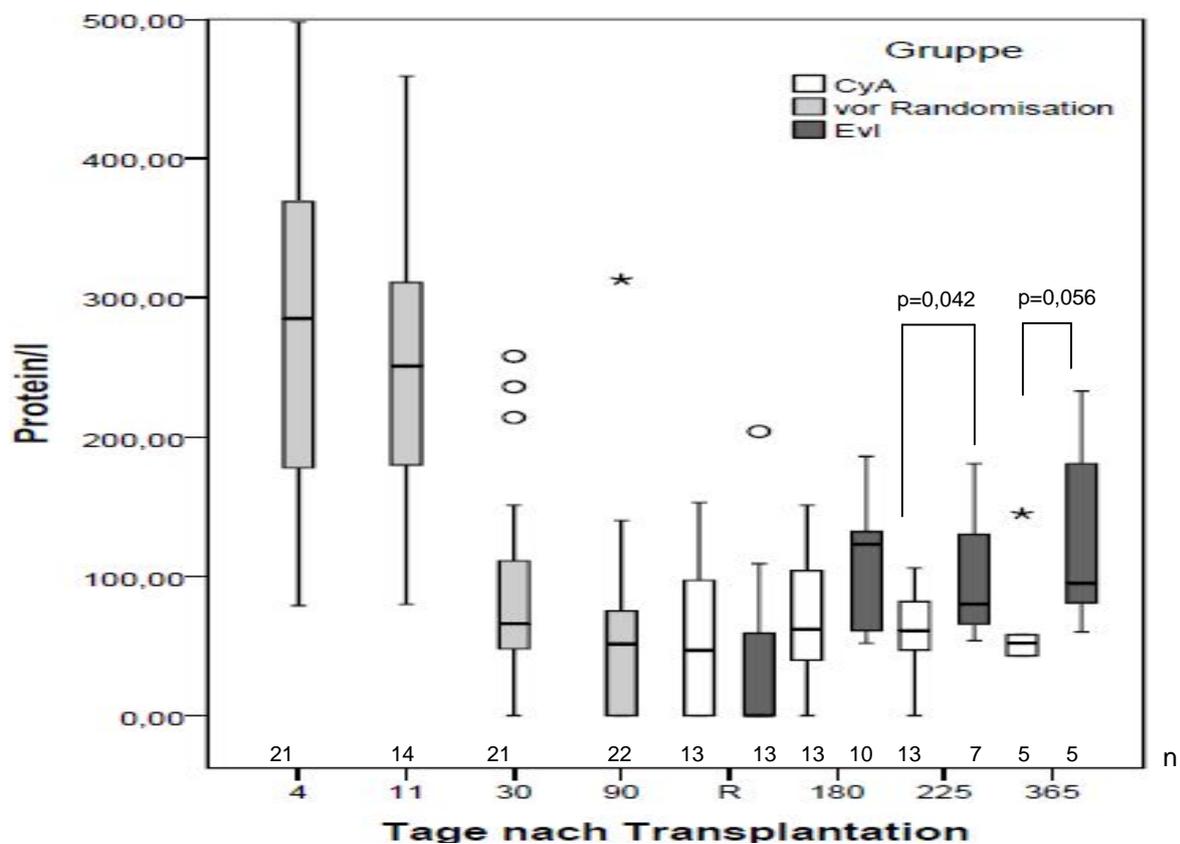


Abb. 20: Proteinkonzentration im Urin im Studienzeitraum

Alle Patienten (hellgrau) vom Transplantationstag (TX) bis zur Randomisation (R), danach Cyclosporin-Gruppe (weiß), Everolimus-Gruppe (dunkelgrau), n=Fallzahl

3.4.4 Glukosekonzentration

Die Glucosekonzentration im Serum ist in Abbildung 21 dargestellt. Die Glucosekonzentration verläuft auf einem konstanten Niveau ohne signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen im Studienzeitraum zu zeigen.

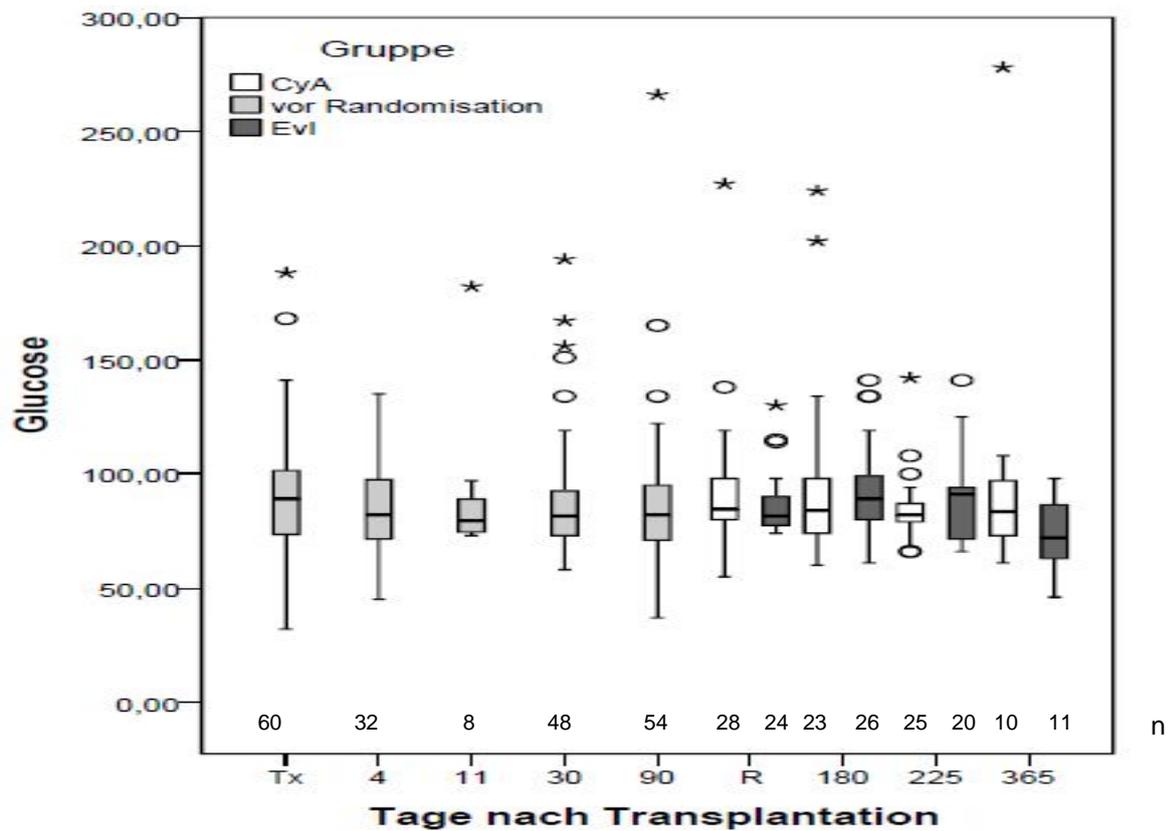


Abb. 21: Glukose im Serum im Studienzeitraum

Alle Patienten (hellgrau) vom Transplantationstag (TX) bis zur Randomisation (R), danach Cyclosporin-Gruppe (weiß), Everolimus-Gruppe (dunkelgrau), n=Fallzahl

3.4.5 Fettprofil

Die Cholesterinkonzentration steigt wie in Abbildung 22 dargestellt nach der Transplantation in beiden Gruppen an. Nach der Umstellung ist die Cholesterinkonzentration in der Evl-Gruppe höher, ohne einen signifikanten Unterschiede im Vergleich zur CyA-Gruppe zu erreichen.

Die Triglyzeride sind in Abbildung 23 dargestellt. Nach der Transplantation befinden sie sich auf konstantem Niveau. Nach der Randomisation sind die Werte in der Evl-Gruppe etwas höher als in der CyA-Gruppe, ohne dass dieser Unterschied das Signifikanzniveau erreicht.

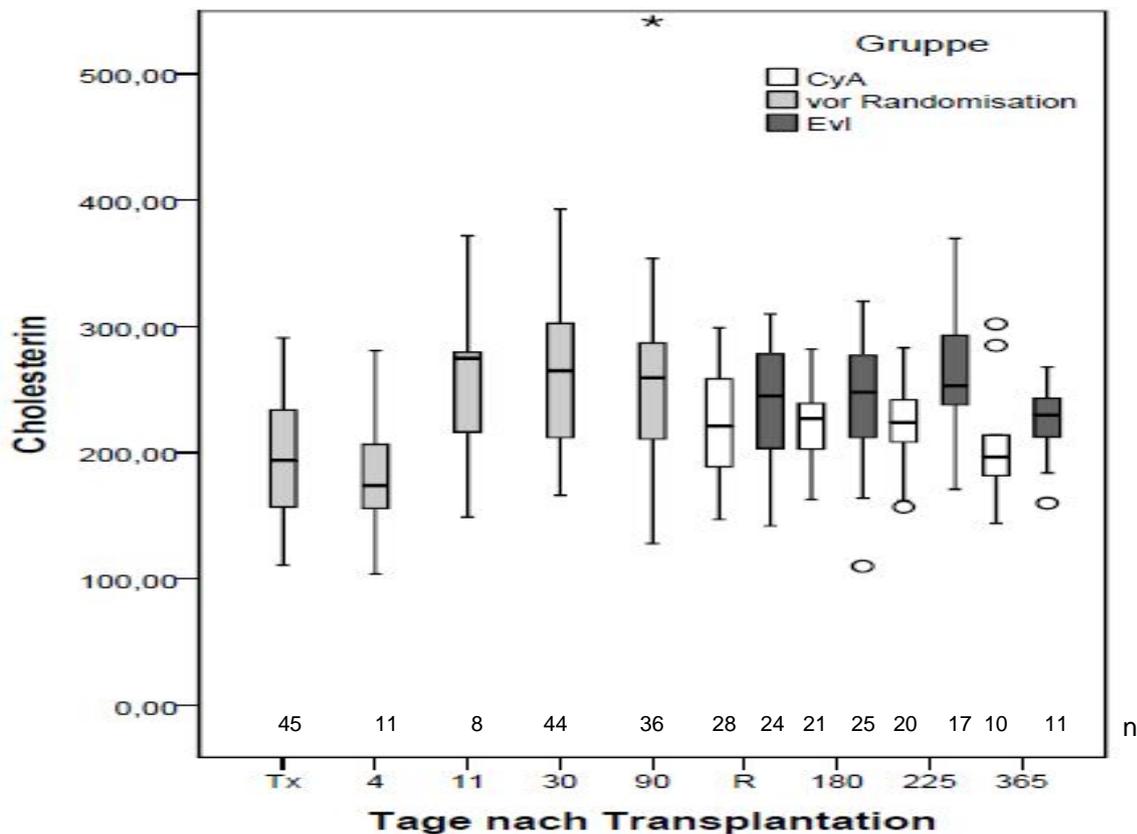


Abb. 22: Gesamt-Cholesterin [mg/dl] (B) im Studienzeitraum

Alle Patienten (hellgrau) vom Transplantationstag (TX) bis zur Randomisation (R), danach Cyclosporin-Gruppe (weiß), Everolimus-Gruppe (dunkelgrau)

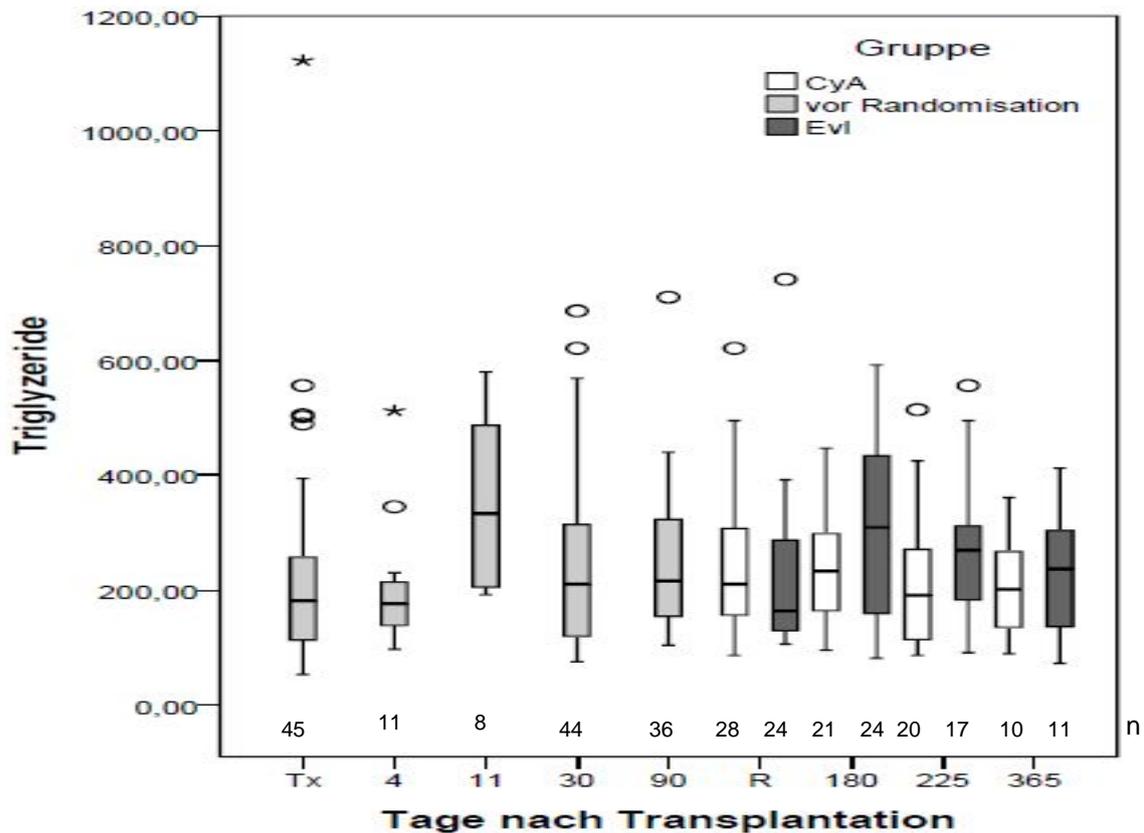


Abb. 23: Triglyzeride (A) und Gesamt-Cholesterin [mg/dl] (B) im Studienzeitraum

Alle Patienten (hellgrau) vom Transplantationstag (TX) bis zur Randomisation (R), danach Cyclosporin-Gruppe (weiß), Everolimus-Gruppe (dunkelgrau)

Die Abbildungen 24 A und B zeigen die HDL- und LDL-Cholesterinmenge im Serum über den gesamten Studienverlauf in beiden Gruppen. Die HDL-Cholesterinmenge steigt unmittelbar nach Transplantation an und bleibt bis zum Randomisationszeitpunkt auf einem konstanten Niveau. Nach der Randomisation ist der Verlauf in der CyA- und Evi-Gruppe identisch auf einem konstanten Niveau. Signifikante Unterschiede zwischen den Studienarmen bestehen zu keinem Zeitpunkt.

Die LDL-Cholesterinkonzentration im Serum steigt unmittelbar nach der Transplantation und verläuft bis zum Randomisationszeitpunkt auf höherem Niveau.

Zum Randomisationszeitpunkt ist die LDL-Cholesterinmenge im Evi-Arm etwas höher als im CyA-Arm. Dieser Unterschied ist nicht signifikant. Nach der Randomisation fallen die LDL-Cholesterinwerte in beiden Gruppen bis zum Tag 365 ab ohne signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen aufzuweisen.

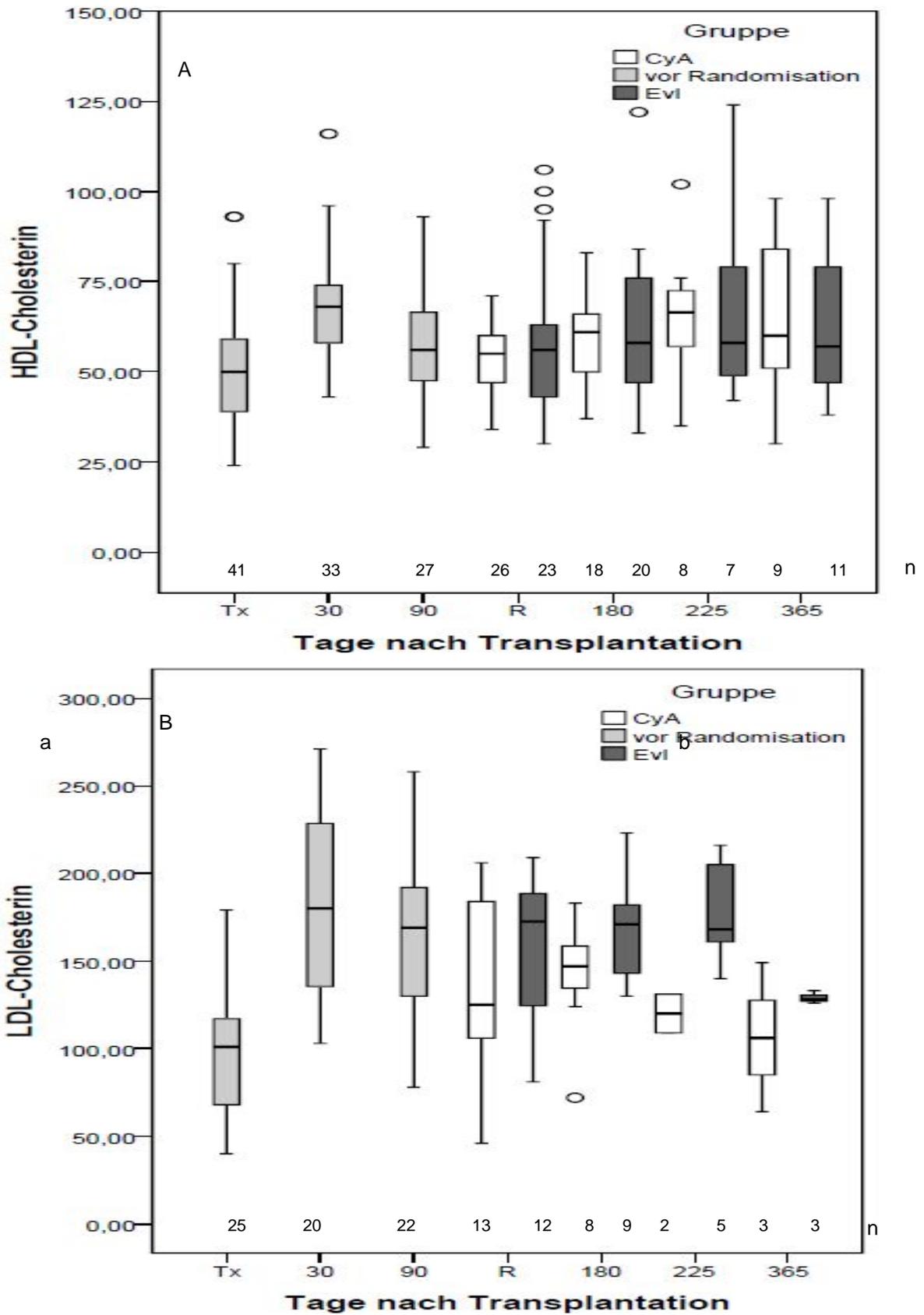


Abb. 24: HDL- (A) und LDL-Cholesterin [mg/dl] (B) im Studienzeitraum
 Alle Patienten (hellgrau) vom Transplantationstag (TX) bis zur Randomisation (R), danach Cyclosporin-Gruppe (weiß), Everolimus-Gruppe (dunkelgrau)

3.5 Nebenwirkungen und Biomarker

3.5.1 Gruppeneinteilung

Die unerwünschten Ereignisse sind in folgende Gruppen eingeteilt worden:

1. Gastrointestinale Ereignisse (GI)
(Diarrhoe, Obstipation, Übelkeit und Erbrechen, abdominale Schmerzen, Pyrosis, Aphten, Flatulenz)
2. Stoffwechselbezogene Ereignisse (SW)
(Hypercholesterinämie, -triglyzeridämie, Diabetes mellitus, art. Hypertonie, Adipositas, Hyperurikämie)
3. blutbildbezogene Ereignisse (Blut)
(Anämie, Polyglobulie, Leukopenie und -zytose, Thrombozytopenie und -zytose)
4. Auffälligkeiten im Urin (Urin)
(Proteinurie, Hämaturie, Leukozyturie)
5. Heilungsstörungen (Lymphocele, Wundheilungsstörung)
6. Nierenfunktionsstörungen (erhöhtes Kreatinin und Transplantatdysfunktion).

3.5.2 Häufigkeit der Vorerkrankungen und unerwünschten Ereignisse

Die Häufigkeit der Vorerkrankungen nach späteren Studiengruppen getrennt zeigt Tabelle 9. Die häufigste Vorerkrankung betraf die Gruppe der Stoffwechselerkrankungen (N=52). Anämien (N=47) waren ebenfalls häufig. Die Unterschiede zwischen den Studienarmen waren nicht signifikant.

Von 1388 dokumentierten unerwünschten Ereignissen entfallen 335 auf die festgelegten Gruppierungen. Einen Überblick über die Anzahl betroffener Patienten und registrierter Ereignisse in der gesamten Population und nach Studienarm getrennt gibt Tabelle 10 wieder.

Häufig dokumentierte unerwünschte Ereignisse sind Nierenfunktionsstörungen (57 Ereignisse), Heilungsstörungen (37 Ereignisse), Diarrhö (35 Ereignisse), Übelkeit, Hypercholesterinämie und Anämie (je 34 Ereignisse) und Obstipation (30 Ereignisse).

Die meisten Patienten sind nach Transplantation von Nierenfunktionsstörungen (N=37) betroffen. Es folgen eine Hypercholesterinämie (N=31), Heilungsstörungen und Diarrhö (je N=28), Übelkeit (N=27), Obstipation (N=26), abdominelle Schmerzen und Anämie (20 Patienten), Leukopenie (19 Patienten) und Proteinurie (18 Patienten). Die Unterschiede in der Häufigkeit dieser unerwünschten Ereignisse zwischen den Studienarmen sind nicht signifikant.

Tab. 9: Häufigkeit der Vorerkrankungen aller Patienten in den späteren Gruppen

	CyA		Evl		Gesamt		p*
	%	N	%	N	%	N	
Anämie	66,7	22	83,3	25	74,6	47	0,129
GI	18,2	6	3,3	1	11,1	7	0,061
Urin	3,3	1	10	3	6,3	4	0,257
SW	81,8	27	83,3	25	82,5	52	0,874

SW: Stoffwechselerkrankungen, GI: gastrointestinale Erkrankungen, *: Chi²-Test zwischen Cyclosporin- und Everolimus-Gruppe

Tab. 10: unerwünschte Ereignisse und betroffene Patienten im Studienzeitraum

UE	CyA			Evl			Alle		
	%	N=33	E	%	N=30	E	%	N=63	E
NFS	54,5	18	28	36,7	11	16	46,0	29	44
Proteinurie	24,2	8	8	26,7	8	8	25,4	16	16
Hämaturie	6,1	2	3	10,0	3	4	7,9	5	7
Leukozyturie	6,1	2	3	6,7	2	3	6,3	4	6
Lymphozele	24,2	8	9	33,3	10	12	28,6	18	21
Heilungsstörungen	36,4	12	17	46,7	14	18	15,9	10	13
Abd. Schmerzen	24,2	8	11	30,0	9	14	27,0	17	25
Anorexie	6,1	2	3	10,0	3	3	7,9	5	6
Aphten	3,0	1	2	16,7	5	9	9,5	6	11
Diarrhö	33,3	11	14	40,0	12	15	36,5	23	29
Flatulenz	9,1	3	6	10,0	3	3	9,5	6	9
Übelkeit	27,3	9	11	40,0	12	16	33,3	21	27
Obstipation	39,4	13	14	36,7	11	13	38,1	24	27
Pyrosis	3,0	1	1	16,7	5	7	9,5	6	8
Erbrechen	27,3	9	16	16,7	5	6	22,2	14	22
Cholesterinämie	42,4	14	16	46,7	14	15	44,4	28	31
Triglyzeridämie	3,0	1	1	23,3	7	8	12,7	8	9
Diabetes mellitus	18,2	6	6	30,0	9	13	23,8	15	19
Hypertension	15,2	5	5	10,0	3	3	12,7	8	8
Hyperurikämie	15,2	5	5	10,0	3	3	12,7	8	8
Anämie	21,2	7	7	30,0	9	14	25,4	16	21
Leukopenie	18,2	6	6	30,0	9	9	23,8	15	15
Leukocytose	9,1	3	3	13,3	4	5	11,1	7	8
Thrombopenie	3,0	1	1	10,0	3	4	6,3	4	5
Thrombocytose	0,0	0	0	3,3	1	1	1,6	1	1
Polyglobulie	0,0	0	0	0,0	0	0	0	0	0

UE: unerwünschte Ereignisse; N: Anzahl betroffener Patienten; E: Anzahl der Ereignisse; NFS: Nierenfunktionsstörungen

Bei folgenden unerwünschten Ereignissen ist ein Unterschied zwischen den erhobenen Biomarkern aufgrund vermuteter immunologischer Zusammenhänge bzw. Zusammenhängen mit den erhobenen Biomarkern untersucht worden: Nierenfunktionsstörung, Wundheilungsstörung, Diarrhö, Anämie, Leukopenie und Proteinurie.

3.5.3 Auftreten der Nebenwirkungen über den Studienzeitraum

Die unerwünschten Ereignisse sind bis zu 150 Tage über das Studienende hinaus dokumentiert worden. In Tabelle 11 sind die unterschiedlichen Häufigkeiten der Nebenwirkungen zwischen den Studienarmen aufgeführt. Da es zwischen den Studienarmen keine signifikanten Unterschiede bzgl. der Häufigkeit der unerwünschten Ereignisse gab, wurden die Biomarker-Ergebnisse beider Gruppen gemeinsam analysiert (siehe 3.5.4 Unterschiede der PD-Parameter in Abhängigkeit der unerwünschten Ereignisse).

Tab. 11: Zeitliche Verteilungsunterschiede in Studienarmen

Nebenwirkung	Beobachtungen	Alle Patienten	Hazard-Ratio	p*
Nierenfunktionsstörung	28	63	2,2	0,138
Wundheilungsstörung	9	63	0,71	0,399
Proteinurie	16	63	0,01	0,942
Diarrhö	22	63	0,10	0,751
Leukopenie	13	63	0,16	0,690
Anämie	19	63	0,39	0,530

*: Log-Rank-Test zwischen CyA- und Evi-Arm

Die Zeit bis zum Eintreten einer Anämie bzw. Leukopenie sind in den Abbildungen 25 bzw. 26 dargestellt. Innerhalb von 50 Tagen nach Transplantation tritt eine Anämie bei 8/19 Patienten (42%) auf. Nach der Randomisation gibt es bis zum Studienende 9 weitere Fälle (47%). Die durchschnittliche Zeit bis zum Auftreten einer Anämie beträgt 318 Tage (Standardfehler 17).

Zwischen Tag 39 und Randomisation werden 8/13 Leukopenie-Fälle (62%) registriert. Die restlichen 5 (38%) werden von der Randomisation bis Tag 200 beobachtet. Die durchschnittliche Zeit bis zum Auftreten einer Leukopenie beträgt 335 Tage (Standardfehler 15).

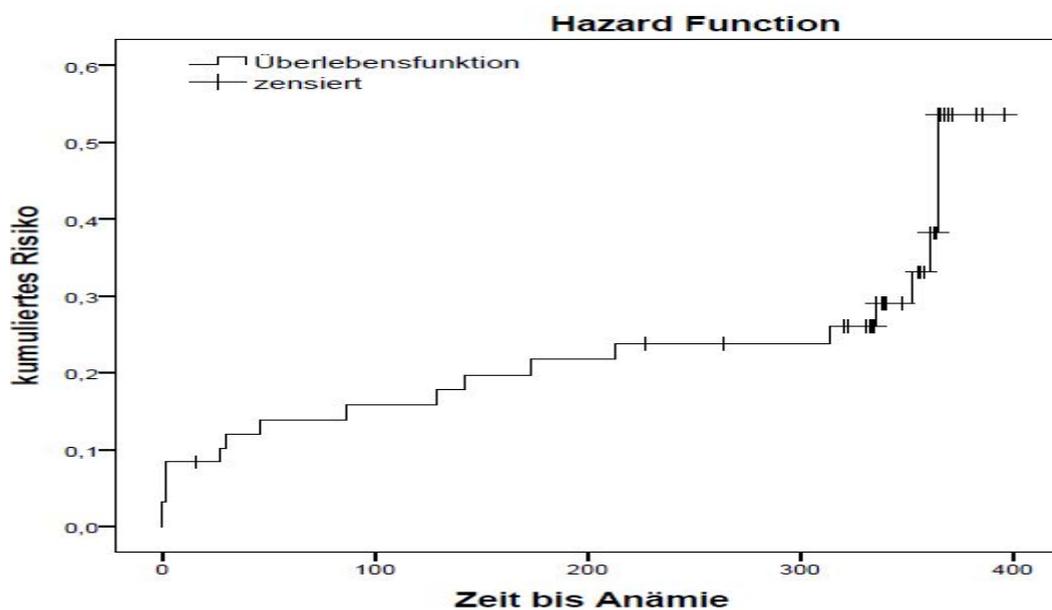


Abb. 25: Zeit bis zur ersten Anämie

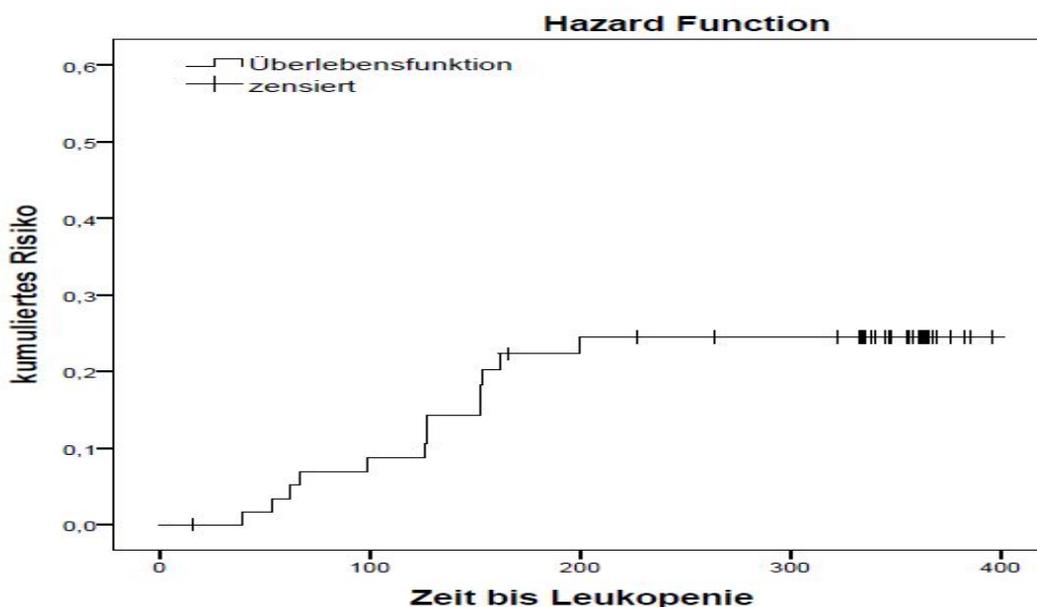


Abb. 26: Zeit bis zur ersten Leukopenie

Die Abbildungen 27 bzw. 28 bilden den zeitlichen Verlauf bis zum Auftritt einer Diarrhö bzw. Proteinurie ab. Vor der Randomisation treten 14/22 Diarrhö-Fälle (64%) auf. Die übrigen 8 (36%) treten bis Tag 291 ein. Die durchschnittliche Zeit bis zum Auftreten einer Diarrhö beträgt 274 Tage (Standardfehler 20).

Die Proteinurie tritt in 9/16 Fällen (56%) im ersten Monat nach Transplantation auf. 7 Fälle (33%) werden nach der Randomisation beobachtet. Die durchschnittliche Zeit bis zum Auftreten einer Proteinurie beträgt 318 Tage (Standardfehler 18).

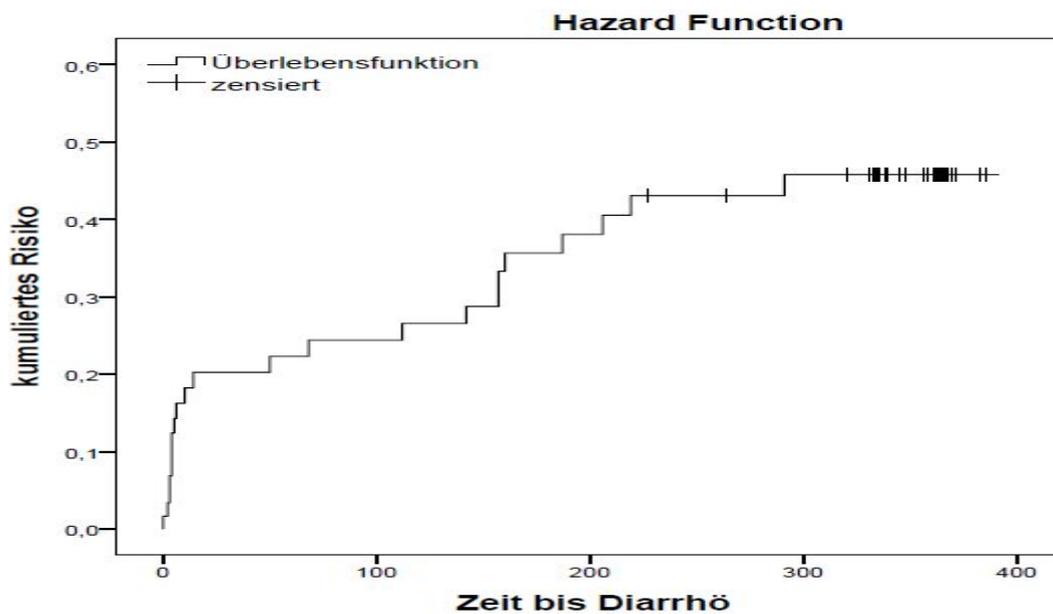


Abb. 27: Zeit bis zur ersten Manifestation von Diarrhö

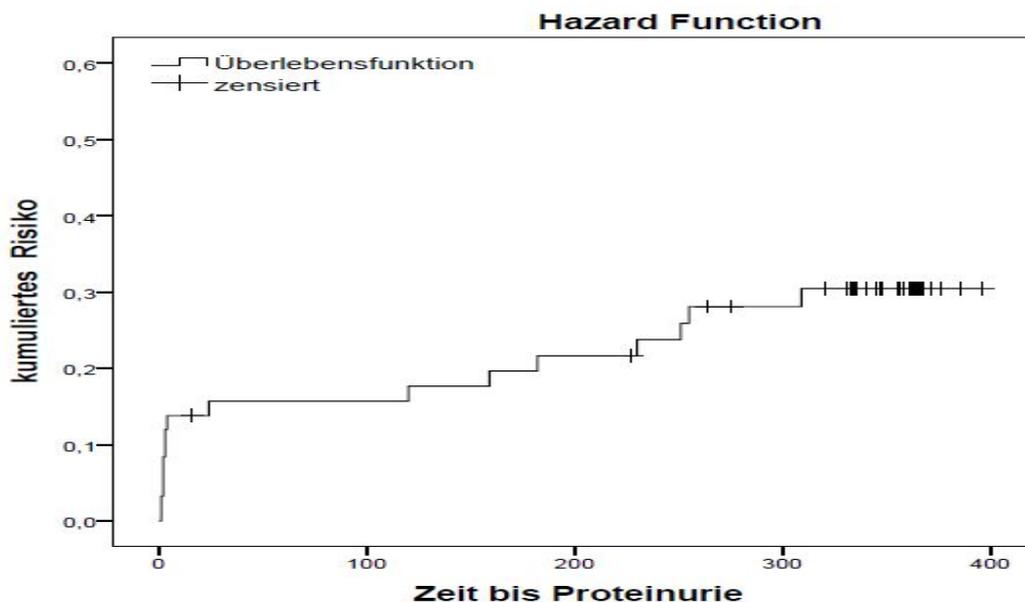


Abb. 28: Zeit bis zur ersten Proteinurie

Abbildung 29 bzw. 30 zeigen den Auftritt von Wundheilungsstörungen bzw. Nierenfunktionsstörungen im Studienzeitraum. Alle Wundheilungsstörungen (9/9) werden vor der Randomisation registriert. Die durchschnittliche Zeit bis zum Auftreten einer Wundheilungsstörung beträgt 337 Tage (Standardfehler 18)

Die Nierenfunktionsstörung tritt in 24/28 Fällen (86%) vor Randomisation, in 19/28 Fällen (68%) vor Tag 30 auf. Die übrigen 4 Fälle (14%) treten zwischen Randomisation und Tag 260 auf. Die durchschnittliche Zeit bis zum Auftreten einer Nierenfunktionsstörung beträgt 239 Tage (Standardfehler 23).

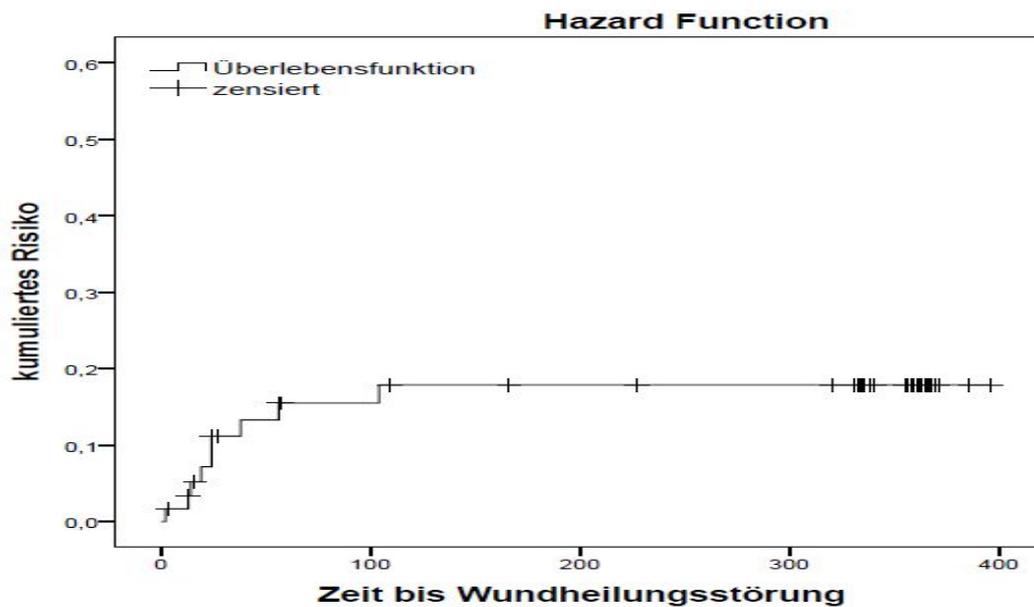


Abb. 29: Zeit bis zur Erstmanifestation einer Wundheilungsstörung

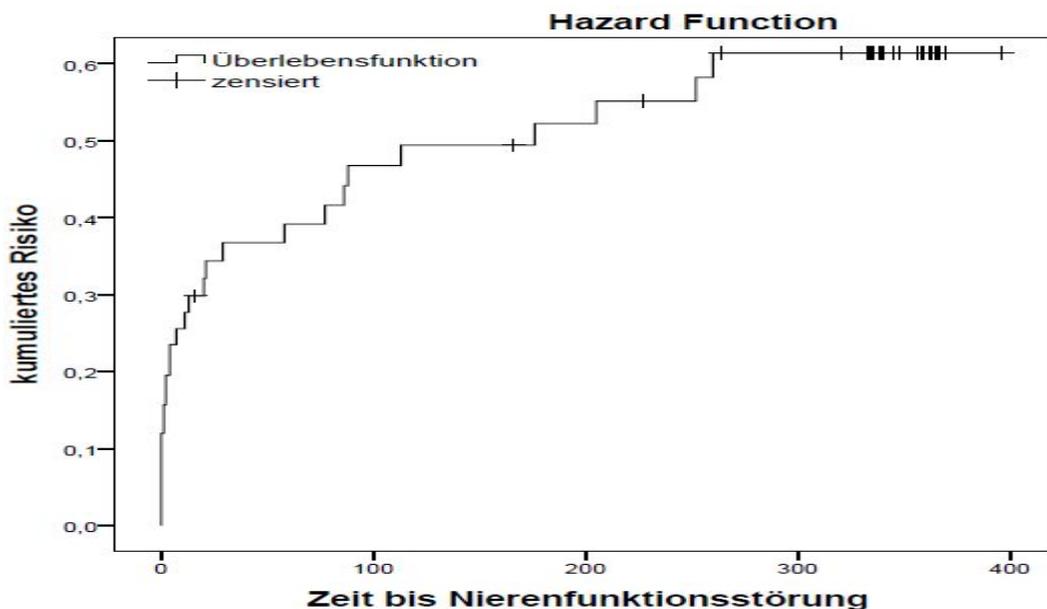


Abb. 30: Zeit bis zum ersten Auftreten von Nierenfunktionsstörungen

3.5.4 Biomarker in Bezug auf später vorhandene Nebenwirkungen

Tabelle 12 zeigt die Unterschiede zwischen Patienten mit und ohne Nebenwirkung in der Expression der PD-Parameter zum letzten Messzeitpunkt vor dem Eintreten dieser Nebenwirkung. Für die Nebenwirkungen Proteinurie, Nierenfunktionsstörung und Wundheilungsstörung sind keine signifikanten Unterschiede in der Biomarker-Expression beobachtet worden. Die CD25-Expression ist an Tag 90 bei Patienten mit einer Anämie im darauffolgenden Zeitraum signifikant kleiner als bei Patienten ohne diese Nebenwirkung (Median 23,8% vs. 10,3%, $p=0,03$).

Die IL-2-Expression an Tag 90 ist tendenziell geringer bei Patienten mit einer Leukopenie im darauffolgenden Zeitraum gegenüber Patienten ohne Leukopenie (Median 10,5% vs. 19%, $p=0,065$). Ebenso hat die TNF- α -Expression an Tag 30 bei Patienten mit späterer Leukopenie höhere Werte (Median 15,1% vs. 8,1%, $p=0,077$). Die IMPDH-Aktivität an Tag 30 ist bei Patienten mit Leukopenie tendenziell niedriger als bei Patienten ohne (Median 31,2 vs. 53,5 $\mu\text{mol s}^{-1}\text{mol AMP}^{-1}$, $p=0,061$).

Die Zytokin-Expression ist an Tag 135 bei Patienten mit einer darauffolgenden Diarrhö signifikant höher (IL-2: 27,3% vs. 16,2% $p=0,001$ sowie TNF- α : 16,2% vs. 7,2%, $p=0,006$). Die CD71-Expression und die IMPDH-Aktivität sind zu diesem Zeitpunkt bei Patienten mit dieser Nebenwirkung signifikant niedriger (CD71: 7,5% vs. 15,4%, $p=0,002$ sowie IMPDH-Aktivität: 20,8 vs. 46,5 $\mu\text{mol s}^{-1}\text{mol AMP}^{-1}$, $p=0,039$).

Tab. 12: Unterschiede in der Biomarker-Expression vor im darauffolgenden Zeitraum auftretenden Nebenwirkungen

Zeitpunkt	Nebenwirkung	Biomarker	Ohne Nebenwirkung		Mit Nebenwirkung		p^*
			Median %	N	Median %	N	
Tag 90	Anämie	CD25	23,8	34	10,3	11	0,03
Tag 30	Leukopenie	TNF- α	8,1	30	15,1	11	0,077
Tag 30	Leukopenie	IMPDH	7,7	31	4,5	10	0,061
Tag 90	Leukopenie	IL-2	19	40	10,5	8	0,065
Tag 135	Diarrhö	IL-2	13,1	34	27,3	16	0,001
Tag 135	Diarrho	TNF- α	7,2	34	16,2	16	0,006
Tag 135	Diarrhö	CD71	15,4	32	7,5	17	0,002
Tag 135	Diarrhö	IMPDH	46,5	32	20,8	14	0,039

*Mann-Whitney-U-Test

4. Diskussion

Eine immunsuppressive Therapie muss engmaschig überwacht werden, um die mit ihr verbundenen Nebenwirkungen zu minimieren und so das Langzeitüberleben Transplantierter zu verbessern (42,79,108-110). Heute werden ausschließlich pharmakokinetische Parameter für das „Therapeutic Drug Monitoring“ herangezogen, um die Medikamentenkonzentration in einem therapeutischen Bereich zu halten. Die pharmakokinetischen Parameter geben jedoch keine Auskunft über das individuell schwankende Ausmaß der immunsuppressiven Wirkung. Ziel wäre es direkt den Effekt der Immunsuppressiva zu messen.

Die Messung pharmakodynamischer Biomarker soll zu einer Verbesserung des „Therapeutic Drug Monitoring“ führen. In dieser Arbeit wurden Biomarker unter zwei immunsuppressiven Kombinationstherapien explorativ untersucht. Ziel war es, den zeitlichen Verlauf der erhobenen Biomarker unter Immunsuppression nach der Transplantation sowie dessen Zusammenhang zu pharmakokinetischen Parametern zu untersuchen und statistische Zusammenhänge der Biomarker-Expressionen mit später auftretenden Nebenwirkungen zu überprüfen.

Im ersten Teil der Diskussion wird die anhand der Biomarker gemessene immunologische Funktion über den Studienzeitraum bis zur Randomisation diskutiert. Anschließend geschieht dies vergleichend für die Studiengruppen nach Randomisation. Am Ende werden die gefundenen Zusammenhänge der Biomarker untereinander bzw. mit den PK-Parametern bewertet.

Der zweite Teil der Diskussion widmet sich klinischen Nebenwirkungen und laborchemischen Veränderungen in beiden Studiengruppen. Abschließend werden die beobachteten Zusammenhänge zwischen Biomarkern und Nebenwirkungen diskutiert.

4.1 Biomarker-Verlauf bis zur Randomisation

Alle gemessenen PD-Biomarker werden unmittelbar nach der Transplantation durch die Immunsuppressiva stark gehemmt. Eine Ähnlichkeit im Verhalten der Biomarker untereinander mit Ausnahme der IMPDH-Aktivität ist über den gesamten Zeitraum bis zur Randomisation erkennbar. Dem signifikanten Einbruch unmittelbar nach Transplantation mit Erreichen des absoluten Minimums an Tag 11 folgt bis zur Randomisation eine Erholung unterschiedlichen Ausmaßes. Der Verlauf nach der Randomisation ist hingegen je nach Biomarker und Studiengruppe verschieden.

Die maximale Hemmung unmittelbar nach Transplantation ist auf die immunsuppressive Kombinationstherapie zurückzuführen, die wegen des großen Risikos einer akuten Abstoßung initial hochdosiert gegeben wird (23,42). Da sich im weiteren Verlauf nach der Transplantation das Abstoßungsrisiko infolge von Anpassungsvorgängen zwischen Transplantat und Empfänger verringert, wird die Dosis der Immunsuppressiva kontinuierlich gesenkt, was die Erholung der Biomarker erklärt (23,42). So wurde die durchschnittliche CyA-Talspiegelkonzentration von etwa 230ng/ml an Tag 11 nach Transplantation auf etwa 140ng/ml zum Randomisationstag reduziert. Die durchschnittlichen Tagesdosen der Kortikoide und des EC-MPS sind von 80mg bzw. 1440mg an Tag 4 auf 5mg bzw. 1300mg an Tag 90 gesenkt worden.

Das Ausmaß der maximalen relativen Hemmung zum Ausgangswert der Biomarker durch die Talspiegelkonzentration ist unterschiedlich und ergibt aufsteigend die Reihenfolge: IMPDH-Aktivität (51%), TNF- α (65%), IL-2 (67%), CD71 (79%), CD25 und lymphozytäre Proliferationsrate (je 94%). Dieser Unterschied beruht, wie im Folgenden diskutiert, auf der Wirkung der einzelnen Immunsuppressiva und deren synergistischer Effekte bedingt durch die physiologisch gegebenen Abhängigkeiten der Biomarker im Aktivierungsweg der T-Lymphozyten (9,23,81,82).

IMPDH-Aktivität

Die IMPDH ist für die DNA-Synthese im proliferierenden Lymphozyten essentiell. Die vor Medikamenteneinnahme gemessene IMPDH-Aktivität halbiert sich initial und bleibt bis zum Studienende auf diesem Niveau. Diese Hemmung wird ausschließlich durch die Mycophenolsäure hervorgerufen (35,48,111). Verglichen mit den anderen Immunsuppressiva bleibt die EC-MPS-Dosis nahezu unverändert (1440mg/d vs. 1300mg/d), was diesen konstanten Verlauf erklärt. Dies ist ein Hinweis, dass die IMPDH-Aktivität durch die anderen Immunsuppressiva nicht in bemerkenswertem Ausmaß gehemmt wird und für MPA spezifisch ist.

Intrazelluläre Zytokine

Die intrazellulären Zytokine IL-2 und TNF- α werden von T-Zellen zur Aktivierung benötigt. Die beiden Biomarker IL-2 und TNF- α stehen am Beginn der Signal-Kaskade zur Lymphozytenaktivierung. Sie werden durch Signale vom T-Zell-Rezeptor CD3 und kostimulatorische Signale aktiviert. Abgesehen von CyA und Methylprednisolon, die die Transkription hemmen, wirken die anderen eingesetzten Immunsuppressiva nicht in diesem ersten Abschnitt der T-Zell-Aktivierung.

IL-2 ist an der Lymphozytenaktivierung essentiell beteiligt (100). Die IL-2-Synthese wird in vitro durch CyA gehemmt, bleibt jedoch von MPA, mTOR-Inhibitoren oder Methylprednisolon in vitro unbeeinflusst (49,85,112-115). Daher ist die Hemmung der IL-2-Expression weitgehend auf die CyA-Wirkung zurückzuführen und geringer gehemmt als Biomarker, die der synergistischen Hemmung mehrerer Immunsuppressiva unterliegen. Einen dosisabhängigen CyA-Einfluss auf die IL-2-Expression haben Böhler et al. 2007 in vitro gezeigt (85).

Die IL-2-Expression steigt bis zur Randomisation in stärkerem Ausmaß als alle anderen Biomarker an. Dies ist wahrscheinlich auf die reduzierte CyA-Dosis und dem dadurch gesenkten Talspiegel (von 230ng/ml auf 140ng/ml) zurückzuführen. Eine konstante Antigenpräsenz durch das Spenderorgan bewirkt eine zunehmende Anergie der T-Zellen des Empfängers gegenüber IL-2 (23,43). Ein dadurch ausbleibendes Feedback auf die Aktivierung durch das IL-2-induzierte Signal ist ebenfalls für eine Erhöhung der IL-2-Synthese als Ursache denkbar.

Die TNF- α -Expression wird ebenfalls durch CyA inhibiert (116,117). Betrachtet man die relativen Werte entspricht diese von uns beobachtete Inhibition in etwa der von IL-2 (116). TNF- α aktiviert NF κ B, das zusammen mit NFAT die IL-2-Synthese reguliert (26). NF κ B wird auch durch Calcineurin aktiviert und beeinflusst die IL-2- und IL-2-Rezeptor-Synthese positiv (52,103,118,119).

Die TNF- α -Expression steigt bis zur Randomisation ebenfalls auf die Hälfte des Ausgangswertes an. Dies ist wahrscheinlich ebenfalls auf die reduzierte CyA-Dosis zurückzuführen, da die TNF- α -Expression durch Calcineurin wie von Böhler et al. 2007 gezeigt dosisabhängig beeinflusst wird (85).

Oberflächenaktivierungsmarker

Die Oberflächenaktivierungsmarker werden von aktivierten T-Zellen exprimiert. Sie sind nach der Transplantation stark gehemmt und erreichen zur Randomisation etwa die Hälfte des Ausgangswertes.

Die Expressionshemmung der Oberflächenaktivierungsmarker fällt stärker aus als die der Zytokine. Barten et al. zeigten 2003 in vitro am Blut gesunder Probanden, dass verschiedene Kombinationen einen unterschiedlichen Einfluss auf die CD25-Expression bzw. Proliferationsrate haben (88). Dies zeigt, dass unter einer immunsuppressiven Therapie je nach verwendeter Dosierung und Kombination der Medikamente eine Verstärkung oder auch Abschwächung einer erwarteten Einzelwirkung

eintreten kann. Dies hebt die Nützlichkeit pharmakodynamischer Messungen hervor. So verstärkt eine Kombination aus Tacrolimus und MPA die Inhibition der CD25-Expression im Vergleich zur Einzeltherapie (88). Eine dosisabhängige Hemmung der CD25- bzw. CD71-Expression durch CyA, Sirolimus, Methylprednisolon und MPA wurde für jede Substanz einzeln *in vitro* gezeigt (85,91,120). Barten et al. 2005 zeigten *in vitro* an Rattenblut unter einer Kombination von CyA und MPA eine stärkere Hemmung der CD25-Expression und Proliferationsrate als unter CyA allein (121). Böhler et al haben eine dosisabhängige Hemmung der CD71-Expression durch CyA, MPA und Sirolimus *in vitro* nachgewiesen (85).

Die im Vergleich zur Erholung von CD71 stärkere Erholung von CD25 ist wahrscheinlich auf die ausklingende Wirkung von Basiliximab und einer in diesem Zeitraum steigenden IL-2-Expression zurückzuführen (22,23,122). Basiliximab ist ein chimärer monoklonaler nicht-depletierender Antikörper, der an den IL-2-Rezeptor bindet und mit dem Antikörper bei der Färbung konkurriert (22,46,122). So haben Praditpronsilpa et al. eine über 12 Wochen bestehende CD25-Inhibition nach zweimaliger Basiliximab-Gabe (je 20mg) beobachtet (122).

Bis zur Randomisation steigt die Expression der Oberflächenaktivierungsmarker CD25 und CD71, ebenfalls wie bei den intrazellulären Zytokinen, auf die Hälfte des Ausgangswertes an. Diese Erholung der Aktivierungsmarker-Expression geht mit der bereits geschilderten reduzierten Immunsuppression in diesem Zeitraum einher.

Lymphozytäre Proliferationsrate

Die Aktivierung der T-Zelle endet mit ihrer Proliferation. Die lymphozytäre Proliferationsrate beinhaltet auch B-Zellen, die jedoch nur etwa 10% der Lymphozyten ausmachen. Die lymphozytäre Proliferationsrate wird initial massiv gehemmt und steigt zum Randomisationszeitpunkt auf ein Viertel des Ausgangswertes.

Die lymphozytäre Proliferationsrate wird von allen gemessenen Biomarkern nach der Transplantation am stärksten gehemmt und erholt sich bis zur Randomisation am wenigsten. Da sich dieser Biomarker am Ende der Aktivierungskaskade befindet und den anderen erhobenen Biomarkern im Aktivierungsweg nachgeschaltet ist, zeigt dieser Biomarker möglicherweise am besten den Gesamteffekt der immunsuppressiven Kombinationstherapie (81,82). Bereits unter Einzelanwendung *in vitro* zeigt sich die Proliferationshemmung durch MPA, CyA, Sirolimus und Methylprednisolon (85,88,91,123-125). Barten et al. 2003 haben die lymphozytäre Proliferation *in vitro* in

einer Kombination aus einem CNI und MPA gemessen (88). Sie zeigten dabei eine additive Verstärkung der Proliferationshemmung bei niedriger MPA-Konzentration und eine gegenteilige Wirkung bei höherer MPA-Konzentration gegenüber der Monotherapie mit CyA (88). Die Kombination aus MPA und Sirolimus war stets additiv (88). Dies verdeutlicht, dass die immunologische Funktion, gemessen anhand der Biomarker, von der Kombination und Dosis der eingesetzten Immunsuppressiva abhängig und bisher schlecht vorhersehbar ist. In unserer Studie sind die Effekte unter einer immunsuppressiven Medikation bestehend aus CyA und MPA mit zusätzlichem Einsatz von Methylprednisolon und einer vorherigen Induktionstherapie noch stärker ausgeprägt als unter in vitro Bedingungen bei Barten et al. 2003 (Proliferationshemmung: 94% vs. 80%, CD25: 94% vs. 75%) (85,88).

4.2 Vergleich des studienarmabhängigen Biomarker-Verlaufs

Die Biomarker-Expression ist nach der Randomisation je nach Studienarm unterschiedlich.

IMPDH-Aktivität

Die IMPDH-Aktivität vor MPA-Einnahme ist in der CyA-Gruppe höher als in der Evl-Gruppe. Die in der CyA-Gruppe vorliegende IMPDH-Aktivität liegt im Bereich der von Budde et al. erhobenen Daten an sechs Nierentransplantierten unter einer Immunsuppression mit 1g/d Mycophenolat Mofetil (MMF) (34). Die kleine Diskrepanz der Messwerte beruht auf den in der vorliegenden Studie höheren Dosen (1200-1300mg/d), einer anderen Galenik (Budde: MMF, hier: EC-MPS) und der geringeren Fallzahl. CyA fördert den MPA-Abbau und hemmt die Wiederaufnahme aus dem enterohepatischen Kreislauf, wodurch niedrigere MPA-Spiegel unter CyA Therapie beobachtet werden (126,127). Kreis et al. beobachtete eine Zunahme der Nebenwirkungen unter Evl und MPA (128), die vermutlich auf die höhere MPA-Blutspiegel zurückzuführen sein könnten.

Intrazelluläre Zytokine

Die IL-2-Expression zeigt keine Unterschiede zwischen den Gruppen. Die Calcineurin-Hemmung durch CyA besteht weiterhin, wohingegen Evl keinen Effekt auf die IL-2-Synthese hat (85). Die IL-2-Expression sollte theoretisch in der CyA-Gruppe niedriger sein als nach dem Absetzen von CyA in der Evl-Gruppe.

Betrachtet man die Messzeitpunkte vor Randomisation und 6 Wochen danach, so spiegelt sich dieses aus der Theorie abgeleitete Verhalten tendenziell auch im unterschiedlichen Verhalten beider Studiengruppen wieder, erreicht jedoch keine statistische Signifikanz. Entsprechend zeigt die Evt-Gruppe eine höhere IL-2-Expression (30%) als die CyA-Gruppe (22%). Die gemessene IL-2-Expression in der CyA-Gruppe von 22% deckt sich gut mit den Ergebnissen von Böhler et al., der an 5 Patienten einmalig (13 bis 188 Monate nach Nierentransplantation) unter einer Therapie mit CyA (191mg/d, Talspiegel 103ng/ml) und EC-MPS (1080mg/d) einen Anteil IL-2-positiver T-Zellen von 23,6% gemessen hat (85). Das Ergebnis von Stalder et al., der an 8 Nierentransplantierten unter einer Therapie mit CyA, MMF und Prednisolon etwa 30 Monate nach Transplantation einen Anteil IL-2-positiver T-Zellen von 15% gemessen hat, liegt ebenfalls in unserem Messbereich (129).

Die TNF- α -Expression zeigt keine Unterschiede zwischen den Gruppen. Die Höhe der gemessenen TNF- α -Expression in der CyA-Gruppe (16,2%) ist vergleichbar mit Böhler et al. (21,3%) bzw. Stalder et al. (25%) (85,129). Die Unterschiede sind möglicherweise auf den späteren Messzeitpunkt nach der Transplantation in diesen Studien, interindividuelle Schwankungen oder unterschiedliche Stimulantien bzw. Messmethoden zurückzuführen. Die CyA-Serumkonzentrationen unterscheiden sich nicht wesentlich: Böhler: 103ng/ml, Stalder: 122ng/ml, hier: 113ng/ml (85,129). Die MMF-Tagesdosis ist bei Stalder mit etwa 1025mg etwas geringer als in der vorliegenden Studie, in der durchschnittlich 1200mg pro Tag verabreicht wurden (129).

Oberflächenaktivierungsmarker

Die CD25-Expression weist zwischen den beiden Studienarmen keine signifikanten Unterschiede auf. Die gemessene CD25-Expression (29,2%) in der CyA-Gruppe liegt im Bereich von Böhler et al. (25,1%) und Stalder et al. (29%) (85,129).

Die CD71-Expression ist in der CyA-Gruppe signifikant höher als in der Evt-Gruppe. Die erhobene CD71-Expression (21,3%) liegt zwischen den von Böhler et al. (16,6%) und Stalder et al. (24%) gemessenen Werten (85,129). Es fällt auf, dass trotz annähernd gleicher Blutkonzentration von CyA (117ng/ml, Böhler: 103ng/ml, Stalder 122ng/ml) die Werte bei Böhler et al. niedriger und bei Stalder et al. höher als in der vorliegenden Studie sind (85). Diese Unterschiede können durch die Fallzahl (Böhler: N=5, Stalder: N=8, hier: N=22) und den späteren Messzeitpunkt verursacht worden sein (85,129). Die von Barten et al. 2003 in vitro und von Böhler et al. in vivo beobachtete stärkere CD71- als CD25-Hemmung durch Sirolimus konnte von uns auch

beim Sirolimus-Derivat Everolimus beobachtet werden (85,88). Vermutlich hemmt das an FKBP-12 gebundene Evi die iron-response-element-binding-proteins oder die CD71-Synthese direkt.

Lymphozytäre Proliferation

Die lymphozytäre Proliferationsrate ist generell stark gehemmt. Außerdem ist die Proliferationsrate in der Evi- tendenziell niedriger als in der CyA-Gruppe. Evi hemmt das durch IL-2 und CD25 induzierte Enzym „mTOR“ und damit über das Enzym „p70S6-Kinase“ die PCNA-Synthese (31,124,130,131). Das Signifikanzniveau ist vermutlich aufgrund der starken Hemmung in beiden Gruppen nicht erreicht.

4.3 Korrelation der erhobenen Biomarker

Die starken Zusammenhänge zwischen IL-2- und TNF- α -Expression bzw. zwischen CD25-Expression, CD71-Expression und Proliferationsrate können zum einen auf deren gemeinsame physiologischen Aktivierungswege und zum anderen deren gemeinsame Stimulation und anschließende Bestimmung aus derselben Probe zurückgeführt werden.

Die TNF- α - und IL-2-Expression zeigen eine starke Korrelation zueinander. Zwei Signale werden für die T-Zell-Aktivierung benötigt: Über den T-Zell-Rezeptor wird Calcineurin und damit NFAT aktiviert (23,47,132,133). Das kostimulatorische Signal besteht in der Aktivierung von NF κ B über den TNF-Rezeptor-1 (24,132). NFAT und NF κ B sind Transkriptionsfaktoren, die die IL-2-Synthese starten (26,47,132,133). Sowohl TNF- α als auch NFAT sind somit an der IL-2-Synthese beteiligt, was diesen Zusammenhang gut erklären kann.

Über den IL-2-Rezeptor wird die p70S6-Kinase aktiviert, die wiederum die PCNA-Synthese aktiviert (31). Diese Aktivierung über den CD25-Rezeptor erfolgt einerseits direkt über RAS und andererseits indirekt über mTOR (31). Der Transferrin-Rezeptor, CD71, reguliert den intrazellulären Eisengehalt und wird seinerseits durch IL-2 und CD25 reguliert (37,134-136). Sowohl CD71, IMPDH, Ribonukleotid-Reduktase als auch PCNA sind für die eigentliche Zellproliferation notwendig. Während CD71 das Eisen zur DNA-Synthese bereitstellt, sorgen IMPDH und Ribonukleotid-Reduktase für die Purin-Synthese und PCNA reguliert zum einen die DNA-Reparatur und zum anderen die DNA-Synthese und damit das Voranschreiten in der Mitose von der S- in die G₂-Phase (32,35,37,38).

Die IMPDH-Aktivität vor Medikamenteneinnahme zeigt keine direkte Korrelation mit den erhobenen Parametern, insbesondere nicht mit der Proliferationsrate. Dies ist möglicherweise zum einen durch die unterschiedliche Stimulationstechnik der Assays und zum anderen mit einem Schwellenwert erklärbar, der für den Proliferationsstart benötigt durch die IMPDH-Hemmung jedoch nicht erreicht wird. Die IMPDH-Hemmung zu anderen Zeitpunkten nach Einnahme könnte ein besseres Abbild liefern.

4.4 Korrelation zwischen PK und PD

Die einfache Korrelation zwischen den Biomarkern und der Vortagesdosierung bzw. Medikamentenkonzentration im Blut zeigt keine starken Zusammenhänge. Dies ist vermutlich auf individuelle Unterschiede oder auch auf synergistische Effekte zwischen den immunsuppressiven Medikamenten zurückzuführen, die einen einfachen Zusammenhang verzerren.

Vor der Randomisation sind die Korrelationen stärker ausgeprägt als danach. Dies wird u. a. durch die Fallzahl verursacht, die um 75% kleiner als vor der Randomisation ist. Die Prednisolondosis zeigt vor der Randomisation eine erkennbare Korrelation zur CD25- und CD71-Expression und Proliferationsrate. Die Produktion dieser Biomarker wird aufgrund der ersten beiden Aktivierungssignale initiiert, jedoch blockieren Kortikoide deren Produktion durch Hemmung der Gentranskription (137). Dieser Zusammenhang ist jedoch nach der Randomisation deutlich vermindert. Dies liegt möglicherweise an der reduzierten Prednisolon-Dosis. So hemmen Kortikoide die Antikörperproduktion erst in hoher Dosis, was auch für die Gentranskription immunologischer Aktivierungssignale gelten könnte (137).

Die CyA- und EC-MPS-Dosis sowie die MPA-Talspiegelkonzentrationen zeigen vor Randomisation ebenfalls Zusammenhänge mit der CD25- und CD71-Expression und Proliferationsrate, die jedoch deutlich schwächer als bei Prednisolon sind. In dieser Zeit sind die Dosierungen noch höher als nach der Randomisation.

Nach der Randomisation zeigt die MPA-Talspiegelkonzentration im Cyclosporin-Arm eine deutliche Korrelation mit der Proliferationsrate, der IMPDH-Aktivität, der CD25- und CD71-Expression. Im Evl-Arm zeigt sich dies für die Proliferationsrate und schwächer für die IMPDH-Aktivität. Zwischen der IL-2- und TNF- α -Expression besteht zu keinem pharmakodynamischen Parameter ein Zusammenhang. Barten et al. 2005 haben an Herztransplantierten Patienten unter einer Immunsuppression aus

CyA mit MPA stärkere Korrelationen zwischen Talspiegelkonzentration, der Konzentration zwei Stunden nach Einnahme und pharmakodynamischen Parametern erhalten (117). Die unterschiedlichen Ergebnisse können auf verschiedene Patientenkollektive, Messzeitpunkte, Medikamentenregime und Zeiträume nach Transplantation zurückzuführen sein. So sind unsere Patienten im Gegensatz zu Barten et al. 2005 nicht in der stabilen Phase sondern de novo transplantiert. Sie haben neben CyA und MPA auch Prednisolon und Basiliximab erhalten und wurden renal und nicht cardial transplantiert. Außerdem korreliert Barten et al. 2005 mit der CyA-Konzentration zwei Stunden nach Einnahme (117).

4.5 studienarmabhängige Nebenwirkungen und laborchemische Veränderungen

In dieser Substudie waren wie auch in der Hauptstudie die Vorerkrankungen zwischen den Studienarmen ähnlich häufig (92). Die drei häufigsten Vorerkrankungen (Elektrolytstörungen, Anämie und Stoffwechselerkrankungen) in beiden Studiengruppen spiegeln die Auswirkungen einer terminalen Niereninsuffizienz wieder und verdeutlichen die Indikation zur Nierentransplantation (1).

Diarrhö, Anämie, Leukopenie und Proteinurie sind als Nebenwirkungen der Studienmedikation bekannt. CyA verursacht Diabetes mellitus, Hypertonie und Hyperlipidämie, ist nephrotoxisch und wird als ein möglicher Entstehungsfaktor der chronischen Transplantatdysfunktion angesehen (21,23,39). MPA verursacht mit steigender oraler Dosierung zunehmend Diarrhö, Anämie und Leukopenie (9,23,34,138,139). Evtl kann eine Proteinurie, Wundheilungsstörungen, eine Hyperlipidämie und Thrombozytopenie verursachen (9,23,140).

Die Nebenwirkungen sind ebenfalls ohne signifikante Unterschiede zwischen den Studienarmen aufgetreten. Am häufigsten waren Ödeme und Nierenfunktionsstörungen, Wundheilungsstörungen, Diarrhö, Anämie, Leukopenie und Proteinurie. Ödeme, Nierenfunktions- und Wundheilungsstörungen sind als Nachwirkungen der Transplantation zu sehen, da sie insbesondere in der postoperativen Phase, bis 30 Tage nach Transplantation aufgetreten sind. Albano et al. haben an Nierentransplantierten die Häufigkeit von Nierenfunktions- und Wundheilungsstörungen zwischen zwei unterschiedlichen Immunsuppressionregimen verglichen (141). Die eine Gruppe hat Evtl unmittelbar postoperativ, die andere Gruppe in den ersten fünf Wochen nach

Transplantation MPA und danach Evl erhalten (141). Albano et al haben keine Unterschiede zwischen den Gruppen entdeckt (141).

Einige laborchemische Messparameter weisen je nach Studienarm Unterschiede auf. Die Laborparameter Hämoglobin und Thrombozytenanzahl im EDTA-Blut sowie Glukose im Serum und der glykosylierte Anteil des Hämoglobins (HbA_{1c}) im EDTA-Blut zeigen keinen Unterschied zwischen den Studiengruppen.

Der Abfall der Kreatininkonzentration im Blut unmittelbar nach der Transplantation zeigt den Erfolg der Nierentransplantation. Die nach der Randomisation niedrigere Kreatininkonzentration in der Evl-Gruppe ist auf das Absetzen von CyA und die wegfallende Vasokonstriktion zurückzuführen (39,142).

Die Erythrozytenzahl ist im Evl-Arm am Ende der Studie höher als im CyA-Arm, dagegen sind das mittlere korpuskuläre Volumen und mittlere korpuskuläre Hämoglobin in der Evl-Gruppe tendenziell niedriger als in der CyA-Gruppe. Diese Ergebnisse zeigen das Vorliegen einer mikrozytären Anämie, die bereits Kreis et al. unter der Kombination mit Sirolimus plus Mycophenolsäure häufiger als unter der Kombination mit CyA plus MPA beobachtet haben (43% vs. 29%) (128). Mikrozytäre Erythrozyten hat Cahill et al. bei Lungentransplantierten entdeckt, die mit Sirolimus behandelt worden sind (143). Sanchez-Fructoso et al. haben mikrozytäre Erythrozyten und eine verringerte Transferrin-Sättigung bei der Umstellung auf Evl beobachtet, die über einen Zeitraum von 6 Monaten bestehen blieben und sich danach normalisierten (59). Die verringerte Transferrin-Sättigung könnte durch die beobachtete Hemmung der Transferrin-Rezeptor-Expression erklärt werden, die zu einer verminderten Eisenaufnahme in die Zelle und damit eine niedrigere Proliferation verursacht (37). Transferrin transportiert Eisen im Blut und wird durch den Transferrin-Rezeptor (CD71) in die Zellen verbracht. Die CD71-Expression ist auch für die Erythropoese essentiell, um das für die Hämoglobinsynthese benötigte Eisen in die Zellen aufzunehmen (37). Wenn der intrazelluläre Eisengehalt vermindert ist, wird die Transferrin-Rezeptor-mRNA stabilisiert und CD71 exprimiert (38). Eisen ist für die Zellproliferation wichtig (38,134), da es für das Enzym Ribonukleotid-Reduktase essentiell ist (37,144,145). Möglicherweise bindet der mTOR/FKBP-12-Komplex an iron-response-element bindende Proteine, die die Transferrin-Rezeptor-mRNA stabilisieren, und verhindert dadurch die CD71 Transkription.

Die Leukozytenzahl ist im Evl-Arm niedriger als im CyA-Arm. Dies ist vielleicht auf die Proliferationshemmung durch die beiden Proliferationshemmer Evl und MPA zurück-

zuführen. Dieser Unterschied ist klinisch nicht relevant. Die Evl-Gruppe zeigt wie in der Hauptstudie auch nach der Randomisation eine stärkere Proteinurie als die CyA-Gruppe. Diese Nebenwirkung ist für mTOR-Inhibitoren mehrfach beschrieben worden (23,140-142,146-152).

Die bekannten Immunsuppressiva steigern wahrscheinlich das kardiovaskuläre Risiko durch Zunahme von arterieller Hypertonie, Diabetes mellitus und Hyperlipidämie (5,6,47,60,137,153,154). Unsere Studie zeigt erhöhte Lipidwerte (Triglyzeride, Gesamt-, HDL- und LDL-Cholesterin) in beiden Studienarmen. Ein je nach Immunsuppressivum unterschiedliches Auftreten kardiovaskulärer Risikofaktoren wie sie in der Literatur beschrieben sind, zeigt sich dabei nicht. Eine zu geringe Fallzahl und eine lipidsenkende Komedikation könnten dies erklären. Die mTOR-Inhibitoren zeigen möglicherweise günstige Effekte auf den Lipidstoffwechsel, da sie intrazelluläre Lipidspeicher leeren, Makrophagen in arteriosklerotischen Plaques eliminieren und Entzündungen unterdrücken (58). Ein kurzzeitiger Anstieg der Lipide im Evl-Arm wäre somit zu erwarten gewesen.

Der mit CNI und Glukokortikoiden auftretende Diabetes Mellitus lässt sich 6½ Monate nach Umstellung im Langzeitzucker-Wert erahnen. Im Gegensatz dazu ist die Glukosekonzentration weit unterhalb des oberen Normwertes.

4.6 Biomarker-Expression als Indiz für konsekutive Nebenwirkungen

Es ist ein Ziel dieser Arbeit gewesen, prognostische Aussagen zu ermöglichen, ob die Biomarker-Expression Unterschiede zu einem Zeitpunkt vor dem Eintreten von Nebenwirkungen zu beobachten sind.

Die CD25-Expression an Tag 90 ist bei Patienten mit konsekutiver Anämie niedriger. Die Wirkung von Basiliximab ist zu diesem Zeitpunkt bereits abgeklungen (122). Bereits in der Monotherapie wird die CD25-Expression durch die Mycophenolsäure gehemmt (85). Eine immunsuppressive Kombination aus MPA, CyA und Prednisolon scheint bei diesen Patienten eine besonders starke Wirkung zu entfalten.

Die Ergebnisse zeigen, dass die IL-2-Expression und die IMPDH-Aktivität tendenziell niedriger bei Patienten mit später auftretender Leukopenie sind. Im Gegensatz dazu ist die TNF- α -Expression bei dieser Nebenwirkung tendenziell höher. Sowohl die IL-2-Expression als auch die IMPDH-Aktivität müssen zur Proliferation in ausreichender Menge vorhanden sein (47,98). Je nach Zelltyp und dessen funktionellen Status kann TNF- α zu einer Proliferation (NF κ B bzw. TRAF) oder Apoptose (FADD/Kaspase

8) führen (27,155). Obwohl die TNF- α -Expression hoch ist, tritt eine Leukopenie auf. Vielleicht ist die proliferative Wirkung von TNF- α blockiert oder die apoptotische Wirkung von TNF- α aktiviert. Da NF κ B im Signalweg von Calcineurin liegt, könnte dessen Hemmung durch CyA ebenfalls zu einer verminderten Expression von NF κ B und einer damit verbundenen verringerten proliferativen Wirkung des TNF- α geführt haben (23). Die TNF- α -Expression könnte somit aufgrund fehlender Rückkopplung durch NF κ B weiter angestiegen sein.

Bei Patienten mit später auftretender Diarrhö ist die TNF- α - und IL-2-Expression erhöht und die CD71-Expression und IMPDH-Aktivität vermindert. Das Darmepithel ist ein stark proliferierendes Gewebe, durch dessen Hemmung der Durchfall erklärt werden könnte. Die verminderte IMPDH-Aktivität könnte ein Hinweis auf eine Sensibilität gegenüber der MPA und die damit verbundene stärkere Wirkung sein. Individuelle Unterschiede der Metabolisierung der MPA sind bekannt (156-158). Dies erklärt auch die große Spannweite der beobachteten Häufigkeit der bekannten Nebenwirkung der Diarrhö (42-70%) unter MPA (156,159). Die CD71-Expression erfolgt nach vorheriger Aktivierung durch IL-2 bzw. TNF- α (136). Die CD71-Expression ist vermindert, was auf eine Blockierung des durch Zytokine induzierten Aktivierungsweges hindeuten kann. Durch ein ausbleibendes Feedback könnte somit die Zytokinexpression verstärkt werden.

4.7 Limitationen der Studie

Einige Limitationen müssen an dieser Studie benannt werden:

Die Stimulation durch Zugabe mitogener Substanzen unter Laborbedingungen ist artifiziell und entspricht den Bedingungen in vivo nur näherungsweise. Der Vorteil besteht in der Reproduzierbarkeit aufgrund standardisierter Verfahren. Der Nachteil der Methodik ist, dass keine alloantigen abhängige Reaktivität überprüft wird. Die Variabilität der immunologischen Assays kann die verlässliche Ergebnisauswertung ebenfalls erschweren. Die Variabilität der Assays ist in absteigender Reihenfolge wie folgt: TNF- α , IL-2, lymphozytäre Proliferation, CD71, CD25, IMPDH-Aktivität (85,93). Mehrere Mitarbeiter haben die FACS-Daten erhoben, sodass kleine interindividuelle Unterschiede bei der Durchführung zusätzlich diese Ergebnisse beeinflussen. Es konnten leider nicht alle vorgesehenen Messungen bei allen eingeschlossenen Patienten zu allen vorgegebenen Zeitpunkten durchgeführt werden.

Diese Studie ist als Substudie einer Hauptstudie geführt worden, sodass die Anzahl einzuschließender Patienten nicht beeinflussbar gewesen ist. Die unerwünschten Ereignisse wurden durch die Studienärzte erhoben. Sofern präventiv eine Begleitmedikation gegeben wurde, konnten die unerwünschten Ereignisse klinisch verborgen geblieben bleiben, wodurch die Zahl dieser Ereignisse vergrößert wäre.

Weiterhin ist eine Korrelation der Biomarker untereinander schwierig, da das Ausmaß der Expression durch die pharmakokinetischen Eigenschaften der Immunsuppressiva mitbestimmt wird. Das sich einstellende Gleichgewicht wird durch wechselnde Dosierungen und Applikationszeiten fortwährend verändert, sodass eine Untersuchung der Biomarker zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Medikamenteneinnahme vermutete Zusammenhänge besser darstellen würde.

5. Schlussfolgerung

Die vorliegende Studie gibt erste Hinweise, dass Biomarker zur Abbildung einer neu begonnenen immunsuppressiven Kombinationstherapie geeignet sind. Die Biomarker bilden darüberhinaus Unterschiede einer eingesetzten immunsuppressiven Kombinationstherapie ab.

Eine Veränderung der Biomarker-Expression ist in der Zeit unmittelbar nach der Transplantation durch die immunsuppressive Kombinationstherapie maximal gehemmt. Die an diese Zeit anschließende Erholung der Biomarker zeigt ein je nach Biomarker und Therapie individuelles Ausmaß. Das Ausmaß der Biomarker-Expression im Verlauf der Therapie kann einen Hinweis auf eine Nebenwirkung im weiteren Verlauf geben. Somit könnte man durch die Biomarker-Expression die Therapie dahingehend anpassen, dass das Eintreten dieser Nebenwirkung verhindert wird.

Die Steuerung einer immunsuppressiven Therapie durch Messung pharmakodynamischer Biomarker ist theoretisch ein guter Ansatz, da er den Effekt des Medikaments misst. Die Etablierung eines Referenzbereiches, der zur Therapiekontrolle benötigt wird, könnte jedoch aufgrund der hohen individuellen Schwankung der Biomarker lange dauern. Die Verfahren zur Detektion der Biomarker müssten dahingehend verfeinert werden, diese individuellen Schwankungen auszugleichen. Somit ist eine weitere Optimierung dieser Verfahren notwendig, um dieses Ziel zu verwirklichen und die Therapie und damit das Langzeitüberleben zu verbessern.

6. Literaturverzeichnis

1. Kuhlmann U, Walb D, Böhler J, Luft FC. Nephrologie. 5 ed. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, p. 1-662, 2008.
2. Carpenter CB, Milford EL, Sayegh MH. Transplantation in the treatment of renal failure. In: Kasper DL, Fauci AS, Longo DL, Braunwald E, Hauser SL, Jameson JL, eds. Harrison's principles of internal medicine. New York: Mc Graw Hill, p. 1668-1674, 2005.
3. Kunzendorf U, Renders L, Ziegler E. Chronic renal failure and transplantation. Internist (Berl) 48: 804-12, 2007.
4. Weidtmann B, Schunkert H. Kidney insufficiency and cardiovascular disease. Internist (Berl) 48: 770-8, 2007.
5. Collins AJ, Foley RN, Herzog C, et al. Excerpts from the United States Renal Data System 2008 Annual Data Report. Am J Kidney Dis 53: 1-374, 2009.
6. Frei U, Schober-Halstenberg H-J. Nierenersatztherapie in Deutschland - Bericht über Dialysebehandlung und Nierentransplantation in Deutschland 2006-2007. Berlin: Quasi Niere gGmbH, p. 1-64, 2008.
7. Niu SF, Li IC. Quality of life of patients having renal replacement therapy. J Adv Nurs 51: 15-21, 2005.
8. 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 341: 1725-30, 1999.
9. Budde K, Giessing M, Liefeldt L, Neumayer HH, Glander P. Modern immunosuppression following renal transplantation. Standard or tailor made? Urologe A 45: 9-17, 2006.
10. Satayathum S, Pisoni RL, McCullough KP, et al. Kidney transplantation and wait-listing rates from the international Dialysis Outcomes and Practice Patterns Study (DOPPS). Kidney Int 68: 330-7, 2005.

11. Knoll G. Trends in kidney transplantation over the past decade. *Drugs* 68 Suppl 1: 3-10, 2008.
12. Baid-Agrawal S, Frei UA. Living donor renal transplantation: recent developments and perspectives. *Nat Clin Pract Nephrol* 3: 31-41, 2007.
13. Hoogeveen RC, Ballantyne CM, Pownall HJ, et al. Effect of sirolimus on the metabolism of apo. *Transplantation* 72: 1244-50, 2001.
14. Winkelmayer WC, Weinstein MC, Mittleman MA, Glynn RJ, Pliskin JS. Health economic evaluations: the special case of end-stage renal disease treatment. *Med Decis Making* 22: 417-30, 2002.
15. Howard K, Salkeld G, White S, et al. The cost-effectiveness of increasing kidney transplantation and home-based dialysis. *Nephrology (Carlton)* 14: 123-32, 2009.
16. May J. Arterieller Blutdruck und Transplantatüberleben nach allogener Nierentransplantation. 4-117. 2008. Klinik für Nephrologie der Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin. 1-6-2008.

Ref Type: Thesis/Dissertation

17. Guild WR, Harrison JH, Merrill JP, Murray J. Successful homotransplantation of the kidney in an identical twin. *Trans Am Clin Climatol Assoc* 67: 167-73, 1955.
18. Murray G, Holden R. Transplantation of kidneys, experimentally and in human cases. *Am J Surg* 87: 508-15, 1954.
19. Harrison JH, Merrill JP, Murray JE. Renal homotransplantation in identical twins. *Surg Forum* 6: 432-6, 1956.
20. Merrill JP, Murray JE, Harrison JH, Guild WR. Successful homotransplantation of the human kidney between identical twins. *J Am Med Assoc* 160: 277-82, 1956.
21. Calne R. Cyclosporine as a milestone in immunosuppression. *Transplant Proc* 36: 13S-5S, 2004.
22. Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik M. *Immunobiology - The immune system in health and disease*. 5 ed. New York: Garland Publishing, p. 1-732, 2001.

23. Halloran PF. Immunosuppressive drugs for kidney transplantation. *N Engl J Med* 351: 2715-29, 2004.
24. Sharpe AH. Mechanisms of costimulation. *Immunol Rev* 229: 5-11, 2009.
25. Wang D, Matsumoto R, You Y, et al. CD3/CD28 costimulation-induced NF-kappaB activation is mediated by recruitment of protein kinase C-theta, Bcl10, and IkappaB kinase beta to the immunological synapse through CARMA1. *Mol Cell Biol* 24: 164-71, 2004.
26. Perl A, Gergely P, Jr., Puskas F, Banki K. Metabolic switches of T-cell activation and apoptosis. *Antioxid Redox Signal* 4: 427-43, 2002.
27. Zhou T, Mountz JD, Kimberly RP. Immunobiology of tumor necrosis factor receptor superfamily. *Immunol Res* 26: 323-36, 2002.
28. Rahman MM, McFadden G. Modulation of tumor necrosis factor by microbial pathogens. *PLoS Pathog* 2: e4, 2006.
29. Hehlgans T, Pfeffer K. The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. *Immunology* 115: 1-20, 2005.
30. Kahan BD. Individuality: the barrier to optimal immunosuppression. *Nat Rev Immunol* 3: 831-8, 2003.
31. Neuhaus P, Klupp J, Langrehr JM. mTOR inhibitors: an overview. *Liver Transpl* 7: 473-84, 2001.
32. Celis JE, Bravo R, Larsen PM, Fey SJ. Cyclin: a nuclear protein whose level correlates directly with the proliferative state of normal as well as transformed cells. *Leuk Res* 8: 143-57, 1984.
33. Gummert JF, Barten MJ, Sherwood SW, Van Gelder T, Morris RE. Pharmacodynamics of immunosuppression by mycophenolic acid: inhibition of both lymphocyte proliferation and activation correlates with pharmacokinetics. *J Pharmacol Exp Ther* 291: 1100-12, 1999.

34. Budde K, Braun KP, Glander P, et al. Pharmacodynamic monitoring of mycophenolate mofetil in stable renal allograft recipients. *Transplant Proc* 34: 1748-50, 2002.
35. Allison AC, Eugui EM. Mycophenolate mofetil and its mechanisms of action. *Immunopharmacology* 47: 85-118, 2000.
36. Rodwell VW. Metabolism of purine and pyrimidine nucleotides. In: Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW, eds. *Harper's Biochemistry*. New York: McGraw-Hill, p. 386-401, 2000.
37. Testa U, Kuhn L, Petrini M, Quaranta MT, Pelosi E, Peschle C. Differential regulation of iron regulatory element-binding protein(s) in cell extracts of activated lymphocytes versus monocytes-macrophages. *J Biol Chem* 266: 13925-30, 1991.
38. Rand ML, Murray RK. Plasma proteins, immunoglobulins, and blood coagulation. In: Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW, eds. *Harper's Biochemistry*. New York: McGraw-Hill, p. 737-762, 2000.
39. Waiser J, Schneider M, Eljazyfer S, et al. Profibrotic cytokines and lymphocyte proliferation in stable renal allograft recipients treated with or without cyclosporine A. *Clin Immunol* 119: 59-66, 2006.
40. Nankivell BJ, Borrows RJ, Fung CL, O'Connell PJ, Allen RD, Chapman JR. The natural history of chronic allograft nephropathy. *N Engl J Med* 349: 2326-33, 2003.
41. Yilmaz S, Sar A. Pathogenesis and management of chronic allograft nephropathy. *Drugs* 68 Suppl 1: 21-31, 2008.
42. Budde K, Glander P. Pharmacokinetic principles of immunosuppressive drugs. *Ann Transplant* 13: 5-10, 2008.
43. Schwartz RH. T cell anergy. *Annu Rev Immunol* 21: 305-34, 2003.
44. Sakaguchi S. Naturally arising CD4+ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev Immunol* 22: 531-62, 2004.
45. Warrens AN. On the horizon: tailor-made immunosuppression in renal transplantation. *Nephron Clin Pract* 94: c5-10, 2003.

46. Katzung BG, Lake DF, Akporiaye ET, Hersh EM. Basic & Clinical Pharmacology. 8 ed. Lange Medical Books/Mc Graw Hill, p. 959-986, 2001.
47. Allison AC. Immunosuppressive drugs: the first 50 years and a glance forward. Immunopharmacology 47: 63-83, 2000.
48. Carr SF, Papp E, Wu JC, Natsumeda Y. Characterization of human type I and type II IMP dehydrogenases. J Biol Chem 268: 27286-90, 1993.
49. Allison AC, Eugui EM. Immunosuppressive and other effects of mycophenolic acid and an ester prodrug, mycophenolate mofetil. Immunol Rev 136: 5-28, 1993.
50. Fritsche L, Dragun D, Neumayer HH, Budde K. Impact of cyclosporine on the development of immunosuppressive therapy. Transplant Proc 36: 130S-4S, 2004.
51. Hesselink DA, Smak Gregoor PJ, Weimar W. The use of cyclosporine in renal transplantation. Transplant Proc 36: 99S-106S, 2004.
52. Frantz B, Nordby EC, Bren G, et al. Calcineurin acts in synergy with PMA to inactivate I kappa B/MAD3, an inhibitor of NF-kappa B. EMBO J 13: 861-70, 1994.
53. Wiederrecht G, Lam E, Hung S, Martin M, Sigal N. The mechanism of action of FK-506 and cyclosporin A. Ann N Y Acad Sci 696: 9-19, 1993.
54. Dancey JE. Therapeutic targets: MTOR and related pathways. Cancer Biol Ther 5: 1065-73, 2006.
55. Hall MN. mTOR-what does it do? Transplant Proc 40: S5-S8, 2008.
56. Vodenik B, Rovira J, Campistol JM. Mammalian target of rapamycin and diabetes: what does the current evidence tell us? Transplant Proc 41: S31-S38, 2009.
57. Atkins MB, Yasothan U, Kirkpatrick P. Everolimus. Nat Rev Drug Discov 8: 535-6, 2009.
58. Jia L, Hui RT. Everolimus, a promising medical therapy for coronary heart disease? Med Hypotheses 73: 153-5, 2009.

59. Sanchez FA, Calvo N, Moreno MA, Giorgi M, Barrientos A. Study of anemia after late introduction of everolimus in the immunosuppressive treatment of renal transplant patients. *Transplant Proc* 39: 2242-4, 2007.
60. Kasiske BL, de Mattos A, Flechner SM, et al. Mammalian target of rapamycin inhibitor dyslipidemia in kidney transplant recipients. *Am J Transplant* 8: 1384-92, 2008.
61. Kahan BD, Wong RL, Carter C, et al. A phase I study of a 4-week course of SDZ-RAD (RAD) quiescent cyclosporine-prednisone-treated renal transplant recipients. *Transplantation* 68: 1100-6, 1999.
62. Liu Y, Zhou P, Han M, Xue CB, Hu XP, Li C. Basiliximab or antithymocyte globulin for induction therapy in kidney transplantation: a meta-analysis. *Transplant Proc* 42: 1667-70, 2010.
63. Miller BW, Brennan DC. UpToDate. Waltham, MA: UpToDate in Waltham, MA, 2010.
64. Srinivas TR, Meier-Kriesche HU. Minimizing immunosuppression, an alternative approach to reducing side effects: objectives and interim result. *Clin J Am Soc Nephrol* 3 Suppl 2: S101-S116, 2008.
65. Ojo AO, Held PJ, Port FK, et al. Chronic renal failure after transplantation of a non-renal organ. *N Engl J Med* 349: 931-40, 2003.
66. Flechner SM. Minimizing calcineurin inhibitor drugs in renal transplantation. *Transplant Proc* 35: 118S-21S, 2003.
67. Barbari AG, Stephan AG, Masri MA. Calcineurin inhibitor-free protocols: risks and benefits. *Saudi J Kidney Dis Transpl* 18: 1-23, 2007.
68. Gallagher MP, Hall B, Craig J, Berry G, Tiller DJ, Eris J. A randomized controlled trial of cyclosporine withdrawal in renal-transplant recipients: 15-year results. *Transplantation* 78: 1653-60, 2004.
69. Gallagher M, Jardine M, Perkovic V, et al. Cyclosporine withdrawal improves long-term graft survival in renal transplantation. *Transplantation* 87: 1877-83, 2009.

70. Bestard O, Cruzado JM, Grinyo JM. Calcineurin-inhibitor-sparing immunosuppressive protocols. *Transplant Proc* 37: 3729-32, 2005.
71. Schnuelle P, van der Heide JH, Tegzess A, et al. Open randomized trial comparing early withdrawal of either cyclosporine or mycophenolate mofetil in stable renal transplant recipients initially treated with a triple drug regimen. *J Am Soc Nephrol* 13: 536-43, 2002.
72. Pascual M, Theruvath T, Kawai T, Tolkoff-Rubin N, Cosimi AB. Strategies to improve long-term outcomes after renal transplantation. *N Engl J Med* 346: 580-90, 2002.
73. Klupp J, Holt DW, Van Gelder T. How pharmacokinetic and pharmacodynamic drug monitoring can improve outcome in solid organ transplant recipients. *Transpl Immunol* 9: 211-4, 2002.
74. Brunet M, Millan O, Jimenez O, et al. New concepts in cyclosporine pharmacokinetic and dynamic monitoring: the impact of concomitant immunosuppression on target C2 concentrations. *Transplant Proc* 36: 437S-41S, 2004.
75. Grevel J, Welsh MS, Kahan BD. Cyclosporine monitoring in renal transplantation: area under the curve monitoring is superior to trough-level monitoring. *Ther Drug Monit* 11: 246-8, 1989.
76. Caruso R, Perico N, Cattaneo D, et al. Whole-blood calcineurin activity is not predicted by cyclosporine blood concentration in renal transplant recipients. *Clin Chem* 47: 1679-87, 2001.
77. Kahan BD, Shaw LM, Holt D, Grevel J, Johnston A. Consensus document: Hawk's Cay meeting on therapeutic drug monitoring of cyclosporine. *Clin Chem* 36: 1510-6, 1990.
78. Kahan BD, Grevel J. Optimization of cyclosporine therapy in renal transplantation by a pharmacokinetic strategy. *Transplantation* 46: 631-44, 1988.
79. Yatscoff RW, Aspeslet LJ. The monitoring of immunosuppressive drugs: a pharmacodynamic approach. *Ther Drug Monit* 20: 459-63, 1998.

80. Burkhart C, Heusser C, Morris RE, et al. Pharmacodynamics in the development of new immunosuppressive drugs. *Ther Drug Monit* 26: 588-92, 2004.
81. Oellerich M, Barten MJ, Armstrong VW. Biomarkers: the link between therapeutic drug monitoring and pharmacodynamics. *Ther Drug Monit* 28: 35-8, 2006.
82. Millan O, Urtasun N, Brunet M. Biomarkers of the immunomodulatory effect of immunosuppressive drugs in transplant recipients. *Transplant Rev (Orlando)* 23: 120-8, 2009.
83. Batiuk TD, Kung L, Halloran PF. Evidence that calcineurin is rate-limiting for primary human lymphocyte activation. *J Clin Invest* 100: 1894-901, 1997.
84. Sindhi R, Allaert J, Gladding D, Koppelman B, Dunne JF. Cytokines and cell surface receptors as target end points of immunosuppression with cyclosporine A. *J Interferon Cytokine Res* 21: 507-14, 2001.
85. Bohler T, Nolting J, Kamar N, et al. Validation of immunological biomarkers for the pharmacodynamic monitoring of immunosuppressive drugs in humans. *Ther Drug Monit* 29: 77-86, 2007.
86. Caruso A, Licenziati S, Corulli M, et al. Flow cytometric analysis of activation markers on stimulated T cells and their correlation with cell proliferation. *Cytometry* 27: 71-6, 1997.
87. Mascher B, Schlenke P, Seyfarth M. Expression and kinetics of cytokines determined by intracellular staining using flow cytometry. *J Immunol Methods* 223: 115-21, 1999.
88. Barten MJ, Dhein S, Chang H, et al. Assessment of immunosuppressive drug interactions: inhibition of lymphocyte function in peripheral human blood. *J Immunol Methods* 283: 99-114, 2003.
89. Birsan T, Dambrin C, Klupp J, Stalder M, Fitzsimmons WE, Morris RE. Effects of the malononitrilamide FK778 on immune functions in vitro in whole blood from non-human primates and healthy human volunteers. *Transpl Immunol* 11: 163-7, 2003.

90. Klupp J, Dambrin C, Hibi K, et al. Treatment by mycophenolate mofetil of advanced graft vascular disease in non-human primate recipients of orthotopic aortic allografts. *Am J Transplant* 3: 817-29, 2003.
91. Barten MJ, Gummert JF, Van Gelder T, Shorthouse R, Morris RE. Assessment of mechanisms of action of immunosuppressive drugs using novel whole blood assays. *Transplant Proc* 33: 2119-20, 2001.
92. Budde K, Becker T, Arns W, Sommerer C, Reinke P, Eisenberger U, Kramer S, Fischer W, Gschaidmeier H, Pietruck F. Everolimus-based, calcineurin-inhibitor-free regimen in recipients of de-novo kidney transplants: an open-label, randomised, controlled trial. *Lancet* 2011.
93. Glander P, Sombogaard F, Budde K, Van Gelder T, Hambach P, Liefeldt L, Lorkowski C, Mai M, Neumayer HH, Vulto AG, Mathot RA. Improved assay for the nonradioactive determination of inosine 5'-monophosphate dehydrogenase activity in peripheral blood mononuclear cells. *Ther Drug Monit* 31: 351-9, 2009.
94. Millan O, Brunet M, Campistol JM, et al. Pharmacodynamic approach to immunosuppressive therapies using calcineurin inhibitors and mycophenolate mofetil. *Clin Chem* 49: 1891-9, 2003.
95. 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* 272: 257-72, 2003.
96. Dambrin C, Klupp J, Morris RE. Pharmacodynamics of immunosuppressive drugs. *Curr Opin Immunol* 12: 557-62, 2000.
97. Klupp J, Dambrin C, Regieli J, Van Gelder T, Shorthouse R, Morris RE. New approach in drug development: whole blood pharmacodynamic assays reflect biological activities of tacrolimus. *Transplant Proc* 33: 2172, 2001.
98. 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* 35: 318-28, 1999.

99. Baran J, Kowalczyk D, Ozog M, Zembala M. Three-color flow cytometry detection of intracellular cytokines in peripheral blood mononuclear cells: comparative analysis of phorbol myristate acetate-ionomycin and phytohemagglutinin stimulation. *Clin Diagn Lab Immunol* 8: 303-13, 2001.
100. Kamber M. Phorbol myristate acetate-induced proliferation of an IL-2-dependent T-cell line: action of PMA is independent of IL-2 and cannot be mimicked by diacylglycerols. *Cell Immunol* 102: 177-86, 1986.
101. Ron D, Kazanietz MG. New insights into the regulation of protein kinase C and novel phorbol ester receptors. *FASEB J* 13: 1658-76, 1999.
102. Hopwood D. Fixatives and fixation: a review. *Histochem J* 1: 323-60, 1969.
103. Ginn-Pease ME, Whisler RL. Redox signals and NF-kappaB activation in T cells. *Free Radic Biol Med* 25: 346-61, 1998.
104. Sung SS, Bjorndahl JM, Wang CY, Kao HT, Fu SM. Production of tumor necrosis factor/cachectin by human T cell lines and peripheral blood T lymphocytes stimulated by phorbol myristate acetate and anti-CD3 antibody. *J Exp Med* 167: 937-53, 1988.
105. Imboden JB, Stobo JD. Transmembrane signalling by the T cell antigen receptor. Perturbation of the T3-antigen receptor complex generates inositol phosphates and releases calcium ions from intracellular stores. *J Exp Med* 161: 446-56, 1985.
106. Fujiwara T, Oda K, Yokota S, Takatsuki A, Ikehara Y. Brefeldin A causes disassembly of the Golgi complex and accumulation of secretory proteins in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 263: 18545-52, 1988.
107. Komada H, Nakabayashi H, Hara M, Izutsu K. Early calcium signaling and calcium requirements for the IL-2 receptor expression and IL-2 production in stimulated lymphocytes. *Cell Immunol* 173: 215-20, 1996.
108. Johnston A, Holt DW. Immunosuppressant drugs--the role of therapeutic drug monitoring. *Br J Clin Pharmacol* 52 Suppl 1: 61S-73S, 2001.

109. Oellerich M, Armstrong VW. The role of therapeutic drug monitoring in individualizing immunosuppressive drug therapy: recent developments. *Ther Drug Monit* 28: 720-5, 2006.
110. Del TM. Prospects for personalized immunosuppression: pharmacologic tools--a review. *Transplant Proc* 36: 687-9, 2004.
111. Franklin TJ, Cook JM. The inhibition of nucleic acid synthesis by mycophenolic acid. *Biochem J* 113: 515-24, 1969.
112. Fruman DA, Klee CB, Bierer BE, Burakoff SJ. Calcineurin phosphatase activity in T lymphocytes is inhibited by FK 506 and cyclosporin A. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 3686-90, 1992.
113. Allison AC, Eugui EM. Mechanisms of action of mycophenolate mofetil in preventing acute and chronic allograft rejection. *Transplantation* 80: S181-S190, 2005.
114. Quemeneur L, Flacher M, Gerland LM, Ffrench M, Revillard JP, Bonnefoy-Berard N. Mycophenolic acid inhibits IL-2-dependent T cell proliferation, but not IL-2-dependent survival and sensitization to apoptosis. *J Immunol* 169: 2747-55, 2002.
115. Thomson AW, Woo J, Yao GZ, Todo S, Starzl TE, Zeevi A. Effects of combined administration of FK 506 and the purine biosynthesis inhibitors mizoribine or mycophenolic acid on lymphocyte DNA synthesis and T cell activation molecule expression in human mixed lymphocyte cultures. *Transpl Immunol* 1: 146-50, 1993.
116. Barten MJ, Tarnok A, Garbade J, et al. Pharmacodynamics of T-cell function for monitoring immunosuppression. *Cell Prolif* 40: 50-63, 2007.
117. 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* 37: 1360-1, 2005.
118. Steffan NM, Bren GD, Frantz B, Tocci MJ, O'Neill EA, Paya CV. Regulation of I κ B alpha phosphorylation by PKC- and Ca(2+)-dependent signal transduction pathways. *J Immunol* 155: 4685-91, 1995.

119. Okamoto S, Mukaida N, Yasumoto K, et al. The interleukin-8 AP-1 and kappa B-like sites are genetic end targets of FK506-sensitive pathway accompanied by calcium mobilization. *J Biol Chem* 269: 8582-9, 1994.
120. Barten MJ, Gummert JF, Van Gelder T, Shorthouse R, Morris RE. 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* 253: 95-112, 2001.
121. Barten MJ, Shipkova M, Bartsch P, et al. Mycophenolic acid interaction with cyclosporine and tacrolimus in vitro and in vivo: evaluation of additive effects on rat blood lymphocyte function. *Ther Drug Monit* 27: 123-31, 2005.
122. Praditpornsilpa K, Avihingsanon Y, Kupatawintu P, et al. Monitoring of T-cell subsets in patients treated with anti-CD 25 antibody. *Transplant Proc* 36: 487S-91S, 2004.
123. 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 Transplant* 2: 719-32, 2002.
124. Song J, Salek-Ardakani S, So T, Croft M. The kinases aurora B and mTOR regulate the G1-S cell cycle progression of T lymphocytes. *Nat Immunol* 8: 64-73, 2007.
125. Barten MJ, Rahmel A, Chang H, et al. Assessment of immunosuppression by lymphocyte functions in human blood. *Transplant Proc* 34: 2876-7, 2002.
126. Van Gelder T, Klupp J, Barten MJ, Christians U, Morris RE. Comparison of the effects of tacrolimus and cyclosporine on the pharmacokinetics of mycophenolic acid. *Ther Drug Monit* 23: 119-28, 2001.
127. Hesselink DA, van Hest RM, Mathot RA, Bonthuis F, Weimar W, de Bruin RW, Van Gelder T. Cyclosporine interacts with mycophenolic acid by inhibiting the multidrug resistance-associated protein 2. *Am J Transplant* 5: 987-94, 2005.
128. Kreis H, Cisterne JM, Land W, et al. Sirolimus in association with mycophenolate mofetil induction for the prevention of acute graft rejection in renal allograft recipients. *Transplantation* 69: 1252-60, 2000.

129. Stalder M, Birsan T, Holm B, Haririfar M, Scandling J, Morris RE. Quantification of immunosuppression by flow cytometry in stable renal transplant recipients. *Ther Drug Monit* 25: 22-7, 2003.
130. Mehrabi A, Fonouni H, Kashfi A, et al. The role and value of sirolimus administration in kidney and liver transplantation. *Clin Transplant* 20 Suppl 17: 30-43, 2006.
131. Sehgal SN. Rapamune (RAPA, rapamycin, sirolimus): mechanism of action immunosuppressive effect results from blockade of signal transduction and inhibition of cell cycle progression. *Clin Biochem* 31: 335-40, 1998.
132. Macian F. NFAT proteins: key regulators of T-cell development and function. *Nat Rev Immunol* 5: 472-84, 2005.
133. Clipstone NA, Crabtree GR. Identification of calcineurin as a key signalling enzyme in T-lymphocyte activation. *Nature* 357: 695-7, 1992.
134. Pelosi E, Testa U, Louache F, et al. Expression of transferrin receptors in phytohemagglutinin-stimulated human T-lymphocytes. Evidence for a three-step model. *J Biol Chem* 261: 3036-42, 1986.
135. Trowbridge IS, Omary MB. Human cell surface glycoprotein related to cell proliferation is the receptor for transferrin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78: 3039-43, 1981.
136. Neckers LM, Cossman J. Transferrin receptor induction in mitogen-stimulated human T lymphocytes is required for DNA synthesis and cell division and is regulated by interleukin 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80: 3494-8, 1983.
137. Lake DF, Akporiaye ET, Hersh EM. Immunopharmacology. In: Katzung BG, ed. *Basic & Clinical Pharmacology*. Mc Graw Hill, p. 959-986, 2001.
138. European Mycophenolate Mofetil Cooperative Study Group. Placebo-controlled study of mycophenolate mofetil combined with cyclosporin and corticosteroids for prevention of acute rejection. *Lancet* 345: 1321-5, 1995.
139. Gummert JF, Ikonen T, Morris RE. Newer immunosuppressive drugs: a review. *J Am Soc Nephrol* 10: 1366-80, 1999.

140. Senior PA, Paty BW, Cockfield SM, Ryan EA, Shapiro AM. Proteinuria developing after clinical islet transplantation resolves with sirolimus withdrawal and increased tacrolimus dosing. *Am J Transplant* 5: 2318-23, 2005.
141. Albano L, Berthoux F, Moal MC, et al. Incidence of delayed graft function and wound healing complications after deceased-donor kidney transplantation is not affected by de novo everolimus. *Transplantation* 88: 69-76, 2009.
142. Bumbea V, Kamar N, Ribes D. Long-term results in renal transplant patients with allograft dysfunction after switching from calcineurin inhibitors to sirolimus. *Nephrol Dial Transplant* 20: 2517-23, 2005.
143. Cahill BC, Somerville KT, Crompton JA, et al. Early experience with sirolimus in lung transplant recipients with chronic allograft rejection. *J Heart Lung Transplant* 22: 169-76, 2003.
144. Thelander L, Graslund A. Mechanism of inhibition of mammalian ribonucleotide reductase by the iron chelate of 1-formylisoquinoline thiosemicarbazone. Destruction of the tyrosine free radical of the enzyme in an oxygen-requiring reaction. *J Biol Chem* 258: 4063-6, 1983.
145. Kucera R, Brown CL, Paulus H. Cell cycle regulation of ribonucleoside diphosphate reductase activity in permeable mouse L cells and in extracts. *J Cell Physiol* 117: 158-68, 1983.
146. Liefeldt L, Budde K. Risk factors for cardiovascular disease in renal transplant recipients and strategies to minimize risk. *Transpl Int* 23: 1191-204, 2010.
147. Bertoni E, Bruschi M, Candiano G, et al. Posttransplant proteinuria associated with everolimus. *Transplant Proc* 41: 1216-7, 2009.
148. Butani L. Investigation of pediatric renal transplant recipients with heavy proteinuria after sirolimus rescue. *Transplantation* 78: 1362-6, 2004.
149. Haller H, Richter N, Brocker V, Gwinner W, Gueler F, Schwarz A. Current problems of kidney transplantation. *Internist (Berl)* 50: 523-35, 2009.

150. Ibis A, Akgul A, Ozdemir N. Posttransplant proteinuria is associated with higher risk of cardiovascular disease and graft failure in renal transplant patients. *Transplant Proc* 41: 1604-8, 2009.
151. Merkel S, Mogilevskaja N, Mengel M, Haller H, Schwarz A. Side effects of sirolimus. *Transplant Proc* 38: 714-5, 2006.
152. Morales J, Fierro A, Benavente D, et al. Conversion from a calcineurin inhibitor-based immunosuppressive regimen to everolimus in renal transplant recipients: effect on renal function and proteinuria. *Transplant Proc* 39: 591-3, 2007.
153. Kasiske BL, Snyder JJ, Gilbertson DT, Wang C. Cancer after kidney transplantation in the United States. *Am J Transplant* 4: 905-13, 2004.
154. Kasiske BL, Snyder JJ, Gilbertson D, Matas AJ. Diabetes mellitus after kidney transplantation in the United States. *Am J Transplant* 3: 178-85, 2003.
155. Vallabhapurapu S, Karin M. Regulation and function of NF-kappaB transcription factors in the immune system. *Annu Rev Immunol* 27: 693-733, 2009.
156. Glander P, Hambach P, Braun KP, et al. Pre-transplant inosine monophosphate dehydrogenase activity is associated with clinical outcome after renal transplantation. *Am J Transplant* 4: 2045-51, 2004.
157. Langman LJ, Legatt DF, Halloran PF, Yatscoff RW. Pharmacodynamic assessment of mycophenolic acid-induced immunosuppression in renal transplant recipients. *Transplantation* 62: 666-72, 1996.
158. 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* 41: 470-6, 2003.
159. Mourad M, Malaise J, Chaib ED, et al. Pharmacokinetic basis for the efficient and safe use of low-dose mycophenolate mofetil in combination with tacrolimus in kidney transplantation. *Clin Chem* 47: 1241-8, 2001.

7. Anhang

7.1 Zusammenfassung

Die Nierentransplantation ist die beste Therapieoption des terminalen Nierenversagens, da das Überleben verglichen mit Dialyseverfahren länger ist. Die im Anschluss an eine Nierentransplantation notwendige lebenslängliche immunsuppressive Therapie reduziert wegen dosisabhängiger Nebenwirkungen die Langzeitprognose. Die engmaschige Therapieüberwachung mittels pharmakokinetischer Parameter zur Minimierung der Dosis lässt jedoch keine Rückschlüsse auf die Wirkung der Immunsuppressiva im Individuum zu, sodass Nebenwirkungen und Abstoßungen dennoch auftreten können. Dieser Rückschluss soll durch die Messung immunologischer Funktionen durch pharmakodynamische Parameter (Biomarker) ermöglicht werden.

In dieser Studie wurden de novo Nierentransplantierte nach Basiliximab-Induktion mit einer Dreifach-Immunsuppression aus Cyclosporin, Mycophenolat-Natrium und Methylprednisolon behandelt. Nach Randomisation an Tag 135 nach Transplantation wurde die eine Hälfte der Patienten von Cyclosporin auf Everolimus unter Beibehaltung der immunsuppressiven Komedikation umgestellt und die andere Hälfte fortgeführt. Zu unterschiedlichen Messzeitpunkten nach Transplantation ist die Expression der Zytokine Interleukin-2 (IL-2) und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) in T-Zellen, der Oberflächenrezeptoren CD25 und CD71 auf T-Zellen und die lymphozytäre Proliferationsrate mittels Durchflusszytometrie (FACS) sowie die Inosinmonophosphatdehydrogenase (IMPDH)-Aktivität mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatografie (HPLC) bestimmt worden. Zusätzlich wurden Laborwerte dokumentierte klinische Ereignisse mit den Biomarkern korreliert. Das Ziel dieser Arbeit war es, den Biomarkerverlauf nach Transplantation darzustellen, Unterschiede zwischen den Studienarmen zu erkennen. Ferner sollte die Biomarkereexpression zwischen Patienten mit und ohne Nebenwirkung untersucht werden.

Zur Detektion der Zytokine bzw. der Oberflächenrezeptoren und lymphozytären Proliferationsrate wurde Vollblut mit Ionomycin und 12-Phorbol-13-Myristat-Acetat bzw. Concanavalin A inkubiert. Die entsprechenden Zielstrukturen wurden mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern (CD3, IL-2, TNF- α , CD25, CD71, Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen und Propidium-Iodid) gefärbt. Abschließend wurde im FACS der Anteil biomarkere exprimierender Zellen bestimmt. Zur Bestimmung der IMPDH-Aktivität wurden periphere mononukleäre Zellen isoliert. Die Zellen wurden lysiert und mit einem Inkubationspuffer bestehend aus Inosinmonophosphat, Nikotinamid-Adenin-

Dinukleotid, Natriumhydrogencarbonat und Kaliumhydrogenphosphat inkubiert. Nach Beendigung mit Perchlorsäure erfolgte die Konzentrationsmessung von Xanthosinmonophosphat und Adenosinmonophosphat mittels HPLC. Die Messwerte wurden in Relation zum Ausgangswert vor Transplantation gesetzt.

Alle Biomarker werden initial stark gehemmt. Die maximale Hemmung der IL-2- und TNF- α -, CD25- und CD71-Expression und lymphozytären Proliferationsrate beträgt 34%, 35%, 6%, 21% und 6% des Ausgangswertes. Die IMPDH-Aktivität wird unmittelbar nach der Transplantation halbiert. Nach der Randomisation bleibt die IMPDH-Aktivität in der Cyclosporin-Gruppe konstant und reduziert sich in der Everolimus-Gruppe weiter. Die Expressionen von IL-2, TNF- α und CD25 zeigen keine Unterschiede zwischen den Studienarmen. Die CD71-Expression ist im Everolimus-Arm niedriger als im Cyclosporin-Arm. Die lymphozytäre Proliferationsrate ist im Everolimus-Arm tendenziell niedriger als im Cyclosporin-Arm. Die IL-2- und TNF- α -Expression korreliert ebenso wie die Expression von CD25 mit CD71 bzw. der Proliferationsrate und die CD71-Expression mit der Proliferationsrate. Die Proliferationsrate und die CD25- bzw. CD71-Expression korrelieren mit der Prednisolon-Dosis und der Mycophenolsäure-Talspiegelkonzentration im cyclosporinhaltigen Regime. Der Kreatininwert in der Everolimus-Gruppe war niedriger als in der Cyclosporin-Gruppe. Die häufigste Nebenwirkung war eine Nierenfunktionsstörung gefolgt von Diarrhö und Wundheilungsstörung, Anämie, Leukopenie und Proteinurie. Die CD25-Expression war bei Patienten mit später eintretender Anämie vermindert. Eine Leukopenie zeigte zuvor eine verminderte IMPDH-Aktivität und IL-2- sowie erhöhte TNF- α -Expression. Die Diarrhö zeigte vor dem Auftreten eine erhöhte IL-2- und TNF- α -Expression sowie eine verminderte CD71-Expression und IMPDH-Aktivität.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass die Messung von Biomarkern eine immunsuppressive Therapie abbilden kann. Die Effekte der einzelnen Immunsuppressiva werden je nach gemessenem Biomarker über den Zeitraum eines Jahres nach Transplantation deutlich. Zukünftige Studien sollten die Eignung der Biomarker zur Steuerung der immunsuppressiven Therapie untersuchen und individuell geeignete immunsuppressive Kombinationen finden, um das Langzeitüberleben und die Therapieeffektivität weiter zu steigern. Weiterhin sollte untersucht werden, ob sich die Biomarker auch zur Detektion von Nebenwirkungen vor der klinischen Manifestation eignen und diese so zu verhindern.

7.2 Summary

Renal transplantation is the first choice in the treatment of endstage renal disease, because it improves long-term survival more than dialysis. The immunosuppression required subsequently impairs that effect due to enclosed dose-related side effects. A close therapeutic drug monitoring using pharmacokinetic parameters to minimize drug dosing allows no conclusion to be drawn about the drug's effect in the individual patient, thus there are people having side effects or rejection episodes. An approach to fill that gap is measuring immunological functions from pharmacodynamic parameters (biomarkers).

In this study de novo renal transplanted patients were treated with a triple immunosuppressive regimen with cyclosporine, enteric coated mycophenolate-sodium and methylprednisolone following an induction with basiliximab. At day 135 one part of the study group was randomized from cyclosporine to everolimus leaving the concomitant immunosuppression unchanged. On different days after transplantation we detected intracellular cytokine expression in T-cells (Interleukin-2 and Tumornecrosisfactor- α), surface activation marker expression on T-cells (CD25 and CD71) and lymphocyte proliferation using flow cytometry. Activity of inosine monophosphate dehydrogenase (IMPDH) was quantified using high performance liquid chromatography (HPLC). Laboratory values and adverse events were correlated with the biomarkers. The aim of this study was to investigate the biomarker's course after transplantation and differences between the two therapies. Differences in biomarker expression between patients with and without adverse events were also to be investigated.

Whole blood was incubated with ionomycine and 12-phorbol-13-myristate-acetate or concanavaline A for detection of cytokines or surface activation markers and lymphocyte proliferation rate, respectively. The targets were stained with fluorescent-marked antibodies (CD3, IL-2, TNF- α , CD25, CD71, proliferating cell nuclear antigen and propidium iodide). The amount of biomarker positive cells was counted in the cytometer.

For IMPDH-activity-measurement peripheral blood mononuclear cells were isolated. The sample was lysed and incubated with a buffer containing nicotinamide-adenine-dinucleotide, sodium dihydrogene carbonate and potassium hydrogene phosphate. After termination with perchloric acid the concentrations of xanthosine and adenosine monophosphate were measured with HPLC. The results were normalized to the initial biomarker value.

All biomarkers were markedly inhibited after transplantation. The maximum inhibition of IL-2-, TNF- α -, CD25- und CD71-expression and lymphocyte proliferation rate was 34%, 35%, 6%, 21% and 6%, respectively. IMPDH-activity was reduced by half. After randomization it remained unchanged in the cyclosporine group whereas it was reduced further in the everolimus group. The IL-2-, TNF- α - and CD25-expression showed no significant differences between the study groups. The CD71-expression was smaller in the everolimus group than in the cyclosporine group. The lymphocyte proliferation rate tended to be smaller in the everolimus group than in the cyclosporine group. The expressions of IL-2 and TNF- α , CD25 and CD71, CD25 and the proliferation rate and CD71 and the proliferation rate correlated. The proliferation rate, CD25- and CD71-expression correlate with the dose of methylprednisolone and trough level of mycophenolic acid in the cyclosporine group. The creatinine level was lower in the everolimus group compared with the cyclosporine group. Most common adverse event was renal dysfunction, followed by diarrhea, wound healing disorder, anemia, leukopenia and proteinuria. CD25-expression was reduced in patients with consequent anemia. Patients suffering from leukopenia showed a smaller IMPDH-activity and a higher IL-2- and TNF- α -expression. Higher IL-2- and TNF- α -expressions and smaller CD71-expression and IMPDH-activity were observed in patients with consequent diarrhea.

This study shows that the course of biomarkers is influenced by the immunosuppressive therapy. Synergistic effects of immunosuppressive combinations are reflected as well as changes in the course of a one-year period after transplantation. Future studies should investigate the biomarker's use to monitor an immunosuppressive therapy in order to find appropriate regimens for the individual patient and to minimize side effects. Another interesting aspect to investigate the biomarker's benefit is to detect adverse events before their clinical manifestation and thus help avoiding them.

7.3 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Demografische Daten der Transplantatspender	35
Tab. 2: Demografische Daten der Transplantierten bei Studieneinschluss.....	36
Tab. 3: HLA-Mismatches in den Studiengruppen	36
Tab. 4: pharmakokinetische Daten beider Studiengruppen im Studienzeitraum.....	37
Tab. 5: Korrelation der PD-Parameter untereinander	46
Tab. 6: Korrelation zwischen pharmakokinetischen und pharmakodynamischen Parametern vor Randomisation	47
Tab. 7: Korrelation zwischen pharmakokinetischen und pharmakodynamischen Parametern im Cyclosporin-Arm.....	48
Tab. 8: Korrelation zwischen pharmakokinetischen und pharmakodynamischen Parametern im Everolimus-Arm.....	49
Tab. 9: Häufigkeit der Vorerkrankungen aller Patienten in den späteren Gruppen...	62
Tab. 10: unerwünschte Ereignisse und betroffene Patienten im Studienzeitraum	63
Tab. 11: Zeitliche Verteilungsunterschiede in Studienarmen.....	64
Tab. 12: Unterschiede in der Biomarker-Expression vor im darauffolgenden Zeitraum auftretenden Nebenwirkungen.....	68

7.4 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 aus (24): T-Zell-Aktivierung durch drei Signale.....	7
Abb. 2 aus (24): Angriffsort unterschiedlicher Immunsuppressiva	10
Abb. 3: Schema über Studienmedikation im Studienzeitraum	21
Abb. 4: Fließdiagramm der Studienpopulation	34
Abb. 5: CyA-Vortagesdosis in mg und -Talspiegelkonzentration in ng/ml.....	38
Abb. 6: Evl-Vortagesdosis in mg und -Talspiegelkonzentration in ng/ml.....	39
Abb. 7: Mycophenolat-Vortagesdosis in mg und MPA-Talspiegelkonzentration in ng/ml.....	39
Abb. 8: IMPDH-Aktivität in $\mu\text{mol s}^{-1}\text{mol AMP}^{-1}$ im Studienzeitraum.....	40
Abb. 9: prozentualer Anteil IL-2-positiver T-Zellen im Studienzeitraum.	41
Abb. 10: prozentualer Anteil TNF- α -positiver T-Zellen im Studienzeitraum	42
Abb. 11: prozentualer Anteil CD25-positiver T-Zellen im Studienzeitraum.	43
Abb. 12: prozentualer Anteil CD71-positiver T-Zellen im Studienzeitraum.	44
Abb. 13: prozentualer Anteil proliferierender Lymphozyten im Studienzeitraum.....	45
Abb. 14: Kreatinin im Serum [mg/dl] im Studienzeitraum.....	50
Abb. 15: Erythrozytenzahl [/nl] im Studienzeitraum	51
Abb. 16: Hämoglobinkonzentration [/mg/dl] im Studienzeitraum.....	52
Abb. 17: mittleres korpuskuläres Volumen (MCV) [fl] (A) und mittlerer korpuskulärer Hämoglobingehalt [pg] (MCH) (B) im Studienzeitraum	53
Abb. 18: Leukozytenzahl [nl] im Studienzeitraum	54
Abb. 19: Thrombozytenanzahl [nl] im Studienzeitraum.....	55
Abb. 20: Proteinkonzentration im Urin im Studienzeitraum.....	56
Abb. 21: Glukose im Serum im Studienzeitraum	57
Abb. 22: Gesamt-Cholesterin [mg/dl] (B) im Studienzeitraum.....	58
Abb. 23: Triglyzeride (A) und Gesamt-Cholesterin [mg/dl] (B) im Studienzeitraum ..	59
Abb. 24: HDL- (A) und LDL-Cholesterin [mg/dl] (B) im Studienzeitraum.....	60
Abb. 25: Zeit bis zur ersten Anämie	65
Abb. 26: Zeit bis zur ersten Leukopenie.....	65
Abb. 27: Zeit bis zur ersten Manifestation von Diarrhö	66
Abb. 28: Zeit bis zur ersten Proteinurie.....	66
Abb. 29: Zeit bis zur Erstmanifestation einer Wundheilungsstörung.....	67
Abb. 30: Zeit bis zum ersten Auftreten von Nierenfunktionsstörungen	67

7.5 Lebenslauf

Lebenslauf Seite 1

Mein Lebenslauf fehlt in der Online-Version dieser Dissertation aufgrund von Datenschutzbestimmungen.

Lebenslauf Seite 2

Mein Lebenslauf fehlt in der Online-Version dieser Dissertation aufgrund von Datenschutzbestimmungen.

8. Publikationen

Nolting J, Glander P, Naik M, et al. Pharmacodynamic monitoring of de novo renal transplant recipients receiving mycophenolate and cyclosporine with a conversion from cyclosporine to Everolimus. *Am J Transplant*, 8: 550-550 Suppl. 2 May 2008

Duerr M, Nolting J, Lange C, Naik MR, Diekmann F, Neumayer HH, Budde K. Increased frequency of regulatory T-cells in renal transplant patients after conversion from CNI- to mTORi-based immunosuppressive regimen in a prospective controlled randomized study. *Am J Transplant*, 10: 465-466, Suppl. 4 April 2010

9. Selbstständigkeitserklärung

„Ich, Marcel Naik, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Untersuchung pharmakodynamischer Biomarker bei Patienten nach einer Nierentransplantation selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift

10. Danksagung

Eine Dissertation ist ein großes Projekt, das zur Fertigstellung einen Doktoranden benötigt. Dieser wiederum benötigt dazu viele Menschen, die ihn bei diesem Vorhaben unterstützen, sei es moralisch, finanziell oder beratend.

An dieser Stelle möchte ich meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Klemens Budde danken, der mir dieses Thema zur Verfügung stellte, mein Interesse für die klinische Forschung weckte und mir die Möglichkeit gab dieser nachzugehen.

Ich danke dem Betreuer meiner Doktorarbeit, Diplom-Ingenieur Jochen Nolting, der mir die Methodik näherbrachte, viel Zeit in die Lektüre meiner Arbeit, vom ersten Rohentwurf bis zur Endversion, investierte, und dabei stets sachdienliche inhaltliche Kritik und Vorschläge äußerte.

Ich danke Frau Dr. rer. nat. Petra Glander, die mir im Umgang mit Datenbanken und statistischen Überlegungen zur Seite stand und mir die Daten für die IMPDH-Aktivität ergänzend zur Verfügung stellte.

Ich danke dem Labor-Team, Christine Lorkowski, Mareen Matz, Pia Hambach und Marco Mai, die für eine angenehme Arbeitsatmosphäre sorgten und den Mit-Doktoranden Anke Godemann, Katrin Beth, Niels Gauer und Martin Lehnert, mit denen der literarische Austausch und die inhaltlichen Diskussion produktiv waren.

Ich danke meinem Freundeskreis, der meine zeitweise häufigen Verspätungen und gelegentlichen Frustmomente mit viel Geduld und Verständnis entgegnete.

Am Ende danke ich den wichtigsten Menschen in meinem Leben, meinen Eltern Renate und Ganesh Naik, die mich finanziell und vor allem emotional unterstützen. Ich danke für ihre Geduld mit mir.

Zu guter Letzt danke ich allen weiteren Menschen, die zum Gelingen meiner Dissertation beigetragen haben.