

Aus der Kinderklinik und Kinderpoliklinik im
Dr. von Haunerschen Kinderspital
Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. Dr. Christoph Klein

**Die entwicklungsphysiologische Regulation der
Inosin 5'-Monophosphat-Dehydrogenase-Aktivität
und deren pharmakologische Inhibition durch
Mycophenolat Mofetil (MMF) in der Pädiatrischen
Nierentransplantation**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Esther Maria Angela Vitt
aus Frankfurt am Main
2014

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München

1. Berichterstatter: PD Dr. med. L.T.Weber

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Dr. Gerhard J. Strugala
Priv. Doz. Dr. Volker Vielhauer

Betreuung durch die promovierte Mitarbeiterin: Fr. Dr. med. A. Rother, Heidelberg

Dekan: Herr Prof. Dr. Dr.h.c. Maximilian Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 27.02.2014

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	6
1 Einleitung	9
1.1 Hintergrund	9
1.2 Mycophenolat Mofetil / Mycophenolsäure	12
1.2.1 Dosierung und Messung des Mycophenolsäurespiegels	15
1.3 Inosin 5'-Monophosphat-Dehydrogenase	16
1.3.1 Eigenschaften und Aufbau der Inosin 5'-Monophosphat-Dehydrogenase.....	16
1.3.2 Hemmung der Inosin 5'-Monophosphat-Dehydrogenase durch Mycophenolsäure.....	17
1.4 Therapeutisches Drug Monitoring	19
1.5 Pharmakodynamisches Drug Monitoring	22
1.5.1 Nutzen eines pharmakodynamischen Drug-Monitorings in der Mycophenolat Mofetil Therapie	22
1.5.2 Eventueller Zusammenhang der individuellen Inosin 5'-Monophosphat-Dehydrogenase-Aktivität mit bereits bekannten genetischen Polymorphismen	23
1.6 Zielsetzung.....	25
2 Methoden	26
2.1 Probanden	26
2.2 Messung der Inosin 5'-Monophosphat-Dehydrogenase-Aktivität	33
2.2.1 Gewinnung der peripheren monoklonalen Blutzellen aus heparinisiertem Vollblut.....	33
2.2.2 Aufbereitung der Proben und Messung der Inosin 5'-Monophosphat-Dehydrogenase-Aktivität.....	35
2.3 Messung von Mycophenolsäure im Plasma.....	37
2.4 Pharmakokinetische und Pharmakodynamische Analyse.....	38
2.5 Genotypisierung der Inosin 5'-Monophosphat-Dehydrogenase 1 und 2.....	40
2.5.1 Probenaufbereitung und Messung der Einzelbasen Polymorphismen	40
3 Statistische Auswertung.....	42
4 Ergebnisse	43
4.1 Demographie und Biochemie.....	43
4.1.1 Vergleich der Inosin 5'-Monophosphat-Dehydrogenase-Aktivität bei gesunden Kindern verschiedener Altersstufen, Erwachsenen und Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz	44
4.1.2 Geschlechtsabhängigkeit der Inosin 5'-Monophosphat-Dehydrogenase-Aktivität.....	47

4.1.3	Pharmakokinetik der Mycophenolsäure	48
4.1.4	Pharmakodynamik der Mycophenolsäure	50
4.1.5	Einfluss von Polymorphismen auf die Inosin 5'-Monophosphat- Dehydrogenase 1- und 2-Aktivität	54
5	Diskussion.....	57
6	Zusammenfassung.....	63
7	Ethische und rechtliche Aspekte	66
8	Literaturverzeichnis	68
Anhang		75
Probandeninformation / Einverständniserklärung Familie.....		75
Einverständniserklärung Eltern / Ältere Probanden		77
Probandeninformation Kinder		78
Einverständniserklärung Kinder		80
Formblatt P		81
Formblatt T		82
Verwendete Oligonukelotide		86
Lebenslauf		Fehler! Textmarke nicht definiert.
Danksagung.....		87

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenosin
AcMPAG	Acetyliertes Mycophenolsäure Glukuronid
ADA	Adenosin Desaminase
ADP	Adenosindiphosphat
AEC	Area under the enzyme versus time Curve
AIC	Akaike Koeffizient
AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adenosintriphosphat
AUC	Area under the concentration versus time curve
Aza	Azathioprin
BE	Blutentnahme
BMI	Body Mass Index (kg/m ²)
BMI SDS _{LMS}	Body Mass Index Standard Abweichungswert
BPAR	in der Biopsie bestätigte akute Abstoßungsreaktion (Biopsy Proven Acute Rejection)
BSA	Bovine Serum Albumin
C	Cytosin
C _{max}	maximale Konzentration im Dosierungsintervall
CrCl	Kreatinin Clearance
Cl/F	Medikamenten Clearance
Cyp A	Cytochrom A
CYP-1A1	Cytochrom P-1A1
CYP-3A4	Cytochrom P-3A4
CYP-450	Cytochrom P-450
dADP	Deoxyadenosindiphosphat
dATP	Deoxyadenosintriphosphat
dGDP	Deoxyguanosindiphosphat
dGTP	Deoxyguanosintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DM-MPA	Desmethyl-Mycophenolsäure
G	Guanin
GDP	Guanosindiphosphat
GFR	glomeruläre Filtrationsrate
g/l	Gramm pro Liter
GMP	Guanosinmonophosphat
GTP	Guanintriphosphat

hetero	heterozygot
homo	homozygot
HGPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
H ₂ O dest	destilliertes Wasser
IC ₅₀	Mittlere inhibitorische Konzentration
IMP	Inosinmonophosphat
IMPDH	Inosin 5'-Monophosphat-Dehydrogenase
kg	Kilogramm
KOF	Körperoberfläche
L	Liter
µl	Mikroliter
µmol	Mikromol
mg	Milligramm
mg/l	Milligramm pro Liter
mg/m ²	Milligramm pro Quadratmeter
mg/m ² KO/d	Milligramm pro Quadratmeter Körperoberfläche pro Tag
ml	Milliliter
mmol	Millimol
MMF	Mycophenolat Mofetil (CellCept)
MNC	Mononukleäre Blutzellen
MPA	Mycophenolsäure (mycophenolic acid)
MPAG	Mycophenolsäure Glukuronid
n	Anzahl
NAD ⁺	Nicotinamid
nm	nanometer (Wellenlänge)
n.s.	nicht signifikant
NTx	Nierentransplantation
PBMC	periphere mononukleäre Blutzellen
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)
PD	Pharmakodynamik
PDDM	Pharmakodynamisches Drug Monitoring
PK	Pharmakokinetik
p.o.	per os
PRPP	5-Phosphoribosyl-1-Pyrophosphat

RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
SD	Standardabweichung (Standard Deviation)
SNP	Single Nucleotide Polymorphism (Polymorphismus einer einzelnen Base)
T	Tyrosin
TABS	Tetra-N-Butylammonium Hydrogensulfat
TBW	Ganzkörpergewicht (total body weight)
t _{C_{max}}	Zeit in der C _{max} im Dosierungsintervall erreicht wurde
TDM	Therapeutisches Drug-Monitoring
UGT	Uridin-Diphospho-Glukuronyltransferase
Vit. C	Vitamin C
WT	Wild Typ
XMP	Xanthosin 5' -Monophosphat
z.B.	zum Beispiel

1 Einleitung

1.1 Hintergrund

In der Transplantationsmedizin stellen Immunsuppressiva die entscheidende Therapiekomponente in der Prophylaxe akuter und chronischer Abstoßungsreaktionen dar. Um eine ausreichende Suppression immunspezifischer Mechanismen zu erreichen, wird meist eine Kombination von Wirkstoffen verabreicht. Der Vorteil dieser Vorgehensweise liegt darin, dass die Dosis der einzelnen Medikamente recht gering gehalten werden kann und man somit potentielle Nebenwirkungen, bei Erhalt der gesamt-immunsuppressiven-Wirkung, reduzieren kann.

Sowohl Unter- als auch Überdosierungen von Immunsuppressiva können entweder zu akuten Abstoßungsreaktionen oder unerwünschten Reaktionen führen und somit den Therapieerfolg gefährden.

Bei der Suche nach der richtigen Dosis und Überwachung der Medikamentenexposition nehmen Kinder in der Pharmakotherapie eine besondere Rolle ein. Häufig wird die Erwachsenendosis an die Körperoberfläche der Kinder angepasst. Der kindliche Organismus unterscheidet sich jedoch von dem eines Erwachsenen, unter anderem durch eine auf die Körpermasse bezogene größere Körperoberfläche. Es wird weiterhin angenommen, dass die Reaktion auf- und Wirkung von Medikamenten entwicklungsbedingten Veränderungen unterliegen. Dies könnte durch altersabhängige Unterschiede der Körperzusammensetzung oder der Haut, der altersabhängigen Aktivierung von Schlüsselenzymen, oder der Entwicklung der Nierenfunktion, wie von Kearns et al beschrieben¹, bedingt sein (Abbildung 1). Leider ist noch relativ wenig über die Auswirkung der individuellen menschlichen Entwicklung auf die Pharmakodynamik bekannt.

Beispielsweise wurden in Studien zur Wirkung von Phenprocoumon², Cyclosporin³ und Midazolam^{3,4} neben entwicklungsabhängigen Änderungen in der Reaktion des Medikaments mit dem entsprechenden Rezeptor, entwicklungsabhängige Änderung des pharmakologischen Effekts im Bezug zur Höhe des Plasmaspiegels beobachtet.

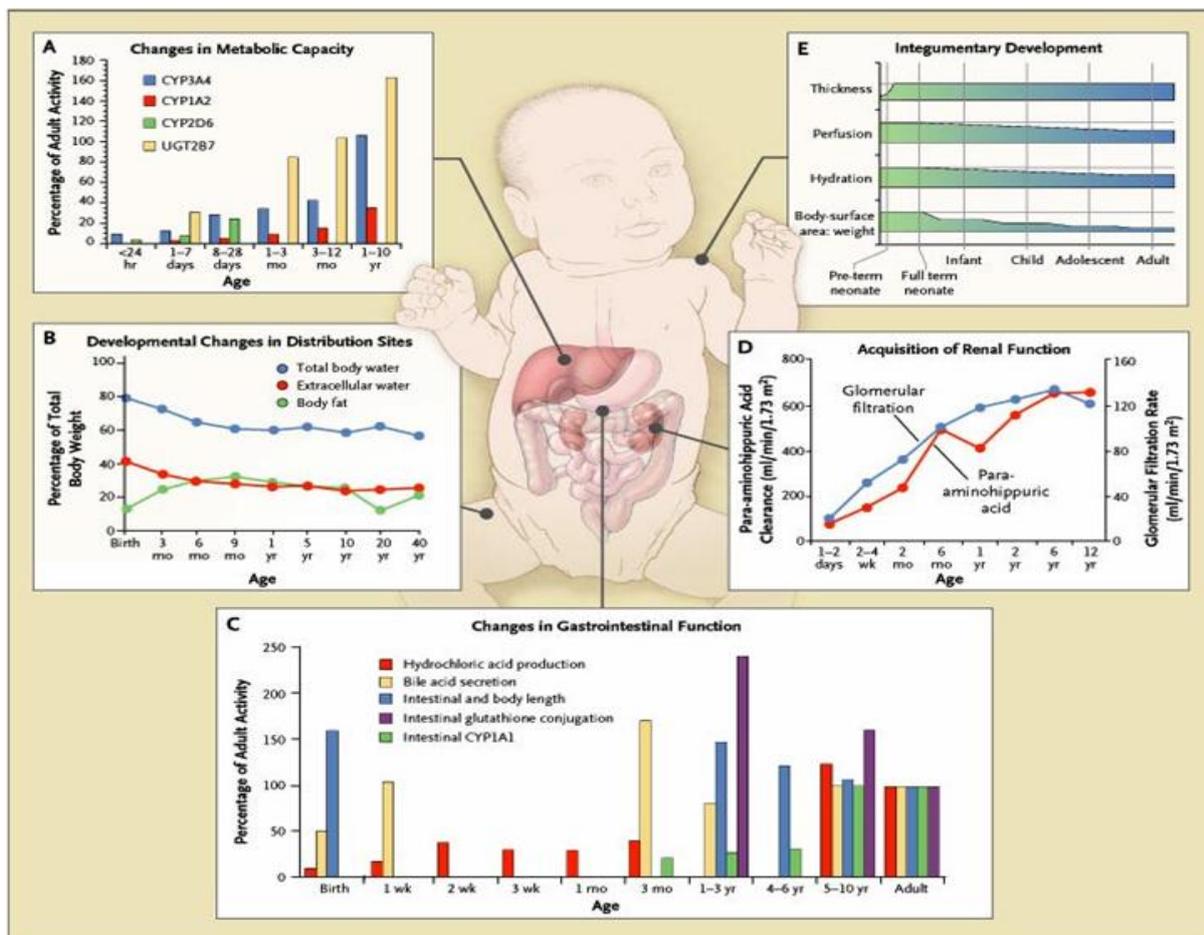


Abbildung 1: Überblick über die altersabhängige Entwicklung verschiedener den Medikamentenmetabolismus betreffenden Enzyme (Abbildung aus¹).

Mycophenolat Mofetil (MMF) wird sowohl bei Kindern als auch bei Erwachsenen als Immunsuppressivum nach Organtransplantationen verwendet. Laut des jährlichen Berichts der North American Pediatric Renal Trials and Collaborative Studies (NAPRTCS) von 2010 werden momentan etwa 60% der pädiatrischen Nierentransplantatempfänger sechs Monate nach Nierentransplantation mit MMF behandelt. Aufgrund großer Fortschritte im Bereich der Nierentransplantation bei Kindern konnten exzellente 1-Jahres Ergebnisse hinsichtlich Transplantat- (96%) und Patientenüberleben (98%), sowie niedrige Abstoßungsraten (8,6% bei Lebendspendern, 16,6% bei Nieren verstorbener Spender), berichtet werden.⁵

Mycophenolsäure (MPA), die aktive Form von MMF, inhibiert reversibel die Inosin 5'-Monophosphat-Dehydrogenase (IMPDH), das geschwindigkeitsbestimmende Enzym der de novo Guanin Triphosphat Biosynthese in proliferierenden B- und T-Lymphozyten.⁶ Im Vergleich zu T-Lymphozyten und anderen Zellen, die die Eigenschaft besitzen ihren Purin-Bedarf durch einen Wiederverwertungsmechanismus zu decken, sind sich teilende Lymphozyten von der Neubildung der Purine abhängig.

Unter MMF-Therapie kann es bei kleineren Kindern (< 6 Jahren), im Vergleich zu Erwachsenen oder älteren Kindern, nach Nierentransplantation häufiger zu MMF assoziierten Nebenwirkungen kommen. Dieses vermehrte Auftreten unerwünschter Ereignisse bei jüngeren Kindern könnte mit einer altersbedingten Veränderung der IMPDH-Aktivität - dem Zielenzym von MMF - zusammenhängen⁷.

In pharmakokinetischen Studien zu MPA wurde eine hohe interindividuelle Variabilität der MPA-Konzentration, sowie eine steigende Medikamentenexposition mit Dauer der Einnahmezeit beobachtet^{8,9}. Da die MPA-Pharmakokinetik nicht notwendigerweise den direkten pharmakologischen Effekt an den Immunzellen widerspiegelt, könnte ein pharmakodynamisches Monitoring mit Messung der IMPDH-Aktivität als Zielenzym von MPA ein vielversprechender Versuch zur Individualisierung der immunsuppressiven Therapie darstellen¹⁰. Hierzu könnte der kürzlich entwickelte nicht radioaktive Assay zur Erfassung der IMPDH-Aktivität verwendet werden. Dieser Test wurde bereits zuverlässig in klinischen Studien angewendet^{11,12}.

Es gibt nur begrenzte Daten hinsichtlich eines pharmakodynamisch-/pharmakokinetischen Zusammenhangs unter MMF-Therapie¹³⁻¹⁵. Kürzlich wurden erstmals IMPDH-Messungen bei pädiatrischen Nierentransplantatempfängern präsentiert¹⁶. Es konnte gezeigt werden, dass bei Erwachsenen die Wahrscheinlichkeit eine akute Transplantatabstoßung, oder unerwünschte Reaktionen zu entwickeln, eng mit der Höhe der vor Transplantation bestimmten IMPDH-Aktivität¹⁷ und IMPDH2 mRNA-Expression zusammenhängt¹⁸. Während einer Langzeit-Therapie mit MMF konnte bei erwachsenen Patienten ein Anstieg der IMPDH-Aktivität innerhalb eines 15-monatigen Beobachtungszeitraums gezeigt werden. Im Zusammenhang hiermit war ein signifikanter Anstieg von Abstoßungsreaktionen zu verzeichnen¹⁵. Momentan gibt es keinerlei Daten, die die IMPDH-Aktivität gesunder Kinder beschreibt und es liegen auch keine Studien

bezüglich einer möglichen entwicklungsabhängigen Regulation der IMPDH-Aktivität vor.

Die IMPDH-Aktivität weist, wie bereits erwähnt, eine hohe interindividuelle Variabilität auf¹³. Noch ist unbekannt ob Promotoren der Lymphozytenaktivierung, wie beispielsweise Infektionen oder chronische Entzündungen, die durch Dialyse hervorgerufen werden können, oder etwa genetische Varianten des IMPDH-Gens zu dieser großen interindividuellen Variabilität beitragen¹⁸⁻²¹.

1.2 Mycophenolat Mofetil / Mycophenolsäure

Seit 1995 wird MPA in Form des 2-Morpholinoethylester Prodrugs Mycophenolat Mofetil (MMF) erfolgreich im Rahmen von immunsuppressiven Therapien nach soliden Organtransplantationen angewandt²². In einer Kombinationstherapie mit Cyclosporin A (CsA) und Steroiden wurde bei nierentransplantierten Patienten in drei Multicenter Studien nachgewiesen, dass es unter MMF Gabe in deutlich weniger Fällen zu Abstoßungsreaktionen kommt, als unter Anwendung von Azathioprin (Aza)²³⁻²⁵. Seit 1996 ist das Medikament zur Anwendung bei Kindern zugelassen²⁶.

Über den Einsatz in der Transplantationsmedizin hinaus findet MPA weitere Anwendungsbereiche, wie beispielsweise in der Therapie von Glomerulonephritiden, Tumoren^{27,28}, Autoimmunerkrankungen wie Myasthenia Gravis, Psoriasis²⁹, Vaskulitiden³⁰ oder der antirheumatischen Therapie³¹.

Die immunsuppressive Wirkung von MPA beruht auf der Inhibition der IMPDH-Aktivität in Lymphozyten. Da das Enzym IMPDH als Schlüsselenzym der de novo Guanin Triphosphat (GTP) Biosynthese in proliferierenden Lymphozyten fungiert, kommt es durch dessen Hemmung zu einer Proliferationshemmung aktivierter Lymphozyten³²⁻³⁵.

Die orale Bioverfügbarkeit von MPA aus MMF beträgt >90%. Nach Aufnahme über den Gastrointestinaltrakt wird MMF durch gewebständige Esterasen innerhalb kürzester Zeit in seine wirksame Komponente MPA transformiert^{36,37} (Abbildung 2). Ein Hinweis für die schnelle Hydrolyse von MMF ist, dass zu keinem Zeitpunkt

nach Medikamenteneinnahme MMF im Plasma nachgewiesen werden kann³⁸.

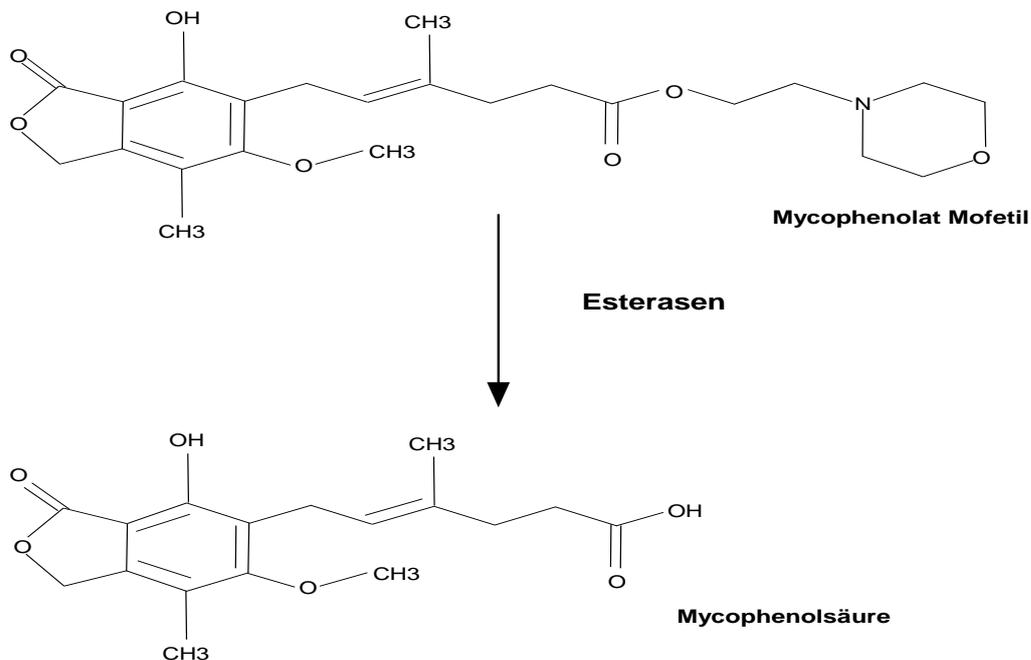


Abbildung 2: Umwandlung von MMF in MPA mittels gewebständiger Esterasen.

Zum besseren Verständnis der Metabolisierung von MPA sei an dieser Stelle kurz auf die sogenannten Phase-1- und Phase-2-Reaktionen der Biotransformation eingegangen.

In der Phase-1-Reaktion werden funktionelle Gruppen in Substanzen eingefügt bzw. funktionelle Gruppen verändert (z.B. Reduktionsreaktionen durch Cytochrom P450). Die beteiligten Enzyme sind meist wenig spezifisch und wirken daher auf eine ganze Gruppe von Substanzen. In Phase-2-Reaktionen werden die Zwischenprodukte der ersten Phase mit wasserlöslichen Stoffen verbunden und damit der Ausscheidung oder einer weiteren Metabolisierung zugeführt. Reaktionsprodukte des zweiten Schritts werden auch als Konjugate bezeichnet (Beispiel: Glukoronidierung).

In der Literatur werden drei Phase 2 Metabolite der MPA beschrieben. Diese werden in der Leber glukuronidiert und später über die Niere ausgeschieden. Der Hauptmetabolit, das MPA-Glukuronid (MPAG), sowie ein weiterer Metabolit der MPA, das Phenolglukosid Konjugat, besitzen keine immunsuppressive Wirkung³⁹. Der Dritte

im Menschen beschriebene und einzig immunsuppressiv wirkende Metabolit der MPA ist die Acylglucuronid MPA (AcMPAG)^{40,41} (siehe Abbildung 3).

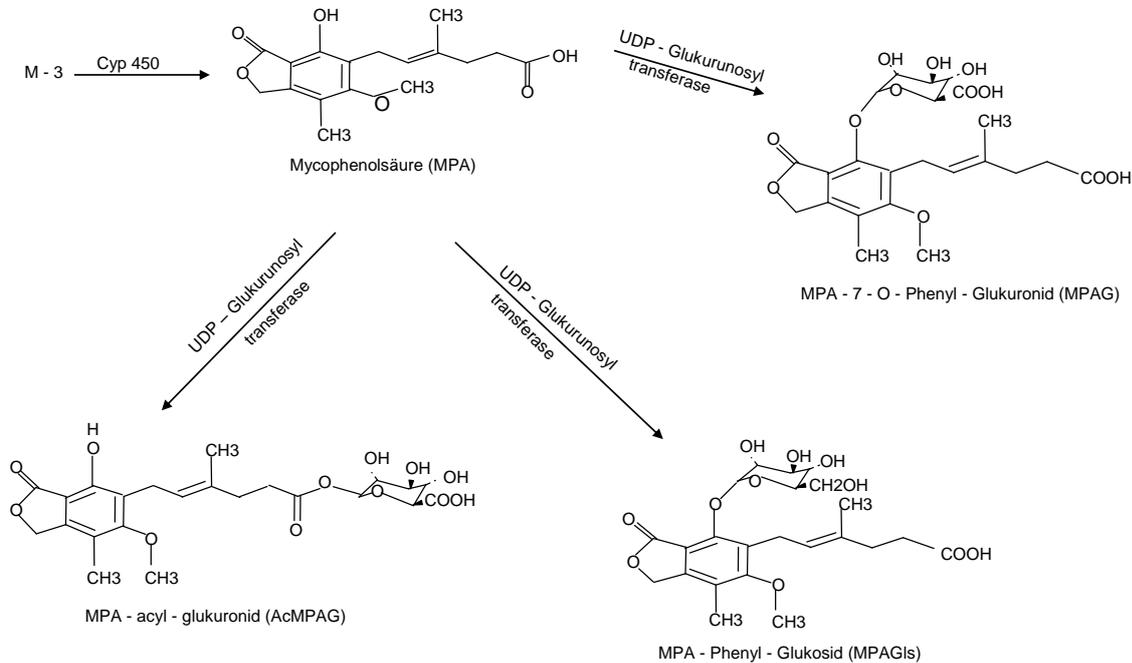


Abbildung 3: Umwandlung von MPA in die am häufigsten beschriebenen Metabolite in der Leber.

Im Körper weist MPA eine hohe Bindungsaffinität zu Albumin auf. Die Proteinbindungsrate gesunder Individuen wird mit 97-99%^{38,42} angegeben. Umfassende Untersuchungen weisen jedoch darauf hin, dass nur die ungebundene Form der MPA eine pharmakologische Wirkung zeigt³⁷.

Ein in der Literatur beschriebener Phase 1 Metabolit der MPA das DM-MPA (Desmethyl-Mycophenolsäure) wird durch CYP-3A produziert. MPA agiert hier als kompetitiver Agonist am Enzym. Der Metabolit ist jedoch noch nicht hinreichend untersucht⁴³.

Im Zusammenhang mit der Depletion der GTP Speicher wurden neben der zuvor diskutierten antiproliferativen Wirkung von MPA noch andere Effekte beschrieben:

- Verhinderung der Rekrutierung von Leukozyten in Entzündungsherde, wie beispielsweise bei vaskulär bedingten Transplantatabstoßungen, durch

fehlende Expression und Glykosylierung von Adhäsionsmolekülen⁴⁴.

- Beeinträchtigung der G-Proteine in der Signaltransduktion⁴⁵
- Inhibition der Proliferation von glattem Muskelgewebe, Fibroblasten und Endothelzellen⁴⁴.
- Inhibition der Immunglobulinsynthese durch Inhibition von B-Lymphozyten⁴⁶. Hieraus ergibt sich eine geringere Ausschüttung von IL-10 und Interferon Gamma⁴⁷.
- Induktion eines nekrotischen Signals und somit Zerstörung lymphatischer Zellen. Dies ist eine mögliche Erklärung für ein geringeres Krebsrisiko in Transplantationspatienten unter Immunsuppression mit MMF im Vergleich zu Azathioprin^{48,49}.

1.2.1 Dosierung und Messung des Mycophenolsäurespiegels

Die Dosierungsempfehlung von MMF für nierentransplantierte Kinder beträgt in Abhängigkeit der bestehenden immunsuppressiven Begleitmedikation und dem genauen Zeitpunkt nach Nierentransplantation zwischen 600mg/m² KOF/d – 1800mg/m² KOF/d^{42,50}. Die Exposition zu MPA wird idealerweise mittels 12-stündigem PK-Profil (Pharmakokinetischem Profil) im Dosierungsintervall als AUC (Area under the concentration time curve) bestimmt. Näherungsweise kann auch der Talspiegel als Ausgangspunkt bestimmt werden.

Im Regelfall erreichen 93,6% aller pädiatrischen Patienten nach Nierentransplantation (NTx) bei einem MPA Talspiegel von >1,2mg/l eine Gesamtexposition des Medikaments im angestrebten Zielbereich von >30mg x h/l. Dies korreliert mit einer geringeren Anzahl bioptisch nachgewiesener Abstoßungsreaktionen. Bei diesen Patienten wäre das Talspiegelmonitoring von MMF zur reinen Effektivitätskontrolle möglicherweise ausreichend. Zur besseren Abschätzung des Toxizitätsrisikos bzw. einer eventuellen Medikamentenüberexposition empfiehlt sich auch hier die Durchführung zumindest eines Kurzprofils⁵¹.

Ein besonderes Augenmerk sollte dabei generell auf Patienten mit eingeschränkter

Nierenfunktion oder Hypoalbuminämie gelegt werden. Hier ist der MPA-Metabolismus verändert^{52,53,38,42}. Die Messung der freien nicht Albumin gebundenen MPA im 12-Stunden-Profil trägt hier zur Risikoabschätzung MMF-assoziiertes Nebenwirkungen bei.

1.3 Inosin 5'-Monophosphat-Dehydrogenase

1.3.1 Eigenschaften und Aufbau der Inosin 5'-Monophosphat-Dehydrogenase

Die Inosin-5'-Monophosphat-Dehydrogenase (IMPDH) katalysiert die Nicotinamid (NAD⁺) -abhängige Oxidation von Inosinmonophosphat (IMP) zu Xanthosin 5'-monophosphat (XMP) (Abbildung 4). Dies macht sie zum geschwindigkeitsbestimmenden Enzym der de novo Guanin Triphosphat (GTP) Biosynthese^{32,33,34,35}. Die Aktivität der IMPDH ist eng verbunden mit der Zellproliferation. In verschiedenen Studien konnten durch IMPDH-Inhibition antikanzeröse, antivirale und immunsuppressive Wirkungen beobachtet werden^{54,27,55,56}.

In der Literatur wird das Vorkommen von zwei IMPDH-Isoenzymen im menschlichen Körper beschrieben^{57,58}, IMPDH1 und IMPDH2. Beide Isoenzyme werden in fast allen Geweben des Körpers exprimiert, besitzen eine bis zu 85% identische Aminosäuresequenz⁵⁸ und formieren sich als Pentamere. Die beiden IMPDH-Enzyme weisen neben einer ähnlichen Substrataffinität auch eine ähnliche Substratbindung auf⁵⁹.

Ein bedeutender Unterschied zeigt sich in der unterschiedlichen Aktivierung der Enzyme. Während IMPDH1 die vorherrschende Form in den meisten Zellen und auch ruhenden Lymphozyten ist, wird bei proliferierenden und neoplastischen Zellen IMPDH2 selektiv hochreguliert^{34,60,61}. In der Differenzierungsphase neoplastischer Zellen wird die IMPDH2 selektiv auf einen Level unter dem der IMPDH1 reguliert, jedoch reagiert IMPDH2 4,8-mal stärker auf MPA als IMPDH1⁵⁹.

1.3.2 Hemmung der Inosin 5'-Monophosphat-Dehydrogenase durch Mycophenolsäure

Ruhende B- und T- Lymphozyten, sowie andere Zellen des menschlichen Körpers besitzen die Möglichkeit ihren GTP Bedarf über die Wiederverwertung bereits synthetisierter Purinbasen (salvage pathway) zu decken. Das entscheidende Enzym dieses salvage pathways ist die Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase (HGPRT) (Abbildung 4), die in den Zellen dem Bedarf entsprechend hoch reguliert wird. Es kommt hierdurch zu keinem Abfall der ATP- oder GTP-Level⁶². In aktivierten Lymphozyten reicht dieser Mechanismus jedoch nicht aus um den Bedarf an GTP zu decken. Einzig die de novo Purinsynthese bietet die Möglichkeit, die erforderliche Menge an GTP für die DNA- und RNA-Synthese zur Verfügung zu stellen^{63,64}.

Hemmt man nun die IMPDH und es kommt zur Aktivierung von Proliferationsvorgängen im Lymphozyten, können diese sich aufgrund des GTP Mangels nicht teilen und verharren im Übergang zwischen G1- und S-Phase⁶⁵. Diese Wirkung konnte anhand von In-vitro-Studien an stimulierten mononuklearen Zellen aus humanem Blut verdeutlicht werden. Hier wird die Lymphozytenproliferation durch MPA zunächst wirksam gehemmt⁶⁶ und durch Zugabe von Guanosin oder Desoxyguanosin wieder aufgehoben.

Ursprünglich wurde die Hypothese vertreten, dass nur die Typ 2 Isoform der IMPDH in proliferierenden lymphatischen- und leukämischen Zellen hoch reguliert wird^{34,35,60,61}. Neuere Studien hingegen zeigen, dass die Menge an mRNA beider Isoformen nach Stimulation zunimmt^{66,67}. Daher besteht keine Klarheit darüber, welche Form der IMPDH das therapeutisch wichtige Zielenzym des Immunsuppressivums MPA ist⁶⁸.

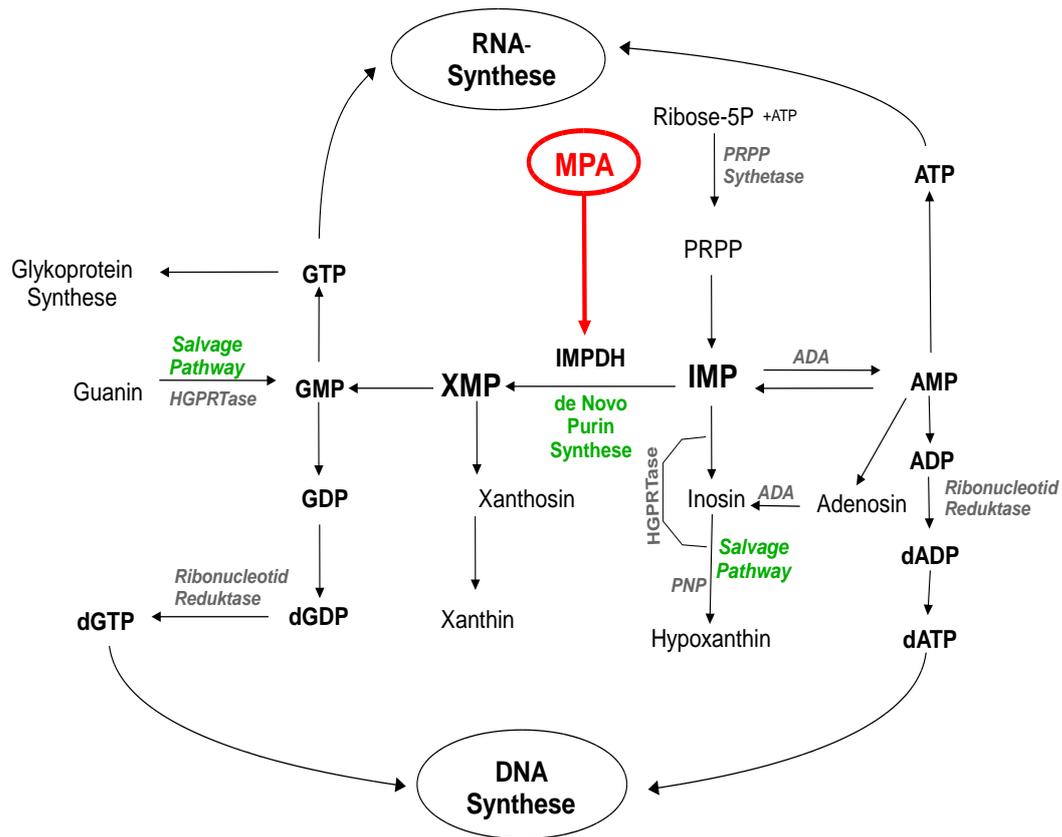


Abbildung 4: Synthesewege des Purinmetabolismus.

Legende: PRPP: 5-Phosphoribosyl-1-Pyrophosphat; IMP: Inosinmonophosphat; AMP: Adenosinmonophosphat; ADP: Adenosindiphosphat; ATP: Adenosintriphosphat; ADA: Adenosin Desaminase; dATP: Deoxyadenosintriphosphat; IMPDH: Inosin 5'-Monophosphat-Dehydrogenase; GMP: Guanidinmonophosphat; GDP: Guanosindiphosphat; GTP: Guanosintriphosphat; HGPRTase: Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase.

(Modifiziert nach Allison und Eugui, 1994).⁶⁹

1.4 Therapeutisches Drug Monitoring

Therapeutisches Drug Monitoring (TDM) wird zur Optimierung von medikamentösen Therapien verwendet. Definitionsgemäß ist es die Bestimmung von Medikamentenkonzentrationen in biologischen Flüssigkeiten um festzustellen, ob die Dosierung und das Dosierungsintervall angemessen sind, oder Veränderungen notwendig sind.

Pharmakokinetik beschreibt die Verstoffwechslung eines Medikaments durch Verteilungs-, Metabolisierungs- und Ausscheidungsvorgänge. Folgende Kriterien sollte ein Medikament erfüllen, damit ein TDM sinnvoll ist. Diese Kriterien sind bei Kindern und Erwachsenen gleich⁷⁰:

- Vorhandensein eines klinisch interpretierbaren Zusammenhangs von Medikamentenkonzentration und pharmakologischem Effekt.
- Enger therapeutischer Bereich. (Bezeichnet eine geringe Spanne zwischen Serumkonzentrationen die eine toxische Wirkung hervorrufen und Serumkonzentrationen die einen therapeutischen Effekt aufweisen).
- Hohe interindividuelle Variabilität der Medikamentenkonzentration im Serum; bedingt durch Absorption, Distribution und Elimination des Medikaments.
- Der pharmakologische Effekt an sich ist nicht unter einfachen Bedingungen direkt zu messen.
- Vorhandensein einer schnellen verlässlichen Messmethode.

Ziel der Überwachung ist es, den Blutspiegel so einzustellen, dass trotz hoher Effektivität die Toxizität des Medikaments niedrig bleibt.

Eine modernere Sichtweise betrachtet das TDM als ein selektives, an der spezifischen Situation des Patienten orientiertes Hilfsmittel zur Optimierung einer medikamentösen Therapie⁷¹. Zur sinnvollen Einschätzung einer möglichen Optimierung der medikamentösen Therapie durch TDM entwickelten Ensom et al

nachfolgenden Algorithmus (Abbildung 5). Laut Autoren sind ideale Bedingungen für ein TDM dann gegeben, wenn alle Fragen mit „Ja“ beantwortet werden können.

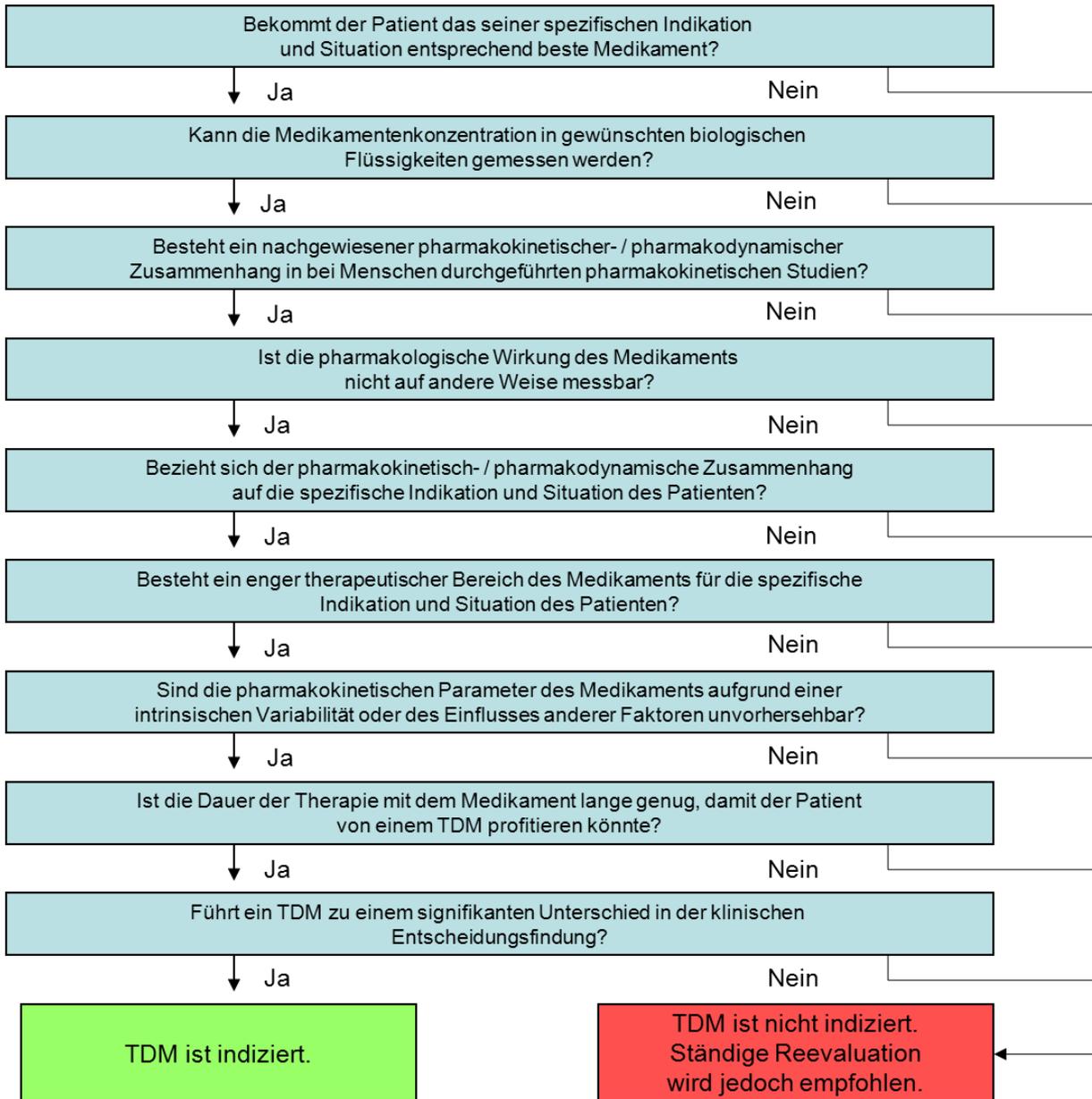


Abbildung 5: Algorithmus zur Entscheidungsfindung für oder gegen ein TDM ⁷¹.

Zusammenfassend sprechen folgende Aspekte für die Durchführung eines therapeutischen Drug-Monitorings von MMF bei nierentransplantierten Kindern:

- Es besteht ein statistisch signifikant nachgewiesener pharmakokinetisch-/pharmakodynamischer Zusammenhang zwischen MPA-AUC-Werten beziehungsweise MPA-Talspiegeln und dem Risiko akuter Abstoßungsreaktionen in der Frühphase nach NTx^{53,72,8}.
- Die MPA-Exposition zeigt sowohl bei Kindern unter einer Körperoberflächen-adjustierten-, als auch bei Erwachsenen unter einer fixen MMF-Dosierung eine erhebliche, interindividuelle Variabilität um den Faktor 10.
- Die Pharmakokinetik von MPA ändert sich signifikant in den ersten Monaten nach Transplantation. Dies ist gekennzeichnet durch einen Anstieg der dosisadjustierten MPA-AUC um ~75% in den ersten Monaten nach pädiatrischer NTx^{9,51}.
- Beide zur Bestimmung von MPA eingesetzten Messmethoden, HPLC (High Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry) und EMIT-Essay liefern vergleichbare Ergebnisse hinsichtlich der Risikoabschätzung einer akuten Abstoßungsreaktion durch Messung der MPA- Plasmaspiegel⁷³.
- Die Verwendung von MPA- Kurzprofilen erleichtert ein exaktes therapeutisches Drug-Monitoring von MPA⁵¹.
- Es besteht eine relevante Medikamenteninteraktion mit anderen Immunsuppressiva wie CsA und Glukokortikoiden^{74,75}.

1.5 Pharmakodynamisches Drug Monitoring

Eine weitere Möglichkeit die Medikamentendosis zu optimieren ist neben dem klassischen pharmakokinetischem TDM, das pharmakodynamische therapeutische Drug Monitoring (PD-TDM). Hierbei werden sowohl die quantitative als auch die qualitative Einflussnahme des Medikaments auf den Körper und somit die eigentliche pharmakologische Wirkung bestimmt. Das PD-TDM ermöglicht eine individuelle Aussage über Dosis-/ Wirkungsbeziehungen eines Medikaments im Organismus.

Folgende Interaktionsmechanismen spielen in der Pharmakodynamik eine Rolle:

- Wechselwirkung mit Rezeptoren (Stimulation, Blockade)
- Beeinflussung der Enzymaktivität (Aktivierung, Hemmung)
- Beeinflussung spannungsabhängiger Ionenkanäle (Öffnung, Blockade)
- Beeinflussung von Transportsystemen
- Hemmung von Biosynthesen in Mikroorganismen⁷⁶

Die Messung erfolgt durch Aktivitätsbestimmung von Enzymen, Genexpressionen oder durch das Vorkommen bestimmter Mikroorganismen beispielsweise im Blut.

1.5.1 Nutzen eines pharmakodynamischen Drug-Monitorings in der Mycophenolat Mofetil Therapie

Wie bereits weiter oben erwähnt wurde, ist bei MPA-Gabe die Überwachung der Medikamentenkonzentration im Plasma durch therapeutisches Drug Monitoring ein wichtiger Parameter der Therapiekontrolle. Bei einigen Patienten scheint dies ausreichend zu sein, jedoch wurde bei anderen Patienten bei gleicher Medikamentenkonzentration ein vermehrtes Auftreten unerwünschter Reaktionen oder Abstoßungsreaktionen beobachtet. Hier wäre eine kalkulierte Individualisierung der Medikamentendosis eine Möglichkeit die Therapiekontrolle zu erweitern. Dies könnte zur Verhinderung von unerwünschten Reaktionen beitragen.

Die Argumente für ein TDM unter MMF-Therapie wurden bereits weiter oben aufgeführt. Die Aktivität der IMPDH weist eine inverse Beziehung zur MPA-Plasmakonzentration auf^{77,78}. Das bedeutet: je höher der MPA Plasmaspiegel, desto geringer die Enzym-Aktivität der IMPDH. Dabei ist die zugrunde liegende IMPDH-Aktivität von einer ausgeprägten interindividuellen Variabilität gekennzeichnet^{77,17}. Die Wirkung von MPA ist wiederum von der Menge der freien nicht an Albumin gebundenen MPA-Fraktion im Plasma abhängig, welche von verschiedenen Faktoren beeinflusst wird⁷⁹. Das Ausmaß der adversen Effekte ist jedoch nicht von der Höhe der applizierten Medikamentendosis abhängig⁸⁰. Theoretisch würde also jeder Patient von einer individualisierten Dosis profitieren.

Eine bei erwachsenen Nierentransplantatempfängern durchgeführte Studie beobachtet einen Zusammenhang zwischen einer initial niedrigen IMPDH-Aktivität vor NTx und der Notwendigkeit einer Reduktion der MMF-Dosis aufgrund von Nebenwirkungen nach NTx. Es zeigte sich hier ebenfalls ein Zusammenhang zwischen einer hohen IMPDH-Aktivität vor NTx und dem Auftreten akuter Abstoßungsreaktionen nach erfolgreicher Transplantation¹⁷.

Diese Ergebnisse legen nahe, dass ein PK-TDM der MPA-Exposition im Plasma allein nicht die nötigen Ergebnisse für jeden Patienten liefern kann. Es besteht hier keine genaue Kontrollmöglichkeit der Medikamentenwirkung über die Dosishöhe zur Vermeidung unerwünschter Reaktionen, oder mittels Biopsie nachgewiesener akuter Abstoßungsreaktionen (BPAR's). Hier scheint, in Hinblick auf die Notwendigkeit einer weiteren Individualisierung des Monitorings der MMF-Therapie, die ergänzende Durchführung eines PD-TDM durch Monitoring der IMPDH-Aktivität zur Anpassung der immunsuppressiven Therapie sinnvoll.

1.5.2 Eventueller Zusammenhang der individuellen Inosin 5'-Monophosphat-Dehydrogenase-Aktivität mit bereits bekannten genetischen Polymorphismen

Die zuvor beschriebene interindividuelle Variabilität der IMPDH-Basisaktivität und die damit verbundenen Schwankungen der MPA bezogenen Wirkungen lassen die Vermutung aufkommen, dass eventuell genetische Ursachen für diese Unterschiede verantwortlich sein können.

Neben unterschiedlichen Mutationen im IMPDH-Gen, die die Bindung von MPA beeinträchtigen und entweder Resistenzen, oder eine hohe Sensitivität hervorrufen, sind bereits mehrere Gen Varianten mit Auswirkungen auf die Enzymaktivität im Menschen beschrieben (Tabelle 1).

Bis heute sind insgesamt 17 Einzel-Basen-Polymorphismen (single nucleotide Polymorphisms (SNP's)) im IMPDH1-Gen und 9 in IMPDH2-Gen beschrieben²⁰. Bei einigen dieser SNP's kommt es zum Austausch von Aminosäuren und somit zur veränderten Aktivität des Enzyms. Tabelle 1 zeigt die in dieser Arbeit untersuchten, verschiedenen Polymorphismen von IMPDH1 und 2, sowie deren klinische Bedeutung. Die hier betrachteten SNP's wurden aufgrund bekannter Mutationen in aktiven Regionen des Enzyms, bei denen vermutet wurde, dass kleine Änderungen bereits eine Auswirkung auf die IMPDH-Aktivität haben könnten, ausgewählt.

IMPDH Typ	SNP	Häufigkeit	Klinische Bedeutung	Literatur
1	106 G>A	43%	Positiv prädiktiver Wert für in der Biopsie nachgewiesene Abstoßungsreaktionen (BPAR): 59%	Wang J 2008 ¹⁹
1	125 G>A	41%	Positiv prädiktiver Wert für BPAR: 55%	Wang J 2008 ¹⁹
2	3757 T>C	1-21%	BPAR dreimal häufiger IMPDH-AUC um 49% erhöht, die IMPDH-Aktivität war vor NTx nicht erhöht Reduziert den antiproliferativen Effekt von MPA in Lymphozyten um ca. 50%	Grinyó 2008 ⁸¹ Sombogaard 2009 ²¹ Winnicki 2009 ⁸²
2	787 C>T	1%	In-Vitro-IMPDH-Aktivität um 10% reduziert	Wang J 2007 ²⁰
2	c.-95 T>G		In der Promoterregion eines cAMP abhängigen Transkriptionsfaktors lokalisiert	Garat 2009 ⁸³

Tabelle 1: Ausgewählte bekannte Polymorphismen des IMPDH-Gens.

1.6 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist es, folgende Fragen im Hinblick auf die Verwendung von Mycophenolat Mofetil (CellCept) in der Pädiatrie zu klären.

Bei gesunden Kontrollpersonen:

1. Haben gesunde Kinder (insbesondere Kleinkinder und jüngere Schulkinder) eine den Erwachsenen vergleichbare basale IMPDH-Aktivität oder ist diese altersabhängig?
2. Bestehen interindividuelle Unterschiede der IMPDH-Aktivität zwischen und innerhalb der 3 verschiedenen Altersgruppen; 2,0-5,9 Jahre; 6,0-11,9 Jahre und 12,0-18,9 Jahre?
3. Welche Rolle spielen genetische Polymorphismen für die IMPDH-Aktivität?

Bei der nierentransplantierten Population unter MPA Gabe:

1. Ist das Ausmaß der IMPDH-Suppression durch MMF in der Standarddosis bei Kindern und Erwachsenen nach Nierentransplantation vergleichbar?
2. Korreliert die IMPDH-Aktivität mit der Plasmakonzentration der Gesamt-MPA beziehungsweise der freien MPA?
3. Wird die IMPDH-Aktivität bei Patienten vor Nierentransplantation durch eine Dialysetherapie beeinflusst?

2 Methoden

2.1 Probanden

Referenzgruppe zur Bestimmung der IMPDH-Aktivität

Von gesunden Kindern wurden im Rahmen einer Routine Blutentnahme folgende Blutproben abgenommen.

- | | |
|------------------------------------|--|
| 1 EDTA Röhrchen (2,5ml) | → Bestimmung des Differentialblutbildes |
| 1 EDTA Röhrchen (2,5ml) | → Polymorphismen Screening des IMPDH-Gens |
| 1 Lithium Heparin Röhrchen (2,5ml) | → Aufreinigung der PBMC's zur IMPDH
Aktivitätsmessung |

Ausschlusskriterien waren:

- Akute oder chronische Erkrankungen
- Anhaltender oder innerhalb der letzten 3 Tage vor Probenentnahme stattgehabter Infekt
- Verwendung jeglicher Medikation (ausgenommen Vit. C und Spurenelemente)

Der zeitliche Abstand von 3 Tagen zu einer infektiösen Episode vor Gewinnung der Proben wurde als notwendig angesehen, um eine mögliche Beeinflussung der IMPDH-Aktivität durch den Infekt auszuschließen. Leichte Infektionen beeinflussen die IMPDH-Aktivität nicht (P.Glander, persönliche Korrespondenz). Im Zeitraum von Mai 2007 bis August 2008 nahmen 79 gesunde Kinder an dieser Studie Teil. Die Kinder wurden in 3 verschiedene Altersgruppen eingeteilt. Die Gruppierung stellt sich wie folgt dar:

Kleinkinder (im Alter von 2,0-5,9 Jahren, n=26)

Schulkinder (im Alter von 6,0-11,9 Jahren, n=31)

Jugendliche (im Alter von 12,0-18,0 Jahren, n=22)

Alle Studienteilnehmer waren kaukasischer Abstammung. Die Probensammlung bei Kindern die jünger als 2 Jahre waren, wurde aufgrund des generell geringen zirkulierenden Blutvolumens als unethisch angesehen. Etwa 95% der pädiatrischen NTx Empfänger waren ≥ 2 Jahre und die Kontrollgruppe reflektiert somit die relevante Zielgruppe unserer Untersuchung. Des Weiteren wurden Blutproben zur Bestimmung der IMPDH Aktivität bei 27 Kindern und Jugendlichen mit ESRD, während einer Routine Blutuntersuchung entnommen.

Die Daten der IMPDH-Aktivitäten der Kinder wurden mit den von Oktober 2002 bis Juni 2008 gesammelten Daten von 106 gesunden, erwachsenen Blutspendern und den von Januar 2002 bis Mai 2010 gesammelten Daten von Erwachsenen mit ESRD verglichen. Es wurden hierbei die gleichen Ausschlusskriterien angewandt. Die demografische Verteilung der Probanden wird in Tabelle 2 dargestellt.

		Anzahl der Individuen	Alter	Geschlecht Männlich/Weiblich n; (%weiblich)
Gesunde Kinder		79	8,7 \pm 4,8 (2,1-17,9)	46 / 33 (42%)
Altersgruppe	2,0 – 5,9 a	26	3,8 \pm 1,0 (2,1-5,4)	18 / 8 (31%)
	6,0 – 11,9 a	31	8,2 \pm 1,9 (6,1-11,8)	18 / 13 (42%)
	12,0- 17,9 a	22	15,3 \pm 1,8 (12,7-17,9)	10 / 12 (55%)
Kinder mit ESRD		27	11,7 \pm 5,0 (2,4-17,8)	18 / 9 (33%)
Gesunde Erwachsene		106	35,3 \pm 11,7 (18,7-67,3)	79 / 27 (25%)
Erwachsene mit ESRD		156	51,8 \pm 13,9 (18,9-74,3)	99 / 57 (37%)

Tabelle 2: Demographische Verteilung von gesunden Individuen und von Patienten mit ESRD.

Die beschriebenen Daten sind zu verstehen als arithmetisches Mittel \pm SD; Der Meßbereich ist in Klammern angegeben.

Studienpopulation zur Bestimmung des pharmakokinetisch-/pharmakodynamischen Zusammenhangs sowie der Pharmakogenetik

Von insgesamt 23 Kindern und Jugendlichen, die im Zeitraum von Juni 2007 bis Juli 2008 ein Nierentransplantat erhalten haben, wurden 17 Kinder und Jugendliche in diese Studie eingeschlossen.

Hier wurden folgende Blutproben entnommen:

- 1 EDTA Röhrchen (2,5ml) → Bestimmung des Differentialblutbildes
- 1 EDTA Röhrchen (2,5ml) → Polymorphismen Screening des IMPDH-Gens
- 1 Lithium Heparin Röhrchen (2,5ml) → Aufreinigung der PBMC's zur IMPDH Aktivitätsmessung

Ausschlusskriterien waren:

- Leukozytenzahl <2,500/ μ l
- Hämoglobinkonzentration <5g/dL
- Massive gastrointestinale Infektion
- Bei Abbruch der MMF Gabe aufgrund von klinischen Gründen
- Alter <2 und >19
- Medikation mit Antaciden, Cholestyramin, Eisen, Probenecid

6 Patienten wurden aufgrund ihres Alters (n=2), einer MMF Intoleranz (n=1) und unzureichender Möglichkeit einer adäquaten Blutgewinnung (n=3) ausgeschlossen. Alle Patienten hatten eine gute primäre Transplantatfunktion, ohne die in Anspruchnahme einer postoperativen Dialyse. Die Patienten wurden hier in 2 Gruppen aufgeteilt:

Präpubertierende Kinder (im Alter von 2,0 - 11,9 Jahren, n=8)

Jugendliche (im Alter von 12 - 18,9 Jahren; n=9)

Weitere biochemische- und patientenspezifische- Daten, die am Tag der Probensammlung zur Bestimmung des pharmakokinetisch-/pharmakodynamischen Profils zu einem frühen Zeitpunkt nach der Transplantation mit erhoben wurden, sind in Tabelle 3 dargestellt.

	Alter		P-Wert
	2,0-11,9 Jahre	12,0-18,9 Jahre	
Tage nach Transplantation (Tage)	16 ± 4	17 ± 4	n.s. ^a
Anzahl der Patienten (n)	8	9	
Alter (Jahre) bei NTx	6,4 ± 3,5	16,6 ± ,0	
BMI SDS_{LMS}	-0,26	-0,73	n.s. ^b
	(-2,14 – 1,63)	(-2,09 – 0,63)	
KOF (m²)	0,68	1,27	0,001 ^b
	(0,58 – 1,25)	(1,17 – 1,82)	
Geschlecht männlich/weiblich (n)	7/1	4/5	n.s. ^c
Spender lebend/verstorbenen (n)	3/5	3/6	n.s. ^c
Patienten mit vorheriger Transplantation (n)	0	3	n.s. ^c
MMF Morgen Dosis (mg/m² KOF)	390 ± 134	393 ± 149	n.s. ^a
Tacrolimus Talspiegel (µg/l)	10,3 ± 2,1	10,4 ± 2,8	n.s. ^a
Serum-Albumin (g/l)	38,4 ± 2,8	38,6 ± 5,2	n.s. ^a
Leukozyten (10⁹/L)	15,4 ± 6,0	11,9 ± 4,4	n.s. ^a
Kreatinin Clearance (ml/min pro 1.73 m²)	105 ± 40	70 ± 21	0,035 ^a

Tabelle 3: Zusammenfassung der Patientendaten, sowie hämatologischer Parameter in der frühen Phase nach Transplantation. Die Daten sind als Mittelwert ± SD angegeben. Nur der BMI SDS_{LMS} wird als Median angegeben. Der Wert wurde mittels LMS-Methode berechnet⁸⁴. Die Körperoberfläche (KOF) wurde durch die Mosteller Formel berechnet⁸⁵. Die Kreatinin Clearance (CrCl) bei Patienten <18 Jahren wurde mittels Schwartz Formel⁸⁶ und bei Patienten ≥18 Jahren mit der Cockcroft-Gault Formel berechnet⁸⁷.

^at-test

^bMann-Whitney U test

Die IMPDH-Aktivität vor Transplantation wurde bei 7 Kindern und 9 Jugendlichen mit ESRD, die auf der Warteliste für eine Nierentransplantation standen, erhoben (Median 1 Tag; bei einem Messbereich von 0-275 Tage vor Transplantation). Die PK-/PD-Profile, die während der ersten 6 Stunden nach MMF-Einnahme zu einem frühen Zeitpunkt nach Transplantation (im Mittel 16 +/- 4 Tage nach Transplantation) gemessen wurden, wurden anhand der Daten von 8 Kindern analysiert. Volle 12 Stunden PK-/PD-Profile wurden bei 9 Jugendlichen bestimmt. Bei 5 von 9 jugendlichen Patienten wurde ein zweites 12-h PK-/PD-Profil in der stabilen Phase nach Transplantation (im Mittel 7,8 +/- 1,8 Wochen) erstellt.

Die Studie wurde nach Prüfung durch die Ethik Komitees der Medizinischen Fakultäten in Heidelberg und München genehmigt. Die Studie wurde in Anlehnung an die Grundsatzerklärung von Helsinki konstruiert und durchgeführt. Alle Eltern, gesetzlichen Betreuer, Patienten und gesunde Probanden wurden vor Studienbeginn schriftlich über den Studieninhalt aufgeklärt.

Pharmakodynamisch-/Pharmakokinetisches Protokoll bei Kindern und Jugendlichen nach Nierentransplantation

Zur Erstellung eines 12-stündigen PK-/PD-Profils, wurden in der stationäre Phase (nach 3 Wochen) und der ambulante Phase (6-36 Wochen) nach der Operation pharmakokinetische/pharmakodynamische Profile durchgeführt. Hierzu wurden je 2,5ml Li-Heparin-Blut und 0,5ml EDTA-Plasma (1ml EDTA-Blut) direkt vor MMF-Einnahme am Morgen (Vor-Dosis-Wert) und dann 0,5-, 1-, 1,5-, 2-, 3-, 4-, 6-, 8- und 12- Stunden nach MMF-Einnahme abgenommen.

Bei Kindern im Alter von 2,0-11,9 Jahren wurde, aufgrund des geringeren Blutvolumens ein verkürztes PK-/PD-Profil innerhalb der ersten 6 Stunden nach MMF-Einnahme erstellt.

Die Patienten waren angehalten ab der Nacht vor Probenentnahme, für mindestens 10 Stunden, bis zur Entnahme der Probe bei 1,5 Stunden nüchtern zu bleiben. Danach war es den Patienten erlaubt ein leichtes Frühstück zu sich zu nehmen. Zudem war es erforderlich, dass alle Patienten vor PK-Messung mindestens 2 ganze Tage die gleiche MMF Dosis erhielten.

Immunsuppressive Therapie

MMF (CellCeptTM, Roche Pharma AG, Grenzach-Wyhlen, Deutschland) wurde entweder in Form einer Kapsel oder als Suspension in einer Dosis von 1200mg/m² KOF pro Tag, aufgeteilt auf 2 Gaben täglich, verabreicht. Am 14. Tag nach der Transplantation erfolgte eine Dosisreduktion auf 600mg/m² KOF pro Tag. Es wurden keine individuell angepassten Dosisänderungen von MMF bezüglich der gemessenen MPA-Konzentration durchgeführt.

Tacrolimus (PrografTM, Astellas Pharma GmbH, München Deutschland) wurde zu Beginn je nach Patientengewicht, aufgeteilt auf 2 Gaben täglich, verabreicht. Patienten mit einem Körpergewicht (KG) <40kg erhielten eine anfängliche Dosis von 0,3mg/kg Körpergewicht/Tag (KG/d), Patienten >40kg erhielten 0,2mg/kg KG/d. Die Tacrolimusdosen wurden im Verlauf so angepasst, dass 12 Stunden Talspiegel von 8-12 ng/ml an den Tagen 0-21 nach NTx und 5-10 ng/ml in den darauf folgenden Tagen erreicht wurden. Methylprednisolon (UrbasonTM, Sanofi-Aventis GmbH, Frankfurt, Deutschland) wurde anfänglich als i.v. Bolus von 300mg/m² KOF mindestens eine Stunde vor Reperfusion appliziert. In den nachfolgenden Wochen wurde das Prednisolon folgendermaßen reduziert:

48mg/m² KOF p.o. am 1. Tag nach Transplantation
32mg/m² KOF p.o. am 2.-7. Tag nach Transplantation
24mg/m² KOF p.o. in der 2. Woche nach Transplantation
16mg/m² KOF p.o. in der 3. Woche nach Transplantation
8mg/m² KOF p.o. in der 5. und 6. Woche nach Transplantation
4mg/m² KOF p.o. nach Woche 6 als Erhaltungsdosis

2.2 Messung der Inosin 5'-Monophosphat-Dehydrogenase-Aktivität

Die PBMC's wurden mittels Ficoll Gradient aus 2,5ml Vollblut aufgereinigt und bis zur Analyse bei -80°C gelagert.

Die IMPDH-Aktivität wurde durch Inkubation der lysierten PBMC's mit Inosinmonophosphat (IMP) gefolgt von chromatografischer Messung des produzierten XMP mittels modifiziertem nicht radioaktivem Assay bestimmt. Das neu erzeugte XMP wurde anhand der in den Zellen enthaltenen AMP- (Adenosinmonophosphat) Konzentration normalisiert. Die AMP- und XMP-Bestimmung erfolgte in derselben HPLC Messung. Eine genaue Beschreibung und Bewertung dieses Verfahrens wurde kürzlich veröffentlicht¹². Die Verwendung der AMP Konzentrationen zur Normalisierung des neu gebildeten XMP weist im Vergleich zu sonst verwendeten Methoden bezüglich Protein Konzentration, oder Zellzahlbestimmung eine deutlich niedrigere Variabilität auf. Die Variabilität innerhalb eines Messdurchlauf und innerhalb eines Tages lag bei <11%¹². Des Weiteren wird in dieser Messmethode lediglich ein einziger analytischer Arbeitsschritt verwendet ohne weitere potentielle Störfaktoren wie beispielsweise weitere Arbeitsschritte oder verwechselte Proben.

2.2.1 Gewinnung der peripheren monoklonalen Blutzellen aus heparinisierem Vollblut

- 2,5ml PBS in ein Leucosept-Röhrchen mittels Dispenser vorlegen, 2,5ml Vollblut vorsichtig mittels Eppendorf Pipette dazu geben.
- Zentrifugation für 20min. bei 1200g, ungebremst, bei Raumtemperatur.
- Nach Zentrifugation Bildung von mehreren Schichten (siehe Abbildung 6) -> vorsichtiges Entnehmen des Röhrchen.
- Abpipettieren der Leukozytenschicht und Überführung in ein 15ml Zentrifugationsröhrchen, welches vorab mit 5ml PBS befüllt wurde.

- Mischen und Waschen durch kurzes kopfüber schwenken.
- Zentrifugation: für 10min., mit 1200g, bei Raumtemperatur, gebremst.
- Überstand mit an der Saugpumpe angeschlossener abgebrochener Pasteurpipette absaugen und verwerfen, Zellpellet belassen (Abbildung 6).
- Zellpellet auf Eis kühlen.
- Zellpellet in 250µl kaltem HPLC-Wasser mittels Pipette resuspendieren.
- Zellsuspension in ein Kryoröhrchen überführen und bei -80°C einfrieren.

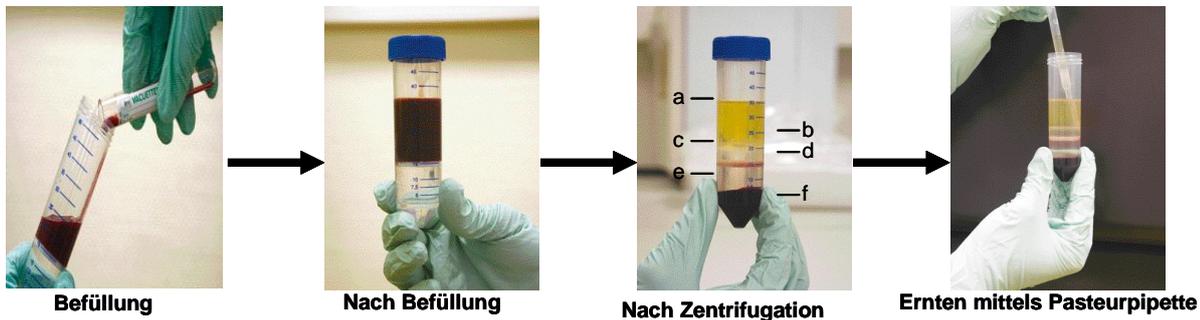


Abbildung aus: User Manual Greiner Bio One

Abbildung 6: Gewinnung des Leukozytenlysats aus heparinisierendem Vollblut mittels Ficoll Gradient.

Materialien und Chemikalien

- 2,5ml Vollblut in Li- Heparin Röhrchen
- PBS, pH 7,4, selbst hergestellt (Arbeitsgruppe Glöckner)
- H₂O dest (HPLC Qualität)
- Leucosept Röhrchen mit Ficoll Paque Beschichtung (14ml) Greiner Bio-One (Frickenhausen, Deutschland)
- Zentrifuge (Heraeus)
- Greiner 14ml Zentrifugationsröhrchen
- Trockeneis
- 2,5ml Gefrieröhrchen Greiner Bio-One (Frickenhausen, Deutschland)
- Saugglocke mit Pasteurpipettenspitze (abgebrochen)

2.2.2 Aufbereitung der Proben und Messung der Inosin 5'-Monophosphat-Dehydrogenase-Aktivität

- Starten der Inkubation: Mischen von 50µl Zelllysat + 130µl Inkubationspuffer in einem 1,5ml Eppendorf Microtube.
- Inkubation bei 37°C und 800rpm auf dem Thermomixer für 150min.
- Abbruch der enzymatischen Reaktion durch Zugabe von 20µl Perchlorsäure (4mol/l) und sofortige Kühlung der Proben auf Eis.
- Zentrifugation für 5min. um präzipitierte Proteine zu entfernen.
- Überführen von 150µl Überstand in ein neues 1,5ml Eppendorf Reaktionsgefäß, mit 10µl KCO.
- Proben für mindestens 30min. bei -80°C oder 2h bei -20°C lagern.
- Nach Auftauen und Zentrifugieren der Proben Überstand in ein HPLC Injektionsgefäß überführen.

Die IMPDH-Aktivität wurden mittels validiertem HPLC-Assay bestimmt⁸⁸. Dieser basiert auf der Inkubation lysierter MNC's mit IMP und der darauf folgenden chromatographischen Bestimmung des produzierten XMP. Das neu gebildete XMP wurde normalisiert und anhand der in den Zellen vorhandenen AMP-Konzentration, die im selben HPLC Lauf wie XMP quantifiziert wurde, gemessen^{11,12}.

Schematisch erfolgte die Messung durch:

- Injektion von 5µl Probe in die HPLC Säule.
- Säulentemperatur 40°C, flow rate 1,0ml/min.
- Zyklus Zeit beträgt 25min. im isokratischen Modus.
- Messung des externen Standards (XMP und AMP in 4 Verdünnungen: 1µmol/l, 5µmol/l, 19µmol/l, 25µmol/l).

Materialien und Chemikalien

IMP, XMP, AMP, NAD⁺, BSA Sigma Aldrich Chemicals Deisenhofen, Deutschland

PBS pH 7,4 PAA Laboratories GmbH Linz, Österreich

Weitere Chemikalien von Merck Darmstadt, Deutschland, von analytischem Grad.

Ion Pair Reagenz Tetra-N-Butylammonium-Hydrogensulfat (TABS) und Methanol HPLC Qualität (LiChropur, LiChrosolv).

Inkubationspuffer:

1mmol/l IMP

0,5mmol/l NAD⁺

40mmol/l (Na)₂HPO₄

100mmol/l KCL pH 7,4

Thermomixer (Eppendorf, Hamburg, Germany)

Shimadzu LC-2010 System (Shimadzu, Kyoto, Japan) mit eingebautem UV vis Detektor, Wellenlänge = 256nm

ProntoSIL AQ C18 Säule (Bischoff Chromatography, Leonberg, Deutschland) mit einer Partikel Größe von 3µm, 3mm inneren Durchmesser x 150mm

ClassVP Software (Shimadzu)

Isokratische Elutionslösung

6:94 (v/v) Methanol: Puffer (50mmol/l KH₂PO₄, 7mmol/l TBAS (pH 5,50))

Externer Standard

XMP oder IMP wurden mittels Inkubationspuffer, in dem 1mg/ml BSA aber weder IMP noch NAD⁺ enthalten waren zugegeben. Mit Perchlorsäure neutralisiert und auf dieselbe Art und Weise wie die Proben behandelt.

2.3 Messung von Mycophenolsäure im Plasma

Die entnommenen EDTA-Plasma Proben zur MPA Quantifizierung wurden innerhalb von 30 Minuten nach Entnahme ins Labor gebracht, zentrifugiert und bei -20°C eingefroren. Zur Messung von Gesamt- und freier MPA wurden die gefrorenen Proben in die Abteilung für klinische Chemie der Georg August Universität Göttingen verschickt (Pharmakokinetik). Hier erfolgte die Messung der Plasma Konzentrationen von MPA mittels validiertem HPLC-Assay⁸⁸. Um Einflüsse auf die Testergebnisse möglichst gering zu halten, wurden in diesem Assay die gleichen Ansatzvolumen zur Bestimmung der MPA Konzentration bei den Proben von Kindern und Erwachsenen verwendet.

- Kalibrieren der Säule mit medikamentenfreiem Plasma und Zusatz von 3mg/l MPA oder 200mg/l MPA.
- Mischen von 200 μl Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) Plasma + 100 μl Acetonitril angereichert mit 15mg/l Carboxy Butoxy Äther von MPA (MPAC) (als interner Standard).
- Zugabe von 20 μl Perchlor Säure (150g/l) + 20 μl Natriumwolframat Lösung (250g/l).
- Mischen und kurz Zentrifugieren.
- Pipettieren von 50 μl des Überstands auf die C18-Säule.
- Runterwaschen der verschiedenen Kompartimente mit Elutionslösung und Messung bei 254nm und 215nm.

Mobile Phase für die Säulenelutionslösung:

Lösung A: 250ml Acetonitril + 750ml 20mmol Phosphat Puffer, (pH 3,0)

Lösung B: 700ml Acetonitril + 300ml 20mmol Phosphat Puffer, (pH 6,5)

Die Elutionslösung zeigte folgenden Gradienten:

0 - 4,5min. 3% B

5 - 12min. 30% B

12,5 - 40min. 100% B

2.4 Pharmakokinetische und Pharmakodynamische Analyse

Die pharmakokinetischen Parameter von Mycophenolat Mofetil wurden anhand der individuellen Plasmakonzentrations–Zeit-Profile unter Verwendung der üblichen non-compartmental Gleichungen bestimmt. Die Konzentration vor Medikamenten Einnahme (C_0), $C_{0,5}$ bis C_6 bzw. C_{12} Werte, t_{cmax} (die Zeit der maximalen Konzentration (C_{max}) im Dosierungsintervall) und die Fläche unter der Konzentrations-Zeit Kurve (AUC_{0-6h}) wurden bei Kindern und Jugendlichen kurz nach der Transplantation verglichen. Die Zeit der maximalen Medikamentenkonzentration C_{max} , $AUC_{0-12 h}$, und die aktuelle Medikamenten Clearance (CL/F) wurden bei Jugendlichen in der stabilen Phase nach Transplantation verglichen. Die Berechnung der AUC erfolgte durch eine linear trapezoidale Methode. Die Medikamenten Clearance CL/F nach oraler Einnahme der Dosis wurde wie folgt berechnet:

$$CL/F = D/AUC_{0-12h}$$

D entspricht der eingenommene MPA Menge (bei Einnahme von 500mg MMF entspricht dies 370mg MPA).

Zur Pharmakodynamischen Analyse wurden die unterschiedlichen IMPDH-Aktivitäten von Kindern und Erwachsenen vor Transplantation ($A_{\text{Pre-Transplant}}$), vor Medikamenteneinnahme (A_0 (12 Stunden nach der vorhergegangenen Medikamenteneinnahme)), die $A_{0,5}$ bis A_6 bzw. A_{12} Werte, t_{Amin} (Zeit bis zur geringsten Enzymaktivität (A_{tmin})), und die relative IMPDH-Inhibition ($(1 - A_{\text{tmin}} / A_0) * 100$) miteinander verglichen. Die erwarteten Flächen unter der Enzymaktivitäts-Zeit-Kurve ($\text{AEC}_{0-6\text{h}}$ oder $\text{AEC}_{0-12\text{h}}$) wurden ebenfalls mit trapezoidal-linearer Methode berechnet.

Darüber hinaus wurde die IMPDH-Aktivität der MPA-Konzentration grafisch gegenübergestellt, und die individuellen Zusammenhänge zwischen Konzentration und Aktivität wurden anhand von 4 Varianten des generell inhibitorischen E_{max} Modells berechnet:

$$A = A_{\text{pre transplant}} - A_{\text{low}} * C^H / (C^H + IC_{50}^H)$$

Variante 1: einfaches E_{max} Modell ($H=1$) mit voller Inhibition bei hohen Konzentrationen ($A_{\text{low}} = A_{\text{pre-transplant}}$).

Variante 2: einfaches E_{max} Modell ($H=1$) mit möglichst inkompletter Hemmung bei hohen Konzentrationen (A_{low} voraussichtlich als ein Messwert).

Variante 3: sigmoides E_{max} Modell (H voraussichtlich als Parameter) mit voller Hemmung bei hohen Konzentrationen ($A_{\text{low}} = A_{\text{pre-transplant}}$).

Variante 4: sigmoides E_{max} Modell mit möglichst inkompletter Hemmung bei hohen Konzentrationen.

Kenngößen waren die maximal mögliche IMPDH-Suppression (A_{low}), die IC_{50} Konzentration, die zur halb maximalen IMPDH-Suppression führt und der Sigmoiditäts Parameter H . Ein Vergleich zwischen den unterschiedlichen Berechnungsmodellen wurde durch visuelle Überwachung der Ergebnisse unter Anwendung des Akaike Informations Kriteriums (AIC)⁸⁹ durchgeführt.

Hier erschienen das einfache E_{max} Modell (bei dem H gleich 1 gesetzt ist) und das Sigmoidale E_{max} Modell (mit der vollen Inhibition bei hohen Konzentrationen), als die am Besten geeigneten Modelle.

2.5 Genotypisierung der Inosin 5'-Monophosphat-Dehydrogenase 1 und 2

Eine mögliche Erklärung der individuell variierenden IMPDH-Aktivität könnte durch Betrachtung bereits bekannter Polymorphismen im IMPDH-Gen gefunden werden. Es wurden insgesamt 6 bekannte Einzelbasenpolymorphismen (SNP's) von IMPDH1 und IMPDH2 untersucht.

2.5.1 Probenaufbereitung und Messung der Einzelbasen Polymorphismen

Aus dem gefrorenen antikoagulierten Blut (2,5ml) wurde die genomische DNA mittels Zentrifugations-Röhrchen (spin columns, Machery Nagel, Düren, Deutschland) aufgereinigt. Einzelbasenpolymorphismen (SNP's) wurden mit Polymerase Kettenreaktion (PCR) amplifiziert und mit Hybridisierungssonden in einem Roche LightCycler 480 genotypisiert (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland).

Folgende 6 SNP's wurden ausgewählt:

1. IMPDH1, Wang et al., Clin Pharm Ther 2008;83:711 *rs2278293* C>T LC480 C-
2. SNP im IMPDH1 Promotor, *rs11761662* A>G LC480 A+
3. IMPDH2, Sombogaard et al., PG & Genomics 2009;19:626 *rs11706052* A>G CP-
4. SNP im IMPDH2 Promotor, ausgewählt *rs4974081* T>C CP+
5. SNP IMPDH2, 1000 Genomes Project, *rs73082350* G>A LC480 C-
6. IMPDH2, Wang et al., PG&Genomics 2007; 17:283 787-L263F C>T LC480 C+

Es wurden bei 79 gesunden Kindern und Jugendlichen sowie bei 26 Kindern mit terminalen Nierenversagen (ESRD), im Alter von 2,4 bis 17,8 Jahren, Blutproben zur Genotyp Bestimmung entnommen. 18 von 26 Kindern wurden zum Zeitpunkt der Probenentnahme dialysiert.

Das Polymorphismen Screening wurde in Zusammenarbeit mit dem genetischen Labor der klinischen Chemie der Universität Göttingen durch die Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. von Ahsen durchgeführt.

Die Versuchsansätze, bestehend aus drei Oligonukleotiden (siehe Anhang) wurden immer mit einer unmarkierten Genotypisierung-Sonde (Beschriftung_CP) gekoppelt. Diese enthielt immer ein 3' Phosphat-Ende, um eine DNA Elongation durch die Taq-Polymerase zu vermeiden. Wenn Signale von unmarkierten Genotypisierungstests niedrig waren, wurde ein herkömmlicher auf 4 Oligonukleotid-Hybridisierungssonden basierender Assay verwendet. Die mit der Beschriftung xxx_anchor bezeichneten Anker-Sonden enthielten ein 5' Cy5 und 3' Phosphat-Ende. Während Proben markiert mit einer _probe Beschriftung Hybridisierungssonden mit einem 3' Fluorescein-Ende enthielten. Alle Oligonucleotide wurden durch Operon (Germany) synthetisiert.

3 Statistische Auswertung

Eine deskriptive, statistische Analyse wurde zur Charakterisierung der Patientendemographie, der Basis IMPDH-Aktivität, zur Bestimmung pharmakokinetischer und pharmakodynamischer Parameter der unterschiedlichen Altersgruppen und den Stadien nach Transplantation angewandt. Im Falle einer nicht normalen statistischen Verteilung wurden Median und Meßbereich angegeben. Zur Bestätigung der Normalverteilung der Daten wurde der Shapiro-Wilks Test verwendet. Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen wurden je nach Anwendungsbereich mit dem two-sided Student's t-Test, dem Fisher's Exact Test, Mann-Whitney U Test, Wilcoxon signed-rank Test, Jonckheere-Terpstra Test und dem nicht parametrischen ANOVA-Test (Kruskal-Wallis Test, gefolgt von einer Schaich-Hammerle post hoc Analyse) auf statistische Signifikanz überprüft.

Die Altersabhängigkeit der IMPDH-Aktivität bei gesunden Individuen wurde mittels linearer und nicht linearer Regressionsanalyse ausgewertet. Um den vermuteten Unterschied der IMPDH-Basal-Aktivität statistisch vergleichen zu können mussten zum Erreichen einer klinischen Relevanz von 60% und einer Leistungsbestimmung von 80% mindestens 20 gesunde Kinder in jeder Altersgruppe verbleiben.

Die beschreibende Statistik und die statistischen Tests wurden unter Verwendung von SPSS Software Version 17.0 (SPSS, Chicago, IL, USA) ausgewertet; Ein Wert von $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen. Zur genauen Berechnung der Hardy Weinberg Gleichung⁹⁰ wurde Power Marker V3.25 verwendet⁹¹. Zusammenhänge zwischen genetischen Polymorphismen und der IMPDH-Aktivität wurden mittels HAPSTAT Software getestet⁹². Pharmakogenetische- und pharmakodynamische Analysen erfolgten durch Verwendung von WinNonlin Professional Version 5.2 (Pharsight Corporation, Mountain View, CA, USA) und Microsoft EXCEL 2003.

Zum Erreichen primärer Objektivität wurde das Probenvolumen berücksichtigt. Um den vermuteten Unterschied der IMPDH-Unterdrückung von 30% und 80% Leistungsanalyse respektiv statistisch vergleichen zu können, mussten mindestens 6 Kinder und Erwachsene nach Nierentransplantation miteinander verglichen werden.

4 Ergebnisse

4.1 Demographie und Biochemie

Die Auswertung des Blutbildes zeigt, dass die Probanden bezüglich der Leukozyten und Lymphozyten-Anzahl Normwerte aufwiesen. Die höheren Lymphozyten- und Leukozytenwerte in der Gruppe der Kleinkinder - im Vergleich zu Schulkindern und Adoleszenten - sind als physiologisch anzusehen, da in dieser Altersgruppe das Immunsystem aufgrund altersphysiologischer Umstände verstärkt aktiviert ist.^{93,94}

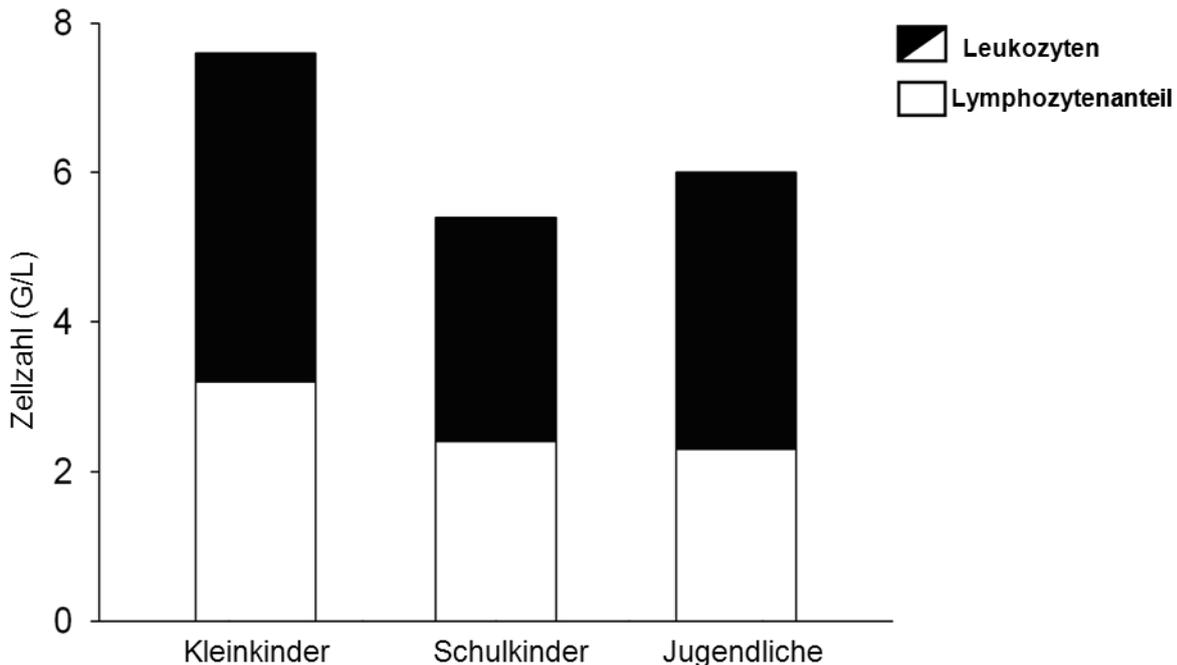


Abbildung 7: Anzahl der Lymphozyten und Leukozyten bei gesunden Probanden. Wie erwartet zeigten Kleinkinder die höchsten absoluten Leukozyten- und Lymphozyten-Werte (7,6g/l (4,9-13,0g/l); 3,2g/l (2,2-6,7g/l; $p < 0,01$) verglichen mit Schulkindern (5,4g/l (2,2-10,0g/l); 2,4g/l (0,8-4,6g/l)) und Jugendlichen (6,0g/l (2,8-13,7g/l); 2,3g/l (1,2-3,2g/l)).

Die Patientendaten und biochemischen Werte der nierentransplantierten Kinder werden in Tabelle 3 erfasst. Die Probensammlung erfolgte zusammen mit der pharmakokinetisch-/pharmakodynamischen Probenentnahme zu einem frühen Zeitpunkt nach Transplantation (Tag 8 - 23 nach Transplantation).

4.1.1 Vergleich der Inosin 5'-Monophosphat-Dehydrogenase-Aktivität bei gesunden Kindern verschiedener Altersstufen, Erwachsenen und Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz

Die IMPDH-Aktivität wies sowohl in der pädiatrischen als auch der Erwachsenen Kontrollgruppe eine große interindividuelle Variabilität auf. Der Variationskoeffizient betrug 40,2% (Abbildung 8).

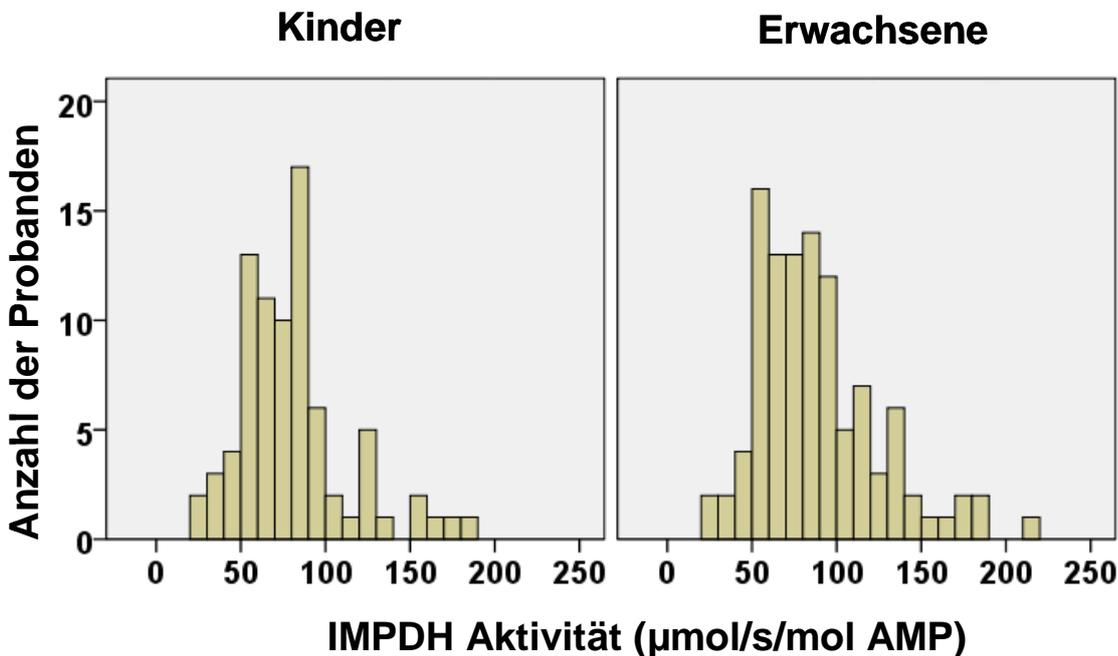


Abbildung 8: Inter-Individuelle Variabilität der IMPDH-Aktivität bei 79 gesunden Kindern und 106 gesunden Erwachsenen.

Zum Vergleich der IMPDH-Aktivität der gesunden Kinder und Erwachsenen bezüglich des Alters wurde eine Regressionsanalyse durchgeführt. Hier konnten keine altersabhängigen Unterschiede bezüglich der IMPDH-Aktivität (Abbildung 9) nachgewiesen werden ($r^2=0,009$, $p=0,19$; Abbildung 9). Die mittlere IMPDH-Basis-Aktivität war bei gesunden Kindern und Erwachsenen vergleichbar (78 (30-184) $\mu\text{mol/s/mol AMP}$ im Vergleich zu 83 (26-215) $\mu\text{mol/s/mol AMP}$) und zeigte ebenfalls keine statistische bzw. biologisch relevante Abweichung in der Gruppe der Kleinkinder (82 (42-184) $\mu\text{mol/s/mol AMP}$), der Gruppe der Schulkinder (61 (30-153) $\mu\text{mol/s/mol AMP}$) und der Gruppe der Jugendlichen (83 (43-154) $\mu\text{mol/s/mol AMP}$).

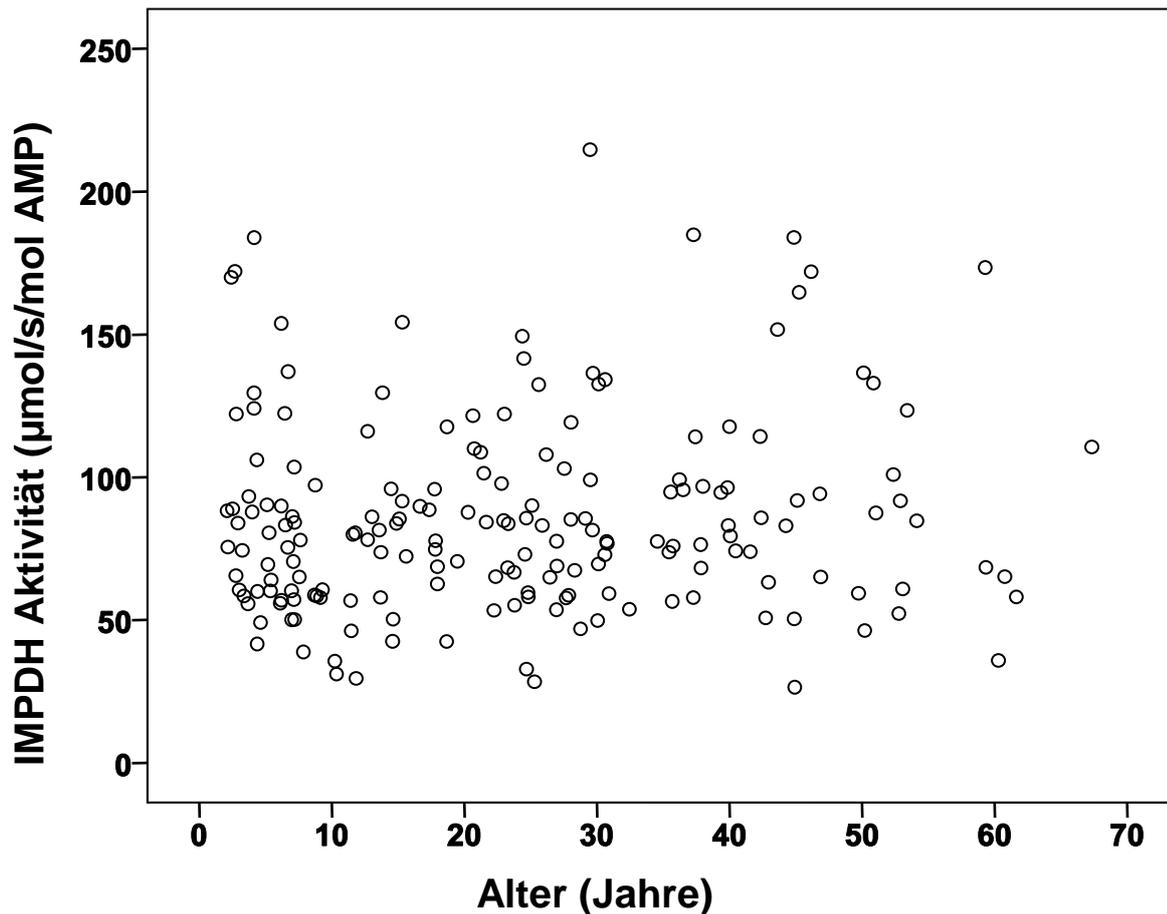


Abbildung 9: IMPDH-Aktivität im Bezug auf das Alter bei 79 gesunden Kindern und 106 gesunden Erwachsenen.

Die um 27% niedrigere IMPDH-Aktivität in der Gruppe der Schulkinder (Tabelle 4) war bei Anwendung des Kruskal-Wallis Tests gerade eben signifikant ($p=0,049$), wohingegen die Post Hoc Analyse keine signifikanten Ergebnisse aufwies.

Bei den erwachsenen Probanden mit ESRD war die mittlere IMPDH-Aktivität signifikant höher als bei gesunden Erwachsenen oder Kindern (Tabelle 4). Des Weiteren konnte eine tendenziell höhere IMPDH-Aktivität bei Kindern mit ESRD im Vergleich zu gesunden Kindern beobachtet werden. Jedoch erreichte dieser Unterschied keine statistische Signifikanz, was auf die geringe Anzahl an Kindern mit ESRD ($n=27$) zurückzuführen sein kann.

Zur Analyse der verschiedenen Untergruppen, wurden die Erwachsenen mit ESRD in 2 Gruppen unterteilt:

Patienten mit Dialysebehandlung bis 24 Monate vor Probenentnahme zur IMPDH-Bestimmung (dies beinhaltet Patienten mit vorherigen Transplantationen) und Patienten die mehr als 24 Monate Dialyse erhielten (inklusive Patienten mit Retransplantationen).

Patienten die >24 Monate dialysiert wurden, hatten eine signifikant höhere IMPDH-Aktivität ($p=0.011$) im Vergleich zu Patienten die ≤ 24 Monate dialysiert wurden (Tabelle 4).

Fisher's exact Test.	Nummer der Individuen	IMPDH-Aktivität ($\mu\text{mol/s/mol AMP}$)		
		Median	Min	Max
Gesunde Kinder	79	78	30	184
Altersgruppe				
2,0-5,9 a	26	82	42	184
6,0-11,9 a	31	61	30	153
12,0-17,9 a	22	83	43	154
Kinder mit ESRD	27	84	40	163
Gesunde Erwachsene	106	83	26	215
Erwachsene mit ESRD	156	94 [†]	36	243
Dialyse ≤ 24 Monate	45	81	47	163
Dialyse > 24 Monate	111	102 ^{††}	36	243

Tabelle 4: Basale IMPDH-Aktivität in peripheren mononukleären Zellen gesunder Individuen und Patienten mit ESRD.

† $p < 0,0001$ Beim Vergleich der Werte gesunder Kinder und Erwachsener.

†† $p = 0,011$ Im Vergleich zu den Werten mit Dialyse ≤ 24 Monaten.

4.1.2 Geschlechtsabhängigkeit der Inosin 5'-Monophosphat-Dehydrogenase-Aktivität

Es konnte kein Unterschied im Median der IMPDH-Aktivität im Bezug auf das Geschlecht festgestellt werden (Abbildung 10).

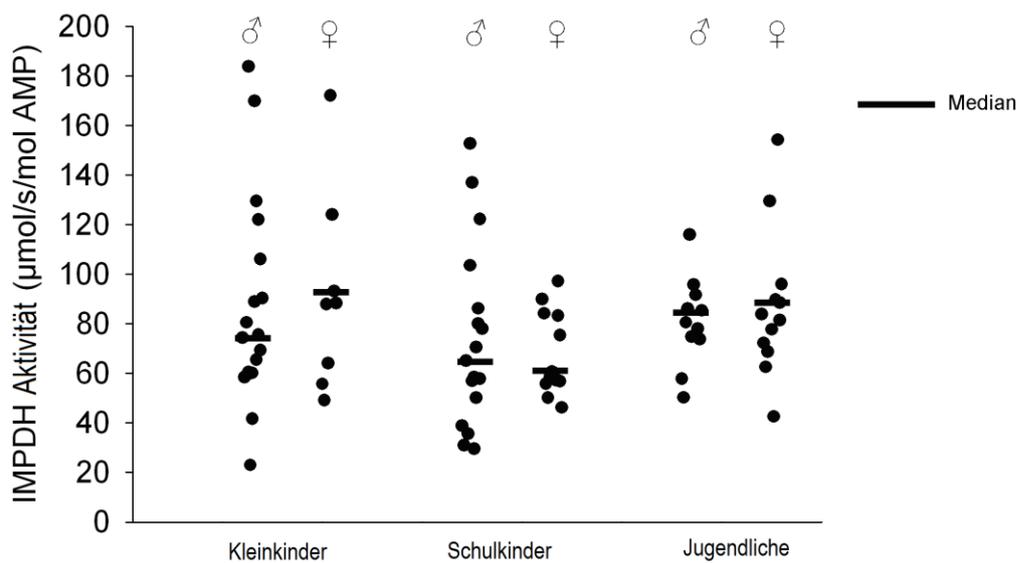


Abbildung 10: Abhängigkeit der IMPDPH-Aktivität vom Geschlecht.

4.1.3 Pharmakokinetik der Mycophenolsäure

Pharmakokinetische Parameter der MPA bei Kindern und Jugendlichen in der frühen Phase nach Transplantation werden in Tabelle 5 dargestellt. Die entsprechenden pharmakokinetischen Profile werden in Abbildung 11 veranschaulicht. Die MPA-Plasma-Konzentrationen während der ersten 6 Stunden nach MMF-Aufnahme verhielten sich bei Kindern und Jugendlichen ähnlich (Tabelle 5). Das pharmakokinetische Profil von MPA war in beiden Altersgruppen durch einen frühen, schnellen Anstieg der MPA-Konzentration charakterisiert. Mit Ausnahme eines Kindes wurde die maximale MPA-Konzentration bereits 0,5 Stunden nach MMF-Gabe von allen Patienten erreicht. Ein kleiner zweiter Peak der MPA-Plasma-Konzentration zeigt sich in einem Zeitraum von 6-12 Stunden nach MMF-Gabe, bei fünf von neun Jugendlichen. Dies ist übereinstimmend mit dem bekannten enterohepatischen Kreislauf von MPA.

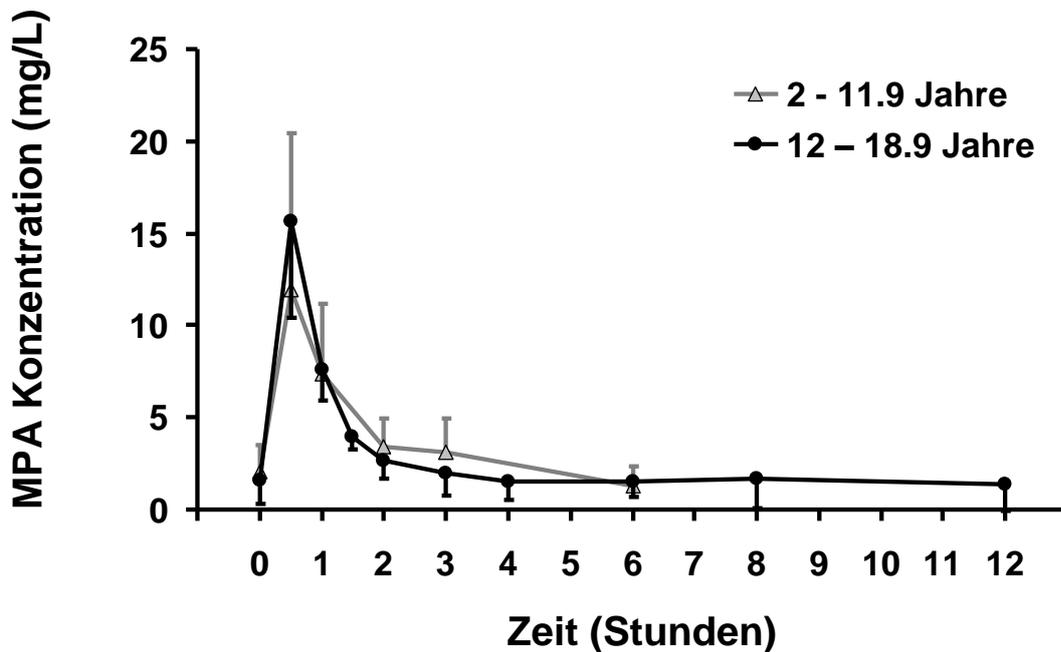


Abbildung 11: Vergleich des zwölfstündigen MPA-Plasma Konzentrations-Zeit Profil (Arithmetisches Mittel – SD) bei Jugendlichen (Altersgruppe 12,0 – 18,9 Jahre, n=9) mit dem sechsstündigen MPA-Plasma-Konzentrations-Zeit Profil (Arithmetisches Mittel + SD) bei Kindern (Altersgruppe 2,0 – 11,9 Jahre, n=8) zu einem frühen Zeitpunkt nach Transplantation.

	Altersgruppe		P Wert
	2,0-11,9 Jahre	12,0-18,9 Jahre	
MPA- Konzentration (mg/l)			
C₀	1,9 (0,1-4,4)	0,8 (0,2-3,4)	n.s.
C_{0,5}	8,4 (3,5-28,7)	14,7 (11,1-28,3)	n.s.
C₁	6,0 (3,3-14,0)	8,0 (4,7-10,0)	n.s.
C₂	3,0 (2,0-5,7)	2,6 (1,3-4,0)	n.s.
C₃	3,3 (0,6-5,4)	1,8 (0,6-3,6)	n.s.
C₆	1,1 (0,1-3,6)	1,6 (0,4-2,6)	n.s.
t_{Cmax} (h)	0,5 (0,5-1,0)	0,5 (0,5)	n.s.
AUC_{0-6h}(h·mg/l)	21,2 (10,3-40,3)	22,4 (16,5-26,6)	n.s.

Tabelle 5: Vergleich pharmakokinetischer und pharmakodynamischer Parameter bei Kindern und Jugendlichen im frühen Stadium nach Transplantation.

Die Daten sind als Median, die Bereiche in Klammern dargestellt. C₀: Basalwert im Plasma vor Dosis-Gabe, C_{0,5} - C₆: Plasma Konzentration zu verschiedenen Zeitpunkten, t_{max}: Zeit bis zur maximalen Plasma Konzentration, AUC_{0-6h}: Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve.

Im Vergleich der PK-Profile der frühen Phase nach Transplantation mit denen der stabilen Phase nach Transplantation finden sich in der stabilen Phase höhere maximale MPA Konzentrationen ((C_{max}) (Median 22,6mg/l; Bereich 15,6-32,4mg/l)) als in der frühen Phase nach Transplantation (Median 14,0mg/l (8,2-15,3mg/l; p=0,043), Abbildung 12).

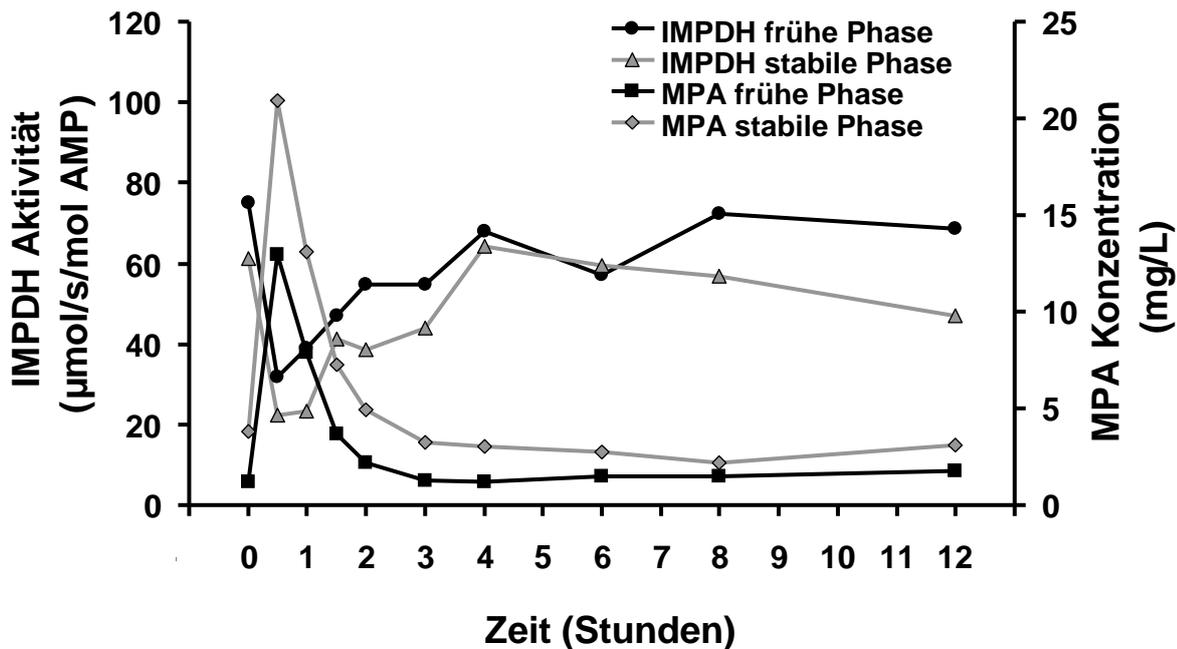


Abbildung 12: Vergleich der Mittleren IMPDH-Konzentration zur mittleren MPA-Konzentration in früher und stabiler Phase nach Transplantation bei 5 Jugendlichen.

Dementsprechend konnte ein 1,9-facher Anstieg der medianen AUC_{0-12h} zwischen der frühen (28.8h·mg/l; Bereich, 20.4-38.9h·mg/l) und stabilen Phase (53.8h·mg/l; Bereich 36.0–63.4h·mg/l; $p=0.043$), gebunden an einen 1.8-fachen Abfall der Medikamenten Clearance (CL/F frühe Phase 11.5l/h; Bereich, 9.5-13.8l/h; stabile Phase 6.5l/h; Bereich, 5.0-10.3l/h; $p=0.043$) beobachtet werden.

4.1.4 Pharmakodynamik der Mycophenolsäure

Die individuellen IMPDH-Aktivitäts-Zeitkurven weisen in ihrer graphischen Darstellung eine hohe Variabilität zwischen den Patienten, sowohl mit einzelnen als auch multiplen Fußpunkt-Profilen, auf. Dennoch verhält sich die IMPDH-Aktivität zur MPA-Plasma-Konzentration entgegengesetzt. Es konnte hier eine maximale IMPDH-Aktivitätshemmung zur Zeit der maximalen MPA-Plasma-Konzentration ($t_{C_{max}}$ und $t_{A_{min}}$) in 12 von 18 Patienten beobachtet werden (Tabelle 6, Abbildung 12, Abbildung 13). Ein Vergleich der IMPDH-Aktivität und deren Reaktion auf MPA bei Kindern und Jugendlichen in der frühen Phase nach Transplantation wies keinen signifikanten Unterschied auf (Tabelle 6).

	Altersgruppe		P Wert
	2,0-11,9 Jahre	12,0-18,9 Jahre	
IMPDH-Aktivität ($\mu\text{mol/s/mol AMP}$)			
A₀	71 (27-103)	79 (43-138)	n.s.
A_{0.5}	23 (5-66)	20 (13-42)	n.s.
A₁	34 (13-44)	39 (12-64)	n.s.
A₂	50 (33-67)	52 (23-103)	n.s.
A₃	46 (19-63)	44 (17-85)	n.s.
A₆	50 (34-71)	47 (22-102)	n.s.
A_{pre-transplant}	84 (76-141)	81 (61-133)	n.s.
t_{Amin} (h)	0.5 (0.5-3.0)	0.5 (0.5-2.0)	n.s.
AEC_{0-6h} (h·$\mu\text{mol/s/mol AMP}$)	284 (181-354)	304 (148-515)	n.s.
Maximale IMPDH-Inhibition (%)	64 (29-87)	73 (52-90)	n.s.

Tabelle 6: Vergleich der IMPDH Aktivität nach MMF Gabe bei Kindern und Jugendlichen im frühen Stadium nach Transplantation.

Die Daten sind als Median, die Bereiche in Klammern dargestellt. A₀: IMPDH-Aktivität vor Dosisgabe, A_{0.5} - A₆: IMPDH-Aktivität zu verschiedenen Zeitpunkten, A_{pre-transplant}: IMPDH-Aktivität vor der Transplantation, t_{Amin}: Zeit bis Erreichen der geringsten Enzym Aktivität, AEC_{0-6h}: Fläche unter der Enzym Zeit Kurve.

Obwohl der Median der MPA-AUC_{0-12h} in der stabilen Phase nach Transplantation signifikant höher lag als in der frühen Phase nach Transplantation, zeigte sich keine statistisch signifikante Differenz ($p=0,345$) in den entsprechenden IMPDH AEC₀₋₁₂ in der frühen Phase nach Transplantation ($727\text{h}\cdot\mu\text{mol/s/mol AMP}$; Bereich, $505\text{-}1113\text{h}\cdot\mu\text{mol/s/mol AMP}$) im Vergleich zur stabilen Phase nach Transplantation ($575\text{h}\cdot\mu\text{mol/s/mol AMP}$; Bereich, $481\text{-}765\text{h}\cdot\mu\text{mol/s/mol AMP}$), (Abbildung 12).

Zur weiteren Charakterisierung der MPA-Wirkung, untersuchten wir den Zusammenhang der IMPDH-Aktivitäts-Werte mit den MPA-Plasma-Konzentrationen (Abbildung 13) und berechneten die individuellen IC_{50} Werte mittels inhibitorischen E_{max} Modellen. Das inhibitorische E_{max} Modell und das inhibitorisch sigmoide E_{max} Modell mit voller Hemmung bei hohen Konzentrationen erwiesen sich als die am Besten geeigneten Modelle. Jedoch wurden einige Profile unter Verwendung des sigmoide Modells angepasst. Hierbei blieb der Mittelwert der AIC-Werte so gut wie unverändert. ($0,83 \pm 5,0$ zu $0,76 \pm 6,3$; für sowohl das einfache, als auch das sigmoide Modell). Beide Modell-Varianten der inkompletten Hemmung bei hohen Konzentrationen blieben, wie auch schon die AIC-Werte vermuten ließen, eher untergeordnet ($2,9 \pm 5,0$ and $4,6 \pm 5,5$). Es konnten keine signifikanten Unterschiede in der IC_{50} von Kindern (Median, 5,4 mg/l; Bereich, 0,8-30,6 mg/l; Median H, 1,0) und Jugendlichen (Median, 4,4 mg/l; (0,8-12,0 mg/l); Median H, 0,9) in der frühen Phase nach Transplantation gefunden werden. Bei Jugendlichen jedoch wies der Median IC_{50} in der stabilen Phase (9,6 mg/l; Bereich 0,8-12,0mg/l; Median H=0,5) einen deutlich höheren Wert als in der frühen Phase nach NTx auf (5,0mg/l; Bereich 0,8-12,0mg/l; Median H=1,0; $p = 0,043$).

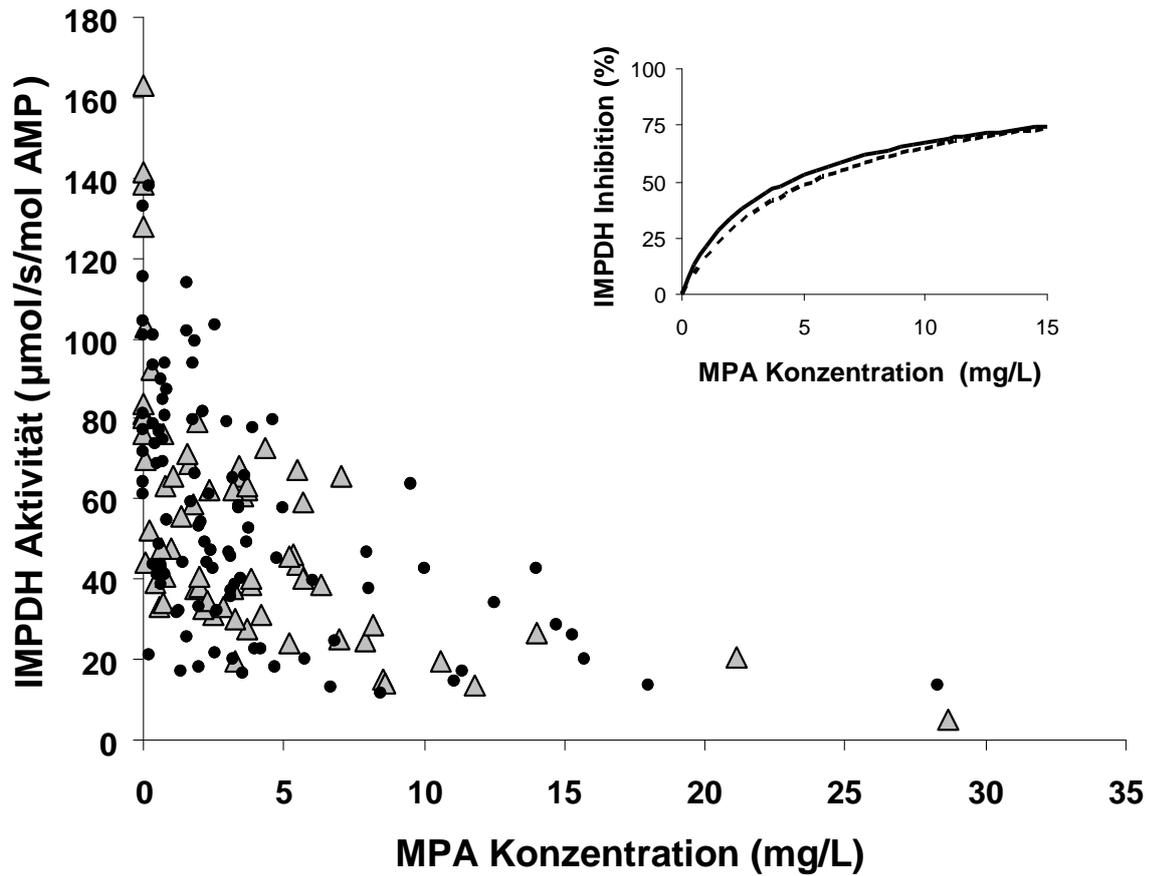


Abbildung 13: Zusammenhang zwischen MPA-Konzentration und IMPDH-Aktivität bei Jugendlichen (im Alter von 12,0-18,9 Jahre, n=9, Kreise) und Kindern (im Alter von 2,0-11,9 Jahre, n=8, Dreieck) in der frühen Phase nach Transplantation. Die kleine Grafik rechts oben zeigt die hieraus abgeleitete PK-PD Abhängigkeit bei Jugendlichen (Kontinuierliche Kurve) und Kindern (gestrichelte Kurve).

4.1.5 Einfluss von Polymorphismen auf die Inosin 5'-Monophosphat-Dehydrogenase 1- und 2-Aktivität

Alle untersuchten SNP's wurden durch die Hardy-Weinberg Gleichung berechnet ($p > 0,1$). Die IMPDH2 *L263F* Mutation²⁰ konnte in der Studienpopulation nicht nachgewiesen werden. Der IMPDH2 *rs73082350* Polymorphismus kam nur in einer Probe vor. Hierbei war auffällig, dass dieser Träger die niedrigste IMPDH-Aktivität in dieser Studie aufwies (23 $\mu\text{mol/s/mol AMP}$). Diese Probe wurde aus den weiteren Analysen ausgeschlossen.

Die verbliebenen 4 SNP's der IMPDH1 und IMPDH2 wurden in den restlichen 105 Proben analysiert (Tabelle 7).

Im Vergleich der gesunden Kinder mit den Kindern mit ESRD zeichnete sich eine Neigung zu niedrigeren IMPDH-Aktivitäten bei gesunden Kindern ab ($p = 0,075$, Mann-Whitney test). Die Genotyp Häufigkeiten für *rs11706052* in IMPDH2 unterschieden sich bei den gesunden Kontrollen im Vergleich zu den ESRD Patienten. Bei ESRD Patienten konnte häufiger ein heterozygoter Genotyp nachgewiesen werden. Ebenfalls konnte eine nicht statistisch signifikante Häufung für *rs11761662* in IMPDH1 gesehen werden. Die geringe Anzahl der ESRD Patienten ($n = 27$) im Vergleich zur Anzahl der gesunden Kontrollen ($n = 79$) könnte eine Begründung für die geringe Signifikanz sein.

Unter Verwendung eines zusätzlichen Modells in HAPSTAT konnte kein signifikanter Zusammenhang innerhalb der sechs für die Studie ausgewählten SNP's und der IMPDH-Aktivität im SNP wise oder two haplotyde Versuch, mit oder ohne Berücksichtigung des Status gesund - im Vergleich zu ESRD als umweltbedingte Variable - festgestellt werden.

Gen	Marker	Genotyp	Gesamt		Gesund		ESRD		Genotyp	
			Anzahl	Freq	Anzahl	Freq	Anzahl	Freq	chi square	p
IMPDH1	rs11766743	WT	73	0,64	49	0,61	24	0,71	0,68	
		Hetero	36	0,32	27	0,34	9	0,26		
		Homo	5	0,04	4	0,05	1	0,03		
IMPDH1	rs7802305	WT	45	0,39	30	0,38	15	0,44	0,42	
		Hetero	55	0,48	38	0,48	17	0,50		
		Homo	14	0,12	12	0,15	2	0,06		
IMPDH1	rs2278293	WT	32	0,28	23	0,29	9	0,26	0,89	
		Hetero	59	0,52	40	0,50	19	0,56		
		Homo	23	0,20	17	0,21	6	0,18		
IMPDH1	rs11761662	WT	84	0,74	54	0,68	30	0,88	0,07	
		Hetero	27	0,24	23	0,29	4	0,12		
		Homo	3	0,03	3	0,04	0	0,00		
IMPDH2	rs4974081	WT	63	0,55	44	0,55	19	0,56	0,90	
		Hetero	45	0,39	31	0,39	14	0,41		
		Homo	6	0,05	5	0,06	1	0,03		

Gen	Marker	Genotyp	Gesamt		Gesund		ESRD		Genotyp	
			Anzahl	Freq	Anzahl	Freq	Anzahl	Freq	chi square	p
IMPDH2	rs11706052	WT	91	0,80	68	0,85	23	0,68		0,04
		Hetero	22	0,19	11	0,14	11	0,32		
		Homo	1	0,01	1	0,01	0	0,00		

Tabelle 7: Häufigkeit der Polymorphismen von IMPDH1 und IMPDH2 bei gesunden Kindern und Kindern mit ESRD.

Chi square p-Werte beziehen sich auf die Genotyp basierten exact chi-square Test-Werte.

5 Diskussion

Dies ist die erste Studie, die unter prospektiven Gesichtspunkten eine mögliche altersabhängige Regulation der IMPDH-Aktivität im Rahmen der kindlichen Entwicklung untersucht. Die zentralen Ergebnisse sind:

- Die IMPDH-Aktivität gesunder Kinder unterliegt weder einer entwicklungsbedingten Regulation (Abbildung 9, Tabelle 4) noch besteht eine Geschlechtsspezifität (Abbildung 10).
- Die ausgeprägten, zuvor in gesunden Erwachsenen beschriebenen, interindividuellen Unterschiede der IMPDH-Aktivität konnten hier ebenfalls in der gesunden Kontrollgruppe bei Kindern und Jugendlichen beobachtet werden (Abbildung 8).
- Es ist nicht gelungen einen signifikanten Zusammenhang zwischen bestehenden Polymorphismen des IMPDH-Gens und der Höhe der IMPDH-Aktivität zu demonstrieren.
- Kinder und Erwachsene mit ESRD wiesen im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe eine erhöhte IMPDH-Aktivität auf (Tabelle 4).
- MPA unterdrückt die IMPDH-Aktivität bei pädiatrischen- und erwachsenen-Nierentransplantatempfängern in vergleichbarer Weise. Es zeigt sich eine maximale Hemmung der IMPDH-Aktivität im Zeitraum der maximalen MPA-Plasmakonzentration (Abbildung 12).

In dieser Studie konnte eine ausgeprägte interindividuelle Variabilität der IMPDH-Aktivität bei gesunden Kindern und Jugendlichen beobachtet werden. Dies korreliert mit den vor kurzem veröffentlichten Ergebnissen zur IMPDH-Aktivität bei Erwachsenen^{95,96}. Es ist denkbar, dass genetische Unterschiede oder umweltbedingte Faktoren, wie beispielsweise Infektionen, die einen Einfluss auf die Lymphozyten-Aktivierung haben, diese Variabilität bedingen.

Es wurde das Vorkommen von 6 relevanten SNP's des IMPDH1- und IMPDH2-Gens im Zusammenhang mit der Variabilität der IMPDH-Aktivität analysiert. Frühere

Studien konnten Zusammenhänge zwischen unterschiedlichen IMPDH-Genpolymorphismen und entweder der Höhe der IMPDH-Aktivität^{20,21} oder dem Risiko einer akuten Transplantatabstossungsreaktion^{19,81,97} beobachten^{20,97}. Interessanterweise konnten wir bei Kindern mit ESRD ein höheres Vorkommen heterozygoter Träger der IMPDH2 Variante *rs 11706052* im Vergleich zu gesunden Kindern oder Erwachsenen mit ESRD finden^{81,97}. Die biologische Bedeutung dieses Vorkommens gilt es noch weiter zu klären. In unserer Analyse konnten wir keinen Einfluss der 6 SNP's auf die IMPDH-Aktivität bestätigen. Dieser fehlende Zusammenhang könnte auf die relativ kleine Anzahl der pädiatrischen Probanden zurückzuführen sein, die hier im Vergleich zu früheren Studien mit erwachsenen Probanden untersucht wurden^{19,20,81,97}.

Obwohl keine generelle Altersabhängigkeit der IMPDH-Aktivität nachgewiesen werden konnte, konnte eine um 27% erniedrigte IMPDH-Aktivität in der Altersgruppe der gesunden Schulkinder verglichen mit gesunden Kleinkindern und Jugendlichen beobachtet werden (Abbildung 8).

Die IMPDH-Aktivität wurde auf die Adenosinmonophosphat (AMP) Konzentration der Zellen bezogen. Laut einer Studie von Glander et al.¹² gibt es keinen Hinweis auf eine Variabilität der AMP-Konzentration in Zellen unterschiedlicher Population. Somit erscheint eine eventuell höhere AMP Konzentration in den Zellen der Schulkinder im Vergleich zu anderen Altersgruppen keine hinreichende Erklärung für eine veränderte IMPDH-Konzentration in dieser Altersgruppe zu sein. Es ist bekannt, dass jüngere Kinder im Vergleich zu älteren Kindern öfter Infektionen des oberen Respirationstrakts haben^{93,94}. Eine Erklärung hierfür wäre, dass hier ein stärker stimuliertes Immunsystem mit nachfolgend erhöhter IMPDH-Aktivität bei jüngeren Kindern zugrunde liegt. Jedoch liegt die Altersgrenze unterhalb der bei Kindern beinahe doppelt so häufig Infektionen auftreten bei 10 Jahren und somit in der Schulkinder-Gruppe. In der Post Hoc Analyse waren die Unterschiede in der IMPDH-Aktivität nicht weiter signifikant und daher gibt es bis jetzt keine ausreichende Erklärung für diese Beobachtung. Im Zusammenhang mit der hohen interindividuellen Variabilität der IMPDH-Aktivität sollte diese Beobachtung als nicht biologisch relevant angesehen werden.

Es kann somit festgehalten werden, dass bezüglich des Patientenalters zum Zeitpunkt der geplanten Nierentransplantation keine Notwendigkeit einer altersbezogenen MMF-Dosisanpassung besteht.

Trotz eines 1,9-fachen, signifikanten Anstiegs der MPA-Exposition in der stabilen Phase nach Transplantation kam es, verglichen mit der frühen Phase nach Transplantation, lediglich zu einem Abfall des IMPDH AEC₀₋₁₂ von 21%. Es konnte nachgewiesen werden, dass in den ersten Monaten nach Transplantation lediglich die Exposition der totalen MPA, jedoch nicht die der freien ungebundenen MPA ansteigt⁹. Die freie MPA spiegelt hier die pharmakologisch aktive Form der MPA wieder³⁷. Demzufolge könnte die beobachtete Diskrepanz zwischen dem deutlichen Anstieg der totalen MPA und einem nur gering korrespondierenden Abfall der IMPDH-Aktivität durch eine unveränderte Exposition zur freien MPA erklärt werden (jedoch wurde in dieser Studie die Menge der freien MPA nicht direkt bestimmt). Ähnliche Beobachtungen finden sich in einer Studie von Chiarelli et al., die von einer signifikanten inversen Korrelation der IMPDH-Aktivität und der Konzentration der freien MPA 2h nach Einnahme der Morgen Dosis, ohne Anstieg der totalen MPA C₂ oder -C₀ berichtet¹⁵. Somit scheint das Ausmaß der IMPDH-Hemmung auf die Konzentration der freien MPA und nicht der totalen MPA zurückzuführen zu sein. Dies deutet wiederum darauf hin, dass die immunsuppressive Aktivität von MPA, zumindest bezüglich der IMPDH-Aktivitätshemmung, in den ersten Monaten nach Transplantation, trotz eines maßgeblichen Anstiegs der totalen MPA-Exposition, relativ konstant bleibt.

Im Vergleich zu den zuvor publizierten IC₅₀ Werten bei pädiatrischen Nierentransplantationspatienten konnten in dieser Studie höhere IC₅₀ Werte beobachtet werden¹⁶. Fukuda et al.¹⁶ berichteten über IC₅₀ Werte um 1mg/l bei pädiatrischen Patienten. Dieser Wert liegt im klinisch etablierten MPA Vor-Dosis-Konzentrations-Zielbereich von 1,0 bis 3,5mg/l⁸. Die in dieser Studie gemessenen mittleren IC₅₀ Werte sind bedeutend höher und korrespondieren eher mit MPA C_{max} als mit den MPA Vor-Dosis-Werten. Dieser Unterschied könnte durch den hier verwendeten weiterentwickelten Tests zur IMPDH-Aktivitäts-Bestimmung¹² erklärt werden. Im Vergleich zu vorhergehenden Meßmethoden¹¹ wird dieser Assay nicht länger durch eine mögliche fehlerhafte MNC Zellzahlbestimmung, die zu falsch niedrigen Messwerten der IMPDH-Aktivität führen kann, beeinflusst.

Das beobachtete Ausmaß der maximalen IMPDH-Hemmung nach MMF-Einnahme war bei Kindern und Jugendlichen (mittlere maximale Hemmung 64%, respektiv 73%) vergleichbar und ist der beschriebenen mittleren maximalen Hemmung bei

nierentransplantierten Erwachsenen⁹⁸ annähernd ähnlich (67%). Diese Beobachtung deckt sich ebenfalls mit den Ergebnissen weiterer klinischer Studien zur MMF-Wirkung - bezogen auf eine Verhinderung von in der Biopsie nachgewiesenen akuten Abstoßungsreaktion - bei pädiatrischen Nierentransplantationspatienten^{7,99}.

Die erhobenen Daten unserer und zuvor durchgeführter Studien bei pädiatrischen und erwachsenen Nierentransplantatempfängern zeigen ebenfalls, dass die IMPDH-Aktivität bereits innerhalb 4-8h nach MMF-Einnahme auf den Ausgangswert zurückkehrt. Diese Beobachtung lässt die Frage aufkommen, ob eine MMF-Gabe alle 8 Stunden effektiver ist, als die bisherige Gabe alle 12 Stunden. Jedoch können momentan keine genauen Aussagen zur klinischen Notwendigkeit einer kompletten IMPDH-Hemmung bei Nierentransplantatempfängern während eines Dosis-Intervalls gemacht werden, da sich durch die Variabilität der MPA-Pharmakokinetik das tatsächlich notwendige Ausmaß der IMPDH-Hemmung nicht klar erkennen lässt¹⁰⁰. Trotzdem sollte an dieser Stelle erwähnt werden, dass es Hinweise auf eine Aufteilung der MMF-Erhaltungsdosis auf 3 Gaben pro Tag gibt, beispielsweise bei der Lupusnephritis¹⁰¹.

Es konnte beobachtet werden, dass Patienten mit ESRD eine höhere IMPDH-Aktivität als gesunde Individuen aufwiesen (Tabelle 4). Zudem hatte die Dialysedauer der Patienten, einen signifikanten Einfluss auf die IMPDH-Aktivität (Abbildung 14). Die potentiell zugrunde liegende Ursache könnte eine konstant erhöhte Aktivierung des Immunsystems bei Patienten mit ESRD sein, da die Urämie per se ähnlich wie die Dialyse mit einer chronischen Entzündung assoziiert ist¹⁰²⁻¹⁰⁴. Spekulativ gesehen könnte man darüber diskutieren, ob ein Anstieg der IMPDH-Aktivität bei Patienten vor geplanter NTx bei längerer Dialysedauer zu einer erhöhten Inzidenz akuter Abstoßungsepisoden und somit erniedrigtem Transplantat-Überleben führt¹⁰⁵, insbesondere wenn man den Bericht von Glander et al. berücksichtigt, der den Zusammenhang zwischen einer hohen IMPDH-Aktivität vor Transplantation und dem Auftreten akuter Abstoßungsreaktionen beschreibt¹⁷.

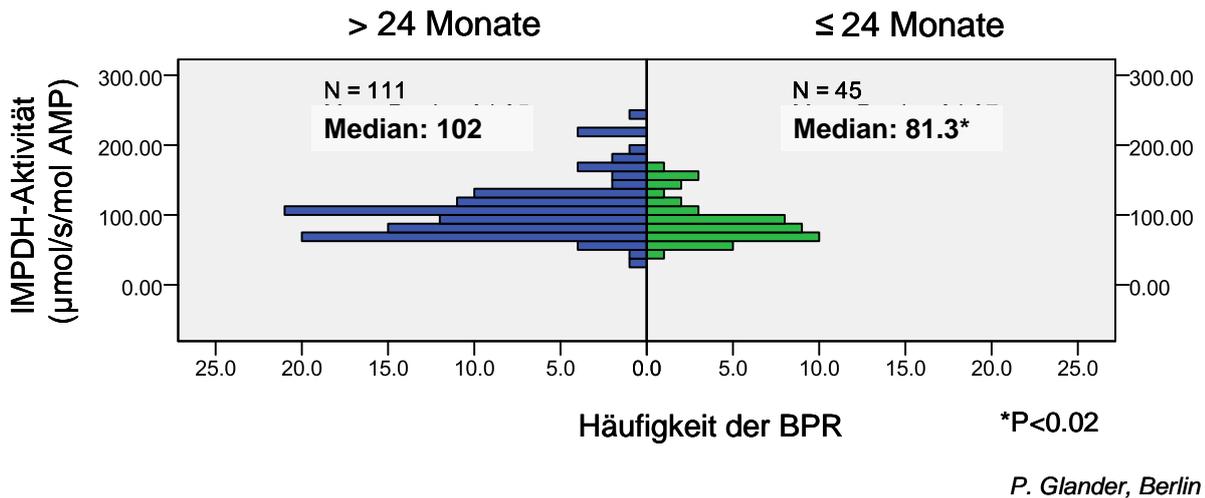


Abbildung 14: Häufigkeit der in der Biopsie nachgewiesenen Abstoßungsreaktionen bei erwachsenen Nierentransplantatempfängern (%), bezogen auf die Höhe der IMPDH-Aktivität und die Dauer der Dialyse. Glander et al, Berlin.

Die Messung und Überwachung der IMPDH-Aktivität wurde kürzlich als pharmakodynamischer Biomarker der MPA-Wirkung beschrieben¹⁶. Es ist in dieser Studie gelungen eine vergleichbare Assoziation der MPA-Pharmakokinetik und der IMPDH-Aktivität in pädiatrischen und erwachsenen Nierentransplantatempfängern zu demonstrieren. Aufgrund dieses Zusammenhangs ist ein vergleichbarer Benefit eines pharmakodynamischen TDM sowohl bei Kindern als auch Erwachsenen nach NTx zu erwarten. Folgende Studien werden noch klären müssen, ob die Bestimmung der IMPDH-Aktivität vor einer Transplantation ein zuverlässiger Wert ist, um die MMF-Dosierung gezielter festzulegen und somit das Patientenoutcome bezüglich des Risikos akuter Abstoßungsreaktionen und unerwünschter Reaktionen zu minimieren¹⁷.

Des Weiteren gilt es zu klären, ob die Bestimmung der IMPDH-Aktivität vor MMF-Einnahme¹⁵ oder der Wert der maximalen IMPDH-Hemmung helfen können Risikopatienten zu identifizieren. Da IMPDH-Aktivitätsmessungen arbeitsaufwendig und teuer sind, bietet sich ebenfalls die Bestimmung der IMPDH mRNA zur Überwachung der Patienten an. Hier hat sich gezeigt, dass die mRNA bei Patienten, die eine akute Abstoßungsreaktion durchlaufen signifikant höher ist^{18,106}.

Die Vergleichbaren Ergebnisse bei den pädiatrischen und erwachsenen Patienten bezüglich der Variabilität der IMPDH-Aktivität und Hemmung als Reaktion auf MPA weisen stark darauf hin, dass auch ein vergleichbarer Zusammenhang zwischen der IMPDH-Aktivität und dem klinischen Outcome bei pädiatrischen Patienten besteht.

6 Zusammenfassung

Schon seit mehreren Jahren wird Mycophenolat Mofetil (MMF) regelmäßig zur Immunsuppression bei sowohl pädiatrischen-, als auch erwachsenen Nierentransplantatempfängern verwendet. Bei Kindern <6 Jahren wurde - trotz Anpassung der Dosis auf die Körperoberfläche - ein vermehrtes Vorkommen unerwünschter Effekte im Vergleich zu älteren Kindern oder Erwachsenen beobachtet. Da viele Zielstrukturen und Enzyme des Medikamentenmetabolismus einer entwicklungsbedingten Regulation unterliegen, könnte eine entwicklungsbedingte pharmakodynamische Regulation von MMF dieses erhöhte Vorkommen unerwünschter Reaktionen bei Kleinkindern erklären.

Mycophenolsäure inhibiert die Inosin 5'-Monophosphat-Dehydrogenase (IMPDH). IMPDH ist das geschwindigkeitsbestimmende Enzym der de novo Guanin Biosynthese, die die einzige Möglichkeit für sich teilende T-Lymphozyten ist ihren Purin Bedarf zu decken und somit in die Zellteilung einzutreten. Es bestehen zwei Isoformen der IMPDH. Diese beiden Isoformen, (IMPDH1 und IMPDH2) werden in unterschiedlichen Aktivitätsstadien in den Zellen exprimiert.

Pharmakokinetische Studien zeigen eine hohe interindividuelle Variabilität der MPA, sowie eine steigende Medikamentenexposition mit Dauer der Einnahmezeit^{8,9}. Da die MPA-Pharmakokinetik nicht den direkten pharmakologischen Effekt an den Immunzellen widerspiegelt, könnte ein pharmakodynamisches Monitoring mit Messung der IMPDH-Aktivität, als Zielenzym von MPA, ein vielversprechender Versuch zur Individualisierung der immunsuppressiven Therapie darstellen.

Die Wahrscheinlichkeit eine akute Transplantatabstoßung oder unerwünschte Effekte zu entwickeln, hängt bei Erwachsenen eng mit Höhe der vor Transplantation bestimmten IMPDH-Aktivität und der IMPDH2-mRNA-Expression zusammen^{18,102}. Die IMPDH-Aktivität weist eine hohe interindividuelle Variabilität auf. Noch ist unbekannt ob Promotoren der Lymphozytenaktivierung, wie beispielsweise Infektionen oder chronische Entzündungen (die durch Dialyse hervorgerufen werden können), oder genetische Varianten des IMPDH-Gens zu dieser großen interindividuellen Variabilität beitragen.

Ziel dieser Studie war es erstmalig zu untersuchen, ob die IMPDH-Aktivität einer möglichen altersabhängigen Regulation unterliegt. Hierzu wurde die IMPDH-Aktivität gesunder Kinder und Jugendlicher im Alter zwischen 2,0 und 18,9 Jahren mit der von gesunden Erwachsenen verglichen. Ausserdem wurden 6 bekannte Einzelbasen Polymorphismen (SNP's) von IMPDH1 und IMPDH2 auf einen Zusammenhang hinsichtlich der interindividuellen Variabilität der IMPDH-Aktivität in der pädiatrischen Gruppe untersucht.

Bei Nierentransplantierten Individuen wurde das Ausmaß der IMPDH-Suppression durch eine MMF-Standardddosis bei Kindern und Jugendlichen verglichen und es wurde überprüft, ob die Konzentrationen der Gesamt-MPA mit der IMPDH-Aktivität korreliert. Ebenfalls wurde untersucht, ob die variierende IMPDH-Aktivität durch eine Dialyse Behandlung vor Transplantation bei Erwachsenen mit Nierenerkrankungen beeinflusst wird.

Die Ergebnisse stellen sich wie folgt dar:

- Die IMPDH-Aktivität in mononukleären Zellen zeigt innerhalb des pädiatrischen Kollektivs keine altersphysiologische Regulation, auch nicht im Vergleich zum Erwachsenenalter.
- Zur hohen interindividuellen Variabilität der IMPDH-Aktivität könnten komplexe Genpolymorphismen beitragen, diese konnten jedoch in unserer Studie nicht nachgewiesen werden. Ursächlich hierfür könnte die verhältnismäßig geringe Patientenzahl in der Gruppe der pädiatrischen ESRD-Patienten sein.
- Die Hemmung der IMPDH-Aktivität korreliert mit der MPA-Konzentration. Es zeigt sich eine maximale IMPDH-Inhibition zum Zeitpunkt der maximalen MPA-Konzentration.
- In der stabilen Phase nach NTx ist trotz Anstieg der Gesamt-MPA-AUC kein entsprechender Abfall der IMPDH-AUC zu beobachten. Dies kann auf eine konstante Exposition zur pharmakologisch aktiven, freien MPA zurückgeführt werden.

- Die Untersuchung der IMPDH-Aktivität vor Transplantation (niedrige vs. hohe Aktivität) kann möglicherweise zu einer optimierten MPA-Therapie im Sinne eines pharmakodynamischen Drug Monitorings beitragen.
- Die Dialysedauer scheint einen Einfluss auf die IMPDH-Aktivität zu haben.

Zusammenfassend konnte kein entwicklungsabhängiger Unterschied der IMPDH-Aktivität bei gesunden Kindern oder Kindern mit ESRD vor einer Transplantation festgestellt werden. Somit besteht momentan bezüglich des Patientenalters zum Zeitpunkt der geplanten Nierentransplantation keine Notwendigkeit einer MMF-Dosisanpassung.

Die IMPDH-Aktivität wies jedoch eine hohe interindividuelle Variabilität auf und schien bei Erwachsenen durch die Dialysedauer der Patienten beeinflusst zu werden. Betrachtet man zudem die beschriebene Assoziation zwischen IMPDH-Aktivität und klinischem Outcome in Zusammenhang mit der variablen MPA-Pharmakokinetik, unterstreichen diese Faktoren die Notwendigkeit eines therapeutischen Drug-Monitoring der MMF-Therapie zur Optimierung der immunsuppressiven Therapie. Ein integriertes PK-/PD-Modell des Medikamentenmonitorings könnte die immunsuppressive Therapie von Patienten mit spezifischen (extremen) IMPDH-Aktivitäts-Werten, im Sinne eines individuell angepassten Dosis-/Konzentrationsverhältnisses, deutlich verbessern.

7 Ethische und rechtliche Aspekte

Die Untersuchung wurde in Übereinstimmung mit der Deklaration von Helsinki in der aktuellen Fassung von 1996 durchgeführt.

Der Untersuchungsplan wurde vor Studienbeginn den Ethikkommissionen der Medizinischen Fakultät Heidelberg und München zur Begutachtung vorgelegt.

Datenschutz:

Die Bestimmungen des Bundesdatenschutzgesetzes und der ärztlichen Schweigepflicht wurden eingehalten. Der Patient/Proband, oder deren gesetzlicher Vertreter oder Erziehungsberechtigter, wurde darüber informiert, dass die bei der klinischen Prüfung erhobenen Daten in pseudonymisierter Form (Probanden-/Patientennummer) elektronisch gespeichert werden und ggf. nur in pseudonymisierter Form weitergegeben werden können. Einblick in die Originaldaten wurde nur den beteiligten Ärzten gewährt. Dritte erhielten keinen Einblick in die Originalunterlagen. Die Blutproben wurden pseudonymisiert und verschlüsselt weitergeleitet.

Aufklärung der Patienten/Probanden:

Die Patienten und Probanden, sowie falls zutreffend deren gesetzlicher Vertreter oder Erziehungsberechtigter, wurden vor Studienbeginn durch den Prüfarzt mündlich und mit Hilfe des Informationsblattes über Wesen, Bedeutung und Tragweite der Studie, über ihr Recht, die Einwilligung jederzeit widerrufen zu können und über den Schutz ihrer persönlichen Daten aufgeklärt. Der Proband/Patient, sowie falls zutreffend deren gesetzlicher Vertreter oder Erziehungsberechtigter, erhielt dabei ausreichend Möglichkeit, Fragen zu stellen.

Freiwilligkeit der Teilnahme:

Die Einwilligung zur Teilnahme an der Studie war freiwillig und konnte jederzeit, auch ohne Angabe von Gründen, ohne Nachteile für den Probanden/Patienten widerrufen werden. Bei Rücktritt von der Studie wurde bereits gewonnenes (Daten-) Material vernichtet oder es wurde beim Patienten/Probanden, sowie falls zutreffend deren gesetzlicher Vertreter oder Erziehungsberechtigter angefragt, ob er mit der Auswertung des Materials einverstanden ist.

Versicherung von Probanden und Patienten:

Da es sich um etablierte Methoden handelt und keine Gefährdung für den Patienten besteht, war eine Patienten- oder Probandenversicherung nicht erforderlich.

Mögliche Komplikationen und/oder Risiken der Studie:

Bei den geplanten Untersuchungen bestand kein Risiko für Patienten/Probanden.

Status der Studie:

Bei der geplanten Studie handelte es sich um eine begleitende Untersuchung zu einer transplantationsmedizinisch ohnehin indizierten Medikamentenverabreichung. Da entsprechend der Medikamentenzulassung behandelt wurde, handelte es sich nach Auffassung der Untersucher um eine nicht interventionelle Prüfung.

8 Literaturverzeichnis

1. Kearns GL, Abdel-Rahman SM, Alander SW, Blowey D, Leeder JS, Kauffman RE. Developmental pharmacology-drug disposition, action, and therapy in infants and children. *N Engl J Med.* 2003;349(12):1157–67. doi:10.1056/NEJMra035092.
2. Takahashi H, Ishikawa S, Nomoto S, et al. Developmental changes in pharmacokinetics and pharmacodynamics of warfarin enantiomers in Japanese children. *Clin Pharmacol Ther.* 2000;68(5):541–55. doi:10.1067/mcp.2000.110977.
3. Marshall JD, Kearns GL. Developmental pharmacodynamics of cyclosporine. *Clin Pharmacol Ther.* 1999;66(1):66–75. doi:10.1016/S0009-9236(99)70055-X.
4. De Wildt SN, Kearns GL, Sie SD, Hop WCJ, van den Anker JN. Pharmacodynamics of intravenous and oral Midazolam in preterm infants. *Clin Drug Investig.* 2003;23(1):27–38. doi:10.2165/00044011-200323010-00004.
5. North American Pediatric Renal Trials and Collaborative Studies. *20. Annual Report.*; 2010.
6. Allison AC, Eugui EM. Purine metabolism and immunosuppressive effects of Mycophenolate Mofetil (MMF). *Clin Transplant.* 1996;10(1 Pt 2):77–84.
7. Höcker B, van Gelder T, Martin-Govantes J, et al. Comparison of MMF efficacy and safety in paediatric vs. adult renal transplantation: subgroup analysis of the randomised, multicentre FDCC trial. *Nephrol Dial Transplant.* 2010;3:1073–1079. doi:10.1093/ndt/gfq450.
8. Weber LT, Shipkova M, Armstrong VW, et al. The pharmacokinetic-pharmacodynamic relationship for total and free mycophenolic acid in pediatric renal transplant recipients: a report of the german study group on Mycophenolate Mofetil therapy. *J Pharmacol Exp Ther.* 2002;313(3):759–768.
9. Weber LT, Lamersdorf T, Shipkova M, et al. Area under the plasma concentration-time curve for total, but not for free, mycophenolic acid increases in the stable phase after renal transplantation: a longitudinal study in pediatric patients. *Ther Drug Monit.* 1999;21(5):498–506.
10. Glander P, Budde K. Target enzyme activity as a biomarker for immunosuppression. *Ther Drug Monit.* 2010;32(3):257–60. doi:10.1097/FTD.0b013e3181ddd7b3.
11. Glander P, Braun KP, Hambach P, et al. Non-radioactive determination of Inosine 5'-Monophosphate Dehydrogenase (IMPDH) in peripheral mononuclear cells. *Clin Biochem.* 2001;34(7):543–549.
12. Glander P, Sombogaard F, Budde K, et al. Improved assay for the Nonradioactive Determination of Inosine 5'-Monophosphate Dehydrogenase Activity in Peripheral Blood Mononuclear Cells. *Ther Drug Monit.* 2009;31(3):351–359.
13. Budde K, Glander P, Braun KP, et al. Pharmacodynamic monitoring of Mycophenolate Mofetil in renal allograft recipients. *Transplant Proc.* 2001;33(7-8):3313–5.
14. Budde K, Bauer S, Hambach P, et al. Pharmacokinetic and pharmacodynamic comparison of enteric-coated Mycophenolate Sodium and Mycophenolate Mofetil in maintenance renal transplant patients. *Am J Transplant.* 2007;7(4):888–98. doi:10.1111/j.1600-6143.2006.01693.x.
15. Chiarelli LR, Molinaro M, Libetta C, et al. Inosine Monophosphate Dehydrogenase variability in renal transplant patients on long-term Mycophenolate Mofetil therapy. *Br J Clin Pharmacol.* 2010;69(1):38–50. doi:10.1111/j.1365-2125.2009.03542.x.

16. Fukuda T, Goebel J, Thøgersen H, et al. Inosine Monophosphate Dehydrogenase (IMPDH) Activity as a Pharmacodynamic biomarker of mycophenolic acid effects in pediatric kidney transplant recipients. *J Clin Pharmacol*. 2011;51(3):309–320. doi:10.1177/0091270010368542.
17. 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*. 2004;4(12):2045–2051.
18. Bremer S, Mandla R, Vethe NT, et al. Expression of IMPDH1 and IMPDH2 after transplantation and initiation of immunosuppression. *Transplantation*. 2008;85(1):55–61.
19. Wang J, Yang JW, Zeevi A, et al. IMPDH1 gene polymorphisms and association with acute rejection in renal transplant patients. *Clin Pharmacol Ther*. 2008;83(5):711–717.
20. Wang J, Zeevi A, Webber SA, et al. A novel variant L263F in human Inosine 5'-Monophosphate Dehydrogenase 2 is associated with diminished enzyme activity. *Pharmacogenet Genomics*. 2007;17(4):283–290.
21. Sombogaard F, van Schaik RHN, Budde K, et al. Interpatient variability in IMPDH activity in MMF-treated renal transplant patients is correlated with IMPDH type II 3757T > C polymorphism. *Pharmacogenet Genomics*. 2009;19(8):626–34. doi:10.1097/FPC.0b013e32832f5f1b.
22. Shaw LM, Nicholls AJ, Hale MD, et al. Therapeutic monitoring of mycophenolic acid. A consensus panel report. *Clin Biochem*. 1998;31(5):317–322.
23. European Mycophenolate Mofetil Cooperative Study Group. Placebo-controlled study of Mycophenolate Mofetil combined with Cyclosporin and Corticosteroids for prevention of acute rejection. *Lancet*. 1995;345(8961):1321–1325.
24. The Tricontinental Renal Transplantation Study Group. A blinded randomized clinical trial of Mycophenolate Mofetile, for the prevention of acute rejection in cadaveric renal transplantation. *Transplantation*. 1996;61(7):1029–1037.
25. Sollinger HW. Mycophenolate mofetil for the prevention of acute rejection in primary cadaveric renal allograft recipients. U.S. Renal Transplant Mycophenolate Mofetil Study Group. *Transplantation*. 1995;60(3):225–232.
26. Tönshoff B. The current status of Mycophenolate Mofetil in pediatric renal transplantation. *Pediatr Transplant*. 1999;3(1):5–9.
27. Sidi Y, Panet C, Wasserman L, Cyjon A, Novogrodsky A, Nordenberg J. Growth inhibition and induction of phenotypic alterations in MCF-7 breast cancer cells by an IMP Dehydrogenase inhibitor. *Br J Cancer*. 1988;58:61–63.
28. Sweeney MJ. Mycophenolic acid and its mechanism of action in cancer and psoriasis. *Jpn J Antibiot*. 1977;30 Suppl:85–92.
29. Spatz S, Rudnicka A, McDonald CJ. Mycophenolic acid in psoriasis. *Br J Dermatol*. 1978;98(4):429–435.
30. Filler G, Hansen M, LeBlanc C, et al. Pharmacokinetics of Mycophenolate Mofetil for autoimmune disease in children. *Pediatr Nephrol*. 2003;18(5):445–449.
31. Goldblum R. Therapy of rheumatoid arthritis with Mycophenolate Mofetil. *Clin Exp Rheumatol*. 1993;11 Suppl 8:0–9.

32. Jackson RC, Weber G, Morris HP. IMP Dehydrogenase, an enzyme linked with proliferation and malignancy. *Nature*. 1975;256:331–333.
33. Natsumeda Y, Ikegami T, Murayama K, Weber G. De novo guanylate synthesis in the commitment to replication in hepatoma 3924A cells. *Cancer Res*. 1988;48(3):507–511.
34. Nagai M, Natsumeda Y, Konno Y, Hoffman R, Irino S, Weber G. Selective up-regulation of type II Inosine 5'-Monophosphate Dehydrogenase messenger RNA expression in human leukemias. *Cancer Res*. 1991;51(15):3886–3890.
35. Collart FR, Chubb CB, Mirkin BL, Huberman E. Increased Inosine 5'-Monophosphate Dehydrogenase gene expression in solid tumor tissues and tumor cell lines. *Cancer Res*. 1992;52(20):5826–5828.
36. Langman LJ, LeGatt DF, Yatscoff RW. Blood distribution of mycophenolic acid. *Ther Drug Monit*. 1994;16(6):602–7.
37. Nowak I, Shaw LM. Mycophenolic acid binding to human serum albumin: characterization and relation to pharmacodynamics. *Clin Chem*. 1995;41(7):1011–1017.
38. Bullingham RE, Monroe S, Nicholls AJ, Hale MD. Pharmacokinetics and bioavailability of Mycophenolate Mofetil in healthy subjects after single-dose oral and intravenous administration. *J Clin Pharmacol*. 1996;36(4):315–24.
39. Nowak I, Shaw LM. Effect of mycophenolic acid glucuronide on Inosine 5'-Monophosphate Dehydrogenase activity. *Ther Drug Monit*. 1997;19(3):358–360.
40. Schütz E, Shipkova M, Armstrong VW, Wieland E, Oellerich M. Identification of a pharmacologically active metabolite of mycophenolic acid in plasma of transplant recipients treated with Mycophenolate Mofetil. *Clin Chem*. 1999;45(3):419–422.
41. Shipkova M, Armstrong VW, Wieland E, et al. Identification of glucoside and carboxyl-linked glucuronide conjugates of mycophenolic acid in plasma of transplant recipients treated with Mycophenolate Mofetil. *Br J Pharmacol*. 1999;126(5):1075–1082.
42. Weber LT, Shipkova M, Lamersdorf T, et al. Pharmacokinetics of mycophenolic acid (MPA) and determinants of MPA free fraction in pediatric and adult renal transplant recipients. German Study group on Mycophenolate Mofetil Therapy in Pediatric Renal Transplant Recipients. *J Am Soc Nephrol*. 1998;9(8):1511–1520.
43. Picard N, Cresteil T, Prémaud A, Marquet P. Characterization of a phase 1 metabolite of mycophenolic acid produced by CYP3A4 / 5. *Ther Drug Monit*. 2004;26(6):600–608.
44. Heemann U, Azuma H, Hamar P, Schmid C, Tilney N, Philipp T. Mycophenolate Mofetil inhibits lymphocyte binding and the upregulation of adhesion molecules in acute rejection of rat kidney allografts. *Transpl Immunol*. 1996;4(1):64–67.
45. Johnson GS, Mukku R. Evidence in intact cells for an involvement of GTP in the activation of Adenylate Cyclase. *J Biol Chem*. 1979;254(1):95–100.
46. Allison AC, Almquist SJ, Muller CD, Eugui EM. In vitro immunosuppressive effects of mycophenolic acid and an ester pro-drug, RS-61443. *Transpl Proc*. 1991;23(2 Suppl 2):10–14.
47. Jonsson CA, Carlsten H. Mycophenolic acid inhibits Inosine 5'-Monophosphate Dehydrogenase and suppresses immunoglobulin and cytokine production of B cells. *Int Immunopharmacol*. 2003;3(1):31–37.

48. Chaigne-Delalande B, Guidicelli G, Couzi L, et al. The immunosuppressor mycophenolic acid kills activated lymphocytes by inducing a nonclassical actin-dependent necrotic signal. *J Immunol.* 2008;181(11):7630–7638.
49. Chaigne-Delalande B, Guidicelli G, Couzi L, Legembre P. An atypical necrotic signal induced by immunosuppressive and anti-viral agents. *Autophagy.* 2009;5(3):425–427.
50. Ettenger R, Bartosh S, Choi L, et al. Pharmacokinetics of enteric-coated Mycophenolate Sodium in stable pediatric renal transplant recipients. *Pediatr Transplant.* 2005;9:780–787.
51. Weber LT, Höcker B, Armstrong VW, Oellerich M, Tönshoff B. Validation of an abbreviated pharmacokinetic profile for the estimation of mycophenolic acid exposure in pediatric renal transplant recipients. *Ther Drug Monit.* 2006;28(5):623–31. doi:10.1097/01.fid.0000246766.12872.12.
52. Shipkova M, Armstrong VW, Weber LT, et al. Pharmacokinetics and protein adduct formation of the pharmacologically active acyl glucuronide metabolite of mycophenolic acid in pediatric renal transplant recipients. *Ther Drug Monit.* 2002;24(3):390–399. doi:10.1097/01.FTD.0000013712.44731.D8.
53. Weber LT, Schütz E, Lamersdorf T, et al. Therapeutic drug monitoring of total and free mycophenolic acid (MPA) and limited sampling strategy for determination of MPA-AUC in paediatric renal transplant recipients. The German Study Group on Mycophenolate Mofetil (MMF) therapy. *Nephrol Dial Transpl.* 1999;14 Suppl 4:34–35.
54. Lui MS, Faderan MA, Liepnieks JJ, et al. Modulation of IMP Dehydrogenase activity and guanylate metabolism by Tiazofurin (2-beta-D-ribofuranosylthiazole-4-carboxamide). *J Biol Chem.* 1984;259(8):5078–82.
55. Tricot GJ, Jayaram N, Lapis E, et al. Biochemically directed therapy of leukemia with Tiazofurin , a selective blocker of Inosine 5' -Monophosphate Dehydrogenase Activity. *Cancer Res.* 1989;49:3696–3701.
56. Morris RE, Wang J, Blum JR, et al. Immunosuppressive effects of the morpholinoethyl ester of mycophenolic acid (RS-61443) in rat and non-human primate recipients of heart allografts. *Transplant Proc.* 1991;23(2 Suppl 2):19–25.
57. Collart FR, Huberman E. Cloning and sequence analysis of the human and Chinese hamster Inosine 5' -Monophosphate Dehydrogenase cDNAs. *J Biol Chem.* 1988;263(30):15769–15772.
58. Natsumeda Y, Onho S, Kawasaki H, Konno Y, Weber G, Suzuki K. Two distinct cDNAs for human IMP Dehydrogenase. *Biol Chem.* 1990;265(9):5292–5295.
59. Carr SF, Papp E, Wu JC, Natsumeda Y. Characterization of human type I and Type II IMP Dehydrogenases. *J Biol Chem.* 1993;268(36):27286–27290.
60. Konno Y, Natsumeda Y, Nagai M, et al. Expression of human IMP Dehydrogenase types I and II in *Escherichia coli* and distribution in human normal lymphocytes and leukemic cell lines. *J Biol Chem.* 1991;266(1):506–509.
61. Nagai M, Natsumeda Y, Weber G. Proliferation-linked regulation of type II IMP Dehydrogenase gene in human normal lymphocytes and HL-60 leukemic cells. *Cancer Res.* 1992;52:258–261.
62. Devyatko E, Zuckermann A, Bohdjalian A, et al. Activation of the purine salvage pathway in mononuclear cells of cardiac recipients treated with Mycophenolate Mofetil. *Transplantation.* 2006;82(1):113–118.

63. Franklin TJ, Cook JM. The inhibition of nucleic acid synthesis by mycophenolic acid. *Biochem J.* 1969;113(3):515–524.
64. Ransom JT. Mechanism of action of Mycophenolate Mofetil. *Ther Drug Monit.* 1995;17(6):681–684.
65. Wang W, Hedstrom L. Kinetic mechanism of human Inosine 5'-Monophosphate Dehydrogenase type II: random addition of substrates and ordered release of products. *Biochemistry.* 1997;36(28):8479–8483. doi:10.1021/bi970226n.
66. Jain J, Almquist SJ, Ford PJ, et al. Regulation of Inosine Monophosphate Dehydrogenase type I and type II isoforms in human lymphocytes. *Biochem Pharmacol.* 2004;67(4):767–776.
67. Dayton JS, Lindsten T, Thompson CB, Mitchell BS. Effects of human T lymphocyte activation on Inosine 5'-Monophosphate Dehydrogenase expression. *J Immunol.* 1994;152(3):984–991.
68. Sintchak MD, Fleming MA, Futer O, et al. Structure and mechanism of Inosine Monophosphate Dehydrogenase in complex with the immunosuppressant mycophenolic acid. *Cell.* 1996;85(6):921–930.
69. Allison AC, Eugui EM. Preferential suppression of lymphocyte proliferation by mycophenolic acid and predicted long-term effects of Mycophenolate Mofetil in transplantation. *Transpl Proc.* 1994;26(6):3205–3210.
70. Soldin OP, Soldin SJ. Review: therapeutic drug monitoring in pediatrics. *Ther Drug Monit.* 2002;24(1):1–8.
71. Ensom MH, Davis GA, Cropp CD, Ensom RJ. Clinical pharmacokinetics in the 21st century. Does the evidence support definitive outcomes? *Clin Pharmacokinet.* 1998;34(4):265–79.
72. Weber LT, Höcker B, Mehls O, Tönshoff B. Mycophenolate mofetil in pediatric renal transplantation. *Minerva Urol e Nefrol.* 2003;55(1):91–9.
73. Weber LT, Shipkova M, Armstrong VW, et al. Comparison of the Emit immunoassay with HPLC for therapeutic drug monitoring of mycophenolic acid in pediatric renal-transplant recipients on Mycophenolate Mofetil therapy. *Clin Chem.* 2002;48(3):517–25.
74. Kobayashi M, Saitoh H, Kobayashi M, Tadano K, Takahashi Y, Hirano T. Cyclosporin A, but not Tacrolimus, inhibits the biliary excretion of mycophenolic acid glucuronide possibly mediated by multidrug resistance-associated protein 2 in rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 2004;309(3):1029–35. doi:10.1124/jpet.103.063073.
75. Kuypers DR. Influence of interactions between immunosuppressive drugs on therapeutic drug monitoring. *Ann Transplant.* 2008;13(3):11–8.
76. Karow T, Lang-Roth R. *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie.* 17. Auflage ed. Köln; 2009:1154–1156.
77. Budde K, Glander P, Bauer S, et al. Pharmacodynamic monitoring of Mycophenolate Mofetil. *Clin Chem Lab Med.* 2000;38(11):1213–6. doi:10.1515/CCLM.2000.191.
78. Budde K, Braun KP, Glander P, et al. Pharmacodynamic monitoring of Mycophenolate Mofetil in stable renal allograft recipients. *Transplant Proc.* 2002;34(5):1748–50.
79. Weber LT, Schütz E, Lamersdorf T, et al. Pharmacokinetics of mycophenolic acid (MPA) and free MPA in pediatric renal transplant recipients - a multicentre study. *Nephrol Dial Transpl.* 1999;14(4):33–34.

80. Van Gelder T, Hilbrands L, Vanrenterghem Y, et al. A randomized, double blind, multicenter plasma concentration controlled study of the safety and efficiency of oral Mycophenolate Mofetile for the prevention of acute rejection after kidney transplantation. *Transplantation*. 1999;68(2):261–266.
81. Grinyó J, Vanrenterghem Y, Najj A, et al. Association of four DNA polymorphisms with acute rejection after kidney transplantation. *Transpl Int*. 2008;21:879–891.
82. Winnicki W, Weigel G, Sunder-Plassmann G, et al. An Inosine 5'-Monophosphate Dehydrogenase 2 single-nucleotide polymorphism impairs the effect of mycophenolic acid. *Pharmacogenomics J*. 2009. doi:10.1038/tpj.2009.43.
83. Garat A, Cauffiez C, Hamdan-Khalil R, et al. IMPDH2 genetic polymorphism: a promoter single-nucleotide polymorphism disrupts a cyclic adenosine monophosphate responsive element. *Genet Test Mol Biomarkers Mag*. 2009;13(6):841–847.
84. Cole TJ. The LMS method for constructing normalized growth standards. *Eur J Clin Nutr*. 1990;44(1):45–60.
85. Mosteller RD. Simplified calculation of body-surface area. *N Engl J Med*. 1987;317(17):1098. doi:10.1056/NEJM198710223171717.
86. Schwartz GJ, Muñoz A, Schneider MF, et al. New equations to estimate GFR in children with CKD. *J Am Soc Nephrol*. 2009;20(3):629–37. doi:10.1681/ASN.2008030287.
87. Myara I, Lahiani F, Cosson C, Duboust A, Moatti N. Estimated creatinine clearance by the formula of Gault and Cockcroft in renal transplantation. *Nephron*. 1989;51(3):426–7.
88. Brandhorst G, Streit F, Goetze S, Oellerich M, Armstrong VW. Quantification by liquid chromatography tandem mass spectrometry of mycophenolic acid and its phenol and acyl glucuronide metabolites. *Clin Chem*. 2006;52(10):1962–4. doi:10.1373/clinchem.2006.074336.
89. Akaike H. Information theory as an extension of the likelihood principle. In: *In: Petrov BN, Csaki F (eds) Second Akademiai, International Symposium on Information Theory. Kiado, Budapest;* 1973:267–281.
90. Guo SW, Thompson EA. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics*. 1992;48(2):361–72.
91. Liu K, Muse S V. PowerMarker: an integrated analysis environment for genetic marker analysis. *Bioinformatics*. 2005;21(9):2128–9. doi:10.1093/bioinformatics/bti282.
92. Lin DY, Zeng D, Millikan R. Maximum likelihood estimation of haplotype effects and haplotype-environment interactions in association studies. *Genet Epidemiol*. 2005;29(4):299–312. doi:10.1002/gepi.20098.
93. Monto AS, Napier JA, Metzner HL. The Tecumseh study of respiratory illness. I. Plan of study and observations on syndromes of acute respiratory disease. *Am J Epidemiol*. 1971;94(3):269–79.
94. Fleming DW, Cochi SL, Hightower AW, Broome C V. Childhood upper respiratory tract infections: to what degree is incidence affected by day-care attendance? *Pediatrics*. 1987;79(1):55–60.
95. Langman LJ, LeGatt DF, Halloran PF, Yatscoff RW. Pharmacodynamic assessment of mycophenolic acid induced immunosuppression in renal transplant recipients. *Immunobiology*. 1996;62(5):666–672.

96. Glander P, Hambach P, Braun KP, et al. Effect of Mycophenolate Mofetil on IMP Dehydrogenase after the first dose and after long-term treatment in renal transplant recipients. *Int J Clin Pharmacol Ther.* 2003;41(10):470–476.
97. Gensburger O, van Schaik RHN, Picard N, et al. Polymorphisms in type I and II Inosine Monophosphate Dehydrogenase genes and association with clinical outcome in patients on Mycophenolate Mofetil. *Pharmacogenet Genomics.* 2010;20(9):537–43. doi:10.1097/FPC.0b013e32833d8cf5.
98. Budde K, Glander P, Krämer BK, et al. Conversion from Mycophenolate Mofetil to enteric-coated Mycophenolate Sodium in maintenance renal transplant recipients receiving tacrolimus: clinical, pharmacokinetic, and pharmacodynamic outcomes. *Transplantation.* 2007;83(4):417–24. doi:10.1097/01.tp.0000251969.72691.ea.
99. Tönshoff B, David-Neto E, Ettenger R, et al. Pediatric aspects of therapeutic drug monitoring of mycophenolic acid in renal transplantation. *Transplant Rev.* 2011;25(2):78–89. doi:10.1016/j.trre.2011.01.001.
100. Weimert NA, Derotte M, Alloway RR, Woodle ES, Vinks AA. Monitoring of Inosine Monophosphate Dehydrogenase activity as a biomarker for mycophenolic acid effect: potential clinical implications. *Ther Drug Monit.* 2007;29(2):141–149.
101. Ginzler EM, Dooley MA, Aranow C, et al. Mycophenolate Mofetil or intravenous Cyclophosphamide for lupus nephritis. *N Engl J Med.* 2005;353(21):2219–28. doi:10.1056/NEJMoa043731.
102. Locatelli F, Bommer J, London GM, et al. Cardiovascular disease determinants in chronic renal failure: clinical approach and treatment. *Nephrol Dial Transplant.* 2001;16(3):459–68.
103. Goldstein SL, Leung JC, Silverstein DM. Pro- and anti-inflammatory cytokines in chronic pediatric dialysis patients: effect of Aspirin. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2006;1(5):979–86. doi:10.2215/CJN.02291205.
104. Pecoits-Filho R, Sylvestre LC, Stenvinkel P. Chronic kidney disease and inflammation in pediatric patients: from bench to playground. *Pediatr Nephrol.* 2005;20(6):714–20. doi:10.1007/s00467-005-1891-z.
105. Cransberg K, Smits JMA, Offner G, Nauta J, Persijn GG. Kidney transplantation without prior dialysis in children: the Eurotransplant experience. *Am J Transplant.* 2006;6(8):1858–64. doi:10.1111/j.1600-6143.2006.01405.x.
106. Sombogaard F, Peeters AMA, Baan CC, et al. Inosine Monophosphate Dehydrogenase messenger RNA expression is correlated to clinical outcomes in Mycophenolate Mofetil – treated kidney transplant patients, whereas Inosine Monophosphate Dehydrogenase activity is not. *Ther Drug Monit.* 2009;31(5):549–556.

Anhang

Probandeninformation / Einverständniserklärung Familie

ENZYMAKTIVITÄT BEI KINDERN NACH NIERENTRANSPANTATION – VERGLEICHSWERTE BEI GESUNDEN KINDERN

Familieninformation

Liebe Familie!

Wir möchten gesunde Kinder um die Teilnahme an einer geplanten Studie zur Aktivitätsbestimmung eines Enzyms bitten und Sie darüber informieren, warum dies für Kinder, die eine Transplantatniere erhalten haben, wichtig und sinnvoll ist.

Was ist das Ziel dieser Studie?

Unter den Therapieverfahren für das chronische Nierenversagen eröffnet die erfolgreiche Nierentransplantation für Kinder die besten Überlebensaussichten und auch die beste Lebensqualität. Eine unabdingbare Voraussetzung für den Erfolg einer Nierentransplantation ist die medikamentöse Kontrolle des Immunsystems, um zu verhindern, dass sich der Organismus des Empfängers gegen das neue Organ wendet und es letztendlich abstößt. Daher müssen nierentransplantierte Kinder in der Regel eine Kombination von Medikamenten einnehmen, die ihr Immunsystem unterdrücken. Es ist eine Eigenschaft eines Teiles dieser Medikamente, dass die Dosis, die optimale Wirkung verspricht, nahe an der Dosis liegt, die zu unerwünschten Nebenwirkungen führen kann. Es ist daher sinnvoll, die Blutkonzentration des Medikamentenwirkstoffes regelmäßig zu überprüfen, um eine Unter- wie auch eine Überdosierung zu vermeiden.

Eine vielversprechendere Methode der Überwachung der Therapie ist die Bestimmung der Aktivität bzw. des Ausmaßes der Aktivitätshemmung des Zielenzym eines Wirkstoffes. Das Zielenzym des das Immunsystem unterdrückenden Wirkstoffes Mycophenolat Mofetil, der Bestandteil der Basistherapie nach Nierentransplantation ist, ist bekannt (Inosin 5`-Monophosphat-Dehydrogenase) und eignet sich für eine derartige Therapieüberwachung.

Um die Therapie nierentransplantierte Kinder mit Mycophenolat Mofetil durch die Bestimmung der Aktivitätshemmung von Inosin 5`-Monophosphat-Dehydrogenase zu verbessern, ist es zunächst notwendig, die von Medikamenten unbeeinflusste Grundaktivität des Zielenzym zu bestimmen. Diese wollen wir im Rahmen dieser Studie bei gesunden Kindern verschiedener Altersstufen untersuchen, um zu klären, ob eine vergleichbare Aktivität wie bei Erwachsenen vorliegt oder ob eine Altersabhängigkeit besteht. Zusätzlich soll untersucht werden, ob verschiedene Zustandsformen des Inosin 5`-Monophosphat-Dehydrogenase-Gens eine Rolle für dessen Aktivität spielen.

Wie wird diese Studie durchgeführt?

Sie stellen Ihr Kind heute in unserer Ambulanz zur Feststellung einer Narkosefähigkeit vor einem bestimmten operativen Eingriff vor. In diesem Rahmen wird Ihrem Kind Blut entnommen, um u.a. eine Störung der Gerinnungsfähigkeit des Blutes oder eine Blutarmut auszuschließen. Das Blut für die zusätzlichen Untersuchungen wird zusammen mit der ohnehin notwendigen Blutentnahme abgenommen. Hierfür sind 5 ml, d.h. ca. ein Esslöffel voll Blut notwendig.

Können bei der Untersuchung Nebenwirkungen auftreten?

Da die erforderliche Blutentnahme zusammen mit einer ohnehin notwendigen Blutentnahme erfolgt, entstehen für Ihr Kind keine weiteren Unannehmlichkeiten.

Wie ist es mit dem Datenschutz?

Die Vorschriften über die ärztliche Schweigepflicht und den Datenschutz werden im Rahmen dieser Studie eingehalten. Medizinische Befunde und persönliche Informationen werden in den Originalkrankenunterlagen, in die der Arzt alle Befunde eingetragen hat, erhoben und niedergeschrieben. Die für diese Untersuchung wichtigen Daten werden dann zusätzlich in einen Dokumentationsbogen eingetragen, der die Initialen Ihres Kindes sowie eine Codenummer enthält, die nur dem Arzt bekannt ist. Die Daten werden in pseudonymisierter Form ausgewertet.

Die Blutproben werden pseudonymisiert und verschlüsselt weitergeleitet. So kann außer dem auswertenden Arzt niemand den Ursprung der Proben nachvollziehen. Es werden nur die basale Aktivität von Inosin 5`-Monophosphat-Dehydrogenase untersucht und eine Analyse des entsprechenden Gens durchgeführt. Nach Abschluss der Studie wird der Rest der Probe vernichtet.

Was ist, wenn wir an dieser Studie nicht teilnehmen möchten?

Die Einwilligung in die Studie ist freiwillig und kann jederzeit - ohne Angabe von Gründen und ohne Nachteile für die weitere medizinische Versorgung Ihres Kindes - widerrufen werden. Sollten Sie ihre Einwilligung widerrufen, werden, falls Sie es wünschen, auch alle bereits vorhandenen Daten und die Blutprobe vernichtet.

Sind alle Ihre Fragen beantwortet?

Wenn Sie zu dieser Studie weitere Fragen haben, stellen Sie diese bitte unbedingt! Wir sind gerne bereit, sie Ihnen zu beantworten.

Vielen Dank!

Einverständniserklärung Eltern / Ältere Probanden

**ENZYMAKTIVITÄT BEI KINDERN NACH NIERENTRANSPLANTATION –
VERGLEICHSWERTE BEI GESUNDEN KINDERN
Eltern / ältere Probanden - Einverständniserklärung**

Ich bin heute von Dr. über die Ziele und den Ablauf der Studie mündlich aufgeklärt worden, habe die Information gelesen und konnte alle meine Fragen stellen.

Ich wurde darüber aufgeklärt, dass die erhobenen Daten in pseudonymisierter Form ausgewertet werden

Ich erkläre mich damit einverstanden, dass ich / mein Sohn / meine Tochter,

.....

(Name des Probanden)

geb. am

an dieser Untersuchung teilnehme/teilnimmt. Ich nehme / Wir nehmen freiwillig an der Studie teil.

Ich bin / Wir sind berechtigt, die Studie jederzeit ohne Angabe von Gründen abzubrechen.

Bei Rücktritt von der Studie bin ich/sind wir mit der Auswertung des (Daten-) Materials einverstanden. Ja/Nein

.....

(Ort, Datum)

(Unterschrift des Probanden)

.....

(Ort, Datum)

(Unterschriften beider Erziehungsberechtigter)

oder:

Die Zustimmung erfolgt in Übereinstimmung mit dem Vater / der Mutter

.....

(Ort, Datum)

(Unterschrift des Erziehungsberechtigten)

.....

(Ort, Datum)

(Unterschrift des Arztes)

Probandeninformation Kinder

ENZYMAKTIVITÄT BEI KINDERN NACH NIERENTRANSPLANTATION – VERGLEICHSWERTE BEI GESUNDEN KINDERN

Kinderinformation

Liebe/r.....,

wir würden Dir gerne etwas Blut abnehmen, und Dir hier nun vorher erklären, worum es dabei geht.

Warum soll bei Dir Blut abgenommen werden?

Manche Kinder haben kranke Nieren. Das kann so weit gehen, dass sie eine neue Niere von einem anderen Menschen bekommen, damit die neue Niere die Arbeit macht, die die eigenen alten Nieren nicht mehr schaffen. Damit der Körper aber die neue, fremde Niere annimmt und nicht abstößt, müssen die Kinder eine ganze Menge Medikamente nehmen, die den Körper dazu bringen, die neue Niere zu akzeptieren.

Dabei ist es schwierig, die richtige Dosis dieser Medikamente zu finden. Nehmen die Kinder zu wenig, kann es sein, dass ihr Körper die neue Niere abstößt. Nehmen die Kinder zu viel, können unerwünschte Nebenwirkungen auftreten. Daher ist es notwendig, genau die richtige Dosis, die in der Mitte zwischen zu viel und zu wenig liegt, zu finden. Wir wissen noch nicht genau, welcher der beste Weg ist, diese richtige Dosis zu finden. Sehr vielversprechend ist es, die Wirkung der Medikamente auf den Körper zu untersuchen. Hierfür müssen wir aber zuerst wissen, wie die entscheidenden Eigenschaften auf ein bestimmtes Medikament zu reagieren, bei gesunden Kindern sind.

Um das zu untersuchen, möchten wir Dir gerne Blut abnehmen. Du kannst damit mithelfen, die Behandlung von Kindern mit einer neuen Niere zu verbessern.

Was wird gemacht?

Du bist heute in unserer Ambulanz, da bei Dir wegen einer bevorstehenden Operation festgestellt werden soll, ob Du die notwendige Betäubung problemlos vertragen wirst.

Die erhobenen Untersuchungsergebnisse werden wir unabhängig voneinander aufschreiben. Außerdem muss Dir auch Blut abgenommen werden. Im Rahmen dieser sowieso stattfindenden Blutentnahme wollen wir Dir etwa einen Esslöffel Blut zusätzlich abnehmen.

Kann bei der Untersuchung etwas passieren? Tut es weh?

Die notwendige Blutentnahme ist etwas unangenehm, muss im Rahmen der Untersuchung aber sein. Die von uns geplante Blutentnahme ist zusätzlich und verursacht keine weitere Unannehmlichkeit. Die von uns benötigte Blutmenge ist klein.

Was passiert mit Deinen Ergebnissen?

Deine Befunde und alle persönlichen Informationen werden zunächst in Deiner Akte eingetragen. Die für diese Untersuchung wichtigen Daten werden dann zusätzlich auf einen Datenbogen übertragen, auf dem nur Deine Initialen und eine Nummer stehen, so dass niemand außer Deinem Arzt weiß, um wen es sich handelt und niemand anderes etwas damit anfangen kann (das nennt man pseudonymisieren). Die Daten werden pseudonymisiert ausgewertet. Die Blutproben werden so verschickt, dass niemand anderes weiß, von wem das Blut stammt. Wir werden nur die vorhin angegebenen Untersuchungen mit deinem Blut machen, danach wird der Rest der Probe weggeworfen.

Was ist, wenn Du an dieser Studie nicht teilnehmen möchtest?

Die Teilnahme an der Untersuchung ist freiwillig, Du kannst jederzeit sagen, wenn Du nicht (mehr) mitmachen willst. Das ist so in Ordnung und wir nehmen das nicht übel. Es hat auch nichts mit Deiner weiteren Behandlung zu tun. Wenn Du aufhören willst, werden auf Deinen Wunsch alle bereits vorhandenen Daten vernichtet und das Blut sofort weggeworfen.

Ist alles klar?

Wenn Du noch Fragen hast, kannst Du sie jederzeit stellen. Wir sind gerne bereit, sie Dir zu beantworten.

Vielen Dank!

Einverständniserklärung Kinder

**ENZYMAKTIVITÄT BEI KINDERN NACH NIERENTRANSPANTATION –
 VERGLEICHSWERTE BEI GESUNDEN KINDERN
 Kinder - Einverständniserklärung**

..... geb. am.....
 (Name des Probanden).

Ich bin heute von Dr. über die geplante Untersuchung informiert worden. Ich habe gelesen, worum es bei dieser Untersuchung gehen soll und konnte alle meine Fragen stellen.

Ich bin mit der Untersuchung einverstanden.

Ich nehme freiwillig an der Untersuchung teil.

Ich kann die Untersuchung jederzeit abbrechen.

Bei Rücktritt von der Studie bin ich mit der Auswertung des (Daten-) Materials einverstanden.
 Ja/Nein

.....
 (Ort, Datum) (Unterschrift des Probanden)

Auch meine Eltern sind einverstanden:

.....
 (Ort, Datum) (Unterschriften beider Erziehungsberechtigter)

oder:

Die Zustimmung erfolgt in Übereinstimmung mit dem Vater / der Mutter

.....
 (Ort, Datum) (Unterschrift des Erziehungsberechtigten)

.....
 (Ort, Datum) (Unterschrift des Arztes)

Formblatt P

IMPDH-Aktivität in MNC-Lysaten, Analyse des IMPDH-Gens

2,5 ml Li- heparinisieretes Vollblut und 2,5 ml EDTA- Blut

Probandeninitialen: Geschlecht: m / w Geburtsdatum: . .

Code: P

Körpergröße (cm): , Körpergewicht (kg): ,

Datum der Probenentnahme: . . Uhrzeit der Probenentnahme: :

Hb: , g/dl Leukozyten: /nl Thrombozyten: /nl

BB-Differenzierung: Stabkernige: %

Segmentkernige: %

Lymphozyten: %

Monozyten: %

(Unterschrift Arzt)

(Unterschrift MTA)

Formblatt T

IMPDH-Aktivität in MNC-Lysaten, Plasmakonzentration von Gesamt-MPA und freier MPA

Jeweils 2,5 ml Li-heparinisieretes Vollblut +
jeweils 1 ml EDTA-Plasma

Patienteninitialen: Geschlecht: m / w Geburtsdatum: . .

Code: T

Körpergröße (cm): , Körpergewicht (kg): ,

Datum der Nierentransplantation: . . MMF-Dosis (mg):

Datum der Probenentnahme (Zeitpunkt nach NTPL: 1 Woche/3 Monate):

. .

Uhrzeit der Probenentnahmen : 2,5 ml Li.-Hep.-/1,0 ml EDTA-Blut

C₀ (vor MMF-Einnahme): .

C_{0,5} (30 Minuten nach MMF-Einnahme): .

C₁ (60 Minuten nach MMF-Einnahme): .

C_{1,5} (90 Minuten nach MMF-Einnahme): .

C₂ (2 Stunden nach MMF-Einnahme): .

C₃ (3 Stunden nach MMF-Einnahme): .

C₄ (4 Stunden nach MMF-Einnahme): .

C₆ (6 Stunden nach MMF-Einnahme): .

C₈ (8 Stunden nach MMF-Einnahme): .

C₁₂ (12 Stunden nach MMF-Einnahme): .

Tacrolimus Dosis/Tag (mg): Tacrolimus Tal-Spiegel (ng/ml):

Hb: , g/dl Leukozyten: /nl Thrombozyten: /nl

BB-Differenzierung: Stabkernige: %

Segmentkernige: %

Lymphozyten: %

Monozyten: %

Eosinophile: %

Andere: %

Kreatinin: mg/dl GFR: ml/min/1,73m²

Albumin: g/l Bilirubin: mg/dl

Bikarbonat: mmol/l

Akute Abstossungsreaktion? Ja/Nein

Wenn „Ja“:

Zeitpunkt des Auftretens?

Banff-Grad?

Therapie?

MMF-assoziierte Nebenwirkungen? Ja/Nein

Wenn „Ja“:

Art?

Hospitalisierung notwendig? Ja/Nein

Eventuell die MPA-Konzentration beeinflussende Medikamente

Dosis

Antazida

Cholestyramin

Glukokortikoide

Metronidazol

Norfloxacin

Aciclovir/Ganciclovir

Phosphatbinder

Furosemid

Weitere Begleitmedikation und deren Dosis (auflisten):

Datum und Uhrzeit der Lymphozytenisolierung:

. . ; .

(Unterschrift Arzt)

(Unterschrift MTA)

Verwendete Oligonukelotide

rs2278293_for GGAAGGTCAAGGCAAGTACC

rs2278293_rev GAAGAAAGCCAGGGATGATG

rs2278293_anchor GAGAGGAAGGACACGCAGGGAGT

rs2278293_probe GCCCCAAGGCTCCAC

rs11761662_for GGACCTTCCAGTGTCTCCTG

rs11761662_rev TTCGTTCCCTGGCAGATTAC

rs11761662_anchor CAGACCGCAGACCTCCC

rs11761662_probe GAGCGCCTCATACCC

rs4974081_for AGTGGGGTTAGGGCTTTTCAG

rs4974081_rev TGCCATCCTCTTGTGTGAC

rs4974081_CP TTGGATAGCTTCCACACTCTTCACT

L263F_for TGAAGATGATGAGCTTGTGG

787-L263F_rev ACCCACCTGTGTAGCAGCTC

L263F_anchor CCCAGGCTGGTGTGGAT

L263F_probe AGGCTGGACTTGCTC

rs4974081_for TCCTAGGACAAGAAGTAAGTCTCAG

rs4974081_rev GGCTGGTGTGGATGTAGTGG

rs4974081_CP AGCTGCCACACAGGTGGGT

rs73082350_probe TCTGCCCACATCTTCTG

rs73082350_for CAGGCAAGATAAGGGCAGTG

rs73082350_rev GGCAAGGCCAACTGATACAC

rs73082350_anchor AGTAGGCATAGTTCAGGGACT

Danksagung

Ganz herzlich möchte ich zuerst meinem Doktorvater Lutz T. Weber für die fabelhafte Betreuung und all die ermunternden Worte danken. Für die gute und unkomplizierte Zusammenarbeit danke ich speziell Annette Rother, Petra Glander und Sylvana Kiesevalter.

Außerdem gilt mein Dank allen mitwirkenden Mitarbeitern in den Laboren und auf den Stationen der Abteilung für Pädiatrische Nephrologie des Universitäts-Kinderklinikum der Ludwig-Maximilians Universität München, der Sektion für pädiatrische Nephrologie des Universitäts-Kinderklinikum der Ruprecht-Karls Universität Heidelberg, der Abteilung für Innere Medizin/ Nephrologie der Humboldt Universität Berlin, der Abteilung für klinische Pharmakologie der Ruprecht-Karls Universität Heidelberg, sowie der Abteilung für klinische Chemie der Georg-August Universität, Göttingen. Hier danke ich besonders David Czock, Nicolas von Ahsen, Victor W. Armstrong, Michael Oellerich, Klemens Budde, Reinhard Feneberg und Burkhard Tönshoff.

Biny und meinem Bruder sage ich vielen Dank für's Korrekturlesen und meinen Eltern Danke für die unermüdlichen Rückfragen, auch wenn es viele waren. Bei Dave bedanke ich mich für viel viel Tee.