

Aus der Abteilung Klinische Chemie
(Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Oellerich)
im Zentrum Innere Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Die inhibitorische Wirkung des Acylglucuronidmetaboliten
der Mycophenolsäure auf die
Inosinmonophosphatdehydrogenase Typ II

INAUGURAL – DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Hendrik Eberhard Schwabe

aus

Bonn

Göttingen 2011

Dekan: Prof. Dr. med. C. Frömmel

I. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Oellerich

II. Berichterstatter/in: Prof. Dr. med. D. Doenecke

Tag der mündlichen Prüfung: 13.12.2011

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	5
1.1	Allgemeines.....	5
1.1.1	Transplantationsmedizin.....	5
1.1.2	Transplantatabstoßung.....	5
1.2	Therapie mit immunsuppressiven Medikamenten.....	7
1.3	Klinische Bedeutung der Mycophenolsäure.....	11
1.4	Inosinmonophosphat-Dehydrogenase.....	15
1.5	Metabolite der Mycophenolsäure.....	15
1.6	Acylglucuronide.....	17
1.7	Zielsetzung dieser Arbeit.....	19
2	Material und Methoden.....	20
2.1	IMPDH-II-Expression und Reinigung.....	20
2.1.1	IMPDH-II-Expression in Escherichia coli.....	20
2.1.2	Enzymaktivitätsbestimmung.....	21
2.1.3	Extraktion der IMPDH-II.....	22
2.1.4	Aufreinigung der IMPDH-II über Phosphocellulosesäule.....	24
2.1.5	Aufreinigung der IMPDH-II über Blue-Sepharose-Säule.....	25
2.1.6	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	26
2.1.7	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	26
2.2	Enzymkinetiken.....	28
2.2.1	Michaelis-Menten-Konstante (K_m).....	30
2.2.2	K_i -Werte von MPA und AcMPAG.....	31
2.2.3	Auswertung der Messergebnisse.....	31
2.3	Albuminbindung von MPA und AcMPAG.....	33
2.3.1	Photometrische Messung der Aktivität der IMPDH-II.....	35
2.3.2	Auswertung der Messergebnisse.....	36
2.4	Stabilität des AcMPAG.....	36
2.4.1	Probengewinnung.....	37
2.4.2	Vorbereitung der Proben für die Hochdruckflüssigchromatographie (HPLC).....	38
3	Ergebnisse.....	40

3.1	IMPDH-II-Extraktion	40
3.1.1	Aufreinigung der IMPDH-II mittels FPLC	40
3.1.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	41
3.2	Stabilität des AcMPAG	42
3.3	Enzymkinetiken	44
3.3.1	Bedingungen für die enzymkinetischen Versuche	44
3.3.2	K_m -Werte	46
3.3.3	Inhibitionsversuch mit MPA	49
3.3.4	Inhibitionsversuche mit AcMPAG	52
3.4	Albuminbindung von AcMPAG und MPA	55
3.4.1	HSA-Bindung von MPA	56
3.4.2	HSA-Bindung von AcMPAG	57
4	Diskussion	58
4.1	Immunsuppressive Eigenschaften von AcMPAG	58
4.2	Einfluß von humanem Albumin auf die immunsuppressive Wirkung von AcMPAG	62
5	Zusammenfassung	65
6	Literaturverzeichnis	66

1 Einleitung

1.1 Allgemeines

1.1.1 Transplantationsmedizin

Die erste erfolgreiche Nierentransplantation wurde am 23.12.1954 in Boston durch Joseph E. Murray durchgeführt (Murray et al. 1955). Seitdem hat die Zahl der Transplantationen solider Organe stetig zugenommen. So betrug laut Jahresbericht 2009 der 1967 in Leiden gegründeten Stiftung Eurotransplant die Zahl der transplantierten Nieren im Jahr 2009 in Deutschland 2164 (2010: 2277) von verstorbenen Spendern und 600 von Lebendspendern.

Eine wesentliche Einschränkung des Transplantationserfolgs beruht auf der Abstoßung des Transplantats durch das Immunsystem des Empfängers, da dieses das Transplantat als nicht körpereigen erkennt. Die Abstoßung führt, wenn eine Behandlung erfolglos ist, zum Absterben des transplantierten Organs und gefährdet somit das Überleben des Patienten. Zur Vermeidung dieser Komplikationen kommt den immunsuppressiven Medikamenten eine entscheidene Bedeutung zu, denn nur durch die Gabe dieser Medikamente kann eine Transplantatabstoßung verzögert oder sogar auf viele Jahre hinaus verhindert werden.

1.1.2 Transplantatabstoßung

In Abhängigkeit vom zeitlichen Verlauf werden verschiedene Arten der Transplantationsabstoßung unterschieden:

Die hyperakute Abstoßung tritt innerhalb weniger Minuten bis wenigen Stunden nach der durchgeführten Transplantation auf. Schon vor der Transplantation im Empfängerblut enthaltene zytotoxische Antikörper (allospezifische Antikörper gegen HLA-Antigene oder blutgruppenspezifische Antikörper gegen AB0-Antigene des Transplantats) führen zu einer Aktivierung des Komplementsystems und des Gerinnungssystems. Die Folge sind Gefäßverschlüsse mit eingeschränkter bis fehlender Durchblutung des Transplantats und somit eine akute Infarzierung. Diese hyperakute Abstoßung tritt insbesondere bei solchen Patienten auf, die aufgrund früherer Transplantationen, Bluttransfusionen oder Schwangerschaften bereits Antikörper gegen HLA- oder AB0-Antigene gebildet haben. Es handelt sich um sogenannte hyperimmunisierte Empfänger.

Mehrere Tage bis wenige Wochen nach erfolgter Transplantation kann eine akute Abstoßungsreaktion auftreten, bei der es durch zytotoxische T-Lymphozyten zu einer zellulären Abstoßung kommt. Diese akute Abstoßungsreaktion kann medikamentös behandelt werden (Corticosteroide, Immunsuppressiva wie beispielsweise Azathioprin, Ciclosporin, Tacrolimus, Mycophenolsäure, oder Antikörper gegen Lymphozyten wie beispielsweise Basiliximab). Im Jahr 2003 betrug die Zahl der im ersten Jahr nach einer Nierentransplantation aufgetretenen akuten Abstoßungsreaktionen 13%, von denen 43% mit Antikörpern behandelt wurden (Meier-Kriesche et al. 2006).

Eine chronische Abstoßungsreaktion kann sich dahingegen über einen Zeitraum von bis zu mehreren Jahren entwickeln und zu einem progredienten Transplantatversagen führen. Sie ist charakterisiert durch eine langsam

fortschreitende Transplantatvaskulopathie aufgrund einer Stimulation von Makrophagen und Endothelzellen in den Gefäßwänden durch CD4⁺-T-Zellen. Die chronische Stimulation der CD4⁺-T-Zellen erfolgt durch antigenpräsentierende Zellen, welche zugrunde gegangene Alloantigen-haltige Zellen des Transplantats aufgenommen und prozessiert haben. Die stimulierten Makrophagen sezernieren Entzündungsmediatoren wie TNF- α und Interleukine. Die Folge ist eine chronische Entzündung der Gefäßwände mit zunehmender und irreversibler Fibrosierung und Vernarbung, welche zu Gefäßverengungen und schließlich –verschlüssen führt. Typisches pathomorphologisches Korrelat ist die Nephrosklerose nach einer Nierentransplantation oder die Koronarsklerose nach einer Herztransplantation mit folgendem Funktionsausfall des Transplantats. Eine dauerhafte immunsuppressive Therapie mit Corticosteroiden, Immunsuppressiva (wie beispielsweise Azathioprin, Ciclosporin, Tacrolimus, Mycophenolsäure) bzw. Anti-Lymphozytenantikörpern (wie beispielsweise Basiliximab) ist daher unerlässlich.

1.2 Therapie mit immunsuppressiven Medikamenten

Um die oben erläuterten Abstoßungsreaktionen zu verhindern und den längerfristigen Erfolg einer Organtransplantation und das Überleben des Patienten zu gewährleisten, ist die Therapie mit immunsuppressiven Medikamenten unmittelbar beginnend mit der Organtransplantation essentiell. Es sind zahlreiche Immunsuppressiva mit unterschiedlichen Wirkmechanismen im klinischen Einsatz.

Die erste erfolgreiche Nierentransplantation war noch syngen, das Organ stammte von dem genetisch identischen Zwilling des Empfängers (Murray et al. 1955), wodurch eine Abstoßungsreaktion umgangen wurde. Wenig später erfolgten die ersten allogenen Nierentransplantationen, bei denen eine Ganzkörperbestrahlung der Empfänger durchgeführt wurde (Dealy et al. 1960). Die Nebenwirkungen der Ganzkörperbestrahlung waren allerdings erheblich, insbesondere traten fulminante Infektionen auf. Mit der Einführung immunsuppressiver Medikamente konnte schließlich ein gezielter Effekt auf die bei der Abstoßungsreaktion beteiligten Zellen ausgeübt werden.

Als erstes Medikament wurde Azathioprin (6-(1-Methyl-4-nitro-5-imidazolyl)-mercaptapurin) in Kombination mit Corticosteroiden eingesetzt (Küss et al. 1962). Azathioprin (Imurek®) ist ein Prodrug, aus welchem verzögert das kurz wirksame 6-Mercaptopurin entsteht (Halbwertszeit ca. 1 h). Es wird desweiteren zu 6-Thioinosinmonophosphat (T-IMP) umgewandelt. T-IMP beeinflusst die Nukleinsäuresynthese, indem es die Umwandlung von Inosinmonophosphat (IMP) zu Purinnukleotiden (Adenosin- und Guanosinnukleotide), essentiellen Bausteinen der DNA und RNA, hemmt. Ein Teil des T-IMP wird zudem direkt in die DNA und RNA eingebaut und stört deren Funktion. Durch eine stärkere Hemmung der T- als der B-Lymphozyten wird vornehmlich die zelluläre Immunreaktion gestört. Ein weiterer Wirkmechanismus wurde 2003 beschrieben (Tiede et al. 2003). Es wurde gezeigt, daß Azathioprin zusätzlich die Apoptose in T-Lymphozyten induzieren kann, indem das aus Azathioprin entstehende 6-Thio-GTP anstelle von GTP an Rac-1 in T-Lymphozyten bindet. Dadurch wird die Aktivierung der von Rac-1 abhängigen Gene (wie MEK, NF- κ B, und bcl-xL) in T-Lymphozyten blockiert,

was zur Apoptose führt. Azathioprin wird zunehmend durch die neuere, 1995 (in den Vereinigten Staaten von Amerika) eingeführte Mycophenolsäure abgelöst.

Mit der Einführung des 1970 entdeckten Ciclosporin (Sandimmun®) (Borel et al. 1976, Calne et al. 1978) wurde ein Medikament erhältlich, welches gezielt die Funktion von T-Lymphozyten hemmt. Ciclosporin bindet an den zytosolischen Rezeptor Cyclophilin. Der entstehende Cyclophilin-Ciclosporin-Komplex hemmt insbesondere den fast ausschließlich in T-Lymphozyten vorkommenden Transkriptionsfaktor NFAT (nuclear factor activating T-Cell) und den Transkriptionsfaktor NF κ B. NFAT induziert die Synthese von Zytokinen (Interleukin 2 bis 6 und Interferon γ). Durch Hemmung der Zytokinsynthese wird die Aktivierung der T-Lymphozyten blockiert und die Folge ist eine hochselektive immunsuppressive Wirkung durch Unterdrückung der zellulären Immunreaktion.

Neuere Immunsuppressiva sind beispielsweise Tacrolimus (Prograf®), Sirolimus (Rapamune®) und Mycophenolsäure (CellCept®).

Tacrolimus, ursprünglich als FK-506 bezeichnet, wirkt ähnlich wie Ciclosporin über Bindung an einen zytosolischen Rezeptor, welches zu einer Hemmung der Synthese verschiedener für die Aktivierung von T-Lymphozyten verantwortlicher Zytokine führt. Der zunehmende klinische Einsatz von Tacrolimus führt derzeit dazu, daß Ciclosporin deutlich seltener angewendet wird.

Sirolimus (Rapamycin) hat einen direkten Einfluß auf den Zellzyklus von T-Lymphozyten, indem es über die Bindung an einen mTOR (mammalian Target of Rapamycin) genannten Rezeptor die Hemmung einer Phosphoinositid-3-Kinase bewirkt. Dadurch wird der Übergang von der G1-Phase in die S-Phase verhindert. Sirolimus hat dadurch einen zytostatischen Effekt auf T-Lymphozyten, da diese nicht die Synthesephase, während welcher die DNA-Replikation stattfindet, erreichen.

Insbesondere die irreversible chronische Abstoßung und die Nebenwirkungen der Standardimmunsuppression limitieren das Langzeitüberleben der Transplantate. Aus diesem Grunde ist eine Individualisierung der immunsuppressiven Therapie notwendig. Weitere Probleme der immunsuppressiven Therapie betreffen kariovaskuläre Effekte, Malignome, Infektionen und Nephrotoxizität.

Patienten, welche Immunsuppressiva erhalten, haben ein erhöhtes Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen, wie arterielle Hypertonie, Hyperlipidämie oder Diabetes mellitus (Miller 2002). Auch treten Malignome infolge einer langjährigen Immunsuppression gehäuft auf (Wimmer et al. 2007; Kessler et al. 2006). Insbesondere ergibt sich ein erhöhtes Risiko, an nicht-melanozytären Hauttumoren, Malignomen des lymphatischen Systems, wie der Gruppe lymphoproliferativer Erkrankungen nach Transplantation (post-transplant lymphoproliferative disorders, PTLD) und virusassoziierten Malignomen zu erkranken. Infektionen des Urogenitaltrakts, der Atemwege und Virusinfektionen sind häufige Probleme in den ersten Monaten nach einer Transplantation (Fishman and Rubin 1998; Snyder et al. 2009).

In der Regel werden Kombinationen von mindestens zwei unterschiedlich wirksamen Immunsuppressiva eingesetzt. Als Dauermedikation ein Jahr nach Nierentransplantation wurde in den Vereinigten Staaten von Amerika im Jahr 2003 an erster Stelle mit einem Anteil von ca. 50% die Kombination Tacrolimus und Mycophenolsäure verwendet, darauf folgte mit einem Anteil von ca. 20% die Kombination Ciclosporin und Mycophenolsäure (Meier-Kriesche et al. 2006).

1.3 Klinische Bedeutung der Mycophenolsäure

Mycophenolsäure (MPA), ein von *Penicillium roqueforti* produzierter Metabolit, ist ein selektiver und unkompetitiver Inhibitor der Inosinmonophosphat-Dehydrogenase (IMPDH) (s. Abbildung 1.1). Die IMPDH nimmt eine Schlüsselstelle in der *de-novo*-Synthese, also der Bildung von Nukleotiden aus einfachen Bausteinen, von Purinnukleotiden ein, indem sie die NAD⁺-abhängige Oxidation von Inosinmonophosphat (IMP) zu Xanthosinmonophosphat (XMP) katalysiert, welches weiter zu Guanosinmonophosphat (GMP) konvertiert wird. Aus GMP entsteht wiederum das für die RNA-Synthese essentielle Guanosintriphosphat (GTP) und das für die DNA-Synthese essentielle Deoxyguanosintriphosphat.

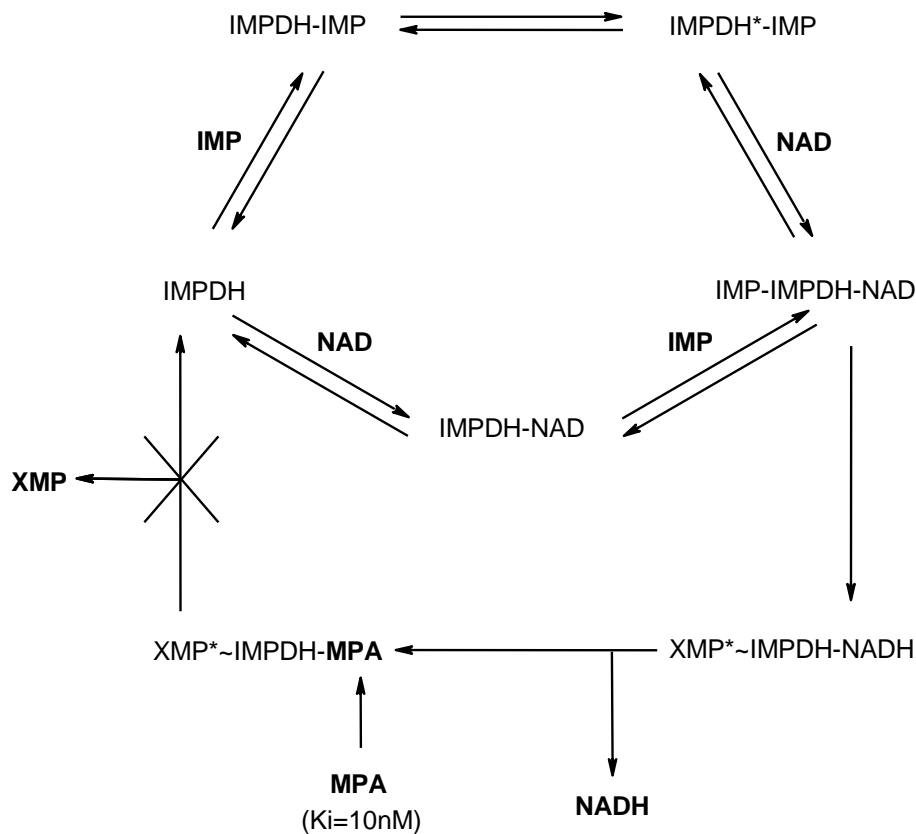


Abbildung 1.1: Inhibition von IMPDH 2 durch Mycophenolsäure

Es existiert ein alternativer Syntheseweg für GMP, der sog. Salvage Pathway. Salvage Pathway bedeutet, daß Nukleotide durch die Wiederverwertung vorgefertigter Basen synthetisiert werden. GMP wird hierüber aus Guanin, entstanden beim hydrolytischen Abbau von Nukleinsäuren und Nukleotiden, gebildet. Dieser Salvage Pathway ist in den meisten Zellen aktiv, allerdings fehlt er in T- und B-Lymphozyten (Allison and Eugui 1993a). Lymphozyten sind also auf die *de-novo*-Synthese von Guaninnukleotiden und somit auf die Aktivität von IMPDH angewiesen. Bei Erschöpfung der intrazellulären Guaninnukleotide ist eine weitere Proliferation der Zelle nicht mehr möglich. Durch Hemmung der IMPDH mittels MPA wird somit ein zytostatischer Effekt auf T- und B-Lymphozyten ausgeübt, womit eine selektive Immunsuppression erreicht werden kann.

Zwei Typen der IMPDH sind bekannt, Typ I und Typ II, deren unterschiedliche genetische Sequenzen bereits beschrieben wurden (Collart and Huberman 1988) und von denen mehrere Polymorphismen bekannt sind (Sintchtak et al. 1996; Colby et al. 1999; Farazi et al. 1997). IMPDH vom Typ I (IMPDH-I) wird ubiquitär exprimiert, während IMPDH vom Typ II (IMPDH-II) vor allem in neoplastischen und proliferierenden Zellen, insbesondere in aktivierten Lymphozyten dominant ist (Allison and Eugui 1993b). Die Charakterisierung beider Typen der IMPDH (Carr et al. 1993) ergab eine 4,8 fach höhere Sensitivität der IMPDH-II auf Mycophenolsäure als der IMPDH-I. MPA hemmt aufgrund dieser erhöhten Sensitivität vornehmlich die IMPDH-II und daher die Proliferation und die Zellfunktion insbesondere von neoplastischen und proliferierenden Zellen, sowie von aktivierten B- und T-Lymphozyten.

Aufgrund der Abhängigkeit von Lymphozyten von der *de-novo*-Synthese von Guaninnukleotiden und der starken Sensitivität der IMPDH-II auf MPA stellte MPA eine gute Option für die Entwicklung eines selektiven Chemotherapeutikums oder eines Immunsuppressivums dar. Dank der selektiven zytostatischen Wirkung auf B- und T-Lymphozyten etablierte sich die Mycophenolsäure in der Behandlung von Patienten nach einer Organtransplantation zur Vermeidung von Abstoßungsreaktionen.

In der Transplantationsmedizin wird Mycophenolsäure heute entweder als das Prodrug Mycophenolat-Mofetil (MMF) (CellCept®) oder neuerdings als Mycophenolat-Natrium (Myfortic®) eingesetzt. MMF wurde entwickelt, um die Bioverfügbarkeit von MPA zu erhöhen.

Das Prodrug MMF ist der pharmakologisch inaktive Morpholinoethylester von MPA und hat eine Bioverfügbarkeit von ca. 94%. In einer Leberpassage wird MMF vollständig zur pharmakologisch aktiven MPA hydrolysiert.

Mycophenolat-Natrium wird nahezu vollständig resorbiert und hat eine Bioverfügbarkeit von ca. 72%.

Sowohl MPA als auch ein bekannter Metabolit, das Glucuronid MPAG, binden reversibel an das globuläre Protein Albumin (Nowak and Shaw 1995), wodurch die Wirksamkeit von MPA *in vivo* reduziert wird, da nur der im Blut freie Anteil von MPA pharmakologisch wirksam ist. Albumin liegt physiologischerweise in einer Konzentration von 35-53 g/l im menschlichen Serum vor. Bei reduzierter Albuminkonzentration (Hypalbuminämie) ist eine reduzierte Arzneimittelbindung an Albumin bekannt (Jusko and Gretch 1976). Zu einer reduzierten Albuminkonzentration kommt es bei verschiedenen Krankheitsbildern, beispielsweise bei Erkrankungen der Leber (Blaschke 1977) oder Erkrankungen der Nieren wie einer Glomerulonephritis. Daher kommt der verringerten Bindung von MPA an Albumin insbesondere bei Patienten mit eingeschränkter Nieren- oder Leberfunktion nach einer Nieren- oder Lebertransplantation und der konsekutiven Steigerung des freien Anteils der MPA eine besondere Rolle zu und Dosisanpassungen werden erforderlich.

Eine Untersuchung genetischer Polymorphismen der IMPDH I und IMPDH II (Gensburger et al. 2010) zeigte, daß eine Typisierung der IMPDH II keinen Vorteil in der Behandlung mit MPA ergeben würde, wohl aber eine Typisierung der IMPDH I, da gezeigt wurde, daß Patienten mit einem bestimmtem genetischem Polymorphismus der IMPDH I ein niedrigeres Risiko einer akuten

Abstoßung, aber ein erhöhtes Risiko einer Leukopenie im ersten Jahr nach Transplantation haben.

1.4 Inosinmonophosphat-Dehydrogenase

Inosinmonophosphat-Dehydrogenase (IMPDH) wurde in Säugetieren, Bakterien und Pflanzen gefunden und 1957 aus *Aerobacter aerogenes* zum ersten Mal isoliert (Magasanik et al. 1957). IMPDH ist ein Homotetramer, das aus vier jeweils 56 kD großen Monomeren besteht. IMPDH katalysiert die von der Reduktion von NAD^+ zu NADH abhängige Oxidation von IMP zu XMP. Bekannt ist, daß jedes Monomer der IMPDH eine Bindungsstelle für den Cofaktor NAD^+ und eine für das Substrat IMP besitzt. Mycophenolsäure bindet an und blockiert die Bindungsstelle von NAD^+ . Sowohl IMP als auch NAD^+ kann zuerst an IMPDH binden (Wang and Hedstrom 1997).

Nach Bindung von IMP und NAD^+ an die IMPDH findet die Umwandlung von E-IMP zu E-XMP* statt. Nach Abspaltung von NADH entsteht E-XMP und XMP wird durch Hydrolyse freigesetzt. Mycophenolsäure bindet an E-XMP* und blockiert die hydrolytische Freisetzung von XMP.

1.5 Metabolite der Mycophenolsäure

Der Hauptabbauweg der Mycophenolsäure erfolgt über die Bildung des 7-O-Glucuronid (7-O-MPAG) (Bullingham et al. 1998), indem MPA an der phenolischen Hydroxylgruppe durch die Glucuronosyltransferase glucuronidiert wird (s. Abbildung 1.2). Hierdurch wird die enzymhemmende

Wirkung auf IMPDH-II aufgehoben (Nowak and Shaw 1997) und MPAG kann größtenteils renal, sowie in geringerem Maße biliär ausgeschieden werden. Es wird vermutet, daß ein Teil des biliär ausgeschiedenen MPAG allerdings im enterohepatischen Kreislauf zu MPA deglucuronidiert und reabsorbiert wird (Shaw and Nowak 1995).

In Göttingen wurden mittels eines modifizierten HPLC-Protokolls drei weitere Metaboliten der MPA in Plasmaproben von mit MMF therapierten Patienten nach Nieren-, Leber- und Herztransplantation gefunden und identifiziert.

Ebenfalls durch eine von Glucuronosyltransferase katalysierte Glucuronidierung, allerdings an der Acylgruppe der MPA, entsteht das Acylglucuronid der MPA (AcMPAG) (Shipkova et al. 1999). Bei diesem AcMPAG wurde beobachtet, daß es selber eine hemmende Wirkung auf IMPDH-II besitzt. Desweiteren wird vermutet, daß AcMPAG eine IMPDH-II-unabhängige Wirkung auf Monozyten aufweist, indem AcMPAG die Expression von Interleukin 2 und Nucleobindin 1 in Monozyten beeinflusst (Petrova et al. 2009). In Patientenproben lag die Konzentration von AcMPAG bei ungefähr 10% der Konzentration von MPA (Shipkova et al. 2002).

Ein weiterer Metabolit entsteht durch eine von Glucosyltransferase katalysierte Glucosylierung an der phenolischen Hydroxylgruppe der MPA, das 7-O-Glucosid. Dieses 7-O-Glucosid weist wie das 7-O-Glucuronid ebenfalls keine pharmakologische Aktivität auf.

Über eine durch das hepatische mikrosomale Cytochrom-P450-System (CYP450) katalysierte Oxidation entstehen zudem aus MPA sehr geringe Mengen eines weiteren inaktiven Metaboliten.

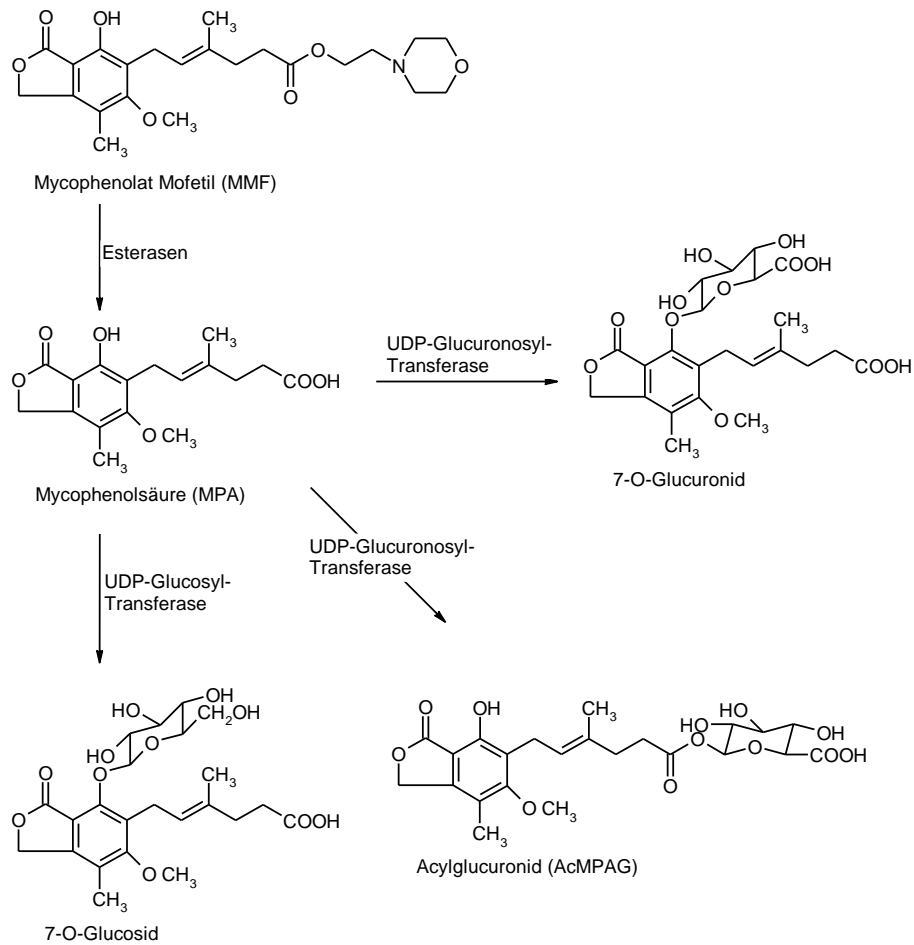


Abbildung 1.2: Mycophenolat-Mofetil, Mycophenolsäure und ihre Metabolite

1.6 Acylglucuronide

Acylglucuronide entstehen durch eine Esterbildung von Carboxylsäuren mit Glucuronsäuren. Dieser Weg der Metabolisierung ist für einige körpereigene Produkte, wie Retinolsäure oder Bilirubin, sowie für verschiedene Medikamente bekannt. Zu diesen zählen neben der Mycophenolsäure u.a. einige nicht-steroidale Antirheumatika, Fibrate (z.B. Gemfibrozil) und Diuretika

(z.B. Furosemid). Aufgrund verschiedener Interaktionen sind Acylglucuronide verantwortlich für Medikamentennebenwirkungen und -unverträglichkeiten (Ritter 2000). Zu diesen Interaktionen zählen Hydrolyse, Migration der Acylgruppe auf andere Hydroxylgruppen und die Bildung von kovalenten Bindungen der Acylglucuronide mit Makromolekülen, wie Proteinen oder DNA-Nukleosiden (Spahn-Langguth and Benet 1992). Diese kovalenten Bindungen z.B. mit Proteinen wie hauptsächlich Albumin (Spahn-Langguth et al. 1996) führen möglicherweise durch Funktionsstörungen des Proteins oder durch Antigenbildung und folgende Immunreaktion zu toxischen Nebenwirkungen bei der Medikamentengabe (Pumford and Halmes 1997).

Die vornehmlichen Nebenwirkungen bei einer Therapie mit Mycophenolsäure sind Infektionen (wie bei allen immunsuppressiven Medikamenten), Leukopenie und gastrointestinale Beschwerden. Möglicherweise ist zumindest partiell das AcMPAG für einige dieser Nebenwirkungen, abgesehen von Diarrhoen (Heller et al. 2007; Xia et al. 2010), verantwortlich. Mittels Western Blot mit Antikörpern gegen MPA wurden in Proben von mit MPA behandelten Patienten Verbindungen von AcMPAG und Albumin (Shipkova et al. 2002) beobachtet.

1.7 Zielsetzung dieser Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist,

- die zuvor beobachtete Hemmung der Inosinmonophosphatdehydrogenase Typ II (IMPDH-II) durch das Acylglucuronid der Mycophenolsäure (AcMPAG) durch enzymkinetische Untersuchungen zu analysieren und auf einer quantitativen Basis zu beschreiben und
- den Einfluß von humanem Albumin durch Bindung von AcMPAG auf die Hemmung der IMPDH-II zu untersuchen.

2 Material und Methoden

2.1 *IMPDH-II-Expression und Reinigung*

2.1.1 IMPDH-II-Expression in *Escherichia coli*

Für die Expression der humanen Inosinmonophosphat-Dehydrogenase Typ II (IMPDH-II) wurde eine Kultur aus *E. coli* mit dem pProEX-HTb-Plasmid verwendet. Zunächst wurde in 100 ml sterilen LB-Mediums (Luria Broth Base) mit Ampicillin eine kleine Menge der bei -80°C konservierten *E. coli*-Kultur gelöst und über Nacht bei 37°C vorkultiviert. Ein Milliliter dieser Kultur wurde in 200 ml sterilen LB-Mediums mit Ampicillin in einem 500 ml-Erlenmeyerkolben gemischt und anschließend die optische Dichte bei 550 nm (OD 550) bestimmt. In Schritten von 1 ml wurde weiter von der Kultur hinzugefügt, bis eine OD 550 von 0,05 bis 0,1 erreicht wurde. Diese Kultur wurde dann weiter inkubiert, bis die OD 550 1,0 erreicht hatte. Dann wurde die Expression der IMPDH-II durch Zugabe von IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid) induziert und die Kultur bei 37°C über Nacht unter Schütteln inkubiert. Nach Inkubation wurde die Enzymaktivität bestimmt (s. unten) und die Kultur zweimalig je 50 ml für 15 min bei 4000 U/min in 50-ml-Falconröhrchen zentrifugiert. Nach Eintauchen in Flüssigstickstoff wurden die Sedimente bei -80°C eingelagert. Die Extraktion und Aufreinigung der in den Sedimenten enthaltenen IMPDH-II konnte dann zu beliebigem Zeitpunkt erfolgen.

2.1.2 Enzymaktivitätsbestimmung

Lösungen:

Extraktionspuffer:	10 mM	Tris/HCl, pH 8,2
	2 mM	DTT
	1 mM	EDTA
	4 M	Harnstoff
	5 µg/ml	Leupeptin
	10 µg/ml	Aprotinin
	1 mM	PMSF

Assaypuffer:	100 mM	Tris/HCl, pH 8,0
	100 mM	KCl
	3 mM	EDTA
	2 mM	DTT
	200 µM	IMP
	300 µM	NAD ⁺ .

Um die Enzymaktivität der gewonnenen IMPDH-II zu überprüfen, wurden zweimal 2ml der Kultur (s. oben) für eine Minute in Ciclocups zentrifugiert, die Überstände verworfen und die Sedimente in 200µl Extraktionspuffer mittels Ultraschall suspendiert und homogenisiert. Nach Zentrifugation für 2 min bei 12000 U/min und 4°C wurde der IMPDH-II enthaltende Überstand mit einer Eppendorf-Pipette abgenommen. Von diesem Überstand wurden 20µl mit

600µl des Assaypuffers in einer Eppendorf-Küvette gemischt und die Aktivität photometrisch bei einer Wellenlänge von 340 nm und 37°C in einem Beckman DU7400 bestimmt. Für den Leerwert wurden 600µl des Assaypuffers und 20µl des Extraktionspuffers verwendet. Die Aktivität wurde als Zunahme der Absorption dargestellt. Bei Linearität der gemessenen Aktivität wurde Mycophenolsäure (MPA) zugegeben. Bei sofortigem Aktivitätsverlust wurde gezeigt, daß es sich um humanes rekombinantes IMPDH-II handelte.

2.1.3 Extraktion der IMPDH-II

Die IMPDH-II wurde durch wiederholtes Zentrifugieren aus den konservierten Sedimenten extrahiert.

Lösungen:

Extraktionspuffer 1: 10 mM	Tris/HCl, pH 8,2
2 mM	DTT
1 mM	EDTA
5 µg/ml	Leupeptin
10 µg/ml	Aprotinin
1 mM	PMSF

Extraktionspuffer 2: 100 mM	Tris/HCl, pH 8,0
2 mM	DTT
1 mM	EDTA

500 mM	NaCl
4 M	Harnstoff
5 µg/ml	Leupeptin
10 µg/ml	Aprotinin.

Die IMPDH-II wurde aus den bei -80°C gelagerten Sedimenten, welche aus jeweils 100ml der *E. coli*-Kultur gewonnen wurden, in drei Schritten extrahiert. Zunächst wurde das Sediment in 2,5ml des Extraktionspuffers 1 gelöst. Dies erfolgte durch zehnmaliges 20 Sekunden langes Homogenisieren mittels Ultraschall (Polytron). Zwischen den einzelnen Wiederholungen wurde die Probe auf Eis gekühlt. Das Lysat wurde in einer Ultrazentrifuge für 15 min bei 15.500 U/min und 4°C in einem 10ml Zentrifugierrohrchen zentrifugiert und der Überstand für spätere Bestimmung der enzymatischen Aktivität gekühlt aufgehoben. Das Sediment wurde daraufhin zwei weitere Male jeweils in 1,25ml des Extraktionspuffers 2 mittels Ultraschall (viermal 20 Sekunden) homogenisiert und das Lysat für 30 min bei 25500 U/min und 4°C abzentrifugiert.

Von den drei so gewonnenen Überständen wurden jeweils 20µl mit 600µl des Assaypuffers gemischt und photometrisch die enzymatische Aktivität überprüft. Bei vorhandener Aktivität wurde der Harnstoff aus den Überständen 2 und 3 durch gemeinsame Dialyse in Extraktionspuffer 1 im Mengenverhältnis 1:300 über Nacht entfernt. Anschließend erfolgte die Aufreinigung der IMPDH-II über eine Phosphocellulosesäule und anschließend über eine Blue-Sepharose-Säule.

2.1.4 Aufreinigung der IMPDH-II über Phosphocellulosesäule

Lösungen:

Waschpuffer A:	20 mM	PO ₄ , pH 7,4
	100 mM	KCl
	1 mM	DTT
	0,1 mM	EDTA

Elutionspuffer B:	20 mM	PO ₄ , pH 7,4
	1,5 mM	KCl
	1 mM	DTT
	0,1 mM	EDTA.

Nach Aufbereiten der Phosphocellulose gemäß Anweisung des Herstellers wurde die Phosphocellulose-Säule (60ml) zunächst mit 90ml (das 1,5fache des Säulenvolumens) Waschpuffer A gewaschen. Nach dem Beladen mit der auf 100ml verdünnten IMPDH-II-Lösung erfolgte das Waschen mit Waschpuffer A, bis die Basislinie erreicht wurde. Die IMPDH-II wurde dann mit dem Elutionspuffer B von der Säule eluiert und in Fraktionen zu 0,5ml gesammelt. Die Fraktionen wurden auf ihre enzymatische Aktivität überprüft. Die Fraktionen mit hoher Enzymaktivität wurden daraufhin vereinigt und zur weiteren Aufreinigung über eine Blue-Sepharose-Säule vorbereitet.

2.1.5 Aufreinigung der IMPDH-II über Blue-Sepharose-Säule

Lösungen:

Waschpuffer A:	10 mM	Tris/HCl, pH 7,5
	100 mM	KCl
	800 mM	Harnstoff
	1 mM	DTT
	1 mM	EDTA

Elutionspuffer B:	10 mM	Tris/HCl, pH 7,5
	1,5 M	KCl
	800 mM	Harnstoff
	1 mM	DTT
	1 mM	EDTA

Verdünnungslösung: 1 mM DTT.

Die von der Phosphocellulose-Säule gewonnenen Fraktionen wurden zunächst mit 1mM DTT verdünnt (1:4), um die KCl-Konzentration unter 0,4M zu bringen.

Nach Aufbereiten der Blue-Sepharose gemäß Anweisung des Herstellers wurde die Blue-Sepharose-Säule (60ml) zunächst mit 90ml (dem 1,5fachen des Säulenvolumens) des Waschpuffers A gespült. Die Säule wurde mit der verdünnten Elution beladen und mit 60ml des Waschpuffers A gewaschen. Die IMPDH-II wurde dann mit 60ml des Elutionspuffers B eluiert und fraktioniert

gesammelt. Die Fraktionen wurden auf ihre enzymatische Aktivität überprüft und die enzymatisch aktiven Fraktionen vereinigt.

Nach der flüssigkeitschromatographischen Reinigung wurde die IMPDH-II-Lösung mit einem Centriprep-Konzentrator PM30 (Membranfilter 30 kDa, AMICON30) aufkonzentriert. Nach erneuter Kontrolle der enzymatischen Aktivität wurde die Proteinkonzentration der Lösung bestimmt.

2.1.6 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration wurde mit Hilfe des Protein-Assay-Reagent-Kit (Pierce) ermittelt. Hierzu wurde die konzentrierte IMPDH-II-Lösung 1:20 und 1:40 verdünnt eingesetzt. Albuminstandardreihe (0,2 mg/ml, 0,4 mg/ml, 0,6 mg/ml, 0,8 mg/ml, 1,0 mg/ml und 1,2 mg/ml BSA), Proben und Reagenz wurden zusammen in Küvetten für 30 Minuten bei 37°C inkubiert.

Anschließend erfolgten jeweils photometrische Doppelmessungen bei 562 nm Wellenlänge. Durch Vergleich der Absorptionswerte der Proben mit der Albuminstandardreihe wurde die Proteinkonzentration der Proben in mg/ml errechnet.

Nach erfolgter Bestimmung der Proteinkonzentration wurde die Lösung als 60%ige Glycerinlösung bei -20°C gelagert.

2.1.7 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Reinheit der IMPDH-II-Lösung wurde mittels SDS-PAGE mit dem Phast-System (Pharmacia) beurteilt.

Lösungen:

Probenpuffer:	10 mM	Tris/HCl, pH 8,8
	1 mM	EDTA
	5% (w/v)	SDS
	0,1 M	DTT
	50 µl 1% (w/v) Bromphenolblau/H ₂ O (BPB) auf 1,5 ml Probenpuffer.	

Die IMPDH-II-Probe wurde im Verhältnis 1:10 in Eppendorf-Reaktionsgefäßen mit dem Probenpuffer gemischt, dann zusätzlich auf ein Verhältnis von 1:20 und 1:40 verdünnt. Die verdünnten Proben wurden in den Reaktionsgefäßen in einem Heizblock bei 95°C für 5 min geschüttelt inkubiert. Als Marker wurden zwei kommerzielle Standards (SDS low und SDS high) mit Proteinbanden von 14,4 kDa bis 94 kDa und 53 kDa bis 212kDa verwendet. Während der Inkubation der Proben wurde das Phast-System vorbereitet. Mittels einer Schablone wurden in einen Parafilmstreifen kleine Vertiefungen als Stellen für das Auftragen der Proben gerieben. In diese Auftragstellen wurden je 3µl der verdünnten und vorbereiteten Proben pipettiert und mit einem Applikator wieder aufgenommen. Nach Einhängen des Applikators in den Applikatorarm des Phast-Systems wurde dieses geschlossen und gestartet.

Nach erfolgter Elektrophorese wurde die Rückseite des Gels getrocknet und das Gel zur direkten Silberfärbung in die Färbereinheit des Phast-Systems

eingespannt. Das gefärbte Gel wurde bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend luftdicht eingeschweißt.

2.2 Enzymkinetiken

Alle Versuche zu der enzymatischen Aktivität und zur Hemmung der IMPDH-II wurden photometrisch durchgeführt. Die durch die IMPDH-II katalysierte Oxidation von Inosinmonophosphat (IMP) zu Xanthinmonophosphat (XMP) hängt von der Energie liefernden Reduktion von NAD^+ zu NADH^+ ab, zudem hat NADH^+ ein Absorptionsmaximum bei 340 nm Wellenlänge, im Gegensatz zu dem Absorptionsmaximum von NAD^+ bei 260 nm. Das bei der Oxidation von IMP zu XMP anfallende NADH^+ führt also zu einer Zunahme der Absorption bei 340 nm. Diese Zunahme der Absorptionsbande bei 340 nm ist direkt proportional zu Konzentration des NADH^+ und somit auch zu der Reaktivität der IMPDH-II.

In Vorversuchen wurde die Linearität der Absorptionzunahme bei 340 nm mit unterschiedlichen Substratkonzentrationen gezeigt. Die Enzymaktivität war linear über die ersten 10 min bei Substratkonzentrationen von 10 bis 100 μM IMP und 20 bis 100 μM NAD, sowie bei einem pH von 8,0 und einer Temperatur von 37°C.

Durch vergleichende Versuche in An- und Abwesenheit von Mycophenolsäure (MPA) und deren Acylglukuronidmetaboliten M-2 (AcMPAG) konnten deren hemmende Eigenschaften auf die Reaktivität der IMPDH-II dargestellt und

bestimmt werden. Dabei zeigte eine verlangsamte Zunahme der Absorption eine Hemmung der Reaktion und somit der IMPDH-II an.

Zunächst wurden die Michaelis-Menten-Konstanten K_m von IMPDH-II in Abhängigkeit von IMP und NAD^+ bestimmt.

Nach erfolgter Bestimmung der K_m -Werte wurden Versuche mit dem Inhibitor MPA durchgeführt, um deren hemmendes Potential mit dem des AcMPAG vergleichen zu können. Hierzu wurden die K_i -Werte jeweils in Abhängigkeit von NAD und IMP bestimmt und miteinander verglichen.

Die Gesamtmenge der Reaktionsproben betrug 600ml. Pipettiert wurde mit Eppendorfpipetten unterschiedlichen Volumens direkt in die Eppendorfküvetten nach festem Schema (s. unten). Nach erfolgtem Pipettieren wurden die Küvetten in das bei 37°C vortemperierte Photometer gestellt und für 10 min inkubiert. Durch Zugabe von 30 μ l der verdünnten IMPDH-II Lösung wurde die Reaktion gestartet und die Messungen nach kurzem Mischen mit Kunststoffmischstäbchen begonnen. Nach maximal 20 Minuten wurden die Messungen gestoppt und die Proben verworfen. Die Messungen wurden jeweils fünfmal wiederholt.

Lösungen:

Assaypuffer:	0,1 M	Tris/HCl, pH 8,0
	100 mM	KCl
	3mM	EDTA
	2 mM	DTT
Stammlösung IMP:	2000 μ M	IMP in Assaypuffer
Stammlösung NAD ⁺ :	6000 μ M	NAD ⁺ in Assaypuffer
Stammlösung MPA:	50 μ M	MPA in Acetonitril
Stammlösung AcMPAG:	2 mM	AcMPAG in Dimethylsulfoxid (DMSO).

2.2.1 Michaelis-Menten-Konstante (K_m)

Für die photometrische Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstante (K_m) für IMP wurde IMP in Endkonzentrationen von 50, 30, 20, 15 und 10 μ M eingesetzt. Die NAD⁺-Endkonzentration betrug 300 μ M.

Für die photometrische Bestimmung des K_m -Wertes für NAD⁺ wurde NAD⁺ variiert mit 100, 80, 40, 30 und 20 μ M eingesetzt. Die IMP-Endkonzentration betrug 200 μ M.

2.2.2 K_i -Werte von MPA und AcMPAG

Vorversuche hatten gezeigt, daß der K_i -Wert von MPA zwischen 10 nM und 20 nM liegen mußte, deshalb wurde MPA für die Versuche mit 20 nM Endkonzentration eingesetzt. Es wurde eine Reihe ohne und eine Reihe mit 20 nM MPA durchgeführt.

Die AcMPAG-Endkonzentration im Reaktionsansatz von 600 μ l sollte 100 und 200 nM betragen.

Bei den Versuchen mit IMP als variablem Substrat betrug die IMP-Endkonzentration 100; 45,8; 29,1; 20,8 und 16,6 μ M. NAD^+ wurde mit 300 μ M eingesetzt.

Bei den Versuchen mit NAD als variablem Substrat betrug die NAD-Endkonzentration 100; 80; 40; 30 und 20 μ M, die IMP-Konzentration 200 μ M.

2.2.3 Auswertung der Messergebnisse

Zur Auswertung der Ergebnisse nach jeweils fünfmaliger Wiederholung wurden die Steigungen der linearen Anfangsabschnitte der Kurven der Absorptionsanstiege, also die Anfangsgeschwindigkeiten v_0 der Reaktion, einzeln für jede Substratkonzentration $[S]$ bestimmt. Diese zeigten den Umsatz der NAD^+ zu $\text{NADH}^+ + \text{H}^+$ in $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ an. Sie wurden von dem an das Photometer angeschlossenen Computer nach Eingabe der Anfangs- und Endzeiten direkt ausgegeben. Diese Werte wurden mittels des

EnzymeKinetics Moduls des Programms SigmaPlot 2.0 (Version 8.0 der Firma SPSS Inc, UK) bearbeitet.

Bestimmung der K_m -Werte:

Die Berechnung der K_m -Werte erfolgte mittels der Michaelis-Menten-Gleichung:

$$v_o = \frac{V_{\max} * [S]}{K_m + [S]}$$

Dabei bedeutet:

[S]: Substratkonzentration bei Beginn der Reaktion

v_o : Anfangsgeschwindigkeit der Reaktion bei der Substratkonzentration [S]

V_{\max} : maximale Reaktionsgeschwindigkeit bei Substratsättigung

K_m : Michaelis-Menten-Konstante; Substratkonzentration, bei der die Reaktion mit halbmaximaler Geschwindigkeit abläuft.

Bei der graphischen Darstellung der Reaktionsabläufe nach Michaelis-Menten wurde für jeden Wert der Substratkonzentration (Abszisse) der zugehörige

Wert v_o (Ordinate) aufgetragen. Hier können V_{max} auf der Ordinate und K_m auf der Abszisse direkt abgelesen werden.

Zudem wurden von den Reaktionsabläufen Eadie-Hofstee- und Lineweaver-Burk-Graphen angefertigt.

Bestimmung der K_i -Werte:

Nach Darstellung der Messwerte der Inhibitionsversuche durch Michaelis-Menten-, Eadie-Hofstee- und Lineweaver-Burk-Graphen wurden die K_i -Werte von MPA und AcMPAG mittels der Formel für unkompetitive Enzymhemmung berechnet:

$$v = \frac{V_{max}}{1 + [I]/K_i + K_m/[S]}$$

Dabei bedeutet:

[I]: Inhibitorkonzentration.

2.3 Albuminbindung von MPA und AcMPAG

MPA liegt in der Blutbahn zu einem wesentlichen Teil an Albumin gebunden vor (Nowak et al. 1995). Da nur der ungebundene Anteil pharmakologisch aktiv ist, sollte die Bindung von AcMPAG an Albumin ermittelt werden. Damit

kann beurteilt werden, inwieweit die Bindung von AcMPAG an Albumin die Hemmung der IMPDH-II *in vivo* beeinflusst.

Hierzu wurden enzymkinetische Versuche mit unterschiedlichen Konzentrationen von Albumin (human serum albumin, HSA) in Anwesenheit von AcMPAG im Vergleich zu MPA durchgeführt. Die HSA-Konzentration betrug in den Versuchen zwischen 0 und 50 g/l (0 – 724 μ M), deckte also sowohl den bei Erwachsenen physiologischen Bereich von 35 – 45 g/l im Serum, als auch die etwa bei Lebererkrankungen zu findenden erniedrigten HSA-Werte ab.

Mit den Ergebnissen der enzymkinetischen Messungen wurden die IC₅₀-Werte von MPA und AcMPAG für die einzelnen HSA-Konzentrationen berechnet und miteinander verglichen. Der IC₅₀-Wert gibt die Inhibitorkonzentration an, bei der die Aktivität eines Enzyms auf die Hälfte gehemmt wird.

Lösungen:

Assaypuffer:	0,1 M	Tris/HCl, pH 8,0
	100 mM	KCl
	3 mM	EDTA
	2 mM	DTT

Stammlösung IMP:	2000 μ M	IMP in Assaypuffer
------------------	--------------	--------------------

Stammlösung NAD ⁺ :	6000 µM	NAD ⁺ in Assaypuffer
Stammlösung MPA:	4,18 mM	MPA in Acetonitril
Stammlösung AcMPAG:	1,77 mM	AcMPAG in Dimethylsulfoxid (DMSO)
Stammlösung HSA:	100 g/l (1,448 mM)	HSA in Assaypuffer.

2.3.1 Photometrische Messung der Aktivität der IMPDH-II

Die Versuche wurden wie zuvor bei 37°C im Photometer in Eppendorfküvetten durchgeführt. Bestimmt wurde die Aktivität der IMPDH-II über die durch die Bildung von NADH+H⁺ aus NAD⁺ entstehende Absorptionzunahme bei 340 nm Wellenlänge über den Zeitraum von maximal 15 Minuten.

HSA wurde vor jeder Messreihe von fünf Wiederholungen auf einer Feinwaage abgemessen und in Assaypuffer gelöst. Für eine Messreihe mit fünfmaliger Wiederholung wurde je Reaktionsansatz entweder 0; 10; 25 oder 50 g/l HSA eingesetzt.

Variiert wurde die Inhibitorkonzentration mit entweder 0; 20; 40; 80; 160 und 320 nM MPA oder 0; 50; 100; 200; 400 und 800 nM AcMPAG eingesetzt je Messreihe, dagegen waren die Substratkonzentrationen fest mit 200 µM IMP und 300 µM NAD⁺.

Die Menge an IMPDH-II je Reaktionsansatz betrug wie in den vorangegangenen enzymkinetischen Versuchen 3 µg/ml.

Nachdem Assaypuffer, HSA, IMP und NAD^+ mittels Eppendorfküvetten in die Kuvetten pipettiert und gemischt wurden, wurden diese zur Inkubation für 10 Minuten in das bei 37°C vortemperierte Photometer gestellt. Die Inhibitoren MPA oder AcMPAG wurden aufgrund deren möglicher Thermolabilität erst nach Ablauf der Inkubationszeit hinzugefügt. Gestartet wurde die Reaktion und auch die photometrische Messung daraufhin durch die Zugabe der verdünnten IMPDH-II Lösung. Nach 15 Minuten wurde die Messung gestoppt, die Proben verworfen und nach Eingabe der Anfangs- und Endzeiten der Auswertung die Messergebnisse als Aktivität der IMPDH-II in $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ ausgegeben. Nach graphischer Darstellung der Messergebnisse wurden die IC_{50} -Werte von MPA und AcMPAG bei den jeweiligen HSA-Konzentrationen von 0; 10; 25 und 50 g/l bestimmt und miteinander verglichen.

2.3.2 Auswertung der Messergebnisse

Die Messergebnisse in $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ der einzelnen HSA-Konzentrationen wurden graphisch gemeinsam gegen die MPA- oder AcMPAG-Konzentration aufgetragen.

2.4 **Stabilität des AcMPAG**

Die Stabilität des AcMPAG bei Bedingungen, welche denen der enzymkinetischen Versuche entsprachen, wurde nach Probenaufbereitung mittels Hochleistungs-Flüssigchromatographie (HPLC) untersucht.

Lösungen:

Assaypuffer:	0,1 M	Tris/HCl, pH 8,0
	100 mM	KCl
	3 mM	EDTA
	2 mM	DTT

Stammlösung IMP: 2000 μ M IMP in Assaypuffer

Stammlösung NAD⁺: 6000 μ M NAD⁺ in Assaypuffer

Stammlösung MPA: 4,18 mM MPA in Acetonitril

Stammlösung AcMPAG: 1,77 mM AcMPAG in Dimethylsulfoxid
(DMSO)

Interner Standard für die HPLC: 500 mg/L Carboxy-butoxy-ether der MPA
(MPAC) in Acetonitril

Natriumwolframat Lösung, 25 %: 2,5 g Natriumwolframat-Dihydrat in 10 ml
H₂O.

2.4.1 Probengewinnung

Alle Proben enthielten 100 μ M NAD, 100 μ M IMP, verschiedene AcMPAG
Konzentrationen zwischen 0,2 und 2 μ M AcMPAG sowie entsprechend den

enzymkinetischen Versuchen 3 µg/ml IMPDH-II in Assaypuffer bei einem Gesamtvolumen von 1ml. Die einzelnen Bestandteile wurden mit Eppendorfpipetten in 1,5ml Reaktionsgefäße pipettiert. Die Proben wurden jeweils zweimal zubereitet. Nach Mischen wurden die Proben in einen bei 37°C vortemperierten Heizblock gestellt. Die Dauer der Inkubation betrug 0; 2; 5 und 10 min. Nach abgelaufener Inkubation wurden die Proben aus dem Heizblock genommen und nach Standardarbeitsprotokoll für die HPLC vorbereitet.

Neben den beschriebenen Proben wurden zusätzlich eine MPA-Standardprobe mit 0,1 mg/l MPA, eine AcMPAG-Standardprobe mit 1 mg/l, sowie eine Kontrollprobe mit 0,01 mg/l MPA und eine mit 0,001 mg/l MPA jeweils in H₂O vorbereitet.

2.4.2 Vorbereitung der Proben für die Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Vor Einsatz der Proben, der Kontrollen und der Standards in die HPLC zur Bestimmung der MPA-Konzentration mußten diese nach einem Standardarbeitsprotokoll vorbereitet werden.

Nach erfolgter Inkubation wurde von den Proben je 200µl mittels Eppendorfpipetten in neue 1,5ml-Reaktionsgefäße überführt, je 100µl der MPAC-Lösung als Interner Standard wurden hinzugefügt und das Gemisch für 5 min im Vortexer gemischt. Dann erfolgte das Ansäuern der Proben mit je 20µl einer 15 %igen Perchlorsäure zur Ausfällung der enthaltenen IMPDH-II

und Mischen für weitere 10 Sekunden. Nachdem noch je 20µl der 25 %igen Natriumwolframat-Lösung hinzugefügt und die Proben für weitere 20 Sekunden gemischt wurden, wurden diese für 5 min bei 12000 U/min zentrifugiert. Nach erfolgter Zentrifugation wurden die Überstände mittels Eppendorfpipetten in 0,5 ml Reaktionsröhrchen überführt und gekühlt bei +4°C bis zur Messung durch die HPLC gelagert.

3 Ergebnisse

3.1 IMPDH-II-Extraktion

3.1.1 Aufreinigung der IMPDH-II mittels FPLC

Die Aufreinigung der extrahierten IMPDH-II erfolgte mittels FPLC erst über eine Phosphocellulose- und danach über eine Blue-Sepharose-Säule.

Die mit einem Gradienten von 0,1 bis 1,0 M KCl von den Säulen eluierte IMPDH-II wurde in Fraktionen von 1 ml bei einer Laufmenge von 1 ml/min gesammelt. Die gewonnenen Fraktionen wurden einzeln auf ihre enzymatische Aktivität photometrisch überprüft. Hierzu wurde die Absorptionzunahme in Anwesenheit von IMP und NAD⁺ bei 340 nm Wellenlänge gemessen. Daraus konnte auf den IMPDH-II-Gehalt der Fraktionen geschlossen werden.

Diejenigen Fraktionen mit hoher enzymatischer Aktivität wurden anschließend gemeinsam weiter über eine Blue-Sepharose-Säule gegeben.

Die IMPDH-II wurde wie bei der Phosphocellulose-Säule mit einem Gradienten von 0,1 bis 1,0 M KCl von der Blue-Sepharose-Säule eluiert und in Fraktionen gesammelt.

Diejenigen Fraktionen mit hoher enzymatischer Aktivität wurden vereint, gemeinsam aufkonzentriert und als 60%ige Lösung in Glycerin bei -20°C

konserviert. Es folgten Bestimmung der Proteinkonzentration sowie eine SDS-Elektrophorese zur Beurteilung der Reinheit der IMPDH-II-Lösung.

3.1.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Reinheit der gewonnenen IMPDH-II wurde mittels SDS-PAGE überprüft. Es wurden verschiedene IMPDH-II-Chargen in unterschiedlichen Verdünnungen nebeneinander aufgetragen. Zur Ermittlung des Molekulargewichts wurde eine SDS-Standardreihe mit Banden zwischen 14,4 und 97 kDa verwendet. Nach Silberfärbung der SDS-Gele fanden sich deutlich gefärbte solitäre Banden im Bereich von 54 kDa, dem Molekulargewicht von IMPDH-II.

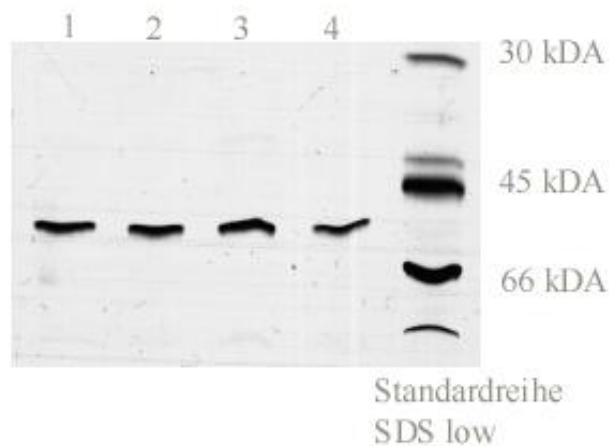


Abbildung 3.3: SDS-PAGE zweier IMPDH-II-Chargen in den Verdünnungen von 1:100 (Nr. 4), 1:50 (Nr. 3), 1:8 (Nr. 2) und 1:50 (Nr. 1).

3.2 Stabilität des AcMPAG

Der Anteil der aus AcMPAG entstandenen MPA über den Zeitraum der enzymkinetischen Versuche wurde über HPLC bestimmt. Somit konnte beurteilt werden, inwieweit die beobachtete Hemmung der IMPDH-II durch AcMPAG oder fälschlicherweise durch entstehendes MPA verursacht wurde.

Nach Inkubation über 0 bis 10 min bei 37°C wurden die Proben für die HPLC vorbereitet. Die in der HPLC gemessene MPA-Konzentration lag bei eingesetzter AcMPAG-Konzentration von 200 nM (0,1 mg/l) auch nach mehrfacher Wiederholung unter der Nachweisgrenze der HPLC für MPA von 0,05 ng/ml bei einer Standardprobe mit 0,1 mg/l MPA und zwei Kontrollproben mit 0,01 und 0,001 mg/l MPA.

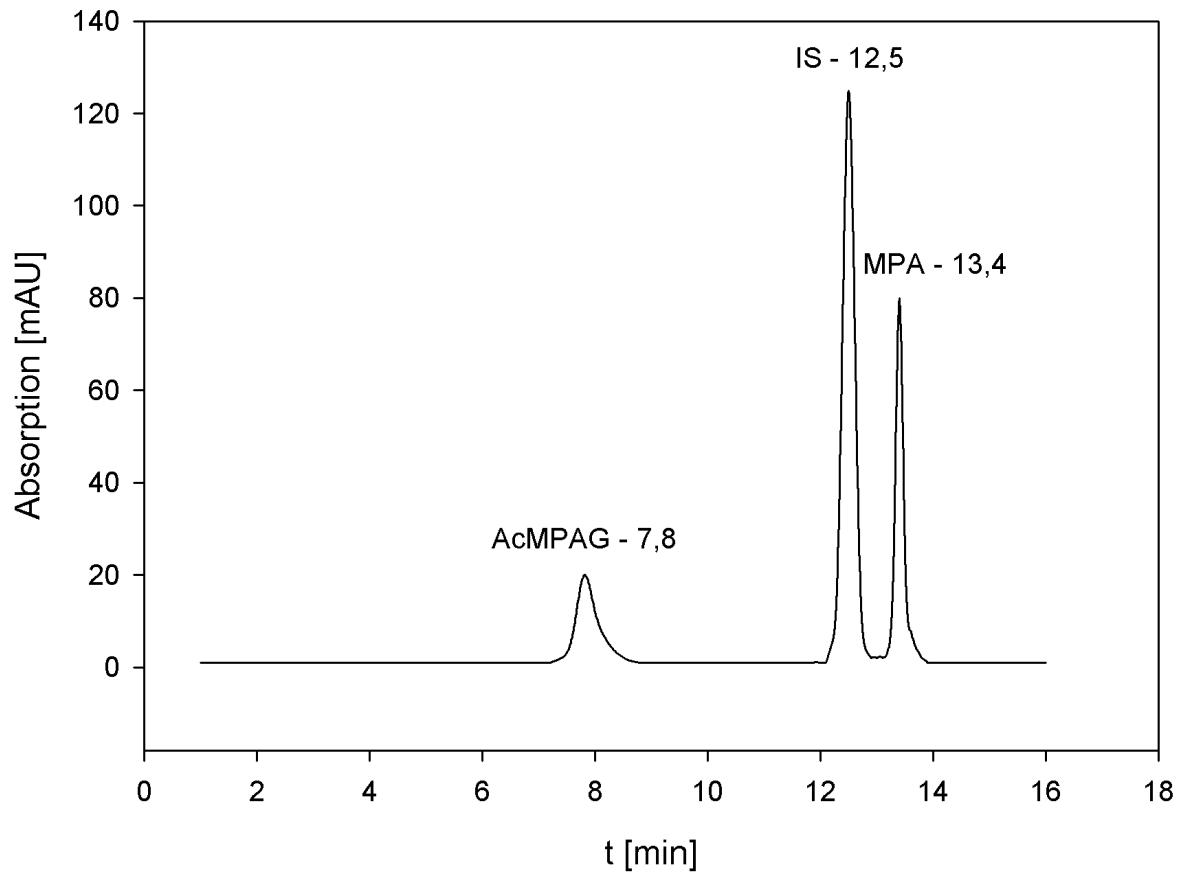


Abbildung 3.4: Beispiel einer HPLC mit MPA, AcMPAG und MPAC als Interner Standard

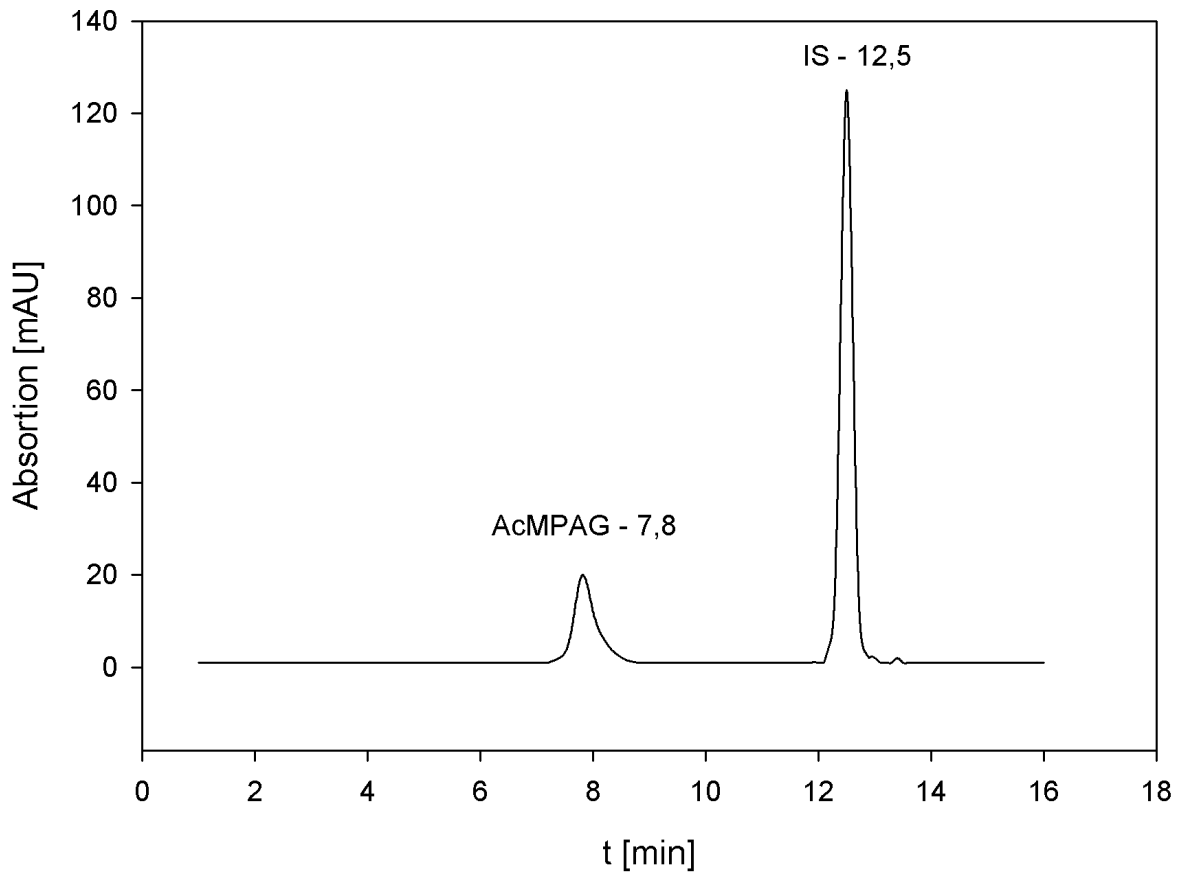


Abbildung 3.5: Beispiel einer HPLC mit AcMPAG und MPAC als Interner Standard

3.3 Enzymkinetiken

3.3.1 Bedingungen für die enzymkinetischen Versuche

In Vorversuchen wurden die Bedingungen für die späteren enzymkinetischen Versuche definiert. Hierzu wurden vergleichende Messungen sowohl mit pH 7,5 und pH 8,0 als auch bei Temperaturen von 25°C und 37°C durchgeführt. Betrachtet wurde dabei der erste Anteil der Absorptionsanstiege. Es zeigte sich, daß bei einer Temperatur von 37,0°C und pH 8,0 über einen Zeitraum

von 10 min der Absorptionsanstieg linear war (s. Abbildung 3.1). Nach diesen 10 min fiel die Aktivität der IMPDH-II aufgrund der abnehmenden Substratkonzentrationen kontinuierlich ab.

Bei 25°C und pH 7,5 waren die Absorptionsanstiege insgesamt niedriger, der lineare Anteil zeitlich verzögert.

Da die Aktivität der IMPDH-II bei 37°C und pH 8,0 optimal war, wurden die folgenden enzymkinetischen Versuche unter diesen Bedingungen durchgeführt.

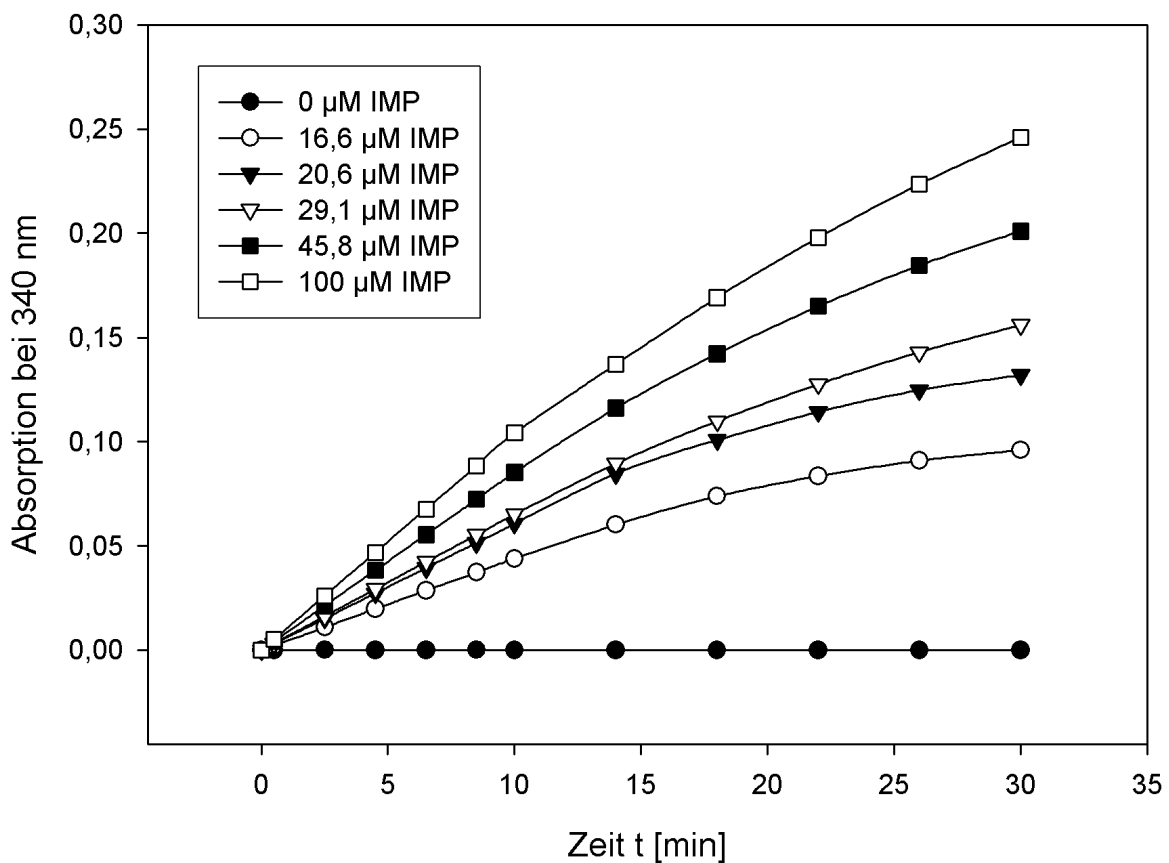


Abbildung 3.6: Aktivität der IMPDH-II bei 37°C, pH 8,0, 300 μM NAD und steigenden IMP-Konzentrationen. Gemessen wurde die NADH⁺-Bildung bei 340 nm Wellenlänge.

3.3.2 K_m -Werte

Die K_m -Werte der IMPDH-II für die Substrate IMP und NAD^+ wurden nach fünfmaliger Wiederholung der photometrischen Messung bei 340 nm Wellenlänge ermittelt. Die Substratkonzentrationen betragen dabei 10, 15, 20, 30 und 50 μM IMP sowie 300 μM NAD^+ für die Versuche mit IMP als variables Substrat und 20, 30, 40, 80, 100 μM NAD^+ sowie 200 μM IMP für die Versuche mit NAD^+ als variables Substrat. Die photometrisch erhaltenen Werte der Absorptionsanstiege über 10 min Meßdauer wurden graphisch dargestellt und die K_m -Werte errechnet.

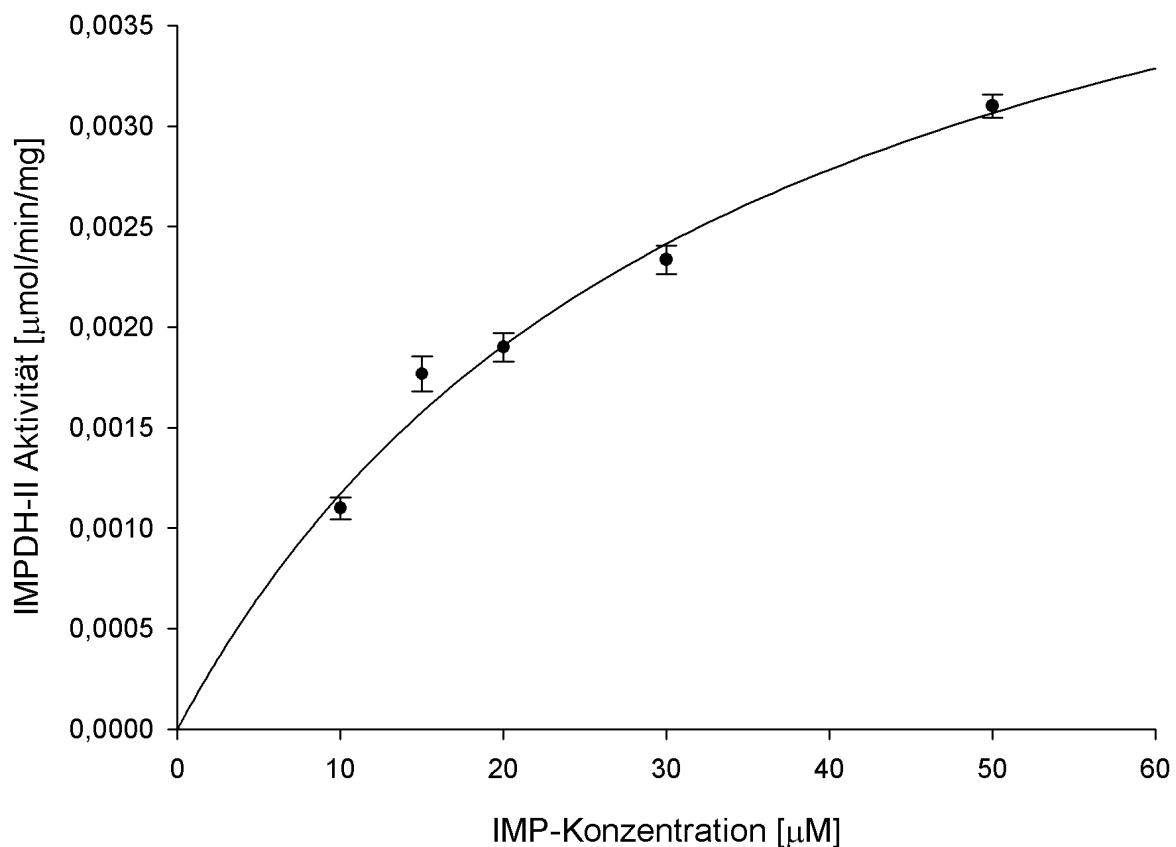


Abbildung 3.7: Michaelis-Menten-Darstellung der IMPDH-II-Aktivität in Abhängigkeit steigender Inosinmonophosphat-Konzentrationen. Darstellung

der Mittelwerte sowie der Minimal- und Maximalwerte aus fünf Wiederholungen.

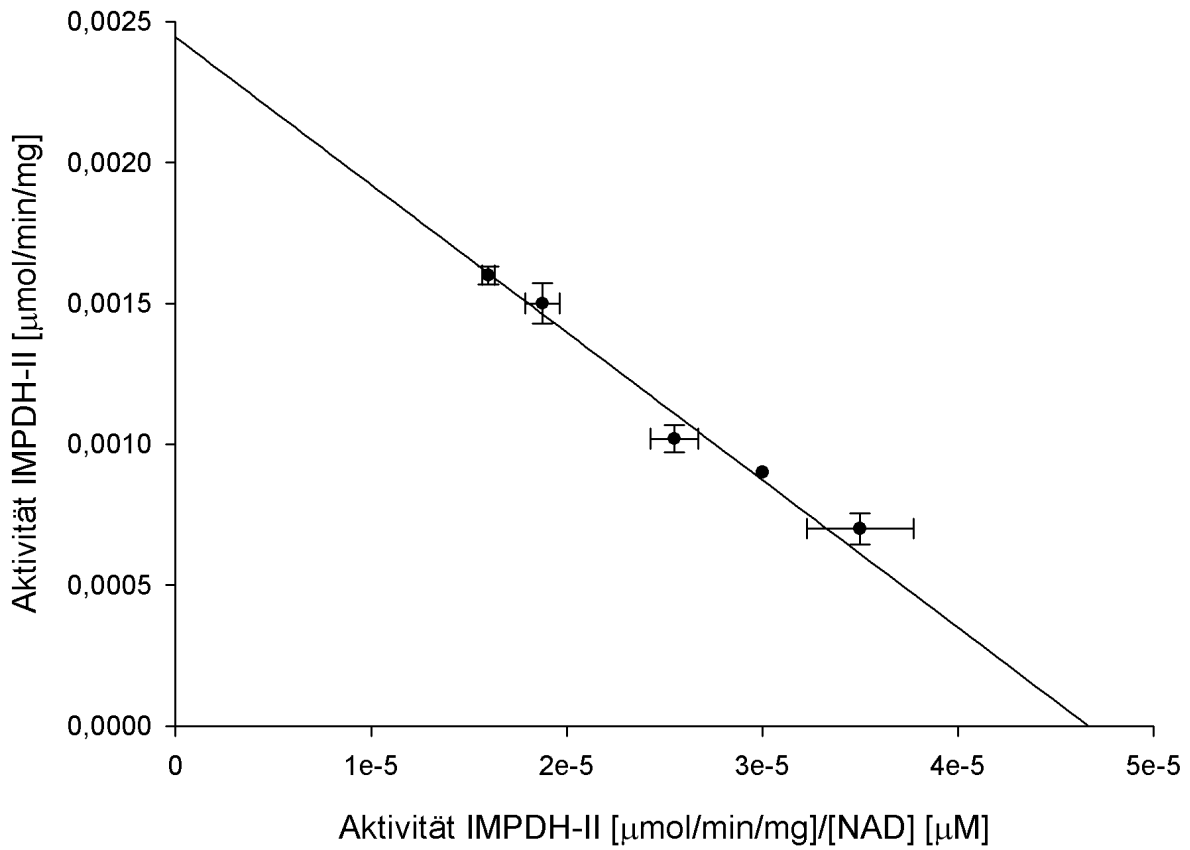


Abbildung 3.8: Eadie-Hofstee-Darstellung der IMPDH-II-Aktivität in Abhängigkeit steigender NAD^+ -Konzentrationen. Darstellung der Mittelwerte sowie der Minimal- und Maximalwerte aus fünf Wiederholungen.

Für die Berechnung der K_m -Werte wurde die Michaelis-Menten-Gleichung verwendet:

$$v_o = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{K_m + [S]}$$

Dabei bedeutet:

[S]: Substratkonzentration bei Beginn der Reaktion

v_o : Anfangsgeschwindigkeit der Reaktion bei der Substratkonzentration [S]

V_{\max} : maximale Reaktionsgeschwindigkeit bei Substratsättigung

K_m : Michaelis-Menten-Konstante; Substratkonzentration, bei der die Reaktion mit halbmaximaler Geschwindigkeit abläuft.

Die errechneten K_m -Werte der IMPDH-II betragen $33,96 \pm 4,83 \mu\text{M}$ in Abhängigkeit von IMP als variables Substrat ($V_{\max} = 0,0051 \pm 0,0004 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$) und $52,38 \pm 7,43 \mu\text{M}$ für NAD^+ als variables Substrat ($V_{\max} = 0,00244 \pm 0,00016 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$).

Werden die Meßdaten doppelt-reziprok, also $1/v_o$ gegen $1/[S]$, aufgetragen, erhält man eine Darstellung nach Lineweaver-Burk. Hierbei ist der Reaktionsverlauf nicht als Kurve wie bei Michaelis-Menten, sondern als Gerade aufgetragen. Der Vorteil liegt darin, daß V_{\max} hier an dem Schnittpunkt der Geraden mit der Ordinate als $1/V_{\max}$ abgelesen werden kann.

Zusätzlich wurden Eadie-Hofstee-Graphen angefertigt, bei denen v_o gegen $v_o/[S]$ aufgetragen werden. Die so aufgetragene Gerade bringt als Vorteil eine Verstärkung der Abweichung der Meßwerte von der Linearität.

3.3.3 Inhibitionsversuch mit MPA

Die Inhibitionsversuche mit MPA erfolgten mit MPA-Konzentrationen von 0 und 20 nM als enzymkinetische Messungen mit IMP und NAD^+ als variable Substrate. Die Substratkonzentrationen betragen dabei 16,6, 20,8, 29,1, 45,8 und 100 μM IMP sowie 300 μM NAD^+ für die Versuche mit IMP als variables Substrat und 20, 30, 40, 80, 100 μM NAD^+ sowie 200 μM IMP für die Versuche mit NAD^+ als variables Substrat. Die Darstellung erfolgte wieder mittels Michaelis-Menten-, Lineweaver-Burk- und Eadie-Hofstee-Graphen.

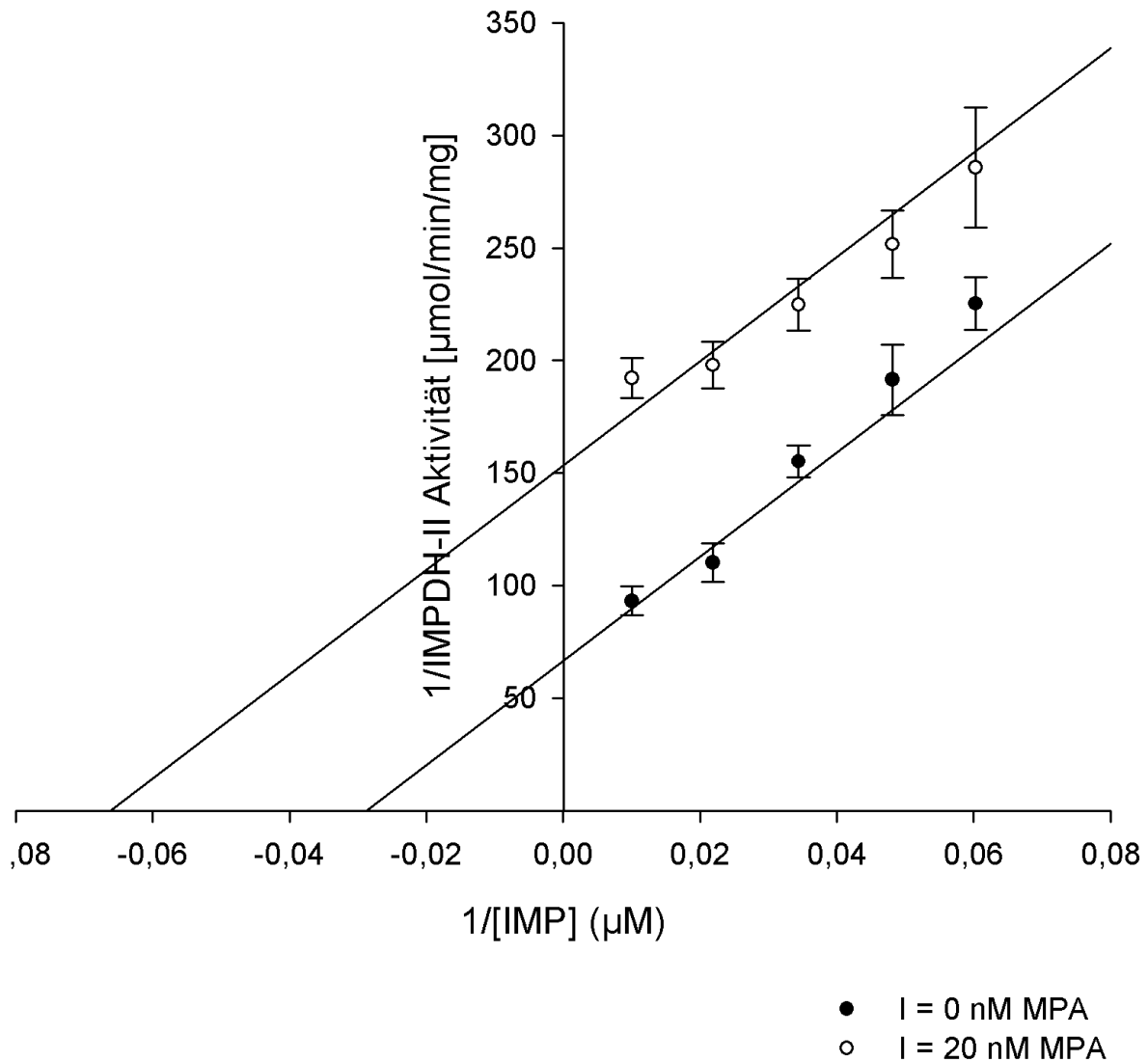


Abbildung 3.9: Lineweaver-Burk-Darstellung der IMPDH-II-Aktivität in Abhängigkeit steigender IMP-Konzentrationen in Anwesenheit von 0 (●) und 20 (○) nM MPA. Darstellung der Mittelwerte sowie der Minimal- und Maximalwerte aus fünf Wiederholungen.

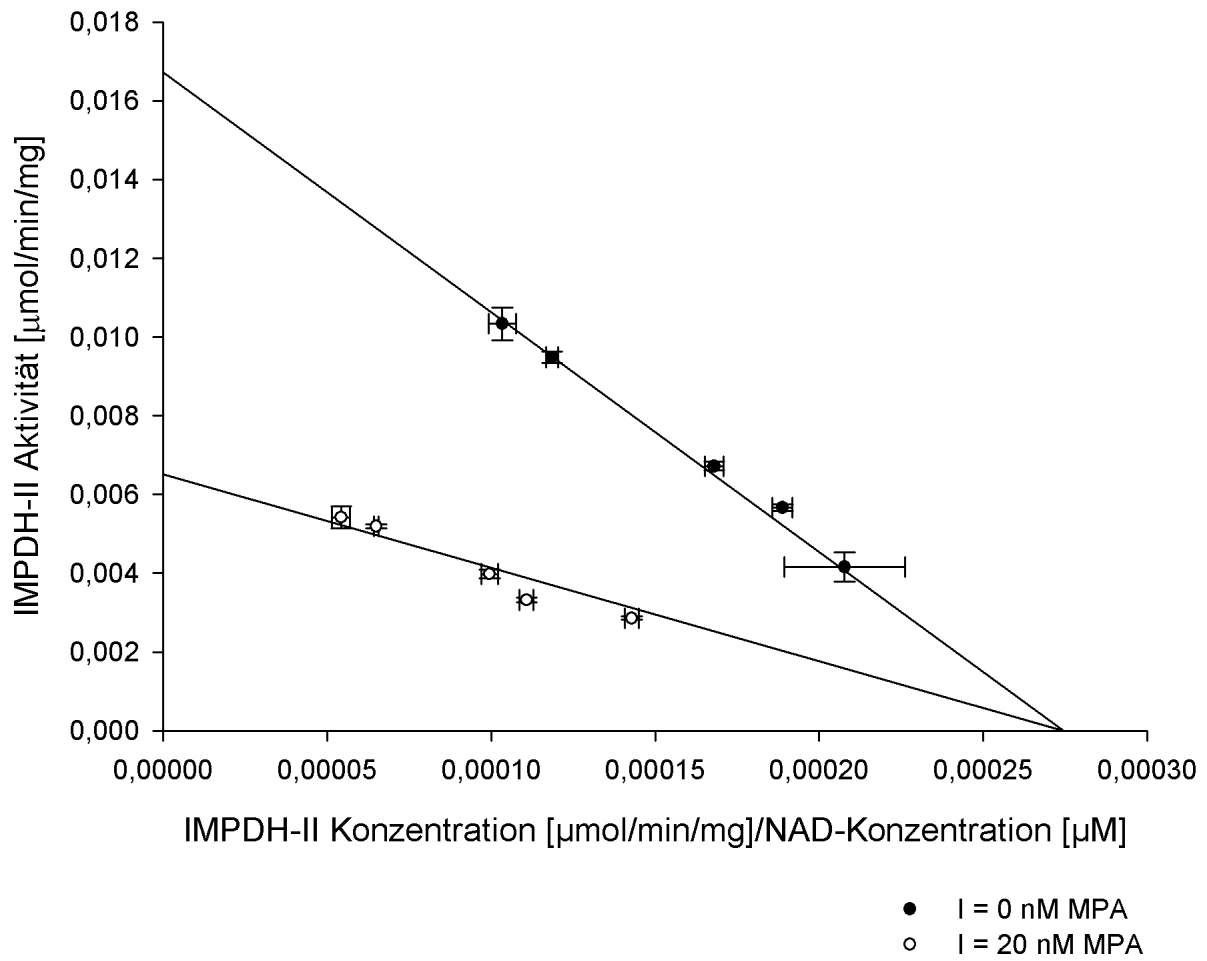


Abbildung 3.10: Eadie-Hofstee-Darstellung der IMPDH-II-Aktivität in Abhängigkeit steigender NAD^+ -Konzentrationen in Anwesenheit von 0 (●) und 20 (○) nM MPA. Darstellung der Mittelwerte sowie der Minimal- und Maximalwerte aus fünf Wiederholungen.

Die K_m -Werte waren mit $34,79 \pm 5,58 \mu\text{M}$ für IMP ($V_{\text{max}} = 0,0150 \pm 0,0012 \mu\text{mol/min/mg}$) und $60,93 \pm 5,66 \mu\text{M}$ für NAD^+ ($V_{\text{max}} = 0,0167 \pm 0,0008 \mu\text{mol/min/mg}$) etwa im Bereich der zuvor bestimmten Ergebnisse.

Der K_i -Wert für MPA mit IMP als variables Substrat betrug $15,32 \pm 2,14 \text{ nM}$, der mit NAD^+ als variables Substrat $12,76 \pm 0,91 \text{ nM}$.

3.3.4 Inhibitionsversuche mit AcMPAG

Die Versuche zur Inhibition der IMPDH-II durch AcMPAG wurden mit AcMPAG-Konzentrationen von 0, 100 und 200 nM als enzymkinetische Messungen mit IMP und NAD^+ als variable Substrate durchgeführt. Die Substratkonzentrationen waren gleich den in den Inhibitionsversuchen mit MPA gewählt. Die Messwerte wurden mittels Michaelis-Menten-, Lineweaver-Burk- und Eadie-Hofstee-Graphen mit der Gleichung für unkompetitive Hemmung dargestellt.

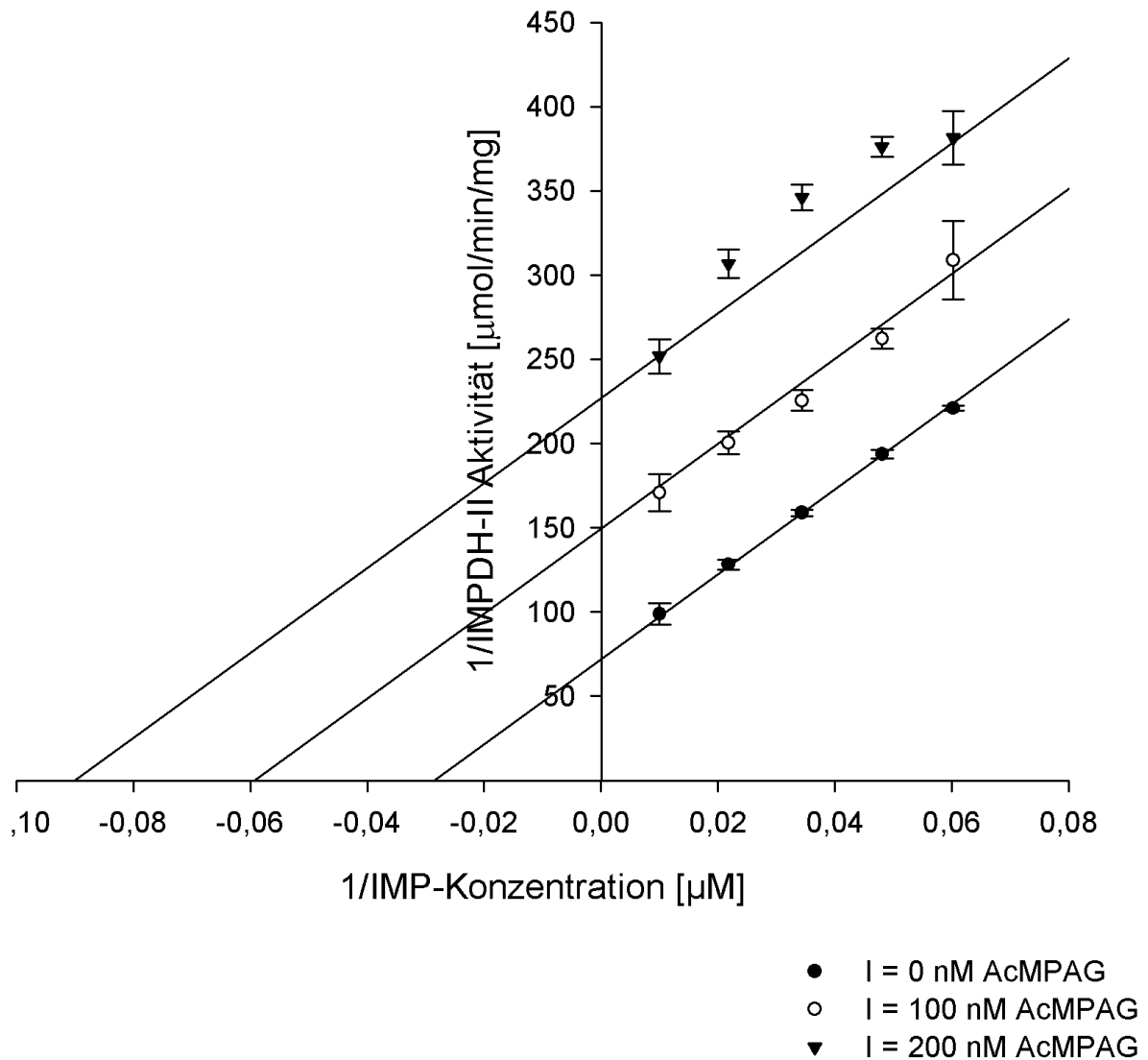


Abbildung 3.11: Lineweaver-Burk-Darstellung der IMPDH-II-Aktivität in Abhängigkeit steigender IMP-Konzentrationen in Anwesenheit von 0 (●), 100 (○) und 200 (▼) nM AcMPAG. Darstellung der Mittelwerte sowie der Minimal- und Maximalwerte aus fünf Wiederholungen.

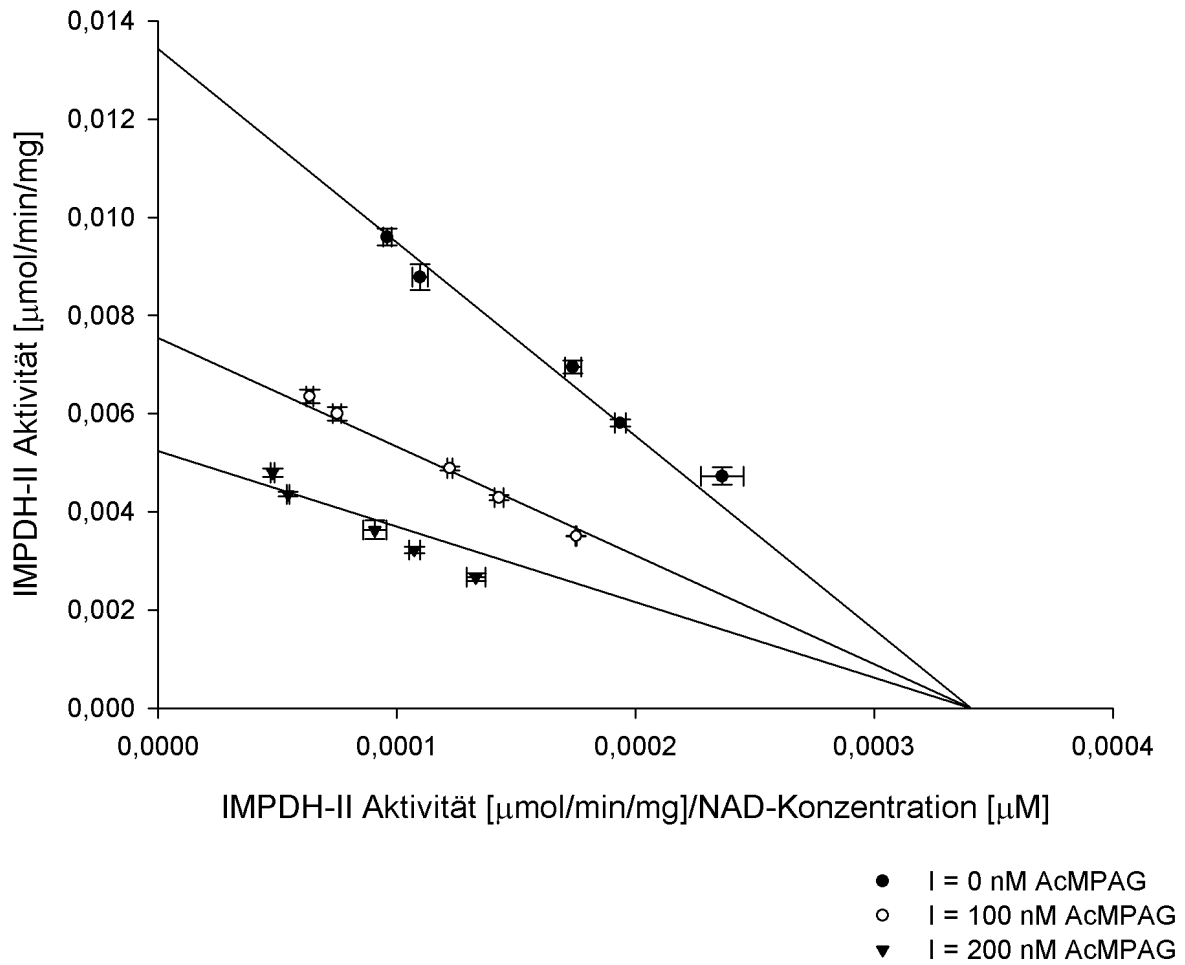


Abbildung 3.12: Eadie-Hofstee-Darstellung der IMPDH-II-Aktivität in Abhängigkeit steigender NAD^+ -Konzentrationen in Anwesenheit von 0 (\bullet), 100 (\circ) und 200 (\blacktriangledown) nM AcMPAG. Darstellung der Mittelwerte sowie der Minimal- und Maximalwerte aus fünf Wiederholungen.

Die K_m -Werte betragen $34,97 \pm 2,71 \mu\text{M}$ für IMP ($V_{\text{max}} = 0,0139 \pm 0,0005 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$) und $39,41 \pm 2,22 \mu\text{M}$ für NAD^+ ($V_{\text{max}} = 0,0134 \pm 0,0003 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$).

Die Berechnung der K_i -Werte der IMPDH-II von AcMPAG ergab $93,01 \pm 5,28 \text{ nM}$ für IMP als variables Substrat und $128,01 \pm 5,29 \text{ nM}$ für NAD^+ als variables Substrat, sie lagen also um den Faktor 6 bis 10 über denen der MPA.

Eine Zusammenfassung der Ergebnisse der enzymkinetischen Versuche gibt die folgende Tabelle:

Variables Substrat	IMP	NAD^+
K_i -Wert von MPA	$15,32 \pm 2,14 \text{ nM}$	$12,76 \pm 0,91 \text{ nM}$
K_i -Wert von AcMPAG	$93,01 \pm 5,28 \text{ nM}$	$128,01 \pm 5,29 \text{ nM}$

Tabelle 3.1: Enzymkinetische Eigenschaften der IMPDH-II in Abhängigkeit der Inhibitoren MPA und AcMPAG und der Substrate IMP und NAD^+ .

3.4 Albuminbindung von AcMPAG und MPA

Die Bindung von MPA und AcMPAG an Albumin und damit die Abnahme der Inhibition der IMPDH-II wurden vergleichend als enzymkinetische Versuche mit steigenden MPA- und AcMPAG-Konzentrationen bei HSA-Konzentrationen von 0, 10, 25 und 50 g/l durchgeführt. Die Auswertung erfolgte graphisch.

3.4.1 HSA-Bindung von MPA

In Anwesenheit von HSA sank die Inhibition der IMPDH-II durch MPA deutlich. Bei Zunahme der HSA-Konzentration von 0 auf 10 g/l und 25 g/l stieg die IC_{50} der MPA von 25 nM auf 130 nM und 320 nM. Bei HSA-Konzentrationen von 0; 10; 25 und 50 g/l wurde eine 80 %ige Inhibition der IMPDH-II durch MPA-Konzentrationen von 10; 35; 95 und 130 nM erreicht.

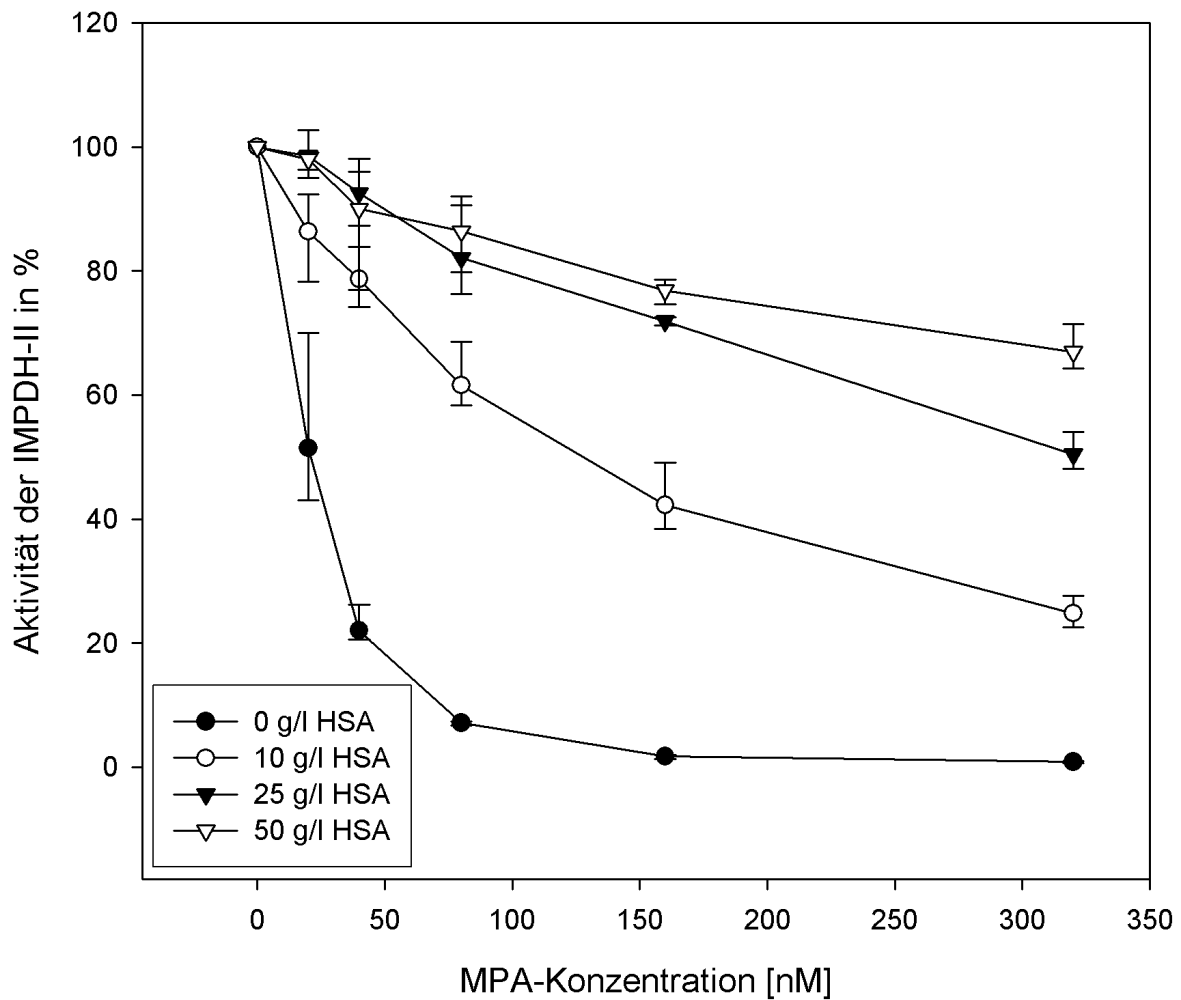


Abbildung 3.13: Einfluß steigender MPA- und HSA-Konzentrationen auf IMPDH-II. Darstellung der Mittelwerte sowie der Minimal- und Maximalwerte aus fünf Wiederholungen.

3.4.2 HSA-Bindung von AcMPAG

Wie zuvor für MPA beobachtet, hatte die Bindung von AcMPAG an HSA auch einen deutlichen Einfluß auf die Inhibition der IMPDH-II. Die IC_{50} der AcMPAG stieg bei Zunahme der HSA-Konzentration von 0 auf 10 g/l von 185 nM auf 740 nM. Eine 80 %ige Inhibition der IMPDH-II wurde bei HSA-Konzentrationen von 0; 10; 25 und 50 g/l durch AcMPAG-Konzentrationen von 70; 180; 380 und 640 nM erreicht.

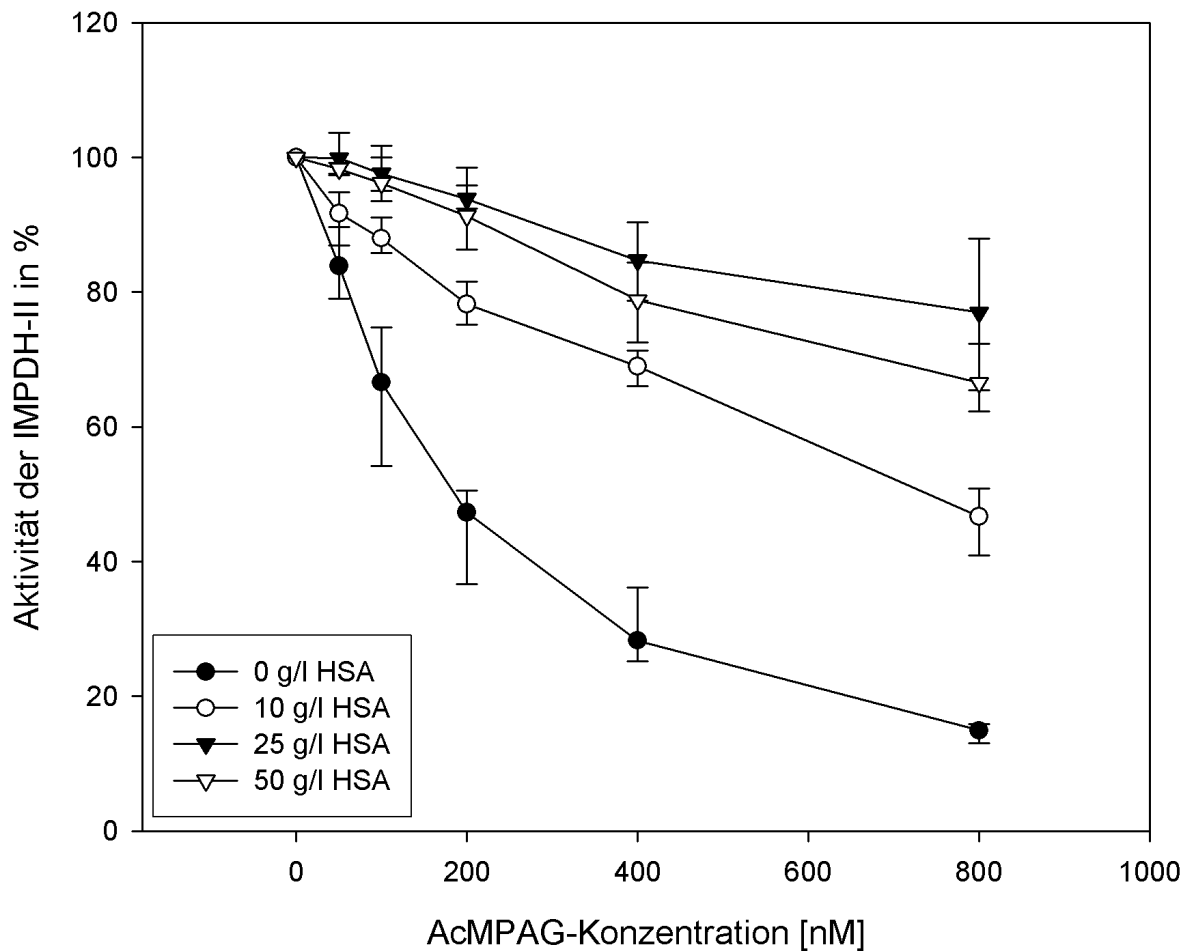


Abbildung 3.14: Einfluß steigender AcMPAG- und HSA-Konzentrationen auf IMPDH-II. Darstellung der Mittelwerte sowie der Minimal- und Maximalwerte aus fünf Wiederholungen.

4 Diskussion

4.1 *Immunsuppressive Eigenschaften von AcMPAG*

Die Bedingungen der durchgeführten enzymkinetischen Versuche wurden in einer Reihe von Vorversuchen bestimmt. Grundlegend für die Reaktion von IMP zu XMP, katalysiert durch IMPDH-II sind pH-Wert und Temperatur. Wir führten Vorversuche bei pH-Werten von 7,5 und 8,0 und bei Temperaturen von 25°C und 37°C durch. Der optimale pH-Wert für die Aktivität von IMPDH-II beträgt 8,0 (Hedstrom 1999). W. Hager (Hager et al. 1995) und S. Carr (Carr et al. 1993) führten die enzymkinetischen Versuche bei einer Temperatur von 37°C durch. Bei einer Temperatur von 37°C konnte ein linearer Kurvenabschnitt für einen Zeitraum von ca. 10 Minuten beobachtet werden und bei einem pH-Wert von 8,0 lief die Reaktion stabil, sodass die ermittelten K_m -Werte reproduzierbar und mit den beschriebenen übereinstimmend waren.

Für die Auswertung der enzymatischen Aktivitäten der IMPDH-II wurde der initiale lineare Kurvenabschnitt der Absorptionzunahme bei 340 nm Wellenlänge, dem Absorptionsmaximum von aus der bei der durch IMPDH-II katalysierten Oxidation von IMP zu XMP entstandenen NADH^+ verwendet. Die Linearität ist entscheidend für die Auswertung der Aktivität mittels der Michaelis-Menten-Gleichung und wurde in den durchgeführten Versuchen über einen Zeitraum von 10 Minuten beobachtet. Später nimmt die Reaktionsgeschwindigkeit zunehmend ab. Dies ist zum einen von der sich langsam erschöpfenden Konzentration des eingesetzten Substrats IMP und zum anderen von der zunehmenden Konzentration des Produkts XMP

bedingt. Die zunehmende Konzentration des Produkts XMP führt dazu, daß der Enzym-Substrat-Komplex aus IMPDH-II und IMP zunehmend in seine Einzelkomponenten zerfällt und nicht in das Produkt XMP und das freie Enzym IMPDH-II umgewandelt wird. Dies führt zudem dazu, daß die enzymatische Reaktion eine Maximalgeschwindigkeit V_{\max} zeigt, graphisch beispielsweise in Abbildung 3.6 dargestellt.

Die Ergebnisse der enzymkinetischen Versuche zeigten, daß AcMPAG wie die Mycophenolsäure ebenfalls ein Inhibitor der IMPDH-II ist. Der K_i -Wert von AcMPAG beträgt dabei $93,01 \pm 5,28$ nM mit IMP als variablem Substrat und $128,01 \pm 5,29$ nM mit NAD^+ als variablem Substrat, der von MPA unter identischen Versuchsbedingungen $15,32 \pm 2,14$ nM für IMP und $12,76 \pm 0,91$ nM für NAD^+ . Somit besitzt AcMPAG selber ein hemmendes Potential, welches ungefähr um den Faktor 6-10 über dem der MPA liegt. Die Reproduzierbarkeit wurde durch fünffache Wiederholung der Versuche bestätigt. Der K_m -Wert der IMPDH-II in den Versuchsreihen ohne Inhibitor ($33,96 \pm 4,83$ μM für IMP; $52,38 \pm 7,43$ μM für NAD^+), in Anwesenheit von MPA ($34,79 \pm 5,58$ μM für IMP; $60,93 \pm 5,66$ μM für NAD^+) und von AcMPAG ($34,97 \pm 2,71$ μM für IMP; $39,41 \pm 2,22$ μM für NAD^+) zeigte die Vergleichbarkeit der Versuchsreihen untereinander. Bei unkompetitiven Inhibitoren nimmt zwar die maximale Reaktionsgeschwindigkeit ab, wie in den graphischen Darstellungen nach Eadie-Hofstee (vergl. Abbildung 3.10 und 3.12) zu sehen, mit demselben Faktor wird jedoch auch die Steigung der Geraden reduziert.

Daß AcMPAG ein unkompetitiver Inhibitor der IMPDH-II ist, wurde graphisch in den doppelt-reziproken Darstellungen der IMPDH-II-Aktivität in Abhängigkeit von der Substratkonzentration nach Lineweaver-Burk dargestellt.

Charakteristisch für die unkompetitive Hemmung ist in dieser Art der graphischen Darstellung die Parallelität der Geraden unterschiedlicher Inhibitorkonzentration, beispielsweise in Abbildung 3.11 dargestellt. Im Gegensatz zur unkompetitiven Hemmung zeigt die graphische Darstellung einer Reaktion mit kompetitiver Hemmung die Geraden divergent, mit Schnittpunkt aller auf der Y-Achse, bei dem Wert von $1/V_{max}$. Eine Reaktion mit nichtkompetitiver Hemmung zeigt ebenfalls divergente Geraden, wobei der gemeinsame Schnittpunkt auf der Y-Achse liegt, bei $-1/K_m$. Bei unkompetitiven Hemmungen bindet der Inhibitor an den Enzym-Substrat-Komplex, dabei entsteht ein inaktiver Enzym-Substrat-Inhibitor-Komplex.

Die Untersuchungsbedingungen waren vergleichbar mit einer 2009 veröffentlichten Arbeit (Gensburger et al. 2009), hierin wurden allerdings für die unkompetitive Hemmung von IMPDH-II durch MPA und AcMPAG abweichende K_i -Werte beschrieben. Die K_i -Werte für AcMPAG betragen jedoch ebenfalls ungefähr das 8-10 fache der K_i -Werte von MPA. Eine Ursache für die Unterschiede der K_i -Werte trotz vergleichbarer Relation der Werte zueinander könnte, wie von Gensburger schon vorgeschlagen, am ehesten an der unterschiedlichen Quelle des verwendeten IMPDH-II liegen. Das in dieser Arbeit verwendete Enzym wurde für die Versuche eigens extrahiert, Gensburger verwendete industriell zur Verfügung gestelltes Material. In beiden Fällen wurde durch *E.coli* nach Einbringen eines für IMPDH-II kodierenden Plasmids das Enzym produziert. Angaben zu den zur Extraktion und

Reinigung der IMPDH-II verwendeten Methoden fehlen bei Gensburger allerdings.

Für den Hauptmetaboliten der Mycophenolsäure MPAG, ein 7-O-Glucuronid, wurde die zuvor angenommene pharmakologische Aktivität widerlegt. Von M. Korecka (Korecka et al. 1999) wurde beschrieben, daß die beobachtete Inhibition der IMPDH-II nicht durch MPAG, sondern durch in den Versuchsreihen enthaltene Spuren von MPA verursacht wurde. Daher bestand in der vorliegenden Arbeit die Befürchtung, daß für die in den Versuchen beobachtete Inhibition der IMPDH-II nicht AcMPAG, sondern während des Versuchszeitraums durch Hydrolyse aus AcMPAG entstandene MPA verantwortlich ist. Die Hydrolyse behebt die Glucuronidierung an der Acylgruppe, AcMPAG ist also nicht stabil, sondern wird in gewissem Maße zu MPA zurückgebildet. Um eine für die Ergebnisse relevante Hydrolyse auszuschließen, wurde die Stabilität von AcMPAG untersucht. Dabei wurden Versuchsansätze mit fünffacher Wiederholung unter Versuchsbedingungen bei 37°C über einen Zeitraum von 10 Minuten, entsprechend dem für die Auswertung relevanten Zeitraum, inkubiert und anschließend mittels HPLC die Konzentration der MPA in den Ansätzen bestimmt. Hierbei lag die vermutete MPA-Konzentration wiederholt unter der für die HPLC bestehenden Nachweisgrenze von 0,05ng/ml für ein Injektionsvolumen von 20µl. In den Versuchsansätzen betrug die AcMPAG-Konzentration 100nM und 200nM. Somit wurde gezeigt, daß die beobachtete Hemmung der IMPDH-II wie erwartet durch AcMPAG und nicht durch neu entstandene MPA verursacht wurde.

Zur immunsuppressiven Therapie wird zumeist das Prodrug Mycophenolat-Mofetil (MMF) oder neuerdings Mycophenolat-Natrium verwendet. *In vivo* wird MMF hepatisch mit einer Bioverfügbarkeit von ca. 94% zu MPA hydrolysiert. Die Konzentration des Acylglucuronids AcMPAG beträgt in Patientenproben ca. 10% der Konzentration von MPA, der immunsuppressive Einfluß von AcMPAG mit einem ca. 6-10 fach höheren K_i -Wert ist daher als recht niedrig anzusehen.

4.2 Einfluß von humanem Albumin auf die immunsuppressive Wirkung von AcMPAG

Sowohl MPA als auch die Metaboliten MPAG (Nowak and Shaw 1995) und AcMPAG (Shipkova et al. 2002) werden *in vivo* durch humanes Serumalbumin (HSA) gebunden. Die mittlere Konzentration von Albumin, einem kleinen Plasmaeiweiß mit einem Molekulargewicht von 69.000, beträgt 40 g/l (579 $\mu\text{mol/l}$) bei einem Normbereich von 35 - 45 g/l. Trotz der kleinen Größe stellt Albumin ca. 60% der Plasmaeiweißmenge *in vivo*. Andere Plasmaeiweiße sind beispielsweise γ -Globuline wie IgM mit einem Molekulargewicht von 960.000 oder α -Globuline wie α_1 -Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 44.000. Die Aufgaben von Albumin beinhalten zum einen das Aufrechterhalten des kolloidosmotischen Drucks, zum anderen dient es als Transportprotein, indem es sowohl andere körpereigene Stoffe, wie Bilirubin, Urobilin und Fettsäuren, als auch körperfremde Stoffe wie Medikamente (Penicillin, Sulfonamide, MPA) oder Schwermetalle (Quecksilber) bindet.

In enzymkinetischen Untersuchungen entsprechend dem von I. Nowak (Nowak and Shaw 1995) beschriebenen Versuchsprotokoll mit Konzentrationen von HSA von 0, 10, 25 und 50 g/l in An- und Abwesenheit von AcMPAG und MPA und in Abhängigkeit sowohl von IMP als auch von NAD^+ konnte gezeigt werden, daß sowohl die Bindung von MPA an HSA als auch die Bindung von AcMPAG an HSA jeweils die enzymatische Aktivität senkt. Eine 80%ige Hemmung der IMPDH-II wurde in Anwesenheit von 50g/l HSA ungefähr bei der 9fachen AcMPAG-Konzentration und der 13fachen MPA-Konzentration als in den Versuchen ohne zugesetzten HSA beobachtet. Umgekehrt führt eine Reduktion der Plasmakonzentration von HSA von 50g/l auf 25 g/l dazu, daß wesentlich niedrigere AcMPAG- bzw. MPA-Konzentrationen zu einer Hemmung der IMPDH-II benötigt werden. Beispielsweise reichen bei einer Plasmakonzentration von 25g/l HSA 60% der bei einer HSA-Konzentration von 50g/l benötigten AcMPAG-Konzentration, um eine 80%ige Hemmung der IMPDH-II zu erreichen. Bei MPA beträgt dieser Wert 73 %.

Die Ergebnisse zeigen auch, daß die inhibitorische Aktivität von AcMPAG genau wie von MPA abhängig von dem freien, nicht an HSA gebundenen Anteil der Konzentration ist. *In vivo* gibt es beachtliche Schwankungen der HSA-Konzentration im Serum, besonders pathologisch niedrige Werte werden bei Patienten mit Erkrankungen der Leber und der Nieren gefunden. In Hinblick auf Transplantationspatienten kommt daher der möglicherweise nach einer Organtransplantation bestehenden Nieren- bzw. Leberfunktionsstörung mit konsekutiver Hypalbuminämie der genauen Dosierung von MPA eine entscheidene Rolle zu, um unerwünschte Nebenwirkungen oder

Überdosierungen zu vermeiden. Die Dosierung der MPA-Gabe sollte nach Bestimmung der Plasmakonzentration von MPA und der Serumkonzentration von HSA erfolgen, wenn zu vermuten ist, dass die renale oder hepatische Funktion eingeschränkt sein könnte.

5 Zusammenfassung

AcMPAG ist wie MPA ein unkompetitiver Inhibitor der IMPDH-II, wobei das hemmende Potential ungefähr um den Faktor 6-10 über dem der MPA liegt. Dabei wird durch Bindung an Albumin schon im physiologischen Konzentrationsbereich eine Reduktion des hemmenden Potentials des AcMPAG erreicht. Bei reduzierten Albuminkonzentrationen werden niedrigere Konzentrationen von AcMPAG benötigt, um eine Hemmung der IMPDH-II zu erreichen, dies ist insbesondere bei Patienten mit vorliegender Hypalbuminämie zu berücksichtigen.

Da *in vivo* nach oraler Gabe von Mycophenolat-Mofetil die Konzentration von AcMPAG ungefähr ein Zehntel der MPA-Konzentration beträgt, ist der Einfluß von AcMPAG auf die IMPDH-II-Hemmung als sehr niedrig anzusehen. Eine routinemäßige Bestimmung der AcMPAG-Konzentration in Patienten mit MPA-Behandlung wäre demnach nicht erforderlich, allerdings im Falle einer vorliegenden Hypalbuminämie, beispielsweise durch hepatische Synthesestörungen, in Erwägung zu ziehen.

6 Literaturverzeichnis

Allison AC, Eugui EM (1993a):

The design and development of an immunosuppressive drug, mycophenolate mofetil
Springer Semin Immunopathol 14(4), 353-80

Allison AC, Eugui EM (1993b):

Mycophenolate mofetil, a rationally designed immunosuppressive drug
Clin Transplantation 7, 96-112

Blaschke TF (1977):

Protein binding and kinetics of drugs in liver diseases
Clin Pharmacokinet 2(1), 32-44

Borel JF, Feurer C, Gubler HU, Stähelin H (1976):

Biological effects of cyclosporin A: a new antilymphocytic agent
Agents Actions 6(4), 468-75

Bullingham RE, Nicholls AJ, Kamm BR (1998):

Clinical pharmacokinetics of mycophenolate mofetil
Clin Pharmacokinet 34(6), 429-55

Calne RY, White DJ, Thiru S, Evans DB, McMaster P, Dunn DC, Craddock GN,
Pentlow BD, Rolles K (1978):

Cyclosporin A in patients receiving renal allografts from cadaver donors
Lancet 1978, 2, 1323-7

Carr SF, Papp E, Wu JC, Natsumeda Y (1993):

Characterization of human type I and type II IMP Dehydrogenases
J Biol Chem 268(36): 27286-27290

Colby TD, Vanderveen K, Strickler MD, Markham GD, Goldstein BM (1999):

Crystal structure of human type II inosine monophosphate dehydrogenase:
implications for ligand binding and drug design
Proc Natl Acad Sci USA 96(7): 3531-6

Collart FR, Huberman E (1988):

Cloning and sequence analysis of the human and Chinese hamster inosine-5'-
monophosphate dehydrogenase cDNAs
J Biol Chem 263(30), 15769-72

Dealy JB, Dammin GJ, Murray JE, Merrill JP (1960):
Total body irradiation in man: tissue patterns observed in attempts to increase the
receptivity of renal homografts
Ann N Y Acad Sci 87, 572-85

Farazi T, Leichman J, Harris T, Cahoon M, Hedstrom L (1997):
Isolation and characterization of mycophenolic acid-resistant mutants of inosine-5'-
monophosphate dehydrogenase
J Biol Chem 272(2): 961-5

Fishman JA, Rubin RH (1998):
Infection in organ-transplant recipients
N Engl J Med 338(24): 1741-51

Gensburger O, Picard N, Marquet P (2009):
Effect of mycophenolate acyl-glucuronide on human recombinant Type-II inosine
monophosphate dehydrogenase
Clin Chem 55(5), 986-993

Gensburger O, Van Schaik RH, Picard N, Le Meur Y, Rousseau A, Woillard JB, Van
Gelder T, Marquet P (2010):
Polymorphisms in type I and II inosine monophosphate dehydrogenase genes and
association with clinical outcome in patients on mycophenolate mofetil
Pharmacogenet Genomics 20(9): 537-43

Hager PW, Collart FR, Huberman E, Mitchell BS (1995):
Recombinant human inosine monophosphate dehydrogenase Type I and II proteins
Biochem Pharmacol 49(9), 1323-1329

Hedstrom L (1999):
IMP Dehydrogenase: Mechanism of action and inhibition
Curr Med Chem 6, 545-560

Heller T, van Gelder T, Budde K, de Fijter JW, Kuypers D, Arns W, Schmidt J,
Rostaing L, Powis SH, Claesson K (2007):
Plasma concentrations of mycophenolic acid acyl glucuronide are not associated with
diarrhea in renal transplant recipients
Am J Transplant 7(7), 1822-31

Jusko WJ, Gretch M (1976):
Plasma and tissue protein binding of drugs in pharmacokinetics
Drug Metab Rev 5(1), 43-140

Kessler M, Jay N, Molle R, Guillemin F (2006):
Excess risk of cancer in renal transplant patients
Transpl Int 19(11): 908-14

Korecka M, Nikolic D, van Breemen RB, Shaw LM (1999):
The apparent inhibition of inosine monophosphate dehydrogenase by mycophenolic acid glucuronide is attributable to the presence of trace quantities of mycophenolic acid
Clin Chem 45, 1047-1050

Küss R, Legrain M, Mathe G, Nedey R, Camey M (1962):
Homologous human kidney transplantation. Experience with six patients
Postgrad Med J 38, 528-31

Magasanik B, Moyed HS, Gehring LB (1957):
Enzymes essential for the biosynthesis of nucleic acid guanine; inosine 5'-phosphate dehydrogenase of *Aerobacter aerogenes*
J Biol Chem 226(1), 339-50

Meier-Kriesche HU, Li S, Gruessner RWG, Fung JJ, Bustami RT, Barr ML, Leichtman AB (2006):
Immunosuppression: Evolution in practice and trends, 1994-2004
Am J Transplant 6(2), 1111-1131

Miller LW (2002):
Cardiovascular toxicities of immunosuppressive agents
Am J Transplant 2(9): 807-18

Murray JE, Merrill JP, Harrison JH (1955):
Renal homotransplantation in identical twins.
Surg Forum 1955 VI, 432-436

Nowak I, Shaw LM (1995):
Mycophenolic acid binding to human serum albumin: Characterization and relation to pharmacodynamics
Clin Chem 41(7), 1011-1017

Nowak I, Shaw LM (1997):
Effect of mycophenolic acid glucuronide on inosine monophosphate dehydrogenase activity
Ther Drug Monit 19(3), 358-60

Petrova DT, Heller T, Hitt R, Wieland E, Oellerich M, Armstrong VW, Shipkova M (2009):
Regulation of IL2 and NUCB1 in mononuclear cells treated with acyl glucuronide of mycophenolic acid reveals effects independent of inosine monophosphate dehydrogenase inhibition

Ther Drug Monit 31(1), 31-41

Pumford NR, Halmes NC (1997):
Protein targets of xenobiotic reactive intermediates.
Annu Rev Pharmacol Toxicol 37, 91-117

Ritter JK (2000):
Roles of glucuronidation and UDP-glucuronosyltransferases in xenobiotic bioactivation reactions.
Chem Biol Interact 129(1-2), 171-93

Shaw LM, Nowak I (1995):
Mycophenolic acid: measurement and relationship to pharmacologic effects.
Ther Drug Monit 17(6), 685-9

Shipkova M, Armstrong VW, Wieland E, Niedmann PD, Schütz E, Brenner-Weiß G, Voihsel M, Braun F, Oellerich M (1999):
Identification of glucoside and carboxyl-linked glucuronide conjugates of mycophenolic acid in plasma of transplant recipients treated with mycophenolate mofetil
Br J Pharmacol 126, 1075-1082

Shipkova M, Armstrong VW, Weber L, Niedmann PD, Wieland E, Haley J, Tönshoff B, Oellerich M (2002):
Pharmacokinetics and protein adduct formation of the pharmacologically active acyl glucuronide metabolite of mycophenolic acid in pediatric renal transplant recipients
Ther Drug Monit 24, 390-399

Sintchak MD, Fleming MA, Futer O, Raybuck SA, Chambers SP, Caron PR, Murcko MA, Wilson KP (1996):
Structure and mechanism of inosine monophosphate dehydrogenase in complex with the immunosuppressant mycophenolic acid
Cell 85(6): 921-30

Snyder JJ, Israni AK, Peng Y, Zhang L, Simon TA, Kasiske BL (2009):
Rates of first infection following kidney transplant in the United States
Kidney Int 75(3): 317-26

Spahn-Langguth H, Benet LZ (1992):

Acyl glucuronides revisited: is the glucuronidation process a toxification as well as a detoxification mechanism?

Drug Metab Rev 24(1), 5-47

Spahn-Langguth H, Dahms M, Hermening A (1996):

Acyl glucuronides: covalent binding and its potential relevance

Adv Exp Med Biol 387, 313-28

Tiede I, Fritz G, Strand S, Poppe D, Dvorsky R, Strand D, Lehr HA, Wirtz S, Becker C, Atreya R (2003):

CD28-dependent Rac1 activation is the molecular target of azathioprine in primary human CD4+ T lymphocytes

J Clin Invest 111(8), 1133-45

Wang W, Hedstrom L (1997):

Kinetic mechanism of human inosine 5'-monophosphate dehydrogenase type II: random addition of substrates and ordered release of products

Biochemistry 36(28), 8479-83

Wimmer CD, Rentsch M, Crispin A, Illner WD, Arbogast H, Graeb C, Jauch KW, Guba M (2007):

The janus face of immunosuppression - de novo malignancy after renal transplantation: the experience of the Transplantation Center Munich

Kidney Int 71(12): 1271-8

Xia ZW, Jun CY, Hao C, Bing C, Min SM, Jie XJ (2010):

The occurrence of diarrhea not related to the pharmacokinetics of MPA and its metabolites in liver transplant patients

Eur J Clin Pharmacol 66(7), 671-9