

Medizinische Fakultät
der
Universität Duisburg-Essen

Aus dem Institut für Medizinische Psychologie und Verhaltensimmunbiologie

Dosisabhängige Effekte einer kurzzeitigen Einnahme von Everolimus auf
psychoneuroimmunologische Parameter bei gesunden Männern

I n a u g u r a l d i s s e r t a t i o n
zur
Erlangung des Doktorgrades der Medizin
durch die Medizinische Fakultät
der Universität Duisburg-Essen

Vorgelegt von
Frederike Kolbe
aus Datteln
2025

Dekan: Herr Univ.-Prof. Dr. med. J. Buer
1. Gutachter/in: Herr Univ.-Prof. Dr. rer. biol. hum. M. Schedlowski
2. Gutachter/in: Frau Priv.-Doz. Dr. med. J. Friesbus-Kadash

Tag der mündlichen Prüfung: 15.09.2025

DuEPublico

Duisburg-Essen Publications online

UNIVERSITÄT
DUISBURG
ESSEN

Offen im Denken

ub | universitäts
bibliothek

Diese Dissertation wird via DuEPublico, dem Dokumenten- und Publikationsserver der Universität Duisburg-Essen, zur Verfügung gestellt und liegt auch als Print-Version vor.

DOI: 10.17185/duepublico/84519

URN: urn:nbn:de:hbz:465-20251106-131010-2

Alle Rechte vorbehalten.

Teile dieser Arbeit wurden im Rahmen einer größeren Studie im Deutschen Klinischen Studienregister (DRKS00017020) registriert.

Teile dieser Arbeit wurden publiziert in:

Hörbelt, T., Kahl, A.L., Kolbe, F., Hetze, S., Wilde, B., Witzke, O., und Schedlowski, M. (2020). Dose-Dependent Acute Effects of Everolimus Administration on Immunological, Neuroendocrine and Psychological Parameters in Healthy Men. *Clinical and Translational Science* 13, 1251-1259.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1 Einleitung	7
1.1 Everolimus	7
1.1.1 Wirkmechanismus und Anwendungsbereiche	8
1.1.2 Pharmakokinetik.....	10
1.1.3 Nebenwirkungen	12
1.2 Immunologische pharmakodynamische Biomarker	14
1.3 Kortisol.....	16
1.4 Die psychologische Komponente Angst	17
1.5 Konditionierung von Immunfunktionen.....	18
2 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit.....	21
3 Material und Methoden	23
3.1 Studienteilnehmer.....	23
3.2 Studiendesign	24
3.3 Everolimusspiegel im Blut	25
3.4 Isolierung mononukleärer Zellen aus dem peripheren Blut	25
3.5 Messung der Zytokinsekretion von IL-2 und IL-10 in PBMC-Überständen	26
3.6 Messung der Kortisolspiegel in Blutplasma und Speichel.....	26
3.7 Das State-Trait-Angstinventar.....	27
3.8 Generische Beurteilung von Symptomen und Nebenwirkungen	28

3.9	Statistische Analyse.....	29
4	Ergebnisse	30
4.1	Merkmale der Studienkohorte	30
4.2	Everolimusspiegel im Blut während der Studientage	31
4.3	Effekt von Everolimus auf die Zytokinsekretion von mitogenstimulierten PBMCs	32
4.3.1	Effekt von Everolimus auf die Interleukin-2-Sekretion.....	32
4.3.2	Effekt von Everolimus auf die Interleukin-10-Sekretion.....	33
4.4	Subjektiv wahrgenommene Symptome und deren Attribuierung auf die Kurzeiteinnahme von Everolimus.....	34
4.5	Effekt von Everolimus auf die Kortisolspiegel in Blutplasma und Speichel	35
4.6	Effekt von Everolimus auf die Zustandsangst.....	36
4.6.1	Korrelation zwischen Zustandsangst und Kortisolspiegeln	37
5	Diskussion	38
6	Zusammenfassung (deutsch).....	51
7	Zusammenfassung (englisch).....	52
8	Literaturverzeichnis.....	53
9	Tabellenverzeichnis.....	66
10	Abbildungsverzeichnis	67

11 Abkürzungsverzeichnis	68
12 Danksagung	70
13 Lebenslauf	71

1 Einleitung

1.1 Everolimus

Das Medikament Everolimus ist ein Derivat des Immunsuppressivums Rapamycin. Das makrozyklische Lacton Rapamycin wurde erstmalig in den 1970er Jahren aus dem Bakterium *Streptomyces hygroscopicus* isoliert. Der Fundort, die Osterinsel Rapa Nui, wurde namensgebend für das Medikament (Vézina et al., 1975). Im Laufe der Jahre fand man heraus, dass Rapamycin neben seiner anfänglich beobachteten antimykotischen Wirkung noch weitere pharmakologische Eigenschaften besitzt, insbesondere immunsuppressive und antiproliferative Wirkungen (Martel et al., 1977). Bereits Eng et al. (1984) berichteten über die hemmende Wirkung auf das Wachstum von Tumoren im Tiermodell, wobei gleichzeitig weniger Nebenwirkungen unter der Behandlung mit Rapamycin auftraten als bei bisherigen Krebsmedikamenten. Weitere Tierstudien belegten, dass Rapamycin in der Transplantationsmedizin ein effektives Mittel zur Verhinderung von Organabstoßungen darstellt und Guba et al. (2002) zeigten, dass der antiangiogene und antiproliferative Effekt der mechanistic target of rapamycin (mTOR)-Inhibition zu einem gewissen Schutz vor erneutem Krebsauftreten bei Hochrisikotransplantierten zu führen scheint. Rapamycin erwies sich auch bei Erkrankungen wie der rheumatoiden Arthritis als vorteilhaft, da es die Fibroblastenaktivität senkt und damit die synoviale Hyperplasie hemmt (Migita et al., 1996). Genetische Erkrankungen wie die tuberöse Sklerose, bei der Mutationen in den Tumorsuppressorgenen tuberous sclerosis complex (TSC) 1 und TSC2 durch eine Überaktivität des mTOR-Signalwegs zu multiplen Tumorwucherungen aufgrund von unkontrolliertem Zellwachstum führen, rückten ebenfalls in den Fokus der Forschung, da Rapamycin als mTOR-Inhibitor eine zielgerichtete und effektive Therapie versprach (Kwiatkowski, 2003).

Everolimus unterscheidet sich von Rapamycin durch eine zusätzliche 2-Hydroxyethyl-Kette an Position 40 in der Molekülstruktur. Diese strukturelle Abwandlung verschafft Everolimus eine größere Stabilität, höhere Löslichkeit und damit günstigere

Pharmakokinetik im Sinne einer verbesserten oralen Bioverfügbarkeit, bei gleichzeitig kürzerer Halbwertszeit (Schuler et al., 1997; Kirchner et al., 2004).

Nachdem Everolimus 2003 als oral applizierter mTOR-Inhibitor in der europäischen Union für die Behandlung fortgeschrittener Nierenzellkarzinome offiziell zugelassen wurde und bis heute weiterhin dafür angewendet wird, sind im Laufe der Jahre viele weitere Behandlungsfelder hinzugekommen. Everolimus wird sowohl als Monotherapeutikum, als auch in Kombination mit anderen Medikamenten für die Behandlung von soliden Tumoren, wie beispielsweise neuroendokriner Tumore (Chan et al., 2017; Novartis Pharma GmbH, 2024a) und dem Hormonrezeptor-positiven, humanen epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor 2 (HER2/neu)-negativen, fortgeschrittenen Mammakarzinom angewandt (Moreau-Bachelard et al., 2023; Novartis Pharma GmbH, 2024a). In großen randomisierten klinischen Studien zur Prävention von Organabstoßungen hat sich Everolimus über die Jahre weiterhin als hoch wirksam erwiesen, so dass es heute klinische Anwendung bei Nieren-, Herz- und Lebertransplantationen findet (Novartis Pharma GmbH, 2024b).

1.1.1 Wirkmechanismus und Anwendungsbereiche

Everolimus entfaltet seine Wirkung durch die Hemmung des mTOR-Proteins, einer Serin/Threonin-Kinase, die zur Familie der Phosphoinositid-3-Kinasen (PI3K)-ähnlichen Kinasen (PIKK), gehört. mTOR spielt als zentraler Knotenpunkt eine entscheidende Rolle in der Regulierung zahlreicher zellulärer Prozesse, darunter Zellwachstum, -proliferation, -überleben und Apoptose. Die vor- und nachgeschalteten Signalwege sind komplex und spielen eine essenzielle Rolle in verschiedenen Schlüsselmechanismen der Zellbiologie, darunter die Überwachung von Kontrollpunkten im Zellzyklus sowie die Erkennung und Reparatur von DNA-Schäden (Schmelzle und Hall, 2000; Caron et al., 2015).

Das mTOR-Protein existiert in zwei funktionell unterschiedlichen Komplexen, mTOR complex (mTORC) 1 und mTORC2, wobei Everolimus vorwiegend mTORC1 hemmt. Die Aktivität von mTORC1 ist eng mit dem vorgeschalteten PI3K/Protein Kinase B (Akt)-Signalweg verknüpft. PI3Ks bilden eine Klasse von Lipidkinasen, die durch Wachstumsfaktoren, Insulin und andere Signale aktiviert wird. PI3Ks katalysieren die Umwandlung von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) in Phosphatidylinositol-

3,4,5-trisphosphat (PIP₃), wodurch die Aktivierung von Proteinen wie der Serin/Threonin-Kinase Akt ermöglicht wird. Akt wiederum phosphoryliert und aktiviert mTORC1 (Yu et al., 2014). Um mTORC1 mit hoher Affinität binden und inaktivieren zu können, bildet Everolimus zunächst mit dem intrazellulären 12-kDa-FK506-bindenden Protein (FKBP12) einen Komplex. Durch die Hemmung von mTORC1 unterbricht Everolimus die durch PI3K/Akt/mTOR induzierte weitere Signalübertragung und greift so in die zentrale Regulierung von Wachstum, Proliferation, Überleben und Stoffwechsel der Zellen ein (Bjornsti und Houghton, 2004). Von großer Relevanz für die zentrale Regulierung der Zellfunktionen ist die Steuerung der Proteinsynthese. mTORC1 reguliert die Proteinsynthese, indem es den Repressor der mRNA-Translation, das eukaryotische Initiationsfaktor-4E-bindende Protein 1 (4E-BP1), durch Phosphorylierung deaktiviert und gleichzeitig die p70-S6-Kinase phosphoryliert und aktiviert. Diese Kinase modifiziert wiederum das ribosomale Protein S6 und stimuliert die Translation spezifischer mRNAs. Die Hemmung von mTORC1 durch Everolimus führt zu einer signifikanten Modulation der Proteinsynthese und einem Zellzyklus-Stopp in der G1-Phase (Säemann et al., 2009).

Everolimus wird in der Transplantationsmedizin als effektives Immunsuppressivum eingesetzt, um Organabstoßungen zu verhindern. Seine Wirkung beruht auf der gezielten Regulierung der angeborenen und adaptiven Immunreaktion. Dabei hemmt es die Proliferation und Differenzierung von T- und B-Zellen und moduliert die Freisetzung entzündlicher Zytokine sowie die Produktion von Antikörpern (Säemann et al., 2009). Neben seiner immunsuppressiven Wirkung nimmt Everolimus auch Einfluss auf Krebszellen, da mTOR-Signalwege in Tumorzellen nach aktuellen Erkenntnissen häufig dysreguliert und hyperaktiv sind, was unkontrolliertes Zellwachstum fördert und mTOR zu einem attraktiven therapeutischen Zielmolekül in der Krebstherapie macht (Popova und Jücker, 2021). Durch die Hemmung von mTORC1 blockiert Everolimus anabole Prozesse, wie die Proteinsynthese und die Aufnahme von Nährstoffen, die für das Wachstum und Überleben von Krebszellen notwendig sind. Dies führt zu einer Verlangsamung der Zellproliferation und kann unter bestimmten Umständen Apoptose induzieren. Darüber hinaus kann Everolimus die Tumorumgebung beeinflussen, indem es die Produktion von Wachstumsfaktoren und Zytokinen reduziert, die für die

Tumorangiogenese und das Überleben der Krebszellen förderlich sind (Zou et al., 2020). Diese Mechanismen machen Everolimus zu einem wichtigen und interessanten Therapeutikum in der Onkologie, wobei die komplexen Mechanismen des mTOR-Signalweges Bestandteil weiterer Forschungen sind.

Ein spezielles Anwendungsgebiet von Everolimus stellt neben der Transplantationsmedizin und der Onkologie heutzutage auch die tuberöse Sklerose dar. Dabei handelt es sich um eine genetische Erkrankung, die durch Mutationen in den Tumorsuppressorgenen TSC1 und TSC2 verursacht wird und zu gutartigen Wucherungen in verschiedenen Organen, sowie zu neurologischen und kognitiven Beeinträchtigungen führt. Everolimus zeigt durch seine direkte Wirkung auf den durch TSC dysregulierten mTOR-Signalweg großen Therapieerfolg und lindert sowohl kutane und viszerale als auch neuropsychologische Symptome (Curatolo und Moavero, 2012; Bissler et al., 2013).

1.1.2 Pharmakokinetik

Die Kenntnis der Pharmakokinetik eines Medikaments ist entscheidend für die Überprüfung von Wirksamkeit und Sicherheit einer medikamentösen Therapie. Aufgrund der intra- und interindividuellen pharmakokinetischen Variabilität sowie potenzieller Arzneimittelinteraktionen ist im klinischen Setting eine individuelle Therapieüberwachung erforderlich.

Everolimus ist gegenüber Rapamycin durch die 2-Hydroxyethylgruppe an Position 40 polarer und hydrophiler, was zu einer höheren oralen Bioverfügbarkeit und kürzeren Halbwertszeit führt (Schuler et al., 1997). Durch rasche Absorption werden die maximalen Wirkstoffkonzentrationen nach 1-2 Stunden erreicht (Kovarik et al., 2002a). In einer Studie mit gesunden männlichen Probanden konnte gezeigt werden, dass fettreiche Mahlzeiten die maximale Wirkstoffkonzentration von Everolimus um 60 % verringern und zu einer Verzögerung der maximalen Konzentration um rund 1,25 Stunden führen (Kovarik et al., 2002a). Die Konzentrations-Zeit-Kurve (area under the curve, AUC) spiegelt die Everolimus-Exposition des Körpers wider und kann als Maß für die Beurteilung von Wirksamkeit und Sicherheit dienen. Die AUC wird durch fettreiche Mahlzeiten bei gesunden Probanden um 16 % und bei nierentransplantierten Patienten und Patientinnen, unter paralleler Einnahme von Cyclosporin, um 21 %

verringert. Dies spricht zwar insgesamt für eine geringfügige Beeinflussung der AUC, trotzdem wird im klinischen Alltag die Einnahme von Everolimus tendenziell konsequent immer mit oder immer ohne Nahrung empfohlen, um Schwankungen der Medikamentenkonzentration und Wirkung zu minimieren (Kovarik et al., 2002a). Auch Komedikation kann durch Interaktionen zwischen den Medikamenten zu einer veränderten Pharmakokinetik führen. Beispielweise beeinflusst die häufig bei transplantierten Patienten und Patientinnen angewandte kombinierte Therapie mit Cyclosporin das pharmakokinetische Profil von Everolimus im Sinne eines Anstieges der Everolimus-Exposition im Körper (Sánchez-Fructuoso, 2008). Die Metabolisierung von Everolimus erfolgt in Leber und Darm über das Cytochrom-P450 (CYP)-Enzymsystem. Daher hat auch die Einnahme von Medikamenten, wie beispielsweise Rifampicin, welches eine Induktion von CYP3A4 und somit beschleunigten Abbau von Everolimus bewirkt, einen signifikanten Einfluss auf die Wirkstoffkonzentration von Everolimus (Kovarik et al., 2002b). Die Halbwertszeit von Everolimus beträgt circa 28 Stunden. Die Einnahme von Certican® (Novartis Pharma GmbH), einem gängigen Everolimus-Medikament, erfolgt bei Transplantierten zur Prävention von Abstoßungsreaktionen zweimal täglich. Für solide Tumorerkrankungen gibt es Rezepturen, die eine einmal tägliche Einnahme ermöglichen, wie etwa Afinitor® (Novartis Pharma GmbH), das unter anderem bei der Behandlung von Brustkrebs Anwendung findet.

In Studien mit Patienten und Patientinnen konnte unter kombinierter Medikamenteneinnahme gezeigt werden, dass Dosierungen von bis zu 5 mg Everolimus pro Tag ein akzeptables Sicherheitsprofil aufweisen und gut vertragen werden und es erst ab Dosierungen von 10 mg pro Tag zu relevanten Nebenwirkungen kommt (Budde et al., 2004).

Für das therapeutische Arzneimittelmonitoring (therapeutic drug monitoring, TDM), welches einen etablierten Ansatz zur Überwachung und Steuerung von immunsuppressiven Arzneimitteltherapien darstellt, bietet die Bestimmung von Everolimus-Talspiegeln im Blut einen einfach zu erhebenden und zuverlässigen Messparameter. Es besteht eine starke Korrelation zwischen dem gemessenen Talspiegel und der AUC im Steady State, die die Gesamtexposition des Körpers gegenüber dem Medikament widerspiegelt (Novartis Pharma GmbH, 2024a, 2024b).

Auf dieser Grundlage kann der Talspiegel als Indikator für die Therapieüberwachung genutzt werden. In Humanstudien mit Patienten und Patientinnen zeigten sich bei Talspiegeln zwischen 3 und 8 µg/l nachweislich geringere Abstoßungs- und Transplantatverlusten als bei Talspiegeln < 3 µg/l (Salvadori, 2011). Als therapeutische Wirkspiegel haben sich daher Talspiegel-Konzentrationen von 3-8 µg/l bei kombinierter Einnahme mit anderen immunsuppressiven Medikamenten wie Calcineurin-Inhibitoren oder Kortison etabliert. Bei Calcineurin-Inhibitor-freien Therapieregimen können die Talspiegel von Everolimus auch etwas höher liegen (Shipkova et al., 2016).

1.1.3 Nebenwirkungen

In klinischen Studien und bei der Medikamentenüberwachung dient die common terminology criteria for adverse events (CTCAE)-Klassifikation dazu, Nebenwirkungen der Schwere nach zu beurteilen und fünf Grad zuordnen zu können. Die Mehrzahl der durch Everolimus-Therapie verursachten Nebenwirkungen sind in ihrer Ausprägung dem ersten oder zweiten Grad der CTCAE-Klassifikation zuzuordnen und damit leichter zu behandeln und besser zu beherrschen als auftretende Nebenwirkungen unter klassischer Chemotherapie (Arena et al., 2021). Trotz alledem können sie zu einer Lebensqualitätseinschränkung der Patienten und Patientinnen führen und therapielimitierend sein.

Zu den häufigsten Nebenwirkungen unter Everolimus-Therapie gehören Stomatitis, Leukopenie, Thrombozytopenie, Anämie und Müdigkeit (Novartis Pharma GmbH, 2024b). Die mTOR-Inhibition beeinflusst außerdem den Insulin- und Lipidstoffwechsel, was zu Insulinresistenz, Hyperglykämien und Hypercholesterinämien bei langfristiger Einnahme führen kann (Saran et al., 2015). Asthenie, Durchfall, Emesis, Pruritus, Hautausschlag, Wundheilungsstörungen und Lymphödeme sind weitere mögliche Nebenwirkungen. Die nicht-infektiöse Pneumonitis gilt als eine seltene, aber bei Auftreten potenziell lebensbedrohliche Nebenwirkung (Nguyen et al., 2019). Das bei Everolimus beobachtete Nebenwirkungsspektrum deutet darauf hin, dass Everolimus spezifische Toxizitätsmechanismen in gesunden Zellen aktiviert. Die dadurch ausgelösten Nebenwirkungen unterscheiden sich zum Teil von der Toxizität, die typischerweise bei traditionellen Chemotherapien auftritt. Diese Differenzierung zeigt

sich insbesondere in den Haut-, Gefäß- und gastrointestinalen Nebenwirkungen, die durch Rezeptor-Kreuzaktivitäten ausgelöst werden (Arena et al., 2021).

Ein großer Vorteil von Everolimus ist, dass es im Vergleich zu anderen Immunsuppressiva, wie beispielsweise Calcineurin-Inhibitoren, weitaus weniger nephrotoxische Nebenwirkung besitzt. In der Therapie bei transplantierten Patienten und Patientinnen ermöglicht die frühzeitige Hinzunahme von Everolimus eine Reduzierung oder das Absetzen von Calcineurin-Inhibitoren, wodurch die Nierenfunktion klinisch stabilisiert und langfristig verbessert werden kann (Tedesco-Silva et al., 2022).

Die Auswirkungen eingenommener Medikamente auf die Psyche und neurologische Symptome sind für die Lebensqualität transplantierte und krebstherapierter Patienten und Patientinnen selbst und auch für deren behandelnde Ärzte und Ärztinnen von großer Relevanz. Kongruent zu oben beschriebenem Effekt auf die Nierenfunktion gibt es Studien bei Herztransplantierten, die gezeigt haben, dass das Ersetzen von Calcineurin-Inhibitoren durch Everolimus zu einer signifikant verbesserten Konzentrations- und Gedächtnisleistung, sowie zu einer Verbesserung der allgemeinen psychiatrischen Symptome führt (Lang et al., 2009). Studien dokumentierten außerdem, dass Rapamycin und Everolimus bei tuberöser Sklerose positive Effekte auf synaptische Plastizität, kognitive Fähigkeiten, soziale Interaktion und die Frequenz epileptischer Anfälle haben können (Wiegand et al., 2013; Ishii et al., 2015). Allerdings gibt es auch widersprüchliche Befunde, die beschreiben, dass Everolimus angst- und depressionsähnliche Verhaltensweisen bei Tieren (Russo et al. 2016) und Stimmungsschwankungen bei Brustkrebspatienten und -patientinnen hervorruft (Mir et al. 2018).

Zusammenfassend deuten die Beobachtungen darauf hin, dass die Hemmung von mTOR zu neuropsychologischen und Verhaltensänderungen führen kann. Wie und in welchem Ausmaß Komorbiditäten und Komedikationen Einfluss auf die durch Everolimus verursachten Nebenwirkungen haben, bleibt jedoch unklar, da die Ergebnisse größtenteils aus Tier-, Patienten- und Patientinnen-Studien stammen. Zudem sind die molekularbiologischen Mechanismen, durch die Everolimus zu diesen Nebenwirkungen führt, noch nicht abschließend geklärt.

1.2 Immunologische pharmakodynamische Biomarker

Das Immunsystem schützt den Körper vor fremden Organismen und Substanzen, die potenziell schädlich sein können. Es gliedert sich in ein unspezifisches und ein spezifisches Abwehrsystem, die jeweils aus einer zellulären und einer humoralen Komponente bestehen. T-Zellen sind zentrale Akteure des adaptiven Immunsystems und der spezifischen zellulären Immunität. Sie spielen eine entscheidende Rolle bei der Abwehr von Infektionen und der Erkennung von malignen Zellen. T-Zellen reifen im Thymus heran und zirkulieren vorerst als naive T-Zellen im Blut. Durch den Kontakt zu einem spezifischen Antigen in sekundär lymphatischen Organen werden sie aktiviert (Priming) und entwickeln sich zu reifen und spezialisierten T-Zellen. Das cluster of differentiation (CD)-System dient dazu, Zellen anhand ihrer immunphänotypischen Oberflächenmerkmale nach biochemischen und funktionellen Kriterien zu ordnen. Ein bekanntes Beispiel sind die CD4-positiven T-Zellen, die sich in verschiedene Subtypen unterteilen lassen, wie etwa T-Helferzellen und regulatorische T-Zellen. Trotz ihrer unterschiedlichen Funktionen teilen diese Subtypen die Expression des CD4-Moleküls und spielen eine zentrale Rolle in der Koordination der Immunantwort. Eine weitere Untergruppe, die CD8-positiven T-Zellen, sind primär für die zytotoxische Abwehr zuständig und induzieren Apoptose in infizierten oder abnormalen Zellen. Ein Schlüsselmechanismus der T-Zell-vermittelten Immunantwort ist die Produktion von Zytokinen, die als Botenstoffe zwischen den Zellen fungieren. Besonders Interleukin-2 (IL-2) ist ein solches Schlüsselzytokin, das durch autokrine Stimulation die Differenzierung, Proliferation und Expansion von T-Zellen fördert, aber auch eine zentrale Rolle in der Aktivierung von B-Zellen und natürlichen Killerzellen spielt. Außerdem steigert es die Synthese weiterer proinflammatorischer Zytokine. Insgesamt sind Zytokine unerlässlich für die Steuerung und Feinabstimmung der Immunantwort. Sie fungieren als Bindeglied zwischen den verschiedenen Zelltypen des Immunsystems und sorgen für eine präzise und effektive Bekämpfung von Infektionen, während sie gleichzeitig die Homöostase aufrechterhalten (Kaufmann, 2014; Behrends et al., 2021). Immunsuppressive Medikamente zielen darauf ab eine Überaktivität des Immunsystems zu verhindern. Auch Everolimus hemmt die Proliferation und Aktivierung von T- und B-Zellen und reduziert die Produktion und Freisetzung bestimmter Zytokine, wodurch die Immunantwort unterdrückt wird. Der genaue Mechanismus ist jedoch komplex und

verschiedene Zellreihen sind in unterschiedlichem Maß für die mTOR-Inhibition durch Everolimus empfänglich, wobei nicht nur die Funktion und der Metabolismus, sondern auch die Zelldifferenzierung moduliert wird (Zou et al., 2020).

Bei der Anwendung von immunsuppressiven Medikamenten ist es von großem Interesse neben pharmakokinetischen Messparametern wie dem Talspiegel auch pharmakodynamische Biomarker zu identifizieren. Diese Biomarker sollen eine präzisere Einschätzung der individuellen Immunantwort von Behandelten auf das Medikament ermöglichen und zeigen „what the drug does to the body“ (Böhler et al., 2007, S. 82). Dies ist entscheidend, um eine optimale Balance zwischen ausreichender Immunsuppression beispielsweise zur Vermeidung von Abstoßungsreaktionen und der Minimierung von Nebenwirkungen zu erreichen.

Beim pharmakodynamischen Monitoring unterscheidet man grundsätzlich Testmethoden und Biomarker, die unspezifisch den globalen Effekt einer Therapie auf das Immunsystem erfassen und medikamentenspezifische Marker, die den direkten pharmakologischen Effekt des Medikaments untersuchen. Die Messung der Proliferationsfähigkeit stimulierter T- und B-Zellen beispielsweise gehört zu den unspezifischen pharmakodynamischen Verfahren und stellt bis heute einen zentralen Ansatz zur Bewertung der Immunantwort dar (Shipkova und Wieland, 2012). Auch die Messung von Zytokinspiegeln ist ein wertvolles Instrument und ermöglicht bereits bei einigen Erkrankungen die Bewertung der Immunantwort unter Therapie (Döcke et al., 2009). Beim medikamentenspezifischen pharmakodynamischen Monitoring wird hingegen die Aktivität eines spezifischen durch das Medikament blockierten Zielenzym gemessen. Im Fall von Everolimus wird die p70-S6-Kinase als vielversprechender Ansatz für weiterführende Untersuchungen betrachtet, da sie einer der am besten charakterisierten Effektoren des mTORC1-Signalwegs ist, der vorwiegend und damit spezifisch durch mTOR-Inhibitoren beeinflusst wird. Die Phosphorylierung der p70-S6-Kinase kann als Marker zur Bewertung der Aktivität des mTOR-Signalwegs genutzt werden (Hartmann, 2012). Doch trotz der hohen Spezifität, die Everolimus für sein molekulares Ziel aufweist, erschwert der vielschichtige Einfluss des mTOR-Signalwegs auf die Zellphysiologie die Identifizierung und Validierung von Biomarker-Sets in der klinischen Routine und Praxis (Wieland und Shipkova, 2014).

1.3 Kortisol

Kortisol ist der wichtigste Vertreter der Glucocorticoide, die als Steroidhormone vielfältige lebensnotwendige Wirkungen im Körper erfüllen. Kortisol wird wie alle Steroidhormone aus Cholesterin gebildet und die Synthese erfolgt in der Zona fasciculata der Nebennierenrinde. Die spontane Sekretion folgt einem stabilen zirkadianen Rhythmus. Die Regulation der Kortisolproduktion erfolgt über die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden (hypothalamic-pituitary-adrenal, HPA)-Achse. Der Hypothalamus schüttet das Corticotropin-Releasing-Hormon (CRH) aus, welches die Hypophyse zur Freisetzung von adrenocorticotropem Hormon (ACTH) stimuliert. ACTH regt wiederum die Nebennierenrinde zur Produktion und Sekretion von Kortisol an. Ein erhöhter Kortisolspiegel hemmt die Freisetzung von CRH und ACTH durch negative Rückkopplung, um ein Gleichgewicht zu gewährleisten. Nach der Freisetzung liegt Kortisol im Blut überwiegend gebunden an sein Transportprotein Transcortin vor und wirkt auf zahlreiche Organsysteme im Körper. Auf Stoffwechselebene kommt es durch Steigerung der Gluconeogenese, Lipolyse, des Protein- und Knochenkatabolismus zur Mobilisierung von Energiereserven. Kortisol wirkt außerdem komplex auf das Immunsystem durch eine Kombination aus Genregulation, Zellapoptose und Funktionsmodulation. Eine immunsuppressive Wirkung wird dabei sowohl über die Hemmung der Produktion und Freisetzung proinflammatorischer Zytokine als auch über die Hemmung der T- und B-Zellaktivität entfaltet (Behrends et al., 2021). Die immunsuppressiven Eigenschaften werden durch synthetische Derivate als Medikamente gezielt genutzt, um überschießende Immunreaktionen bei entzündlichen und autoimmunen Erkrankungen effektiv zu dämpfen. Dysregulationen der HPA-Achse und die damit verbundenen Veränderungen des Kortisolspiegels können aufgrund der vielfältigen physiologischen Auswirkungen dieses Hormons zu einer breiten Palette von Symptomen und Erkrankungen führen. Unter anderem scheint Kortisol pathophysiologisch eine Rolle bei depressiven Störungen sowie Angststörungen zu spielen (Fiksdal et al., 2019). Studien zeigten, dass Anomalien der HPA-Achse und führend eine Hyperkortisolämie eine zentrale Rolle bei der Pathogenese depressiver Symptome und kognitiver Defizite spielen (Young, 2004; Qin et al., 2023). Es wird vermutet, dass mTOR-Inhibitoren wie Everolimus die HPA-Achse beeinflussen und dadurch die Kortisolproduktion verändern könnten. Es ist

jedoch unklar und erfordert weitere Forschung, wie genau Everolimus die Regulation von Kortisol beeinflusst und Veränderungen in der Aktivität der HPA-Achse hervorruft, was möglicherweise auch Auswirkungen auf das psychische Empfinden haben könnte.

1.4 Die psychologische Komponente Angst

Wie bereits in Kapitel 1.1.3 zu den möglichen Nebenwirkungen von Everolimus erläutert, steht im Raum, dass die Einnahme von Everolimus neurotoxische Effekte sowie angsthähnliches Verhalten und Stimmungsschwankungen hervorrufen kann. Man unterscheidet zwischen Angst als Zustand (State-Anxiety), einem vorübergehenden emotionalen Befinden, und Angst als Eigenschaft (Trait-Anxiety), einem stabilen Persönlichkeitsmerkmal. In standardisierten Testverfahren, wie dem State-Trait-Anxiety-Inventory (STAI), lassen sich diese beiden Formen der Angst, die in wechselseitiger Beziehung zueinanderstehen, in ihrer Ausprägung anhand von Selbstaussagen ermitteln (Laux et al., 1981). Angst ist eine natürliche Reaktion auf wahrgenommene Gefahren, die sich sowohl in Form von körperlichen Symptomen wie Herzrasen und Schwitzen, als auch als unangenehmes Gefühl von Unwohlsein und Unruhe äußern kann. In gefährlichen Situationen kann Angst als Warnsignal dienen und das Überleben sichern. Wird sie jedoch übermäßig oder unbegründet empfunden, kann sie zu einem erheblichen Störfaktor im Alltag werden und die Lebensqualität der Betroffenen stark beeinträchtigen. Angststörungen gehören zu den häufigsten psychischen Erkrankungen in der Allgemeinbevölkerung und sind mit Komorbiditäten wie Depressionen und somatoformen Störungen verbunden. Die Ursachen von Angststörungen sind multifaktoriell und beinhalten eine Vielzahl genetischer, biologischer und psychosozialer Faktoren, die ihre Entstehung komplex machen (Bandelow et al., 2015). Patienten und Patientinnen mit Krebserkrankungen, Transplantationen oder chronischen Krankheiten sind aufgrund ihrer Krankengeschichte und anhaltenden gesundheitlichen Herausforderungen besonders anfällig für Stress, Depressionen und Angstzustände, was zu einer erheblich eingeschränkten Lebensqualität führen kann. Bösche et al. (2015) fassten die komplexe und bis heute nicht vollständig verstandene Datenlage zur Einflussnahme niedermolekularer immunsuppressiver Arzneimittel, einschließlich mTOR-Inhibitoren, auf die psychische Gesundheit zusammen. Sie hoben hervor, wie entscheidend das Verständnis potenzieller

Nebenwirkungen für die Behandlung der Betroffenen und deren Lebensqualität ist (Bösche et al., 2015).

1.5 Konditionierung von Immunfunktionen

Unter Psychoneuroimmunologie (PNI) versteht man das interdisziplinäre Forschungsfeld, welches die Wechselwirkungen zwischen Verhalten, Nervensystem, endokrinem System und Immunsystem untersucht (Ziemssen und Kern, 2007). Als Pionier dieses Gebiets gilt der amerikanische Psychologe Robert Ader, der den Begriff PNI 1980 erstmalig als Neologismus verwendete (Ader, 2000). Ein zentraler Aspekt dabei ist die bidirektionale Verbindung zwischen Nervensystem und Immunsystem, die über Zytokine, den Nervus vagus und die HPA-Achse miteinander kommunizieren (Hadamitzky et al., 2020). Besonders eindrucksvoll sichtbar wird das Potenzial dieser bidirektionalen Kommunikation in der klassischen Konditionierung von Immunfunktionen. Auf Grundlage der klassischen Konditionierung nach Pavlov (1927) zeigten Ader und Cohen (1975) in tierexperimentellen Studien, dass Immunreaktionen durch Konditionierung im Modell der konditionierten Geschmacksaversion (conditioned taste avoidance, CTA) ausgelöst werden können. Das Prinzip der konditionierten Immunsuppression basiert darauf, in der Akquisitionsphase (Lernphase) einen Geschmacksreiz als konditionierten Stimulus (conditioned stimulus, CS) mit einem Immunsuppressivum als unconditionierten Stimulus (unconditioned stimulus, UCS) zu koppeln. Durch wiederholte Paarung entsteht eine Assoziation zwischen beiden Reizen. Zu einem späteren Zeitpunkt erfolgt in der Evokationsphase (Abrufphase) die alleinige Präsentation des Geschmacksreizes (CS), wodurch eine konditionierte Reaktion (conditioned response, CR) ausgelöst wird, die der ursprünglichen, durch das Immunsuppressivum induzierten unconditionierten Reaktion (unconditioned response, UCR) ähnelt. Die Erforschung der Konditionierung von Immunfunktionen hat seit 1975 sowohl in Tiermodellen als auch in Humanstudien bemerkenswerte Fortschritte gemacht. Dabei konnten Immunantworten auf humoraler und zellulärer Ebene sowohl im Tier als auch im Menschen mit Hilfe von Protokollen zur Geschmacksimmunkonditionierung beeinflusst werden. Die Konditionierung von Immunfunktionen bietet als Ergänzung bei der Behandlung mit immunsuppressiven Medikamenten eine vielversprechende Möglichkeit, Nebenwirkungen von

Medikamenten zu minimieren, die Effizienz der Behandlung zu maximieren und damit die Lebensqualität von Patienten und Patientinnen zu steigern (Schedlowski und Pacheco-López, 2010).

In Tierstudien werden meist immunsuppressive Medikamente, wie zum Beispiel Cyclophosphamid und Calcineurin-Inhibitoren wie Cyclosporin als UCS, mit einer Saccharinlösung als neuartiger CS gepaart. Damit konnten bereits konditionierte immunpharmakologische Effekte und verringerte Krankheitssymptome bei Erkrankungen wie Lupus erythematoses (Ader und Cohen, 1982), Kontaktallergie (Exton et al., 2000) und rheumatoider Arthritis (Klosterhalfen und Klosterhalfen, 1983; Lückemann et al., 2020) erzielt werden.

Auf Grundlage der Ergebnisse tierexperimenteller Studien zur Immunkonditionierung wurde dieses Paradigma auf Studien am Menschen ausgeweitet. Dabei diente beispielsweise ein neuartig schmeckendes, grün gefärbtes Getränk als CS, das während der Akquisitionsphase viermal zusammen mit Cyclosporin (UCS) verabreicht wurde. Nach einer viermaligen Re-Exposition nur mit dem CS in der Evokationsphase ließ sich eine erlernte Immunsuppression in Form von verminderter T-Zell-Aktivität nachweisen (Goebel et al., 2002). Mehrere Studien konnten belegen, dass die Immunfunktion bei gesunden Menschen klassisch konditioniert werden kann (Goebel et al., 2002; Wirth et al., 2011; Albring et al., 2014). Kirchof et al. (2018) konnten in ihrer Studie an nierentransplantierten Patienten und Patientinnen das Potenzial von Immunkonditionierungsprotokollen und geschmacksassoziativem Lernen zur Dosisreduktion in bestehenden medikamentösen Regimen mit Cyclosporin unterstreichen, indem sie eine signifikante Reduktion der T-Zell-Proliferation in der Evokationsphase nachwiesen. Die Generalisierbarkeit der Immunkonditionierung mit verschiedenen Medikamenten und unterschiedlichen immunpharmakologischen Wirkmechanismen bleibt jedoch bisher unzureichend geklärt. Jakobs et al. (2024) gelang es in ihrer Studie, die untersuchte inwieweit die immunsuppressiven Effekte von Fingolimod, einem Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptoragonist, konditionierbar sind, nicht, immunsuppressive Effekte durch Konditionierung hervorzurufen. In einer anderen experimentellen Tierstudie konnte jedoch die Konditionierbarkeit der antiproliferativen Effekte des mTOR-Inhibitors Rapamycin nachgewiesen werden. Hetze et al. (2022) zeigten, dass das Wachstum von Glioblastomen bei Ratten durch konditionierte

immunpharmakologische Effekte effektiv verhindert werden kann, indem niedrige Dosen des mTOR-Inhibitors Rapamycin in Kombination mit Saccharin verabreicht werden. Die Frage, ob und inwieweit sich die Effekte von mTOR-Inhibitoren auch beim Menschen konditionieren lassen, ist ein zentraler Bestandteil der geplanten Forschungsaktivitäten unserer Arbeitsgruppe. Zukünftig besteht die Herausforderung darin, Konditionierungsschemata für eine Vielzahl von immunpharmakologischen Medikamenten und Wirkmechanismen zu prüfen und zu optimieren, um sie in Zukunft als ergänzende Behandlungsoptionen im klinischen Alltag einsetzen zu können.

2 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

Everolimus hat als oral zugelassener mTOR-Inhibitor einen großen Stellenwert auf dem pharmakologischen Markt. Es wird zur Verhinderung von Transplantatabstoßungen eingesetzt und trägt in Kombinationstherapien durch die Reduktion oder den Verzicht von nephrotoxischen Medikamenten wesentlich zu einer Aufrechterhaltung der Nierenfunktion bei (Tedesco-Silva et al., 2022; Novartis Pharma GmbH, 2024b). Als modernes Krebstherapeutikum zeigt Everolimus in der Behandlung des Nierenzellkarzinoms und des Hormonrezeptor-positiven, HER2/neu-negativen Mammakarzinoms eine signifikante Verlängerung des progressionsfreien Überlebens (Novartis Pharma GmbH, 2024a). Darüber hinaus ist es bei Erkrankungen, die auf einem dysregulierten mTOR-Signalweg basieren, wie der tuberösen Sklerose, durch seine gezielte Hemmung des Signalwegs von großer therapeutischer Bedeutung (Curatolo und Moavero, 2012). Trotz der Verbesserung von Therapieergebnissen nach Transplantationen und seiner effektiven Wirksamkeit auf die Progression von Tumorerkrankungen, gibt es therapielimitierende Nebenwirkungen bei der Nutzung von Everolimus, die eine sorgfältige Überwachung und Nutzen-Risiko-Abwägung erfordern (Arena et al., 2021).

Es gibt neben tierexperimentellen Studien mit Rapamycin und klinischen Studien mit transplantierten oder onkologischen Patienten und Patientinnen unter Everolimus-Therapie kaum Studien über die pharmakokinetischen und vor allem pharmakodynamischen Eigenschaften und Auswirkungen von Everolimus bei gesunden Personen. In humanen Studien mit Patienten und Patientinnen stellt die zugrundeliegende Erkrankung der Untersuchten selbst, als auch Komorbiditäten und die eingenommene Komedikation einen bedeutsamen Einflussfaktor dar. So ist in klinischen Studien meist unklar ob und inwieweit dokumentierte pharmakologische Wirkungen, aber auch beobachtete Nebenwirkungen auf die Einnahme von Everolimus zurückzuführen sind oder durch eine Kombination mehrerer Faktoren entstehen. Es fehlen insbesondere Daten darüber, ob therapeutische Dosen auch bei gesunden Personen zu Beeinträchtigungen zentraler Funktionen auf Verhaltens-, neuroendokriner

und psychologischer Ebene führen und ob neuropsychologische Nebenwirkungen wie Angstzustände auftreten.

Da eine Langzeitgabe des Immunsuppressivums Everolimus bei gesunden Probanden aus ethischen Gründen nicht möglich ist, wurde im Rahmen dieser Arbeit der Effekt der kurzfristigen Einnahme von Everolimus auf psychoneuroimmunologische Parameter bei gesunden Personen untersucht.

Der Anspruch der explorativen Studie war es zu überprüfen, ob durch die kurzzeitige, viermalige orale Verabreichung von drei verschiedenen Dosierungen (1,5 mg, 2,25 mg und 3 mg) bereits klinisch relevante und therapeutische Blutspiegel, wie sie auch bei Patienten und Patientinnen angestrebt werden, erzielt werden können. Zudem sollte die effektive Dosis ermittelt werden, die valide *ex vivo* messbare Effekte als Biomarker auf immunologischer Ebene (Zytokinsekretion) liefert. Weiterhin wurde der dosisabhängige Einfluss von Everolimus auf neuroendokrine Parameter, wie Kortisol, und psychologische Verhaltensreaktionen, mit Augenmerk auf die Zustandsangst, bei gesunden Probanden untersucht.

Diese Pilotstudie wurde im Rahmen der geplanten weiterführenden Forschungsaktivitäten zur Konditionierung von Immunfunktionen beim Menschen mit Everolimus durchgeführt. Neben den oben genannten Zielen lag der Fokus darauf, geeignete immunologische Biomarker und Protokolle zu etablieren, die den Effekt von Everolimus zuverlässig abbilden und deren Kinetik den zeitlichen Anforderungen des späteren Konditionierungsdesigns entspricht.

3 Material und Methoden

Im Folgenden werden die Rekrutierung der Studienteilnehmer und das Studiendesign detailliert beschrieben. Darüber hinaus werden die angewandten Untersuchungsmethoden zur Erhebung der immunologischen und neuroendokrinen Parameter sowie die verwendeten psychologischen Fragebögen erläutert. Abschließend erfolgt die Beschreibung der statistischen Analyse, mit der die erhobenen Variablen ausgewertet wurden.

3.1 Studienteilnehmer

Für die Studie potenziell infrage kommende Teilnehmer wurden über lokale Aushänge an der Universität Duisburg-Essen und über Anzeigen in Onlineportalen rekrutiert. An der Studie nahmen schlussendlich $n = 19$ gesunde männliche Probanden mit einem Medianalter von 29 Jahren (Altersspanne 22-32 Jahre) teil. Die Studie wurde von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität Duisburg-Essen genehmigt (EK-Nummer: 17-7500-BO) und unter Einhaltung der Grundsätze der Deklaration von Helsinki durchgeführt. Die Probanden wurden zu Beginn in einem persönlichen Gespräch über den Ablauf, Ziele und Risiken der Studie aufgeklärt und anhand von Fragebögen wurde der soziodemografische Hintergrund der Probanden beurteilt. Auf Grundlage von Fragebögen und Erfassung der persönlichen medizinischen Geschichte wurde eruiert, ob die physische und psychische Gesundheit der Probanden prinzipiell eine Teilnahme an der Studie erlaubt. Zusätzlich unterzogen sich die Probanden einer Untersuchung durch Ärzte und Ärztinnen der Klinik für Nephrologie des Universitätsklinikums Essen unter Leitung von Herrn Prof. Dr. O. Witzke. Durchgeführt wurde dabei ein Elektrokardiogramm zur Beurteilung der Herzfunktion sowie eine Urinanalyse und Blutentnahme zur Beurteilung des großen Blutbildes, der Nieren-, Leber- und Schilddrüsenfunktion und verschiedener Parameter des Fettstoffwechsels. Ausschlusskriterien der Studie waren das Vorliegen immunologischer, endokriner, kardiovaskulärer, hämatologischer sowie psychiatrischer Erkrankungen. Des Weiteren ein erhöhter Body-Mass-Index (BMI) > 30 , Allergien gegen während der Studie verwendete Substanzen (Laktoseintoleranz), Leber- und

Nierenerkrankungen, obstruktive Atemwegserkrankungen, Suchterkrankungen oder Diabetes mellitus. Außerdem führten eine Blutspende von > 200 Millilitern in den vorangegangenen zwei Monaten, sowie eine Studienteilnahme an anderen pharmakologischen Studien in den letzten sechs Monaten zum Ausschluss. Bei unbedenklicher Vorgeschichte, unauffälliger Voruntersuchung und durchgeführtem Aufklärungsgespräch mit schriftlicher Einwilligung der Probanden erfolgte der schlussendliche Einschluss in die Studie. Die Teilnahme wurde mit einer Aufwandsentschädigung in Höhe von 200 € entlohnt.

Die Zuordnung der Probanden zu den drei verwendeten Everolimus-Dosisgruppen erfolgte randomisiert und wurde aus ethischen Gründen offen kommuniziert. Demnach wurde keine Verblindung in Bezug auf die Gruppenzuordnung angewendet.

Um nach Beendigung der Studie potenzielle gesundheitliche Beeinträchtigungen, verursacht durch die Studienteilnahme, ausschließen zu können, fand eine ärztliche Nachuntersuchung der Probanden statt.

3.2 Studiendesign

Das Studienprotokoll erstreckte sich über einen Zeitraum von insgesamt 15 Tagen. Entsprechend ihrer zugeteilten Gruppe erhielten die Studienteilnehmer während dieses Zeitraumes eine festgelegte Dosis Everolimus pro Einnahme: 1,5 mg in der Niedrigdosisgruppe, 2,25 mg in der Mitteldosisgruppe oder 3 mg in der Hochdosisgruppe. Insgesamt wurden den Probanden an drei aufeinanderfolgenden Studientagen vier oral applizierte Dosierungen im Abstand von 12 Stunden verabreicht. Die Probengewinnung (Blut- und Speichelproben) erfolgte an Tag 1 (T1) um 9 Uhr morgens vor der ersten Medikamenteneinnahme zur Bestimmung der Ausgangsparameter. Nach viermaliger Einnahme von Everolimus erfolgten an Tag 3 (T3), Tag 8 (T8) und Tag 15 (T15) jeweils um 9 Uhr die weiteren Probenentnahmen zur Durchführung der unten aufgeführten Analysen bezüglich der Auswirkung von Everolimus auf die Zytokin- und neuroendokrine Hormonproduktion. Ebenso erhielten die Probanden an diesen Tagen den STAI-State-Fragebogen zur Selbsteinschätzung und Beurteilung der Zustandsangst und den GASE-Fragebogen zur Erfassung möglicher Symptome und Nebenwirkungen (siehe Abbildung 1).

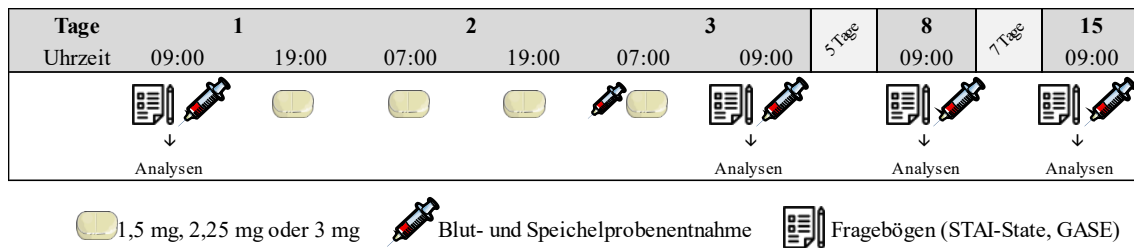


Abbildung 1: Studiendesign

Drei verschiedene Everolimus-Dosierungen (1,5, 2,25 oder 3 mg) wurden viermal in einem 12-Stunden-Zyklus oral verabreicht. Blut-/Speichelproben wurden vor (T1) und nach (T3, T8, T15) der Verabreichung von Everolimus entnommen und Analysen unterzogen. Die Fragebögen zur Zustandsangst (STAI-State) und den empfundenen Symptomen/Nebenwirkungen (GASE) wurden zu den gleichen Zeitpunkten erhoben. STAI, State-Trait-Anxiety-Inventory; GASE, Generic Assessment of Side Effects.

3.3 Everolimusspiegel im Blut

Die Blutentnahmen zur Quantifizierung der Everolimusspiegel erfolgten analog zu oben genanntem Studiendesign zu folgenden Zeitpunkten: An T1 um 9 Uhr zur Bestimmung des Basisniveaus; an T3 um 6:30 Uhr zur Bestimmung des Talspiegels ($T3_{\text{Tal}}$) und um 9 Uhr, zwei Stunden nach der letzten Einnahme des Medikaments, zur Bestimmung der Maximalkonzentration ($T3_{\text{Peak}}$); an T8 um 9 Uhr zur Verifizierung, ob das Medikament im Blutkreislauf bereits vollständig verstoffwechselt wurde.

Die Spiegelbestimmung erfolgte in Ethylendiamintetraacetat (EDTA)-antikoaguliertem Vollblut nach verdunkeltem Transport auf Eis in das Medizinische Versorgungszentrum Dr. Eberhard & Partner in Dortmund. Zur Analyse wurde die validierte Flüssigchromatographie-Tandem-Massenspektrometrie genutzt, die eine bewährte Methode im TDM zur Bestimmung der Everolimuskonzentrationen darstellt (Shipkova et al., 2016). Die untere Bestimmungsgrenze für Everolimus betrug dabei 1 µg/l.

3.4 Isolierung mononukleärer Zellen aus dem peripheren Blut

Für die weiterführenden Analysen der immunologischen Parameter wurden mononukleäre Zellen aus dem peripheren Blut (peripheral blood mononuclear cells, PMBCs) der Probanden mittels Ficoll-Dichtegradienten isoliert. Dafür wurde das Probandenblut in Lithiumheparin Monovetten abgenommen. Das frisch gesammelte heparinisierte Blut wurde 1:1 mit steriler phosphatgepufferter Salzlösung (phosphate-buffered saline, PBS) verdünnt und auf Ficoll (Ficoll-Paque Plus®; GE Healthcare,

München, Deutschland) geschichtet. Anschließend wurden die Hauptblutzelltypen mit einer relativen Zentrifugalbeschleunigung (relative centrifugal force, RCF) von 450 g über 30 Minuten bei einer Temperatur von 20 °C getrennt. Durch Abnahme des Interphasenringes erhält man eine hochkonzentrierte PBMC-Suspension. Die aus der entstandenen Interphase gesammelte PBMC-Fraktion wurde mit Hanks' Salzlösung (Life Technologies, Darmstadt, Deutschland) gewaschen und mit 450 g und bei 20 °C für 10 Minuten zentrifugiert. Die isolierten PBMCs wurden in einem Wachstumsmedium resuspendiert, und die gewünschte Zellzahl von 5×10^6 Zellen/ml über einen automatischen Zellzähler (Sysmex XP-300[®]) eingestellt. Das Wachstumsmedium enthielt Zellkulturmedium RPMI-1640, ergänzt mit GlutaMAX-1, 25 mmol/l HEPES, 10 % fötalem Rinderserum und 1 µl Gentamicin pro ml Medium (Life Technologies, Darmstadt, Deutschland). Die Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert.

3.5 Messung der Zytokinsekretion von IL-2 und IL-10 in PBMC-Überständen

Die PBMCs (5×10^6 Zellen/ml) wurden in 96-Well-Flachboden-Zellkulturplatten ausgesät und für 24 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ mit 50 ng/ml monoklonalem, löslichen Maus-Anti-Human-CD3 Antikörper stimuliert. Nach der Stimulation erfolgte eine Zentrifugation der Zellen bei 4 °C mit 450 g für 5 Minuten. Die Überstände wurden gesammelt, in neue Röhrchen überführt und bei -80 °C für die Zytokinanalysen gelagert.

Für die Bestimmung der IL-2- und IL-10-Werte in den Kulturüberständen wurde die enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)-Technik (BioLegend, San Diego, Kalifornien, USA) gemäß den Anweisungen des Herstellers angewendet. Die Analyse erfolgte auf einem FLUOstar OPTIMA-Mikroplattenlesegerät[®] (BMG LABTECH GmbH, Ortenberg, Deutschland). Die Nachweisgrenze lag bei 4 pg/ml für IL-2 und 2 pg/ml für IL-10. Die interne Messvariabilität lag bei 4,2 % für IL-2 und 4,6 % für IL-10, während die Inter-Assay-Varianz bei 6,1 % für IL-2 und 6,9 % für IL-10 lag.

3.6 Messung der Kortisolspiegel in Blutplasma und Speichel

Zur Bestimmung des neuroendokrinen Parameters Kortisol wurde das Blut der Probanden in EDTA-Monovetten entnommen. Die Monovetten wurden auf Eis ins

Labor transportiert und unmittelbar nach der Entnahme bei 4 °C und 2000 g für 10 Minuten zentrifugiert. Die Plasmaüberstände wurden zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

Zur Gewinnung der Speichelproben erhielten die Probanden zu den jeweiligen Messzeitpunkten eine sterile Salivette, die für eine Dauer von 60 Sekunden in die Mundhöhle eingeführt und durch Kauen vollständig eingespeichelt wurde. Die eingespeichelten Salivetten wurden bei 20 °C und 1000 g für 2 Minuten zentrifugiert, um den Speichel aus der Watte zu extrahieren. Der gewonnene Speichel wurde in Röhrchen für die weiteren Analysen überführt und analog zu den Plasmaüberständen bei -80 °C eingefroren.

Die anschließende Bestimmung der Kortisolkonzentrationen in den Plasmaüberständen und im gewonnenen Speichel erfolgte mittels ELISA-Technik (Cortisol ELISA IBL International, Hamburg, Deutschland) gemäß dem Handbuch des Herstellers. Die Nachweisgrenze betrug 0,005 µg/dl beziehungsweise 0,015 µg/dl. Die Intra-Assay-Varianz betrug 5,6 % im Plasma und 4,8 % im Speichel. Die Inter-Assay-Varianz betrug 6,9 % im Plasma und 5,9 % im Speichel.

3.7 Das State-Trait-Angstinventar

Während der Studie wurde das State-Trait-Angstinventar (STAI) genutzt, um mögliche Veränderungen in Bezug auf die Zustandsangst, beeinflusst durch die Einnahme von Everolimus, im Laufe der Studie zu detektieren. Das State-Trait-Angstinventar stellt dabei ein etabliertes Instrument zur Bewertung von Angst sowohl als Eigenschaft (Trait-Anxiety) als auch als Zustand (State-Anxiety) dar (Laux et al., 1981). Es gehört zu den am häufigsten verwendeten Methoden zur Erfassung von Angst und zeichnet sich durch seine hohe Zuverlässigkeit und Sensitivität aus und wird dabei vor allem im Forschungskontext eingesetzt (Marteau und Bekker, 1992).

Die Trait- als auch State-Angstskalen bestehen jeweils aus 20 Aussagen, anhand derer der Proband auf einer vierstufigen Likertskala angibt, inwieweit die Aussagen auf ihn zutreffen. Die Trait-Skala dient dabei der Ermittlung von Angst als Eigenschaft und spiegelt damit die allgemeine Tendenz, Situationen als bedrohlich zu empfinden und mit Angst zu reagieren, wider. Die Eigenschaftsaussagen werden je nach Zutreffen durch den Probanden auf einer Skala von (1) *fast nie* bis (4) *fast immer* bewertet; wobei

13 Fragenitems Ängstlichkeit und 7 Items Angstfreiheit widerspiegeln. Bei der State-Skala geht es um die situative Gefühlslage des Probanden und Angst als aktuelle Zustandsform. Einschätzungen zu Gefühlen wie beispielsweise Aufregung, Anspannung und Vergnügen werden von *(1) überhaupt nicht* bis *(4) sehr* bewertet.

Die Skalen werden getrennt voneinander ausgewertet und es ergibt sich pro Skala ein Ergebnis zwischen 20 und 80 Rohwertpunkten (Laux et al., 1981).

Die Probanden erhielten bei Einschluss in die Studie den Fragebogen zur generellen Angst als Eigenschaft (STAI-Trait) und an T1 vor Everolimus Einnahme und an T3, T8 und T15 nach Everolimus Einnahme den Fragebogen zur Erhebung der Zustandsangst (STAI-State).

3.8 Generische Beurteilung von Symptomen und Nebenwirkungen

Der generische Fragebogen zur Bewertung von Symptomen und potenziellen Nebenwirkungen (Generic Assessment of Side Effects, GASE) ist ein validiertes Selbstberichts-Screening-Instrument und ermöglicht die subjektive Bewertung von Symptomen und unerwünschten Ereignissen in klinischen Studien (Rief et al., 2024). Der Fragebogen umfasst dabei eine Reihe von Symptomen, die sowohl auf physische als auch psychologische Beschwerden abzielen, und erlaubt eine systematische Bewertung der Beschwerden durch die Teilnehmenden. Enthalten sind dabei für männliche Probanden 35 Items zu verschiedensten potenziell möglichen Beschwerden, die in ihrer Intensität vierstufig skaliert bewertet werden können (*0-1-2-3*). Addiert man die angegebene Anzahl der Symptome in der entsprechend angegebenen Ausprägungsstärke (*0-3*), erhält man den Gesamtscore der Symptomintensität. Der Wert kann dabei in der Theorie zwischen 0 und 105 liegen. Außerdem kann der Proband bei jedem ausgewählten Item angeben, ob er das entsprechende Symptom als medikamenten-/studienassoziiert einschätzt. Aus dieser Analyse ergibt sich der medikamenten-attribuierte symptomatische Gesamtscore. Den GASE-Fragebogen erhielten die Probanden zu denselben Zeitpunkten in der Studie, wie den Fragebogen zur Zustandsangst (STAI-State).

3.9 Statistische Analyse

Zur Analyse der Daten wurde die Software SPSS Statistics® (Version 29; IBM Corp., Armonk, New York) verwendet. Da nicht alle Variablen einer Normalverteilung entsprachen und die Probandenzahl pro Dosisgruppe begrenzt war, wurde die Datenanalyse mithilfe nichtparametrischer Verfahren durchgeführt.

Die soziodemografischen Merkmale (Alter, BMI, Schulbildung), die psychologischen Eigenschaften (STAI-Trait) sowie die physiologischen Parameter (Blutdruck, Herzfrequenz) der drei Dosisgruppen wurden vor Studienbeginn mithilfe des Mann-Whitney-U-Tests auf mögliche Unterschiede zwischen den Gruppen analysiert.

Die Veränderungen immunologischer (Zytokine), neuroendokriner (Kortisol) und psychologischer Parameter (STAI-State) sowie empfundener Symptome (GASE) unter Einnahme von Everolimus wurden im Verlauf der Studie innerhalb der drei Gruppen über die Studientage hinweg mit dem Wilcoxon-Test analysiert. Unterschiede zwischen den Gruppen zu den jeweiligen Messzeitpunkten wurden mittels Mann-Whitney-U-Test überprüft. Das Signifikanzniveau wurde auf $p < 0,05$ festgelegt. Zusätzlich werden die zugehörigen Z-Werte berichtet. Effektstärken werden als Pearson's r für den Mann-Whitney-U-Test und den Wilcoxon-Test angegeben.

Außerdem wurde eine bivariate Korrelation nach Spearman berechnet, um einen möglichen Zusammenhang zwischen den STAI-State-Werten und den Kortisolspiegeln zu untersuchen. Der Korrelationskoeffizient ist als Spearman's ρ dargestellt.

Sowohl die statistischen Berechnungen als auch die Darstellung der Ergebnisse im Fließtext und in den Tabellen dieser Arbeit erfolgen unter Nutzung und Angabe des Medians mit den entsprechenden Interquartilsbereichen [25. Perzentil; 75. Perzentil]. Lediglich in den Abbildungen wird aus Gründen der Anschaulichkeit der Mittelwert \pm Standardabweichung (SD) dargestellt.

Die Ergebnisse zur IL-2- und IL-10-Sekretion (Kapitel 4.3.1 und 4.3.2) werden nicht als Rohdaten in pg/ml angegeben. Stattdessen wurden die Werte an T1 auf 100 % gesetzt und die Messwerte der Tage 3, 8 und 15 als relative Werte bezogen auf den Ausgangswert berechnet und dargestellt.

4 Ergebnisse

4.1 Merkmale der Studienkohorte

An der Studie nahmen insgesamt 19 männliche Probanden teil. Die Anzahl der Probanden in den Dosisgruppen lag in der Niedrigdosisgruppe bei $n = 6$, in der Mitteldosisgruppe bei $n = 7$ und in der Hochdosisgruppe bei $n = 6$.

Die Kohorten unterschieden sich weder hinsichtlich des Alters noch des BMIs oder der Anzahl an absolvierten Schulbildungsjahren signifikant voneinander. Auch bei den zu Studienbeginn erfassten physiologischen Vitalparametern, Blutdruck und Puls, zeigten sich keine Unterschiede zwischen den Gruppen. Die Auswertung des Trait-Angstinventar Fragebogens zur Bestimmung von Angst als Merkmalseigenschaft ergab ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Somit unterschieden sich die Teilnehmer der Gruppen zu Beginn der Studie nicht signifikant voneinander (alle $Z \leq |-1,324|$, $p \geq 0,185$, $r \leq |-0,367|$) bezogen auf die soziodemografischen, physiologischen und psychologischen Merkmale (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1: Soziodemografische, physiologische und psychologische Merkmale der Dosisgruppen vor Studienbeginn

	Everolimus Dosisgruppen in mg			p-Wert
	1,5 (n = 6)	2,25 (n = 7)	3 (n = 6)	
Alter (Jahren)	28,00 [25,00;31,25]	29,00 [26,00;30,00]	29,50 [27,25;31,25]	n.s.
BMI (kg/m ²)	22,53 [21,53;24,53]	21,60 [21,29;24,26]	22,53 [21,21;24,28]	n.s.
Schulbildung > 12 Jahre	100%	100%	100%	n.s.
RR systolisch (mmHg)	110,00 [98,75;117,50]	110,00 [110,00;115,00]	112,50 [110,00;120,00]	n.s.
RR diastolisch (mmHg)	77,50 [67,50;91,25]	80,00 [75,00;85,00]	85,00 [75,00;86,25]	n.s.
Puls (Schläge pro Minute)	56,00 [55,00;67,00]	64,00 [60,00;64,00]	64,00 [53,50;70,00]	n.s.
STAI-Trait	34,00 [29,75;38,75]	35,00 [30,00;39,00]	32,00 [29,00;39,50]	n.s.

Die Daten sind als Median mit den Interquartilsbereichen [25. Perzentil; 75. Perzentil] angegeben. Unterschiede zwischen den Gruppen vor Beginn der Studie wurden mittels Mann-Whitney-U-Test analysiert. RR, Blutdruck; STAI, State-Trait-Anxiety-Inventory; n.s., nicht signifikant.

4.2 Everolimusspiegel im Blut während der Studientage

Die Everolimuskonzentrationen im Blut wurden bei allen Probanden an T1 zu Beginn der Studie, an T3 vor Einnahme der vierten Dosis Everolimus zur Bestimmung der Talspiegel ($T3_{Tal}$), zwei Stunden nach Einnahme der vierten Dosis Everolimus zur Bestimmung der Spitzenspiegel ($T3_{Peak}$), sowie an T8 ermittelt (vergleiche Kapitel 3.3). Es zeigte sich über alle Dosisgruppen hinweg sowohl beim Talspiegel als auch beim Spitzenspiegel ein signifikanter Anstieg der Everolimuskonzentrationen gegenüber dem Ausgangsniveau an T1 (alle $Z \geq |-2,023|$, $p \leq 0,043$, $r \geq |-0,640|$).

In der Analyse der Gruppenunterschiede zueinander zeigte sich, dass die Spitzenspiegel ($T3_{Peak}$) in der Hochdosisgruppe mit $15 \mu\text{g/l}$ im Vergleich zur Niedrigdosisgruppe mit $6,05 \mu\text{g/l}$ und Mitteldosisgruppe mit $9,10 \mu\text{g/l}$ signifikant höher waren ($Z = |-2,903|$, $p = 0,004$, $r = |-0,838|$ und $Z = |-3,021|$, $p = 0,003$, $r = |-0,838|$). Bei den Talspiegeln ($T3_{Tal}$) zeigten sich die Werte der Hochdosisgruppe mit $3,45 \mu\text{g/l}$ im Vergleich zur Niedrigdosisgruppe mit $1,90 \mu\text{g/l}$ ebenfalls signifikant höher ($Z = |-2,562|$, $p = 0,010$, $r = |-0,740|$). An T8 lagen die Spiegel aller Gruppen unterhalb der Nachweisgrenze von $1 \mu\text{g/l}$, was dafürspricht, dass das Medikament an T8 vollständig aus dem Blutkreislauf eliminiert war (siehe Tabelle 2).

Tabelle 2: Systemische Everolimusspiegel im Blut

Konzentration Everolimus K_{EVR} ($\mu\text{g/l}$)	Everolimus Dosisgruppen in mg		
	1,5 (n = 6)	2,25 (n = 7)	3 (n = 6)
K_{EVR} T1	<1	<1	<1
K_{EVR} $T3_{Tal}$	1,90 [1,35;2,73] [*]	3,30 [2,30;4,30] [*]	3,45 [2,95;4,70] ^{**}
K_{EVR} $T3_{Peak}$	6,05 [4,55;7,50] [*]	9,10 [6,20;11,00] [*]	15,00 [13,75;19,75] ^{***§§}
K_{EVR} T8	<1	<1	<1

Die Daten sind als Median mit den Interquartilsbereichen [25. Perzentil; 75. Perzentil] angegeben. Unterschiede zwischen den Studientagen innerhalb einer Gruppe wurden analysiert mittels Wilcoxon-Test (^{*} $p < 0,05$ vs. T1) und Unterschiede zwischen den Gruppen an den jeweiligen Studientagen mittels Mann-Whitney-U-Test ([#] $p < 0,05$ Hoch- vs. Niedrigdosisgruppe; ^{##} $p < 0,01$ Hoch- vs. Niedrigdosisgruppe; ^{§§} $p < 0,01$ Hoch- vs. Mitteldosisgruppe).

4.3 Effekt von Everolimus auf die Zytokinsekretion von mitogenstimulierten PBMCs

Zur Messung der IL-2- und IL-10-Sekretion wurden PBMCs vor (T1) und nach der Einnahme von Everolimus (T3, T8, T15) in den jeweiligen Dosisgruppen aus dem Blut der Probanden isoliert und 24 Stunden mit Anti-CD3-Antikörpern (50 ng/ml) stimuliert. In den anschließend gewonnenen PBMC-Überständen wurde per ELISA-Technik die Menge an IL-2 und IL-10 bestimmt (vergleiche Kapitel 3.5).

4.3.1 Effekt von Everolimus auf die Interleukin-2-Sekretion

Die IL-2-Freisetzung aus stimulierten PBMCs änderte sich in der Niedrig- und Mitteldosisgruppe nicht signifikant durch die Einnahme von Everolimus gegenüber den Ausgangswerten an T1 (alle $Z \leq |-1,572|$, $p \geq 0,116$, $r \leq |-0,454|$). Lediglich in der Hochdosisgruppe führte die Einnahme von Everolimus an T8 zu einer signifikant erniedrigten IL-2-Sekretion im Vergleich zu den Ausgangswerten an T1 ($Z = |-2,023|$, $p = 0,043$, $r = |-0,640|$). In der Analyse zwischen den Gruppen ließ sich ebenfalls lediglich an T8 eine signifikante Suppression der IL-2-Sekretion durch die 3 mg Dosis in der Hochdosisgruppe gegenüber der Mitteldosisgruppe erkennen ($Z = |-2,030|$, $p = 0,042$, $r = |-0,586|$) (siehe Abbildung 2).

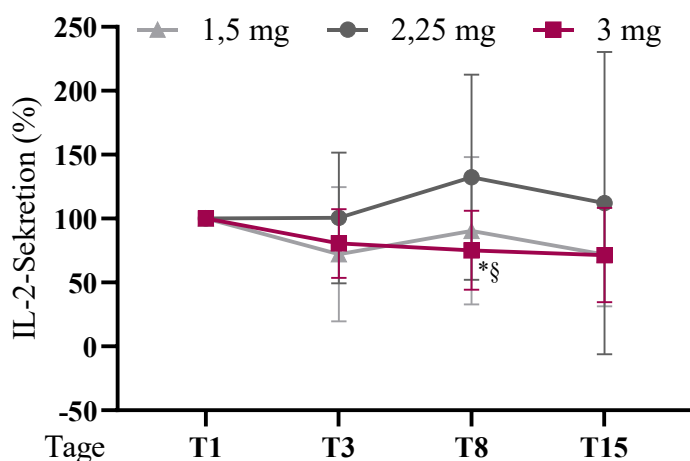


Abbildung 2: Effekt von Everolimus auf die IL-2-Sekretion von mitogenstimulierten PBMCs

Die Daten sind dargestellt als Mittelwerte \pm SD. Unterschiede zwischen den Studientagen innerhalb einer Gruppe wurden analysiert mittels Wilcoxon-Test (* $p < 0,05$ vs. T1) und Unterschiede zwischen den Gruppen an den jeweiligen Studientagen mittels Mann-Whitney-U-Test (§ $p < 0,05$ T8 Hoch- vs. Mitteldosisgruppe).

4.3.2 Effekt von Everolimus auf die Interleukin-10-Sekretion

Die Einnahme von Everolimus führte in allen Dosisgruppen zu einer signifikanten Reduktion der IL-10-Sekretion an T3 im Vergleich zu den Ausgangswerten an T1 (alle $Z \geq |-1,992|$, $p \leq 0,046$, $r \geq |-0,575|$). An T8 zeigten sich die Werte weiterhin in allen Gruppen erniedrigt, jedoch ließ sich zu diesem Zeitpunkt nur noch in der Hochdosisgruppe eine Signifikanz gegenüber T1 nachweisen ($Z = |-2,023|$, $p = 0,043$, $r = |-0,640|$). Die Suppression hielt in dieser Gruppe bis T15 signifikant an ($Z = |-2,201|$, $p = 0,028$, $r = |-0,635|$) (siehe Abbildung 3).

Zwischen den Gruppen konnte zu den einzelnen Messzeitpunkten kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden (alle $Z \leq |-1,761|$, $p \geq 0,078$, $r \leq |-0,508|$).

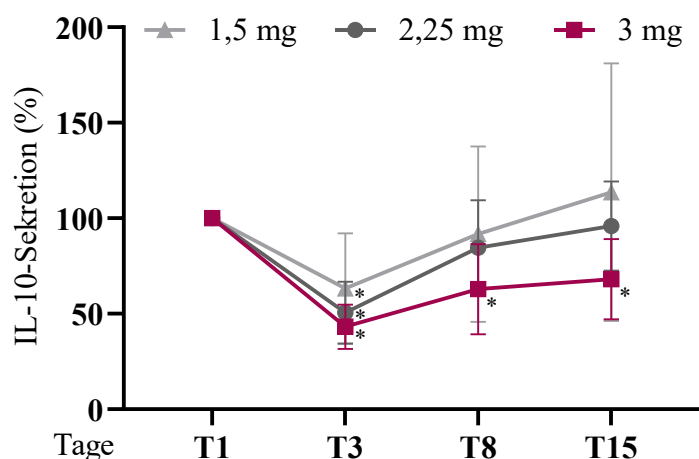


Abbildung 3: Effekt von Everolimus auf die IL-10-Sekretion von mitogenstimulierten PBMCs

Die Daten sind dargestellt als Mittelwerte \pm SD. Unterschiede zwischen den Studientagen innerhalb einer Gruppe wurden analysiert mittels Wilcoxon-Test (* $p < 0,05$ vs. T1) und Unterschiede zwischen den Gruppen an den jeweiligen Studientagen mittels Mann-Whitney-U-Test (alle nicht signifikant).

4.4 Subjektiv wahrgenommene Symptome und deren Attribuierung auf die Kurzzeiteinnahme von Everolimus

Die Auswertung des GASE-Fragebogens ergab, dass die Probanden aller drei Gruppen insgesamt nur wenige und mild ausgeprägte Nebenwirkungen angaben. Die Gesamtpunktzahl der Symptomintensität lag im Median maximal bei 3, wobei die mögliche Punktzahl zwischen 0 und 105 hätte liegen können (siehe Tabelle 3). In der statistischen Analyse kam es in keiner Gruppe zu einem signifikanten Anstieg der empfundenen Symptomintensität unter Everolimuseinnahme; weder innerhalb der Gruppen in Vergleich zu T1 und damit vor Einnahme des Medikaments (alle $Z \leq |-1,841|$, $p \geq 0,066$, $r \leq |-0,531|$), noch zwischen den Gruppen zu den einzelnen Zeitpunkten nach Einnahme des Medikaments (alle $Z \leq |-1,933|$, $p \geq 0,053$, $r \leq |-0,536|$). Bei der Auswertung der Medikamentenattribuierung zeigte sich, dass die Werte an allen Tagen und in allen Gruppen deutlich unterhalb der insgesamt angegebenen Symptomintensität lagen und die Probanden ihre empfundenen Symptome demnach wenig beziehungsweise gar nicht mit der Einnahme von Everolimus in Verbindung brachten.

Tabelle 3: Empfundene Symptomintensität und Medikamentenattribuierung (GASE-Fragebogen) unter Everolimuseinnahme

GASE-Symptomintensität (Punktwert)	Everolimus Dosisgruppen in mg		
	1,5 (n = 6)	2,25 (n = 7)	3 (n = 6)
Symptomintensität T1 medikamenten-attribuiert	2,00 [0,00;3,75] 0,00 [0,00;0,00]	2,00 [0,00;4,00] 0,00 [0,00;0,00]	1,50 [0,75;3,25] 0,00 [0,00;0,00]
Symptomintensität T3 medikamenten-attribuiert	0,00 [0,00;1,25] 0,00 [0,00;0,25]	2,00 [1,00;3,00] 1,00 [0,00;2,00]	0,50 [0,00;2,50] 0,00 [0,00;1,25]
Symptomintensität T8 medikamenten-attribuiert	0,50 [0,00;7,50] 0,00 [0,00;1,50]	2,00 [1,00;4,00] 1,00 [0,00;2,00]	1,00 [0,00;3,00] 0,00 [0,00;1,00]
Symptomintensität T15 medikamenten-attribuiert	2,50 [0,75;7,25] 0,00 [0,00;1,00]	3,00 [1,00;5,00] 0,00 [0,00;1,00]	0,50 [0,00;5,25] 0,00 [0,00;4,50]

Die Daten sind als Median mit den Interquartilsbereichen [25. Perzentil; 75. Perzentil] angegeben. Unterschiede zwischen den Studientagen innerhalb einer Gruppe wurden analysiert mittels Wilcoxon-Test (alle n.s.) und Unterschiede zwischen den Gruppen an den jeweiligen Studientagen mittels Mann-Whitney-U-Test (alle n.s.). GASE, Generic Assessment of Side Effects; n.s., nicht signifikant.

4.5 Effekt von Everolimus auf die Kortisolspiegel in Blutplasma und Speichel

Die Analyse der Kortisolkonzentrationen als Effektparameter von Everolimus auf das neuroendokrine System ergab, dass die Kortisolkonzentration im Blutplasma ausschließlich durch die Einnahme von Everolimus in der Hochdosisgruppe an T3 ($Z = |-2,201|$, $p = 0,028$, $r = |-0,635|$) und an T8 ($Z = |-2,023|$, $p = 0,043$, $r = |-0,640|$) im Vergleich zu den Ausgangswerten an T1 signifikant reduziert wurde (siehe Abbildung 4). Die Kortisolspiegel wurden durch die Einnahme in der Niedrig- und Mitteldosisgruppe nicht signifikant gegenüber den Ausgangswerten an T1 beeinflusst (alle $Z \leq |-1,604|$, $p \geq 0,109$, $r \leq |-0,655|$). Zwischen den Gruppen ergaben sich ebenfalls keine signifikanten Unterschiede an den einzelnen Studientagen (alle $Z \leq |-1,643|$, $p \geq 0,100$, $r \leq |-0,495|$).

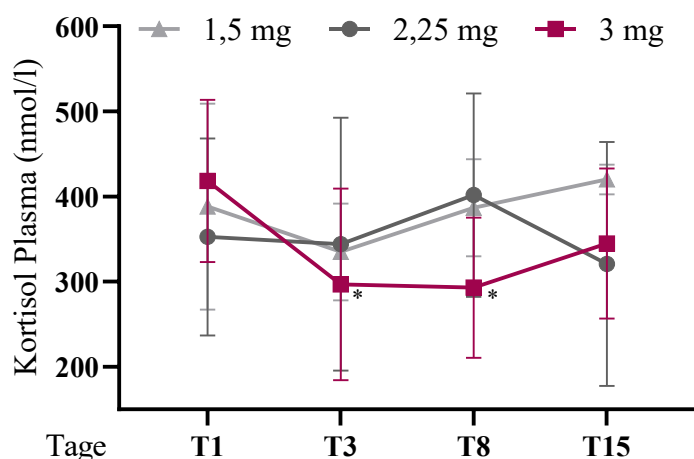


Abbildung 4: Effekt von Everolimus auf die Kortisolkonzentration im Blutplasma

Die Daten sind dargestellt als Mittelwerte \pm SD. Unterschiede zwischen den Studientagen innerhalb einer Gruppe wurden analysiert mittels Wilcoxon-Test (* $p < 0,05$ vs. T1) und Unterschiede zwischen den Gruppen an den jeweiligen Studientagen mittels Mann-Whitney-U-Test (alle nicht signifikant).

Auch im Speichel führte lediglich die Einnahme von 3 mg Everolimus in der Hochdosisgruppe zu einer signifikanten Reduktion der Kortisolkonzentration an T3 ($Z = |-1,992|$, $p = 0,046$, $r = |-0,575|$) im Vergleich zu den Ausgangswerten an T1 (siehe Abbildung 5). In der Niedrig- und Mitteldosisgruppe kam es demnach, wie zuvor auch im Plasma beobachtet, an keinem Messzeitpunkt zu einer signifikanten Veränderung der Kortisolspiegel gegenüber T1 (alle $Z \leq |-1,352|$, $p \geq 0,176$, $r \leq |-0,361|$).

Die Analyse der Gruppenunterschiede zueinander zeigte ausschließlich an T15 eine signifikant niedrigere Kortisolkonzentration in den Speichelproben der Hochdosisgruppe im Vergleich zur Niedrigdosisgruppe ($Z = |-2,066|$, $p = 0,039$, $r = |-0,689|$).

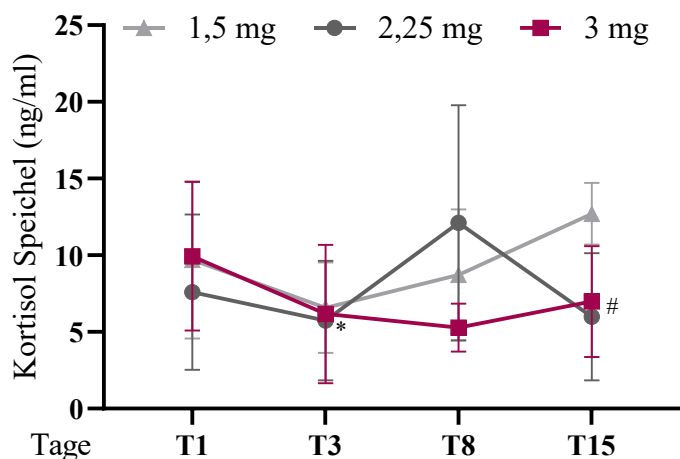


Abbildung 5: Effekt von Everolimus auf die Kortisolkonzentration im Speichel

Die Daten sind dargestellt als Mittelwerte \pm SD. Unterschiede zwischen den Studientagen innerhalb einer Gruppe wurden analysiert mittels Wilcoxon-Test (* $p < 0,05$ vs. T1) und Unterschiede zwischen den Gruppen an den jeweiligen Studientagen mittels Mann-Whitney-U-Test (# $p < 0,05$ T15 Niedrig- vs. Hochdosisgruppe).

4.6 Effekt von Everolimus auf die Zustandsangst

Die statistische Auswertung des STAI-State-Fragebogens ergab einen signifikanten Anstieg der Zustandsangst in der Niedrig- ($Z = |-2,032|$, $p = 0,042$, $r = |-0,587|$) und Mitteldosisgruppe ($Z = |-2,043|$, $p = 0,041$, $r = |-0,546|$) an T3 gegenüber T1 und somit nach viermaliger Einnahme des Medikaments. Eine weitere Signifikanz im Sinne eines Anstiegs gegenüber T1 ließ sich in der 2,25 mg Gruppe an T15 nachweisen ($Z = |-2,117|$, $p = 0,034$, $r = |-0,566|$) (siehe Abbildung 6).

In der Hochdosisgruppe wiederum konnte zu keinem Zeitpunkt gegenüber den Ausgangswerten von T1 eine signifikante Veränderung der Zustandsangst festgestellt werden (alle $Z \leq |-0,677|$, $p \geq 0,498$, $r \leq |-0,214|$). Die Analyse zwischen den Gruppen ergab ebenfalls zu keinem der Erhebungszeitpunkte einen signifikanten Unterschied (alle $Z \leq |-0,961|$, $p \geq 0,337$, $r \leq |-0,277|$).

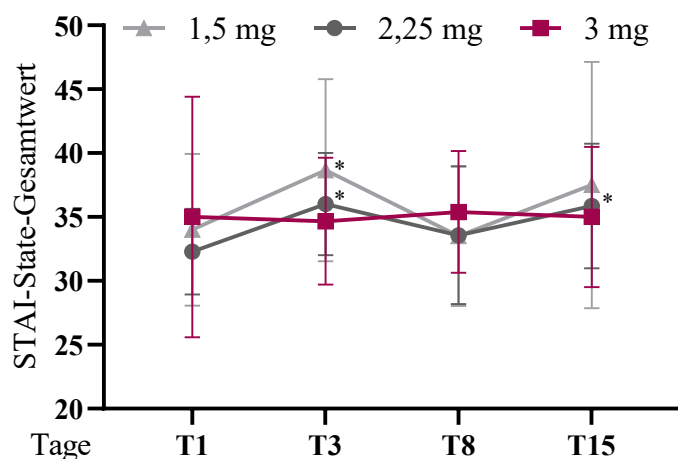


Abbildung 6: Einfluss von Everolimus auf die Zustandsangst (STAI-State)

Die Daten sind dargestellt als Mittelwerte \pm SD. Unterschiede zwischen den Studientagen innerhalb einer Gruppe wurden analysiert mittels Wilcoxon-Test (* $p < 0,05$ vs. T1) und Unterschiede zwischen den Gruppen an den jeweiligen Studientagen mittels Mann-Whitney-U-Test (alle nicht signifikant).

4.6.1 Korrelation zwischen Zustandsangst und Kortisolspiegeln

In den zuvor präsentierten Ergebnissen zeigte sich, dass es unter Everolimuseinnahme in der Niedrig- und Mitteldosisgruppe zu einem Anstieg der Zustandsangst nach der Einnahme von Everolimus an T3 kam. Die Auswertung der Kortisolergebnisse hingegen ergab eine signifikante Veränderung im Sinne eines Abfalls der Kortisolspiegel und dies lediglich in der Hochdosisgruppe. Um einen möglichen Zusammenhang zwischen der Zustandsangst und den Kortisolspiegeln zu prüfen, führten wir eine bivariate Korrelationsanalyse durch.

Vor Einnahme von Everolimus an T1 ergab sich in keiner der Dosisgruppen eine Korrelation zwischen Zustandsangst und den Kortisolspiegeln (alle $p \geq 0,329$, $\rho \leq 0,486$). Auch nach Einnahme von Everolimus konnte in keiner der Dosisgruppen an T3 und T8 ein signifikanter Zusammenhang zwischen den Parametern festgestellt werden (alle $p \geq 0,159$, $\rho \leq 0,595$), obwohl genau an diesen Studientagen jeweils eine signifikante Veränderung der beiden Parameter unabhängig voneinander nachgewiesen wurde. Nur an T15 zeigte sich in der Niedrigdosisgruppe eine statistisch signifikante, positive Korrelation: Höhere STAI-Werte gingen hier mit höheren Kortisolkonzentrationen einher ($p < 0,001$, $\rho = 1,000$).

5 Diskussion

Im Folgenden werden die Ergebnisse und erhobenen Daten kritisch vor dem Hintergrund der aktuellen Forschung analysiert. Abschließend werden limitierende Faktoren der Studie aufgezeigt und ein Ausblick auf mögliche zukünftige Forschungsarbeiten im Rahmen der Konditionierung von Immunfunktion gegeben.

Der Anspruch dieser Arbeit war es, die dosisabhängigen Effekte von Everolimus auf ausgewählte immunologische Parameter (Zytokinproduktion), den neuroendokrinen Marker Kortisol und psychologische Parameter (Zustandsangst) bei gesunden männlichen Probanden zu analysieren. Da bisherige Untersuchungen überwiegend an Tieren oder an transplantierten beziehungsweise onkologischen Patienten und Patientinnen durchgeführt wurden – Populationen, bei denen Grunderkrankungen, Komorbiditäten und Begleitmedikationen die Interpretation der pharmakodynamischen Effekte erschweren – fehlen Daten dazu, inwieweit Everolimus immunologische, neuroendokrine und psychologische Parameter bei gesunden Individuen beeinflusst.

Die explorative Untersuchung der drei verschiedenen Dosierungen (1,5 mg, 2,25 mg und 3 mg) hatte das Ziel zu prüfen, ob bereits bei kurzzeitiger Einnahme therapeutische beziehungsweise klinisch relevante Konzentrationsspiegel im Blut erreicht werden, wie sie in der Behandlung von Patienten und Patientinnen angestrebt werden. Zudem sollte die effektive Dosis identifiziert werden, die nach einer kurzzeitigen Einnahme valide und gut *ex vivo* messbare Effekte als pharmakodynamische Biomarker liefert, welche sich als Effektparameter auch für zukünftige Konditionierungsstudien mit Everolimus eignen.

Da keine expliziten Daten zur Expositionswirksamkeit und Sicherheitsdosis von Everolimus bei gesunden Personen vorliegen, haben wir unsere Studie gemäß den folgenden Empfehlungen für Patientenpopulationen konzipiert. Salvadori et. al (2011) wiesen verringerte Transplantatabstoßungsraten bei nierentransplantierten Patienten und Patientinnen nach, bei denen der Everolimus Talspiegel mindestens bei $> 3 \mu\text{g/l}$ lag. Die Novartis Pharma GmbH (2024b), die Everolimus unter dem Markennamen Certican® in

der Transplantationsmedizin vermarktet, nennt in ihrer Produktinformation ebenfalls einen Talspiegel von 3-8 µg/l als Zielwert für transplantierte Patienten und Patientinnen. Um das Auftreten toxischer Nebenwirkungen nicht zu forcieren, sollten Talspiegel nicht > 10 µg/l liegen und keinesfalls über > 20 µg/l ansteigen (Arena et al., 2021).

Unsere Ergebnisse zeigen, dass es in allen Dosisgruppen zu einem signifikanten Anstieg der Everolimus-Talspiegel im Vergleich zum Ausgangswert an T1 kam. Allerdings überschritten lediglich die Talspiegel der Mittel- und Hochdosisgruppe mit Medianwerten von 3,30 µg/l und 3,45 µg/l den zuvor orientierend festgelegten therapeutischen Schwellenwert von 3 µg/l (vergleiche Tabelle 2 in Kapitel 4.2).

Im Vergleich zu Studien, die Talspiegel > 3 µg/l als Richtwert empfehlen, liefert die Analyse von Shipkova et al. (2016) eine ergänzende Perspektive. Dort wird berichtet, dass bei Patienten und Patientinnen unter Monotherapie mit Everolimus therapeutische Talspiegel in einem Bereich von 6-10 µg/l liegen könnten. Werte lediglich > 3 µg/l könnten unter Umständen nicht ausreichen, um eine optimale Wirksamkeit zu gewährleisten, sondern werden vielmehr als Zielwerte für Kombinationstherapien mit anderen immunsuppressiven Medikamenten angesehen. Zudem weisen Shipkova et al. (2016) darauf hin, dass aufgrund der Halbwertszeit von Everolimus ein stabiler Steady-State-Spiegel erst nach 4-7 Tagen erreicht würde. Da unsere Talspiegel-Messungen bereits an Tag 3 durchgeführt wurden, könnte es sein, dass die ermittelten Werte nicht den finalen Zustand im Steady-State widerspiegeln.

Dennoch erreichten wir in der Hochdosisgruppe mit einer Gesamttagesdosis von 6 mg (2 × 3 mg) ein Therapiefenster, das sich mit den von Budde et al. (2004) empfohlenen Regimen deckt. Laut deren Empfehlungen werden Tagesdosierungen bis zu 5 mg gut vertragen, während ab Dosierungen von 10 mg pro Tag vermehrt toxische Nebenwirkungen auftreten könnten. Auf eine weitere Dosissteigerung wurde daher aus ethischen Gründen zur Vermeidung toxischer Nebenwirkungen bei gesunden Probanden verzichtet.

An T8 zeigten sich in allen Dosisgruppen die Everolimuskonzentrationen im Blut unterhalb der Nachweisgrenze, was dafürspricht, dass das Medikament zu diesem Zeitpunkt vollständig metabolisiert war.

Bei der Analyse der psychoneuroimmunologischen Messparameter hingegen zeigten sich für die Mittel- und Hochdosisgruppe auch noch an T8 und teils darüber hinaus an

T15 signifikante Effekte von Everolimus. Es liegt also nahe, dass mit steigender Dosierung das Auftreten von Resteffekten häufiger wird.

Die für die spätere Immunkonditionierung gewählte Dosis sollte keinesfalls zu lang andauernde Residualeffekte im Körper hervorrufen. Die Messparameter sollten zu Beginn der Abrufphase wieder auf ihrem Ausgangsniveau liegen, da nur so eine sichere Beurteilung der konditionierten Reaktion in der Abrufphase erfolgen kann. Es berichten zwar Studien, dass Retentionsintervalle – also der Zeitraum zwischen Lern- und Abrufphase in der Konditionierung – von 14 bis 30 Tagen für die Konditionierung von Immunfunktionen noch funktional seien (Hörbelt et al., 2019; Lückemann et al., 2021), jedoch nutzten die meisten humanen Studien zur Konditionierung von Immunfunktionen bisher Protokolle mit kürzeren Intervallen (Goebel et al., 2002; Wirth et al., 2011; Albring et al., 2014; Kirchhof et al., 2018). Dies unterstützte die Entscheidung, auf eine weitere Dosissteigerung zu verzichten, da diese nicht nur das Risiko unerwünschter Nebenwirkungen erhöhen, sondern auch zu vermehrten Residualeffekten führen könnte, die dann gegebenenfalls noch deutlich über Studientag 15 hinausgehen könnten und damit zeitlich nicht in die geplante Konditionierungsstudie passen würden.

In Zusammenschau erscheinen, unter Berücksichtigung der ethisch vertretbaren kurzen Einnahme von Everolimus im Rahmen dieser Studie, die beobachteten Talspiegel und das Erreichen von Konzentrationen $> 3 \mu\text{g/l}$ in der Mittel- und Hochdosisgruppe als angemessen und ausreichend. Wir konnten auf die von uns gewählten psychoneuroimmunologischen Parameter bereits mit diesen Dosierungen signifikante Effekte nachweisen und die Kinetik der Parameter passte zu den Zeiten des späteren Konditionierungsdesigns.

Um den immunsuppressiven Effekt von Everolimus abzubilden, analysierten wir als Parameter in unserer Studie die Zytokin-Sekretion in stimulierten PBMCs. Der Ansatz, die Zytokinmessung als möglichen Biomarker zu nutzen, basiert auf den Erkenntnissen über den Wirkmechanismus von Calcineurin-Inhibitoren und die gründlich erforschte Reduktion spezifischer Zytokine, wie IL-2 und Tumornekrosefaktor (TNF)- α , die als etablierte Marker für den Therapieerfolg mit Cyclosporin gelten (Böhler et al. 2007). Die Beeinflussung der Zytokinspiegel durch Everolimus beim Menschen ist bislang

noch nicht ausreichend geklärt. In-vitro-Studien liefern erste Hinweise auf den Einfluss von Everolimus auf Zytokinspiegel. So zeigten ebenfalls Böhler et al. (2007), dass Everolimus im Gegensatz zu Cyclosporin keinen Effekt auf die IL-2 Expression hat, jedoch dosisabhängig eine deutliche Suppression von IL-10 bewirkt. Ergänzend zu den in dieser Dissertation dargestellten in-vivo-Daten, analysierte unsere Forschungsgruppe um Hörbelt et al. (2020) auch die Zytokinsekretion von PBMCs nach Everolimus-Applikation *in vitro*. Dabei zeigte sich, im Gegensatz zu den eben genannten in-vitro-Analysen von Böhler et al. (2007), eine signifikante Reduktion sowohl von IL-10, aber auch von IL-2. Diese in-vitro-Ergebnisse decken sich mit den Befunden von Iwasaki et al. (2019), deren Forschungsgruppe ebenfalls den Einfluss von Everolimus auf die Zytokinexpression *in vitro* untersuchten und dabei ebenfalls eine Suppression der mRNA-Level für IL-2 und IL-10 feststellten.

IL-10 wird traditionell als entzündungshemmendes Zytokin beschrieben, das die Produktion proinflammatorischer Faktoren hemmt, eine Schlüsselrolle bei der Kontrolle von Entzündungs- und Autoimmunprozessen spielt und insgesamt zur Erhaltung der Immunhomöostase beiträgt (Kaufmann, 2014). Eine Suppression dieses antiinflammatorischen Zytokins durch Everolimus scheint daher vorerst paradox. Jedoch ist bewiesen, dass IL-10 auch immunstimulierende und entzündungsfördernde Eigenschaften besitzt. Insbesondere wurde beobachtet, dass IL-10 als chemotaktischer Faktor für CD8-positive T-Lymphozyten wirkt (Jinquan et al., 1993) und die IL-2-abhängige Proliferation von T-Zellen fördert (MacNeil et al., 1990). Diese Eigenschaften legen nahe, dass IL-10 zwar traditionell antiinflammatorisch wirkt, jedoch auch zur Immunaktivierung beiträgt. Diese doppel funktionale Natur von IL-10 verdeutlicht seine komplexe Rolle im Immunsystem (Saxena et al., 2015) und erklärt, dass Everolimus über die IL-10-Suppression immunsuppressiv wirken kann.

Den zuvor beschriebenen in-vitro-Ansätzen von Böhler et al. (2007), Hörbelt et al. (2020) und Iwasaki et al. (2019) stand unser Forschungsansatz mit der Frage gegenüber, ob und in welchem Umfang sich die Zytokinspiegel von IL-2 und IL-10 *in vivo* unter einer Everolimustherapie verändern und somit als *ex vivo* Biomarker dienen können.

Unsere Ergebnisse zum Einfluss von Everolimus auf die Zytokinsekretion in den Überständen stimulierter PBMCs der Probanden zeigten, dass die kurzfristige Einnahme von Everolimus die IL-2-Level nicht beeinflusst. Lediglich in der Mitteldosisgruppe

konnte an T8 eine einzelne signifikante Suppression der IL-2-Sekretion festgestellt werden, während die Verlaufsprofile ansonsten insgesamt sehr uneinheitlich blieben (siehe Abbildung 2 in Kapitel 4.3.1).

Im Gegensatz dazu wiesen die Werte der IL-10-Sekretion in allen Dosisgruppen einen zueinander ähnlichen Verlauf über die Studientage hinweg auf. Die Einnahme von Everolimus führte in allen Dosisgruppen zu einer signifikanten Suppression von IL-10, wobei diese Suppression in der Hochdosisgruppe über T8 und T15 hinweg signifikant anhielt (siehe Abbildung 3 in Kapitel 4.3.2).

Unsere Ergebnisse passen zu den *ex vivo* erhobenen Daten von Böhler et. al (2008), die ebenso nachweisen konnten, dass Everolimus als mTOR-Inhibitor besonders die IL-10-Expression bei nierentransplantierten Patienten und Patientinnen supprimiert. Da es sich bei der Studie von Böhler et. al (2008) um eine klinische Studie handelte, bleibt jedoch unklar, ob die dort beobachtete IL-10-Suppression ausschließlich auf Everolimus zurückzuführen war oder auf die synergistische Wirkung gleichzeitig verabreichter Calcineurin-Inhibitoren und Steroide. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie belegen hingegen eindeutig den suppressiven Effekt einer isolierten Einnahme von Everolimus auf die IL-10-Sekretion bei gesunden Probanden.

Dass sich bei unseren Daten kein signifikanter Effekt auf die IL-2-Level zeigte, unterstützt das Wissen über den molekularen Wirkmechanismus von Everolimus. Dabei verhindert Everolimus nicht die IL-2-vermittelte Lymphozytenproliferation durch Blockierung der IL-2-Synthese, sondern blockiert die IL-2-Rezeptor-abhängige Signalübertragung in aktivierten Lymphozyten, was zu einem Stillstand des Zellzyklus in der frühen G1-Phase führt (Dumont und Su, 1996). Dass eine *in-vitro*-Exposition mit Everolimus zwar in vereinzelt Studien zu einer Suppression von IL-2 führte, jedoch keine *in-vivo*-Studie, einschließlich unserer Daten, diesen Effekt bestätigen konnte, verdeutlicht den fundamentalen Unterschied zwischen *in-vitro*- und *in-vivo*-Bedingungen. Während *in-vitro*-Experimente in einem kontrollierten Laborumfeld stattfinden und isolierte Zellen analysiert werden, stellt das Immunsystem im lebenden Organismus ein hochkomplexes und dynamisches Netzwerk dar, bei dem zahlreiche regulatorische Mechanismen ineinandergreifen.

Zusammenfassend konnten wir zeigen, dass die kurzfristige Einnahme von Everolimus bei gesunden Männern zu einer signifikanten Suppression der IL-10-Sekretion führt.

Damit stellt IL-10 einen potenziellen Biomarker für Messungen unter Everolimuseinnahme dar und kann in weiteren Studien, auch im Rahmen der Konditionierung von Immunfunktionen, als immunologischer Effektparameter genutzt werden.

Des Weiteren untersuchten wir die dosisabhängigen Auswirkungen von Everolimus bei gesunden Männern auf neuroendokrine und psychologische Parameter, da die Hemmung des mTOR-Signalwegs zunehmend mit Veränderungen in diesen Bereichen in Verbindung gebracht wird.

Das bisherige Forschungsbild über die klinischen Auswirkungen von Everolimus ist sehr inkongruent, da sowohl positive als auch negative Effekte der Therapie mit Everolimus auf neuropsychologische Parameter berichtet werden, wie die folgenden Beispiele verdeutlichen. Für das Verständnis möglicher psychologischer Veränderungen durch Everolimus ist grundlegend interessant, dass der mTOR-Signalweg an der Regulierung der Proteinsynthese im Hippocampus beteiligt ist, der für die Gedächtniskonsolidierung erforderlich ist (Bekinschtein et al., 2007), und dass über mTOR-Inhibition Einfluss auf die Neurogenese und Synaptogenese und damit auf die Neuroplastizität des Nervensystems genommen wird (Hoeffler und Klann, 2010; Russo et al., 2016). Der genaue Mechanismus, durch den Everolimus zu neurokognitiven und psychischen Veränderungen führt, ist bisher jedoch nicht geklärt.

Tierstudien konnten als Positivbeispiel zeigen, dass eine Behandlung mit dem Analogon Rapamycin bei Mäusen zu einer Verbesserung der räumlichen Lern- und Gedächtnisfähigkeit führt (Halloran et al., 2012) und beobachteten eine Abnahme von depressivem und angstähnlichem Verhalten (Cleary et al., 2008). Auch im Bereich des klinisch relevanten Anwendungsgebiets der tuberösen Sklerose – einer Erkrankung, die unter anderem mit vielfältigen neuropsychiatrischen Symptomen wie Autismus-Spektrum-Störungen, Angststörungen und Epilepsie einhergeht – gibt es zahlreiche Studien zur Erforschung der positiven Auswirkungen von Everolimus auf die psychoneurologischen Symptome der Erkrankten. In Experimenten zur tuberösen Sklerose führte Rapamycin bei Mäusen zu einer Verbesserung des Lernens und der sozialen Interaktion (Sato et al., 2012). Fallberichte von erkrankten Personen zeigten ebenfalls, dass Everolimus Verhaltensdefizite reduzieren und die kognitiven

Fähigkeiten, die Aufmerksamkeit, die soziale Interaktion sowie die Sprachentwicklung verbessern kann. Zudem wurde eine Verringerung der Häufigkeit epileptischer Anfälle beobachtet (Wiegand et al., 2013; Ishii et al., 2015).

Lang et al. (2009) untersuchten im Rahmen einer Humanstudie mit Herztransplantierten die Effekte einer Calcineurin-Inhibitor-freien Therapie mit mTOR-Inhibitoren gegenüber einer Calcineurin-Inhibitor-basierten Therapie. Die Medikamentenkombination aus Cyclosporin A, Steroiden und Mycophenolat-Mofetil wurde durch eine Cyclosporin freie Kombination mit Everolimus, Steroiden und Mycophenolat-Mofetil ersetzt, worunter sich eine signifikante Verbesserung hinsichtlich der Gedächtnisleistung und der Konzentrationsfähigkeit sowie eine deutliche Steigerung der Lebensqualität, der Stimmung und der allumfassenden psychiatrischen Symptome zeigte. Vermutlich lässt dies auf die positive Wirkung von Everolimus schließen. Es ist jedoch auch möglich, dass die Verbesserung der Symptomatik allein auf das Fehlen der Calcineurin-Inhibitoren und die damit verbundene Reduktion der bekannten Nebenwirkungen dieser Substanzen zurückzuführen ist (Lang et al., 2009).

Dem positiven Nutzen von Everolimus stehen zahlreiche Studien und Berichte gegenüber, die auf das Auftreten oder die Verschlechterung psychoneurologischer Symptome unter mTOR-Inhibition hinweisen. So wiesen sowohl Russo et. al (2016) als auch Hadamitzky et. al (2014) eine Induktion von angstähnlichem und depressivem Verhalten bei Tieren unter Verabreichung von mTOR-Inhibitoren nach. In einer humanen Studie mit Brustkrebspatientinnen konnten Mir et al. (2018) zeigen, dass die Anwendung von Everolimus in Kombination mit einer Hormontherapie im Vergleich zu einer alleinigen Hormontherapie mit signifikant häufigeren Stimmungsschwankungen verbunden war.

Ob all die sowohl positiven als auch negativen beobachteten Effekte dabei allein auf die Wirkung von Everolimus zurückzuführen sind oder andere Faktoren wie Komorbiditäten oder Arzneimittelwechselwirkungen eine Rolle spielen, ist unklar (Bösche et al., 2015). Bisher fehlen Daten darüber, wie und in welchem Ausmaß relevante Dosen von Everolimus neurokognitive und psychologische Funktionen bei gesunden Menschen beeinflussen. Unter Ausschluss potenzieller Störvariablen wie Komedikation und Komorbiditäten untersuchten wir den Einfluss einer kurzfristigen

Everolimuseinnahme auf das psychische Befinden und die systemischen Kortisolspiegel.

Das psychische Befinden der Probanden wurde durch eine Selbsteinschätzung mittels Fragebögen (State-Trait-Angstinventar) an den einzelnen Studientagen abgefragt und galt als Maß für Angst als Eigenschaftsmerkmal und als Zustand. Zu Beginn der Studie unterschieden sich die Probanden der drei Dosisgruppen nicht hinsichtlich ihrer Angst als generelles Eigenschaftsmerkmal (STAI-Trait). Und auch an T1 unmittelbar vor Einnahme der Medikation ergaben sich keine Unterschiede bezogen auf die angegebene Zustandsangst (STAI-State). Nach der kurzzeitigen viermaligen Einnahme der entsprechenden Everolimusdosis kam es in der Niedrig- und Mitteldosisgruppe zu einem Anstieg des Angstniveaus, während die Einnahme der hohen Dosis zu keiner Veränderung des Angstniveaus führte (siehe Abbildung 6 in Kapitel 4.6). Es zeigte sich somit eine dosisabhängige Veränderung der Zustandsangst im Sinne einer gegensätzlichen Korrelation, was die Höhe der Dosis betrifft.

Dass der Einfluss auf das Angstverhalten durch die Inhibition des mTOR-Signalwegs dosisabhängig zu sein scheint, steht im Einklang mit den Daten von Hadamitzky et al. (2014), die ebenfalls einen dosisabhängigen Effekt auf das Angstverhalten berichteten. In Studien an Ratten untersuchte die Arbeitsgruppe den Einfluss des mTOR-Inhibitors Rapamycin und stellte fest, dass die Effekte auf das Angstverhalten der Tiere nach der Verabreichung von 1 mg/kg und 3 mg/kg Rapamycin unterschiedlich stark ausgeprägt waren. Im Gegensatz zu den Ergebnissen der vorliegenden Studie war dabei die höhere Rapamycin-Dosierung mit einem ausgeprägteren Angstverhalten der Tiere assoziiert (Hadamitzky et al., 2014). Unter akuter systemischer Gabe von Rapamycin war zudem die neuronale Aktivität in der Amygdala erhöht, was mit angstähnlichem Verhalten einherging (Hadamitzky et al., 2014). Dieser Effekt wurde unter anderem mit der Hochregulation angstbezogener Proteine in der Amygdala, wie dem FK506-bindenden Protein 51 (FKBP51), in Verbindung gebracht. FKBP51, ein Regulator des Glukokortikoid-Rezeptors, deutete darauf hin, dass mTOR-Inhibitoren indirekt die HPA-Achse beeinflussen, indem sie Proteine wie FKBP51 modulieren. Dies ließ vermuten, dass die psychologischen und verhaltensbezogenen Reaktionen nach der Gabe von mTOR-Inhibitoren sekundärer Genese sind und durch die Modulation mTOR-beeinflusster Proteinkinase-Wege entstehen, und weniger direkt durch die

Hemmung von mTOR verursacht werden (Hadamitzky et al., 2014). Interessanterweise zeigte eine von derselben Arbeitsgruppe später durchgeführte Studie, dass im Gegensatz zur akuten Gabe von Rapamycin, nach wiederholter subchronischer Gabe von Rapamycin die FKBP51-Expression in der Amygdala nicht signifikant verändert wurde. Die Hochregulation von FKBP51 nach einer akuten Rapamycin-Gabe könnte demnach ein frühes Ereignis sein, das bei subchronischer Behandlung nicht mehr nachweisbar ist. Das führte zur Annahme, dass sekundäre Effekte, wie die Modulation der Amygdala-Aktivität und der HPA-Achse durch mTOR-beeinflusste Proteine wie FKBP51, eine Rolle spielen könnten, jedoch schienen die Effekte bei akuter und subchronischer Behandlung unterschiedlich zu sein (Hadamitzky et al., 2018). Die Forschungsergebnisse von Koehl et. al (2021) zeigten, dass bei genetisch veränderten Mäusen das Fehlen des Gens für die ribosomale p70-s6-Kinase zu einem robusten Angstphänotypen führte und mit assoziativen Lerndefiziten einherging. Dadurch wiesen sie nach, dass durch mTOR-Inhibition ausgelöste Angst auch mit einer direkten Hemmung des mTORC1-Signalwegs zusammenzuhängen scheint und nicht ausschließlich auf sekundären Effekten beruht (Koehl et al., 2021). Es war nicht Teil der vorliegenden Studie, die zugrundeliegenden Mechanismen näher zu untersuchen.

Studien zur Nocebo-Wirkung wiesen darauf hin, dass Angst mit der Wahrnehmung von Medikamentennebenwirkungen assoziiert sein kann (Barsky et al., 2002; Benson und Elsenbruch, 2019). Das hätte bedeuten können, dass die von uns nachgewiesene Steigerung der Zustandsangst nicht durch Everolimus verursacht wurde, sondern dadurch, dass Probanden ein Auftreten von Nebenwirkungen erwarteten oder auch Angst vor Nebenwirkungen hatten. Die Auswertung des GASE-Fragebogens, der ein validiertes Selbstberichts-Instrument zur systematischen Bewertung von physischen und psychologischen Nebenwirkungen in klinischen Studien darstellt, ergab jedoch, dass die Probanden kaum von medikamentenbedingten Nebenwirkungen berichteten und es zu keiner Zunahme an Beschwerden oder Nebenwirkungen durch die Einnahme von Everolimus im Laufe der Studie kam. Die beobachtete Zunahme der situativen Angst bei den Probanden der Niedrig- und Mitteldosisgruppe scheint also nicht mit der Wahrnehmung von medikamentenspezifischen Nebenwirkungen in Zusammenhang zu stehen.

Die niedrigen Werte im GASE-Fragebogen und bei der Medikamentenattribuierung deuten insgesamt auf nur wenige Beschwerden während der kurzzeitigen Einnahme von Everolimus hin und sprechen vor allem für eine geringe Zuschreibung der Symptome zur Medikamenteneinnahme. Dies bestätigt die gute Verträglichkeit der drei Everolimus-Dosierungen bei kurzer Einnahme.

Zusammenfassend liefern die Ergebnisse den Nachweis, dass die kurzfristige Einnahme von Everolimus dosisabhängig zu einem Anstieg der Zustandsangst führt, ohne jedoch subjektiv wahrgenommene Nebenwirkungen auszulösen. Dies deutet darauf hin, dass die Zunahme der Zustandsangst möglicherweise eine direkte pharmakologische Wirkung von Everolimus ist, ohne dass die Probanden diese bewusst wahrgenommen beziehungsweise als unangenehm oder bedenklich empfinden. Wir liefern mit dieser Humanstudie insgesamt wertvolle Hinweise darauf, dass es wichtig ist, psychische Symptome unter Therapie mit Everolimus bei Patienten und Patientinnen engmaschig zu beobachten. Darüber hinaus zeigen unsere Befunde, dass Everolimus psychische Prozesse beeinflussen kann, was ein wichtiges Feld für weiterführende Forschungsarbeiten in diesem Bereich eröffnet.

Ergänzend untersuchten wir den Einfluss von Everolimus auf die systemischen Kortisolspiegel in Plasma und Speichel. Unsere Ergebnisse ergaben eine signifikante Suppression der Kortisolkonzentrationen in Plasma und Speichel durch die viermalige Einnahme von 3 mg Everolimus in der Hochdosisgruppe. Im Vergleich zum Ausgangsniveau blieben die Kortisolkonzentrationen in dieser Dosisgruppe auch über T3 hinweg bis zu T8 und T15 weiter erniedrigt (siehe Kapitel 4.5, Abbildung 4 und 5); wobei die Werte nur an T8 im Vergleich zum Ausgangsniveau im Blutplasma und an T15 in der Zwischengruppenanalyse im Speichel Signifikanzen zeigten. In der Niedrig- und Mitteldosisgruppe kam es hingegen zu keinen Veränderungen der Kortisolkonzentrationen. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass Everolimus dosisabhängig auf das neuroendokrine System wirkt und die Kortisolspiegel beeinflusst. In-vitro-Studien untersuchten im Rahmen der Erforschung therapeutischer Felder in der onkologischen Behandlung den gezielten Effekt der mTOR-Inhibition auf Nebennierenrindenzelllinien – dabei wurde neben dem onkologisch

gewünschten antiproliferativen Effekt auch eine Senkung der Kortisolproduktion unter Everolimus nachgewiesen (Martino et al., 2012). Inwiefern sich jedoch eine mTOR induzierte Senkung der Kortisolproduktion, die *in vitro* an Kortisol produzierenden Zellen selbst nachgewiesen wurde, auf eine Senkung bei systemischer Einnahme im Körper übertragen lässt, ist fraglich und erfordert weitere Studien.

Vor dem Hintergrund, dass Kortisol als Schlüsselhormon der HPA-Achse mit der Genese von Angst und depressiven Störungen in Verbindung gebracht wird, war es interessant zu prüfen, ob eine Veränderung der Kortisolspiegel durch Everolimus mit einer Veränderung der Zustandsangst in Verbindung steht. Die Messung von Plasma- und Speichelkortisol wird häufig als Indikator für die Aktivität der HPA-Achse und somit auch für emotionalen Stress herangezogen (Vedhara et al., 2003). Wir konnten in unseren Ergebnissen zwar einen Anstieg der Zustandsangst in der Niedrig- und Mitteldosisgruppe nachweisen, gleichzeitig ergab die Auswertung der Kortisolspiegel in diesen Gruppen zu diesen Messzeitpunkten aber keine signifikanten Veränderungen in Plasma und Speichel. In der Hochdosisgruppe hingegen kam es zwar zu einer signifikanten Abnahme der Kortisolspiegel, ohne dass sich jedoch Veränderungen der Zustandsangst in dieser Gruppe zeigten. Die von uns durchgeführte Korrelationsanalyse nach Spearman unterstützt, dass es keinen Zusammenhang zwischen diesen Parametern gab. Und die lediglich an T15 in der Niedrigdosisgruppe nachgewiesene isolierte positive Korrelation zwischen erhöhten Kortisolwerten und der Zustandsangst stellt keinen überzeugenden Beleg für eine generelle Korrelation zwischen Zustandsangst und systemischen Kortisolspiegeln dar.

In der bestehenden Literatur gibt es Widersprüche bezüglich der Beziehung zwischen Kortisolspiegeln und emotionaler Belastung, insbesondere in Bezug auf selbstberichteten Stress. Während einige Studien einen klaren Zusammenhang zwischen erhöhten Kortisolwerten und subjektiv empfundener emotionaler Belastung zeigten (Qin et al., 2023), konnten andere Studien diese Ergebnisse nicht belegen. Vedhara et. al (2003) untersuchten in ihrer Studie an Frauen, die in einer gynäkologischen Brustambulanz betreut wurden, die Beziehung zwischen emotionaler Belastung und Kortisolspiegeln. Zwischen den absoluten Kortisolwerten und den Belastungsmessungen war keine signifikante Beziehung erkennbar; lediglich die

Veränderungsrate der Kortisolwerte zeigte einen Zusammenhang mit der emotionalen Belastung der Frauen. Einige Jahre später untersuchten Leininger und Skeel (2012) wie absichtlich induzierte Zustandsangst – durch eine Prüfungssituation simuliert – die Leistung in neuropsychologischen Tests beeinflusst. Im Rahmen der Studie prüften sie außerdem, ob der durch den Stress potenziell erhöhte Kortisolspiegel mit der Zustandsangst korreliert. Analog zu unserer Studie wurde die Zustandsangst mittels Selbstbewertungsfragebögen erfasst. Es wurde dabei kein Zusammenhang zwischen der Zustandsangst und den absoluten Kortisolspiegeln der männlichen Probanden festgestellt (Leininger und Skeel, 2012). Unsere Daten stützen diese These, dass das emotionale Befinden und die Zustandsangst nicht unbedingt mit physiologischen Stressreaktionen, wie sie durch Kortisolspiegel gemessen werden, zusammenhängen.

Abschließend lässt sich sagen, dass die Ergebnisse der vorliegenden Studie wichtige Einblicke in die dosisabhängige Wirkung einer kurzzeitigen Einnahme von Everolimus auf immunologische, neuroendokrine und psychologische Parameter bei gesunden männlichen Probanden bieten. Durch die signifikante Suppression der IL-10-Sekretion konnte die immunmodulatorische Wirkung von Everolimus als potenzieller immunologischer Biomarker gezeigt werden. Ferner geben die dosisabhängigen Effekte von Everolimus auf die Kortisolkonzentrationen im Sinne einer Suppression in der Hochdosisgruppe, und der Anstieg der wahrgenommenen Zustandsangst in der Niedrig- und Mitteldosisgruppe Hinweise darauf, dass eine Inhibition des mTOR-Signalwegs zu Veränderungen neuroendokriner Parameter und psychologischen Verhaltens führen kann.

Da die Studie ausschließlich die kurzfristige Einnahme von Everolimus untersuchte, ist es derzeit nicht möglich, die beobachteten Ergebnisse auf eine langfristige Anwendung zu übertragen. Hierfür wären weiterführende Studien notwendig, die jedoch aus ethischen Gründen bei gesunden Probanden aufgrund potenzieller Nebenwirkungen schwer umsetzbar sind. Zusätzlich wäre es interessant, Untersuchungen speziell bei Frauen oder älteren Probanden durchzuführen, da unsere Forschung sich ausschließlich auf junge, männliche Probanden beschränkte. Beispielsweise gibt es geschlechtsspezifische Unterschiede bei der Kortisol-Ausschüttung im Zusammenhang

mit psychischen Erkrankungen (Zorn et al., 2017). Unsere Ergebnisse lassen sich daher nicht ohne Weiteres auf das weibliche Geschlecht, andere Alters- oder Patientengruppen übertragen.

Ein weiterer limitierender Faktor der Studie ist die geringe Stichprobengröße von 19 Probanden, wobei die einzelnen Dosisgruppen kleine Fallzahlen aufwiesen. Da sich die größten Effekte in der Hochdosisgruppe unter der viermaligen Einnahme von 3 mg Everolimus gezeigt haben, könnte eine Erweiterung speziell dieser Stichprobe dabei helfen, die Validität und Verlässlichkeit der Ergebnisse zu erhöhen und mögliche Verzerrungen durch kleine Fallzahlen zu minimieren.

Im Rahmen unseres weiteren Forschungsvorhabens zur Immunkonditionierung erscheint neben der Messung unspezifischer pharmakodynamischer Biomarker – wie der in dieser Arbeit als Effektparameter von Everolimus validierten IL-10-Sekretion und der bereits von unserer Forschungsgruppe als Wirksamkeitsparameter bestätigten Proliferationsmessung CD4- und CD8-positiver T-Zellen (Hörbelt et al. 2020) – insbesondere auch die Analyse der p70-S6-Kinase- und Akt-Protein-Aktivität/Phosphorylierung mittels Western Blot, als spezifischer Biomarker, vielversprechend und zielführend.

6 Zusammenfassung (deutsch)

Everolimus wird als potenter Inhibitor des mechanistic target of rapamycin (mTOR) zur Verhinderung von Transplantatabstoßungen, als modernes Krebstherapeutikum und bei Erkrankungen, die speziell den mTOR-Signalweg betreffen, eingesetzt. Trotz seiner Wirksamkeit wird Everolimus mit neuroendokrinen und psychischen Störungen assoziiert und therapielimitierende Nebenwirkungen erfordern eine sorgfältige Überwachung. Während Studien an Patienten und Patientinnen sowie in-vitro-Studien vorliegen, fehlen Daten zu pharmakokinetischen und -dynamischen Effekten bei gesunden Personen. In Studien mit Erkrankten bleibt oft unklar, ob Wirkungen und Nebenwirkungen auf Everolimus selbst oder auf begleitende Faktoren wie Komorbiditäten und Komedikation zurückzuführen sind. Vor diesem Hintergrund und aufgrund geplanter Forschungsaktivitäten zur Konditionierung von Immunfunktion mit Everolimus, war das Ziel dieser Studie, immunologische Biomarker zu validieren und den dosisabhängigen Effekt von Everolimus auf neuropsychologische Parameter zu untersuchen. Dazu wurden die systemischen Blutspiegel nach viermaliger oraler Gabe von drei Dosen (1,5, 2,25 und 3 mg) gemessen und die Sekretion spezifischer Zytokine (Interleukin (IL)-2 und IL-10) als pharmakodynamische Biomarker untersucht. Zur Analyse der neuropsychologischen Auswirkungen wurden die Kortisolspiegel gemessen, die Zustandsangst der Probanden erfasst und das Auftreten von Nebenwirkungen ermittelt. Die Ergebnisse zeigen, dass die kurzzeitige Einnahme von Everolimus in allen Dosisgruppen zu einer signifikanten Suppression der IL-10-Sekretion führt, wohingegen die IL-2-Sekretion nicht signifikant beeinflusst wird. Die Kortisolspiegel in Plasma und Speichel waren nur in der 3 mg-Gruppe reduziert. Im Gegensatz dazu führte lediglich die Einnahme in den 1,5 mg- und 2,25 mg-Gruppen zu einem Anstieg der Zustandsangst. Relevante medikamentenassoziierte Nebenwirkungen traten in keiner der drei Dosisgruppen auf. Die Ergebnisse bieten wertvolle Einblicke in die dosisabhängige Wirkung einer kurzzeitigen Einnahme von Everolimus auf immunologische Parameter, die Zytokin-Sekretion als möglichen Biomarker sowie Hinweise auf den Einfluss der mTOR-Inhibition auf neuroendokrine und psychologische Parameter bei gesunden Probanden.

7 Zusammenfassung (englisch)

Everolimus is used as a potent inhibitor of the mechanistic target of rapamycin (mTOR) for the prevention of transplant rejection, as a modern cancer therapy and for diseases that specifically affect the mTOR signaling pathway. Despite its efficacy, everolimus is associated with neuroendocrine and psychiatric disorders and treatment-limiting side effects require careful monitoring. While studies in patients and in vitro studies are available, data on pharmacokinetic and pharmacodynamic effects in healthy individuals are lacking. In patient studies, it often remains unclear whether effects and side effects are due to everolimus itself or to concomitant factors such as comorbidities and co-medication. Against this background and due to planned research activities on conditioning of immune function with everolimus, the aim of this study was to validate immunological biomarkers and to investigate the dose-dependent effect of everolimus on neuropsychological parameters. To this purpose, systemic blood levels were measured after four oral doses (1,5, 2,25 and 3 mg) and the secretion of specific cytokines (interleukin (IL)-2 and IL-10) was investigated as pharmacodynamic biomarkers. To analyze the neuropsychological effects, cortisol levels were measured, the subjects' state anxiety was recorded and the occurrence of side effects was determined. The results show that short-term use of everolimus leads to a significant suppression of interleukin-10 secretion in all dose groups, whereas interleukin-2 secretion is not significantly affected. The cortisol levels in plasma and saliva were only reduced in the high-dose 3 mg group. In contrast, only the intake in the 1,5 mg and 2,25 mg groups led to an increase in state anxiety. Relevant drug-related side effects did not occur in any of the three dose groups. The results provide valuable insights into the dose-dependent effect of short-term use of everolimus on immunological parameters and cytokine secretion as a possible biomarker, as well as indications of the influence of mTOR inhibition on neuroendocrine and psychological parameters in healthy volunteers.

8 Literaturverzeichnis

1. Ader, R. (2000). On the development of psychoneuroimmunology. *European Journal of Pharmacology* 405, 167-176.
2. Ader, R., und Cohen, N. (1975). Behaviorally Conditioned Immunosuppression. *Psychosomatic Medicine* 37, 333.
3. Ader, R., und Cohen, N. (1982). Behaviorally conditioned immunosuppression and murine systemic lupus erythematosus. *Science (New York, N.Y.)* 215, 1534-1536.
4. Albring, A., Wendt, L., Benson, S., Nissen, S., Yavuz, Z., Engler, H., Witzke, O., und Schedlowski, M. (2014). Preserving learned immunosuppressive placebo response: perspectives for clinical application. *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 96, 247-255.
5. Arena, C., Bizzoca, M.E., Caponio, V.C.A., Troiano, G., Zhurakivska, K., Leuci, S., und Lo Muzio, L. (2021). Everolimus therapy and side-effects: A systematic review and meta-analysis. *International Journal of Oncology* 59.
6. Bandelow, B., Lichte, T., Rudolf, S., Wiltink, J., und Beutel, M. (2015). S3-Leitlinie Angststörungen (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg).
7. Barsky, A.J., Saintfort, R., Rogers, M.P., und Borus, J.F. (2002). Nonspecific medication side effects and the placebo phenomenon. *JAMA* 287, 622-627.
8. Behrends, J.C., Bischofberger, J., Deutzmann, R., Ehmke, H., Frings, S., Grissmer, S., Hoth, M., Kurtz, A., Leipziger, J., Müller, F., Pedain, C., Rettig, J., Wagner, C., und Wischmeyer, E. (2021). *Duale Reihe Physiologie* (Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG).

9. Bekinschtein, P., Katche, C., Slipczuk, L.N., Igaz, L.M., Cammarota, M., Izquierdo, I., und Medina, J.H. (2007). mTOR signaling in the hippocampus is necessary for memory formation. *Neurobiology of Learning and Memory* 87, 303-307.
10. Benson, S., und Elsenbruch, S. (2019). No Reason to Feel Sick? Nocebo Responses in the Placebo Arms of Experimental Endotoxemia Studies. *Frontiers in Psychiatry* 10, 511.
11. Bissler, J.J., Kingswood, J.C., Radzikowska, E., Zonnenberg, B.A., Frost, M., Belousova, E., Sauter, M., Nonomura, N., Brakemeier, S., de Vries, P.J., Whittmore, V.H., Chen, D., Sahmoud, T., Shah, G., Lincy, J., Lebwohl, D., und Budde, K. (2013). Everolimus for angiomyolipoma associated with tuberous sclerosis complex or sporadic lymphangiomyomatosis (EXIST-2): a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet (London, England)* 381, 817-824.
12. Bjornsti, M.-A., und Houghton, P.J. (2004). The TOR pathway: a target for cancer therapy. *Nature Reviews Cancer* 4, 335-348.
13. Böhler, T., Nolting, J., Kamar, N., Gurraghaa, P., Reisener, K., Glander, P., Neumayer, H.-H., Budde, K., und Klupp, J. (2007). Validation of immunological biomarkers for the pharmacodynamic monitoring of immunosuppressive drugs in humans. *Therapeutic Drug Monitoring* 29, 77-86.
14. Böhler, T., Waiser, J., Lichter, S., Schumann, B., Neumayer, H.-H., Kamar, N., und Budde, K. (2008). Pharmacodynamic effects of everolimus on anti-CD3 antibody-stimulated T-lymphocyte proliferation and interleukin-10 synthesis in stable kidney-transplant patients. *Cytokine* 42, 306-311.

15. Bösche, K., Weissenborn, K., Christians, U., Witzke, O., Engler, H., Schedlowski, M., und Hadamitzky, M. (2015). Neurobehavioral consequences of small molecule-drug immunosuppression. *Neuropharmacology* 96, 83-93.
16. Budde, K., Neumayer, H.-H., Lehne, G., Winkler, M., Hauser, I.A., Lison, A., Fritsche, L., Soulillou, J.-P., Fauchald, P., und Dantal, J. (2004). Tolerability and steady-state pharmacokinetics of everolimus in maintenance renal transplant patients. *Nephrology, Dialysis, Transplantation: Official Publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 19, 2606-2614.
17. Caron, A., Richard, D., und Laplante, M. (2015). The Roles of mTOR Complexes in Lipid Metabolism. *Annual Review of Nutrition* 35, 321-348.
18. Chan, D.L., Segelov, E., und Singh, S. (2017). Everolimus in the management of metastatic neuroendocrine tumours. *Therapeutic Advances in Gastroenterology* 10, 132-141.
19. Cleary, C., Linde, J.A.S., Hiscock, K.M., Hadas, I., Belmaker, R.H., Agam, G., Flaisher-Grinberg, S., und Einat, H. (2008). Antidepressive-like effects of rapamycin in animal models: Implications for mTOR inhibition as a new target for treatment of affective disorders. *Brain Research Bulletin* 76, 469-473.
20. Curatolo, P., und Moavero, R. (2012). mTOR Inhibitors in Tuberous Sclerosis Complex. *Current Neuropharmacology* 10, 404-415.
21. Döcke, W.-D., Asadullah, K., Belbe, G., Ebeling, M., Höflich, C., Friedrich, M., Sterry, W., und Volk, H.-D. (2009). Comprehensive biomarker monitoring in cytokine therapy: heterogeneous, time-dependent, and persisting immune effects of interleukin-10 application in psoriasis. *Journal of Leukocyte Biology* 85, 582-593.

22. Dumont, F.J., und Su, Q. (1996). Mechanism of action of the immunosuppressant rapamycin. *Life Sciences* 58, 373-395.
23. Eng, C.P., Sehgal, S.N., und Vézina, C. (1984). Activity of rapamycin (AY-22,989) against transplanted tumors. *The Journal of Antibiotics* 37, 1231-1237.
24. Exton, M.S., Elfers, A., Jeong, W.Y., Bull, D.F., Westermann, J., und Schedlowski, M. (2000). Conditioned suppression of contact sensitivity is independent of sympathetic splenic innervation. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 279, R1310-5.
25. Fiksdal, A., Hanlin, L., Kuras, Y., Gianferante, D., Chen, X., Thoma, M.V., und Rohleder, N. (2019). Associations between symptoms of depression and anxiety and cortisol responses to and recovery from acute stress. *Psychoneuroendocrinology* 102, 44-52.
26. Goebel, M.U., Trebst, A.E., Steiner, J., Xie, Y.F., Exton, M.S., Frede, S., Canbay, A.E., Michel, M.C., Heemann, U., und Schedlowski, M. (2002). Behavioral conditioning of immunosuppression is possible in humans. *The FASEB Journal* 16, 1869-1873.
27. Guba, M., Breitenbuch, P. von, Steinbauer, M., Koehl, G., Flegel, S., Hornung, M., Bruns, C.J., Zuelke, C., Farkas, S., Anthuber, M., Jauch, K.-W., und Geissler, E.K. (2002). Rapamycin inhibits primary and metastatic tumor growth by antiangiogenesis: involvement of vascular endothelial growth factor. *Nature Medicine* 8, 128-135.
28. Hadamitzky, M., Herring, A., Keyvani, K., Doenlen, R., Krügel, U., Bösche, K., Orłowski, K., Engler, H., und Schedlowski, M. (2014). Acute systemic rapamycin induces neurobehavioral alterations in rats. *Behavioural Brain Research* 273, 16-22.

29. Hadamitzky, M., Herring, A., Kirchhof, J., Bendix, I., Haight, M.J., Keyvani, K., Lückemann, L., Unteroberdörster, M., und Schedlowski, M. (2018). Repeated Systemic Treatment with Rapamycin Affects Behavior and Amygdala Protein Expression in Rats. *The International Journal of Neuropsychopharmacology* 21, 592-602.
30. Hadamitzky, M., Lückemann, L., Pacheco-López, G., und Schedlowski, M. (2020). Pavlovian Conditioning of Immunological and Neuroendocrine Functions. *Physiological Reviews* 100, 357-405.
31. Halloran, J., Hussong, S.A., Burbank, R., Podlitskaya, N., Fischer, K.E., Sloane, L.B., Austad, S.N., Strong, R., Richardson, A., Hart, M.J., und Galvan, V. (2012). Chronic inhibition of mammalian target of rapamycin by rapamycin modulates cognitive and non-cognitive components of behavior throughout lifespan in mice. *Neuroscience* 223, 102-113.
32. Hartmann, B. (2012). p70S6 kinase phosphorylation for pharmacodynamic monitoring. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry* 413, 1387-1390.
33. Hetze, S., Barthel, L., Lückemann, L., Günther, H.S., Wülfing, C., Salem, Y., Jakobs, M., Hörbelt-Grünheidt, T., Petschulat, J., Bendix, I., Weber-Stadlbauer, U., Sure, U., Schedlowski, M., und Hadamitzky, M. (2022). Taste-immune associative learning amplifies immunopharmacological effects and attenuates disease progression in a rat glioblastoma model. *Brain, Behavior, and Immunity* 106, 270-279.
34. Hoeffler, C.A., und Klann, E. (2010). mTOR signaling: at the crossroads of plasticity, memory and disease. *Trends in Neurosciences* 33, 67-75.
35. Hörbelt, T., Kahl, A.L., Kolbe, F., Hetze, S., Wilde, B., Witzke, O., und Schedlowski, M. (2020). Dose-Dependent Acute Effects of Everolimus

- Administration on Immunological, Neuroendocrine and Psychological Parameters in Healthy Men. *Clinical and Translational Science* 13, 1251-1259.
36. Hörbelt, T., Martínez-Gómez, E.M., Hadamitzky, M., Schedlowski, M., und Lückemann, L. (2019). Behaviorally conditioned immunosuppression with cyclosporine A forms long lasting memory trace. *Behavioural Brain Research* 376, 112208.
37. Ishii, R., Wataya-Kaneda, M., Canuet, L., Nonomura, N., Nakai, Y., und Takeda, M. (2015). Everolimus improves behavioral deficits in a patient with autism associated with tuberous sclerosis: a case report. *Neuropsychiatric Electrophysiology* 1, 6.
38. Iwasaki, K., Kitahata, N., Miwa, Y., Uchida, K., Matsuoka, Y., Horimi, K., und Kobayashi, T. (2019). Suppressive Effect of Everolimus on IL-2, IL-10, IL-21, and IFN γ Levels: Implications for the Successful Minimization of Calcineurin Inhibitor Use in Transplantation. *Therapeutic Drug Monitoring* 41, 371-375.
39. Jakobs, M., Hörbelt-Grünheidt, T., Hadamitzky, M., Bihorac, J., Salem, Y., Leisengang, S., Christians, U., Schniedewind, B., Schedlowski, M., und Lückemann, L. (2024). The Effects of Fingolimod (FTY720) on Leukocyte Subset Circulation cannot be Behaviourally Conditioned in Rats. *Journal of Neuroimmune Pharmacology: the official Journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology* 19, 18.
40. Jinquan, T., Larsen, C.G., Gesser, B., Matsushima, K., und Thestrup-Pedersen, K. (1993). Human IL-10 is a chemoattractant for CD8⁺ T lymphocytes and an inhibitor of IL-8-induced CD4⁺ T lymphocyte migration. *The Journal of Immunology* 151, 4545-4551.
41. Kaufmann, S.H.E. (2014). *Basiswissen Immunologie* (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg).

42. Kirchhof, J., Petrakova, L., Brinkhoff, A., Benson, S., Schmidt, J., Unteroberdörster, M., Wilde, B., Kaptchuk, T.J., Witzke, O., und Schedlowski, M. (2018). Learned immunosuppressive placebo responses in renal transplant patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *115*, 4223-4227.
43. Kirchner, G.I., Meier-Wiedenbach, I., und Manns, M.P. (2004). Clinical pharmacokinetics of everolimus. *Clinical Pharmacokinetics* *43*, 83-95.
44. Klosterhalfen, W., und Klosterhalfen, S. (1983). Pavlovian conditioning of immunosuppression modifies adjuvant arthritis in rats. *Behavioral Neuroscience* *97*, 663-666.
45. Koehl, M., Ladevèze, E., Catania, C., Cota, D., und Abrous, D.N. (2021). Inhibition of mTOR signaling by genetic removal of p70 S6 kinase 1 increases anxiety-like behavior in mice. *Translational Psychiatry* *11*, 165.
46. Kovarik, J.M., Hartmann, S., Figueiredo, J., Rordorf, C., Golor, G., Lison, A., Budde, K., und Neumayer, H.H. (2002a). Effect of food on everolimus absorption: quantification in healthy subjects and a confirmatory screening in patients with renal transplants. *Pharmacotherapy* *22*, 154-159.
47. Kovarik, J.M., Hartmann, S., Figueiredo, J., Rouilly, M., Port, A., und Rordorf, C. (2002b). Effect of rifampin on apparent clearance of everolimus. *The Annals of Pharmacotherapy* *36*, 981-985.
48. Kwiatkowski, D.J. (2003). Tuberous sclerosis: from tubers to mTOR. *Annals of Human Genetics* *67*, 87-96.
49. Lang, U.E., Heger, J., Willbring, M., Domula, M., Matschke, K., und Tugtekin, S.M. (2009). Immunosuppression using the mammalian target of rapamycin

- (mTOR) inhibitor everolimus: pilot study shows significant cognitive and affective improvement. *Transplantation Proceedings* 41, 4285-4288.
50. Laux, L., Glanzmann, P., Schaffner, P., und Spielberger, C.D. (1981). State-Trait-Angstinventar (STAI) (Weinheim: Beltz).
51. Leininger, S., und Skeel, R. (2012). Cortisol and self-report measures of anxiety as predictors of neuropsychological performance. *Archives of Clinical Neuropsychology: the official Journal of the National Academy of Neuropsychologists* 27, 318-328.
52. Lückemann, L., Hetze, S., Hörbelt, T., Jakobs, M., Schedlowski, M., und Hadamitzky, M. (2021). Incomplete reminder cues trigger memory reconsolidation and sustain learned immune responses. *Brain, Behavior, and Immunity* 95, 115-121.
53. Lückemann, L., Stangl, H., Straub, R.H., Schedlowski, M., und Hadamitzky, M. (2020). Learned Immunosuppressive Placebo Response Attenuates Disease Progression in a Rodent Model of Rheumatoid Arthritis. *Arthritis & Rheumatology (Hoboken, N.J.)* 72, 588-597.
54. MacNeil, I.A., Suda, T., Moore, K.W., Mosmann, T.R., und Zlotnik, A. (1990). IL-10, a novel growth cofactor for mature and immature T cells. *The Journal of Immunology* 145, 4167-4173.
55. Marteau, T.M., und Bekker, H. (1992). The development of a six-item short-form of the state scale of the Spielberger State-Trait Anxiety Inventory (STAI). *The British Journal of Clinical Psychology* 31, 301-306.
56. Martel, R.R., Klicius, J., und Galet, S. (1977). Inhibition of the immune response by rapamycin, a new antifungal antibiotic. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 55, 48-51.

57. Martino, M.C. de, van Koetsveld, P.M., Feelders, R.A., Sprij-Mooij, D., Waaijers, M., Lamberts, S.W.J., Herder, W.W. de, Colao, A., Pivonello, R., und Hofland, L.J. (2012). The role of mTOR inhibitors in the inhibition of growth and cortisol secretion in human adrenocortical carcinoma cells. *Endocrine-Related Cancer* 19, 351-364.
58. Migita, K., Eguchi, K., aoyagi, T., Tsukada, T., Tsuboi, M., Kawabe, Y., und Nagataki, S. (1996). The effects of the immunosuppressant rapamycin on the growth of rheumatoid arthritis (RA) synovial fibroblast. *Clinical and Experimental Immunology* 104, 86-91.
59. Mir, O., Salvador, A., Dauchy, S., Ropert, S., Lemogne, C., und Gaillard, R. (2018). Everolimus induced mood changes in breast cancer patients: a case-control study. *Invest New Drugs* 36, 503-508.
60. Moreau-Bachelard, C., Robert, M., Gourmelon, C., Bourbouloux, E., Patsouris, A., Frenel, J.-S., und Campone, M. (2023). Evaluating everolimus for the treatment of breast cancer. *Expert Opinion on Pharmacotherapy* 24, 1105-1111.
61. Nguyen, L.S., Vautier, M., Allenbach, Y., Zahr, N., Benveniste, O., Funck-Brentano, C., und Salem, J.-E. (2019). Sirolimus and mTOR Inhibitors: A Review of Side Effects and Specific Management in Solid Organ Transplantation. *Drug Safety* 42, 813-825.
62. Novartis Pharma GmbH (2024a). Afinitor® Fachinformation (Zusammenfassung der Merkmale des Arzneimittels/SmPC). <https://www.novartis.com/de-de/products-list>; Zugriff am: 13.03.2025
63. Novartis Pharma GmbH (2024b). Certican® Tabletten Fachinformation (Zusammenfassung der Merkmale des Arzneimittels/SmPC). <https://www.novartis.com/de-de/products-list>; Zugriff am: 13.03.2025

64. Pavlov, I.P. (1927). *Conditioned Reflexes: An Investigation of the Physiological Activity of the Cerebral Cortex*. Translated and Edited by G.V. Anrep. Oxford University Press, London.
65. Popova, N.V., und Jücker, M. (2021). The Role of mTOR Signaling as a Therapeutic Target in Cancer. *International Journal of Molecular Sciences* 22.
66. Qin, N., Yi, S., Dai, C., Liu, X., Duan, Y., Zhou, Y., Wan, Z., Kang, Y., Zhou, X., Xie, J., und Cheng, A.S.K. (2023). Associations of serum cortisol and inflammatory marker features with depression and anxiety in young women with gynecologic cancer. *Supportive Care in Cancer: official Journal of the Multinational Association of Supportive Care in Cancer* 31, 674.
67. Rief, W., Glombiewski, J.A., und Barsky, A.J. (2024). Generic Assessment of Side Effects (GASE) (PsychArchives).
68. Russo, E., Leo, A., Crupi, R., Aiello, R., Lippiello, P., Spiga, R., Chimirri, S., Citraro, R., Cuzzocrea, S., Constanti, A., und De Saro, G. (2016). Everolimus improves memory and learning while worsening depressive- and anxiety-like behavior in an animal model of depression. *Journal of Psychiatric Research* 78, 1-10.
69. Säemann, M.D., Haidinger, M., Hecking, M., Hörl, W.H., und Weichhart, T. (2009). The multifunctional role of mTOR in innate immunity: implications for transplant immunity. *American Journal of Transplantation: official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 9, 2655-2661.
70. Salvadori, M. (2011). Long-term outcome of everolimus treatment in transplant patients. *TRRM*, 77.

71. Sánchez-Fructuoso, A.I. (2008). Everolimus: an update on the mechanism of action, pharmacokinetics and recent clinical trials. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology* 4, 807-819.
72. Saran, U., Foti, M., und Dufour, J.-F. (2015). Cellular and molecular effects of the mTOR inhibitor everolimus. *Clinical Science (London)* 129, 895-914.
73. Sato, A., Kasai, S., Kobayashi, T., Takamatsu, Y., Hino, O., Ikeda, K., und Mizuguchi, M. (2012). Rapamycin reverses impaired social interaction in mouse models of tuberous sclerosis complex. *Nature Communications* 3, 1292.
74. Saxena, A., Khosraviani, S., Noel, S., Mohan, D., Donner, T., und Hamad, A.R.A. (2015). Interleukin-10 paradox: A potent immunoregulatory cytokine that has been difficult to harness for immunotherapy. *Cytokine* 74, 27-34.
75. Schedlowski, M., und Pacheco-López, G. (2010). The learned immune response: Pavlov and beyond. *Brain, Behavior, and Immunity* 24, 176-185.
76. Schmelzle, T., und Hall, M.N. (2000). TOR, a central controller of cell growth. *Cell* 103, 253-262.
77. Schuler, W., Sedrani, R., Cottens, S., Häberlin, B., Schulz, M., Schuurman, H.-J., Zenke, G., Zerwes, H.-G., und Schreier, M.H. (1997). SDZ RAD, A NEW RAPAMYCIN DERIVATIVE: Pharmacological Properties In Vitro and In Vivo. *Transplantation* 64, 36.
78. Shipkova, M., Hesselink, D.A., Holt, D.W., Billaud, E.M., van Gelder, T., Kunicki, P.K., Brunet, M., Budde, K., Barten, M.J., de Simone, P., Wieland, E., López, O.M., Masuda, S., Seger, C., Picard, N., Oellerich, M., Langman, L.J., Wallemacq, P., Morris, R.G., Thompson, C., und Marquet, P. (2016). Therapeutic Drug Monitoring of Everolimus: A Consensus Report. *Therapeutic Drug Monitoring* 38, 143-169.

79. Shipkova, M., und Wieland, E. (2012). Surface markers of lymphocyte activation and markers of cell proliferation. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry* 413, 1338-1349.
80. Tedesco-Silva, H., Saliba, F., Barten, M.J., Simone, P. de, Potena, L., Gottlieb, J., Gawai, A., Bernhardt, P., und Pascual, J. (2022). An overview of the efficacy and safety of everolimus in adult solid organ transplant recipients. *Transplantation Reviews (Orlando, Fla.)* 36, 100655.
81. Vedhara, K., Miles, J., Bennett, P., Plummer, S., Tallon, D., Brooks, E., Gale, L., Munnoch, K., Schreiber-Kounine, C., Fowler, C., Lightman, S., Sammon, A., Rayter, Z., und Farndon, J. (2003). An investigation into the relationship between salivary cortisol, stress, anxiety and depression. *Biological Psychology* 62, 89-96.
82. Vézina, C., Kudelski, A., und Sehgal, S.N. (1975). Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle. *The Journal of Antibiotics*. 28, 721-726.
83. Wiegand, G., May, T.W., Ostertag, P., Boor, R., Stephani, U., und Franz, D.N. (2013). Everolimus in tuberous sclerosis patients with intractable epilepsy: a treatment option? *European Journal of Paediatric Neurology: EJPN: official Journal of the European Paediatric Neurology Society* 17, 631-638.
84. Wieland, E., und Shipkova, M. (2014). Biomarker im Blut zur Individualisierung der immunsuppressiven Therapie nach der Transplantation solider Organe. *Journal of Laboratory Medicine* 38, 333-343.
85. Wirth, T., Ober, K., Prager, G., Vogelsang, M., Benson, S., Witzke, O., Kribben, A., Engler, H., und Schedlowski, M. (2011). Repeated recall of learned immunosuppression: evidence from rats and men. *Brain, Behavior, and Immunity* 25, 1444-1451.

86. Young, A.H. (2004). Cortisol in mood disorders. *Stress (Amsterdam, Netherlands)* 7, 205-208.
87. Yu, P., Laird, A.D., Du, X., Wu, J., Won, K.-A., Yamaguchi, K., Hsu, P.P., Qian, F., Jaeger, C.T., Zhang, W., Buhr, C.A., Shen, P., Abulafia, W., Chen, J., Young, J., Plonowski, A., Yakes, F.M., Chu, F., Lee, M., Bentzien, F., Lam, S.T., Dale, S., Matthews, D.J., Lamb, P., and Foster, P. (2014). Characterization of the activity of the PI3K/mTOR inhibitor XL765 (SAR245409) in tumor models with diverse genetic alterations affecting the PI3K pathway. *Molecular Cancer Therapeutics* 13, 1078-1091.
88. Ziemssen, T., und Kern, S. (2007). Psychoneuroimmunology – cross-talk between the immune and nervous systems. *Journal of Neurology* 254 Suppl 2, II8-II11.
89. Zorn, J.V., Schür, R.R., Boks, M.P., Kahn, R.S., Joëls, M., und Vinkers, C.H. (2017). Cortisol stress reactivity across psychiatric disorders: A systematic review and meta-analysis. *Psychoneuroendocrinology* 77, 25-36.
90. Zou, Z., Tao, T., Li, H., und Zhu, X. (2020). mTOR signaling pathway and mTOR inhibitors in cancer: progress and challenges. *Cell & Bioscience* 10, 31.

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Soziodemografische, physiologische und psychologische Merkmale der Dosisgruppen vor Studienbeginn.....	30
Tabelle 2: Systemische Everolimusspiegel im Blut	31
Tabelle 3: Empfundene Symptomintensität und Medikamentenattribution (GASE-Fragebogen) unter Everolimuseinnahme.....	34

10 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Studiendesign	25
Abbildung 2: Effekt von Everolimus auf die IL-2-Sekretion von mitogenstimulierten PBMCs	32
Abbildung 3: Effekt von Everolimus auf die IL-10-Sekretion von mitogenstimulierten PBMCs	33
Abbildung 4: Effekt von Everolimus auf die Kortisolkonzentration im Blutplasma	35
Abbildung 5: Effekt von Everolimus auf die Kortisolkonzentration im Speichel	36
Abbildung 6: Einfluss von Everolimus auf die Zustandsangst (STAI-State).....	37

11 Abkürzungsverzeichnis

ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
Akt	Protein Kinase B
AUC	Area under the curve (Konzentrations-Zeit-Kurve)
BMI	Body-Mass-Index
CD	Cluster of Differentiation
CR	Conditioned response (Konditionierte Reaktion)
CRH	Corticotropin-Releasing-Hormon
CS	Conditioned stimulus (Konditionierter Stimulus)
CTA	Conditioned taste avoidance (Konditionierte Geschmacksaversion)
CTCAE	Common Terminology Criteria for Adverse Events
CYP	Cytochrom-P450
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FKBP12	12-kDa-FK506-bindendes Protein
GASE	Generic Assessment of Side Effects (Fragebogen zur allgemeinen Bewertung von Nebenwirkungen)
HER2/neu	Humaner epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor 2
HPA-Achse	Hypothalamic-pituitary-adrenal axis (Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse)
mTOR	Mechanistic Target of Rapamycin
mTORC	mTOR Complex

PBS	Phosphate-buffered saline (phosphatgepufferte Salzlösung)
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinasen
PIKK	Phosphoinositid-3-Kinasen ähnliche Kinasen
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PIP3	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat
PMBCs	Peripheral blood mononuclear cells (Mononukleäre Zellen aus dem peripheren Blut)
PNI	Psychoneuroimmunologie
RCF	Relative centrifugal force (Relative Zentrifugalbeschleunigung)
SD	Standardabweichung
STAI	State-Trait-Anxiety-Inventory (State-Trait-Angstinventar)
TDM	Therapeutic Drug Monitoring (Therapeutisches Arzneimittelmonitoring)
TNF	Tumornekrosefaktor
TSC	Tuberous Sclerosis Complex
UCR	Unconditioned response (Unkonditionierte Reaktion)
UCS	Unconditioned stimulus (Unkonditionierter Stimulus)
4E-BP1	Eukaryotisches Initiationsfaktor-4E-bindendes Protein 1

12 Danksagung

Zunächst möchte ich meinem Doktorvater Prof. Dr. Manfred Schedlowski für die Möglichkeit sowie Betreuung der Anfertigung meiner Dissertation am Institut für Medizinische Psychologie und Verhaltensimmunbiologie danken.

Mein Dank gilt dem gesamten Team des Instituts für die herzliche Aufnahme und angenehme Arbeitsatmosphäre. Alexandra Kornowski danke ich für ihre tatkräftige Unterstützung im Labor. Darüber hinaus möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Oliver Witzke (Klinik für Infektiologie) und Herrn Prof. Dr. Benjamin Wilde (Klinik für Nephrologie) für die Zusammenarbeit sowie bei Frau Dr. Susann Hetze und Herrn Dr. Bastian Tebbe für die kompetente ärztliche Betreuung der Studie bedanken.

Ein besonderer Dank gilt Dr. Anna Lena Friedel und Dr. Tina Hörbelt-Grünheidt für die wunderbare und lehrreiche gemeinsame Zeit während der Studie und das Begleiten meiner ersten Schritte im Labor. Danke für euer immer offenes Ohr, eure anhaltende Motivation sowie emotionale und fachliche Unterstützung. Es war ein großes Glück, diesen Weg mit euch zu gehen, und ich bin sehr dankbar für eure wertvolle Begleitung und das mir entgegengebrachte Vertrauen. Ebenso danke ich Marie Jakobs für die wertvollen Diskussionen biologischer Fragen und das sorgfältige Gegenlesen dieser Arbeit.

Zuletzt möchte ich mich von Herzen bei meinen Eltern Uwe und Anne für ihre bedingungslose Liebe, Vertrauen, Rückhalt und Unterstützung in allen Lebenslagen bedanken. Und Thomas – danke für deine unermessliche Geduld, deinen Zuspruch auf meinem gesamten Weg in der Medizin und dafür, dass du stets an meiner Seite stehst und mir in jeder Herausforderung Halt gibst.

13 Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.