

Aus der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie der
Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Frühe Vorhersage akuter und chronischer Abstoßung
nach Dünndarmtransplantation
in Tacrolimus behandelten Ratten

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Maren Susann Dreißas
aus Berlin

Datum der Promotion: 05.12.2014

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	4
1.1 Die Dünndarmtransplantation	4
1.1.1 Geschichtliche Entwicklung der Dünndarmtransplantation.....	4
1.1.2 Indikation zur Transplantation.....	5
1.1.3 Epidemiologie.....	6
1.1.4 Transplantationsarten.....	7
1.2 Immunologie des Dünndarms	7
1.2.1 Anatomie des intestinalen Immunsystems.....	7
1.2.2 Antigen-abhängige Immunreaktion.....	8
1.2.3 Immunsuppressive Möglichkeiten.....	10
1.2.4 Postoperative Infektion.....	11
1.2.5 Monitoring nach Dünndarmtransplantation.....	11
1.3 Rejektionsmarker	12
1.3.1 CD3.....	12
1.3.2 Perforin.....	13
1.3.3 Alpha-1,2-Mannosidase.....	13
1.3.4 Tolerance associated gene-1.....	14
1.3.5 Lipopolysaccharide Binding Protein.....	15
1.3.6 B-Zell-IgG und Alloantikörper.....	15
1.4 Aufgabenstellung	16
2 Material und Methoden	18
2.1 Versuchsaufbau	18
2.1.1 Modell.....	18
2.1.2 Versuchstiere.....	18
2.1.3 Tierschutzrechtliche Genehmigung.....	18
2.1.4 Gruppeneinteilung.....	18
2.2 Operation, Applikation und Probenentnahme	19
2.2.1 Operationsmethode.....	19
2.2.2 Explantation.....	19
2.2.3 Implantation.....	20
2.2.4 postoperative Therapie.....	21
2.2.5 Beobachtungszeitraum und Probenentnahme.....	22
2.3 Realtime Reverse-Transkriptase-PCR	23

2.3.1 Leukozytenisolierung.....	23
2.3.2 RNA-Isolierung	23
2.3.3 cDNA-Synthese der Organproben.....	24
2.3.4 cDNA-Synthese der Blutproben	24
2.3.5 Primer und Sonden	25
2.3.6 Messung.....	25
2.4 Morphologie	26
2.4.1 Schnittanfertigung.....	26
2.4.2 Hämatoxylin – Eosin Färbung	26
2.4.3 Auswertung.....	26
2.5 Immunhistochemische Färbung mittels APAAP	27
2.5.1 Schnittanfertigung.....	27
2.5.2 Färbung.....	28
2.5.3 Auswertung.....	28
2.6.1 ELISA Ansatz	29
2.6.2 Auswertung.....	29
2.7 LPS-Vollblut-Stimulation	29
2.7.1 Stimulation.....	29
2.7.2 Auswertung.....	30
2.8 Alloantikörper-Screening der Rattenserum	30
2.8.1 FACS-Ansatz.....	30
2.8.2 Auswertung.....	31
2.9 Statistische Auswertung.....	31
2.10 Material.....	31
3 Ergebnisse.....	35
3.1 Überleben.....	35
3.2 Histologie.....	36
3.2.1 Tag 7.....	36
3.2.2 Tag 14.....	38
3.2.3 Tag 45.....	39
3.3 Immunhistochemie.....	40
3.4 rtPCR der Organproben	44
3.4.1 CD3-Expression im Dünndarmtransplantat.....	44
3.4.2 Perforin Expression im Dünndarmtransplantat.....	44
3.4.3 Alpha-1,2-Mannosidase Expression im Dünndarmtransplantat.....	45

3.4.4 TOAG-1 Expression im Dünndarmtransplantat.....	46
3.5 rtPCR der Blutproben	47
3.5.1 CD3 Expression in peripheren Blutproben.....	47
3.5.2 Perforin Expression in peripheren Blutproben	47
3.5.3 Alpha-1,2-Mannosidase Expression in peripheren Blutproben	48
3.5.4 TOAG-1 Expression in peripheren Blutproben.....	49
3.6 Lipopolysaccharid binding protein.....	51
3.8 Humorale Immunantwort	54
3.8.1 rtPCR der B-Zell-IgG Expression in den Organproben.....	54
3.8.2 FACS-Messung der Alloantikörper in peripheren Plasmaproben.....	55
4 Diskussion	58
4. 1 Diskussion der angewandten Methodik	58
4. 2 Diskussion der Ergebnisse	61
5 Zusammenfassung.....	68
6 Abstract.....	69
7 Literatur.....	70
8 Glossar.....	78
9 Lebenslauf	80
10 Eidesstattliche Versicherung	81
11 Danksagung.....	82

1 Einleitung

1.1 Die Dünndarmtransplantation

1.1.1 Geschichtliche Entwicklung der Dünndarmtransplantation

Die Dünndarmtransplantation (DDTx) ist nach wie vor ein sehr junges und weitreichend unerforschtes Gebiet in der Transplantationschirurgie. Aufgrund der hohen Expression von Histokompatibilitätsantigenen und des großen Anteils vorhandener Leukozyten stellt der Dünndarm ein hoch immunogenes Organ dar, sodass nicht beherrschbare akute Abstoßungsreaktionen, systemische Infektionen und auch die Graft-versus-Host-Disease (GVHD) lange Zeit die Entwicklung der DDTx einschränkten.^{1, 2}

Technische Fortschritte und die aussichtsreiche Nutzung von Cyclosporin A in anderen Transplantationsmodellen führten zur ersten erfolgreichen Dünndarmtransplantation im Rahmen einer Multiviszeraltransplantation durch Starzl et al. 1987 in Pittsburgh, USA. Das transplantierte Kind überlebte 6 Monate mit vollständig funktionierender intestinaler Funktion und starb ohne Anzeichen einer Rejektion an einem EBV assoziierten B-Zell-Lymphom.³

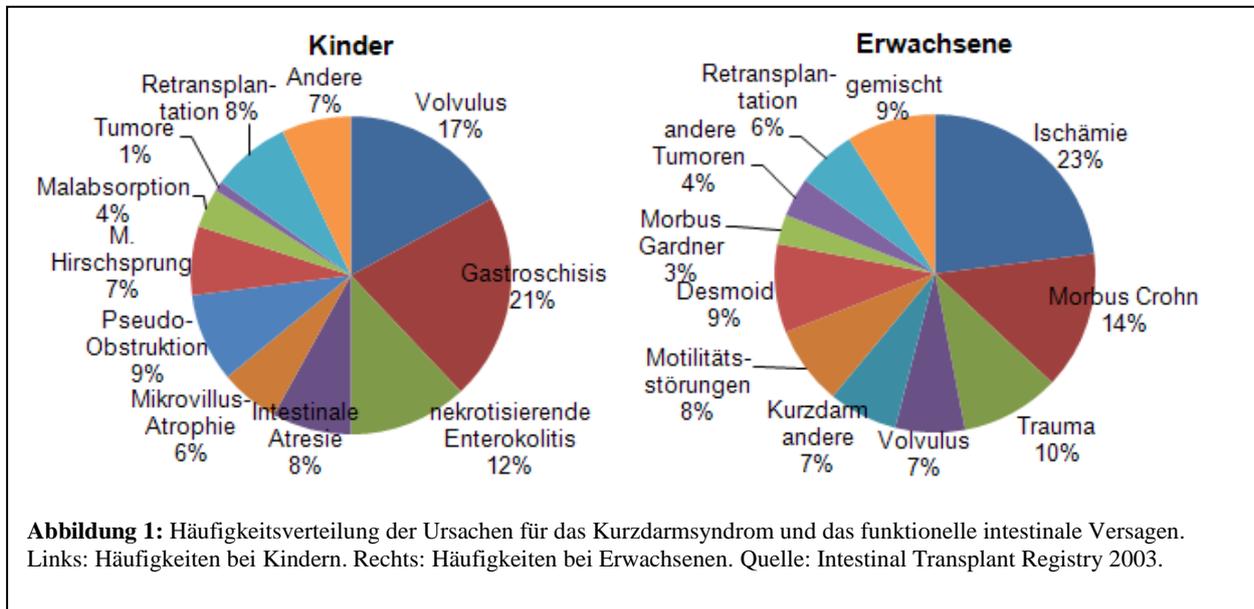
Die erste erfolgreiche isolierte Dünndarmtransplantation wurde ebenfalls 1987 in Kiel, Deutschland, von dem Team um Eberhardt Deltz durchgeführt. Dabei handelte es sich um eine Lebendspende von 60 cm Jejunum zwischen histokompatiblen Schwestern. Die Transplantatempfängerin verstarb nach 56 Monaten.⁴

Trotz technisch erfolgreicher Transplantationen und dem Einsatz neuerer Immunsuppressiva wie Cyclosporin A und Azathioprin blieb das Transplantat- und Empfängerüberleben bescheiden.⁵⁻⁷ Erst 1994 mit der Einführung von Tacrolimus in den klinischen Gebrauch kam es aufgrund der besseren Immunsuppression zu deutlich verbesserten Überlebensraten, sodass die Anzahl der jährlich durchgeführten Dünndarmtransplantationen bis heute kontinuierlich zu nahm.⁸ Mit der Veröffentlichung der Kosten-Effektivitätsanalyse von Abu-Elmagd et al. 1999, in welcher die Amortisierung der hohen Transplantationskosten innerhalb von 2 Jahren nach Transplantation gegenüber der total parenteralen Ernährung (TPN) und deren unerwünschten Nebenwirkungen nachgewiesen wurde, wurde die DDTx in das amerikanische Krankenkassensystem übernommen.⁹ Damit kam es zusätzlich zu einem rapiden Anstieg der Transplantationszahlen (siehe Kapitel 1.1.2).

1.1.2 Indikation zur Transplantation

Trotz der Möglichkeit der vollständigen parenteralen Ernährung ist die Dünndarmtransplantation die einzige kausale Therapie des Kurzdarmsyndroms (KDS) beziehungsweise des funktionellen intestinalen Versagens/Malabsorptionssyndrom. Beides sind pathologische Zustände, die sowohl im Erwachsenen- als auch im Kindesalter auftreten, sodass 2007 56,1 % der Transplantatempfänger unter 18 Jahre alt war.¹⁰ Die Ursachen dafür sind je nach Altersgruppe unterschiedlich (siehe Abbildung 1).

Hauptgrund für die intestinale Dysfunktion ist das Kurzdarmsyndrom, bei Erwachsenen < 80 - 100 cm, bei Kindern < 40 cm Restdünndarm. Ursächlich dafür sind im Kindesalter der Volvulus (17 %), die Gastroschisis (21 %), die nekrotisierende Enterokolitis (12 %) und die intestinale Atresie (8 %), während im Erwachsenenalter die mesenteriale Ischämie (23 %), der Morbus Crohn (14 %), traumatische (10 %) und tumoröse (16 %) Ursachen dominieren. Ursächlich für das Malabsorptionssyndrom bei Kindern sind der Morbus Hirschsprung (7 %) und die Pseudo-Obstruktion (9 %), bei Erwachsenen vor allem Motilitätsstörungen (8 %).¹¹



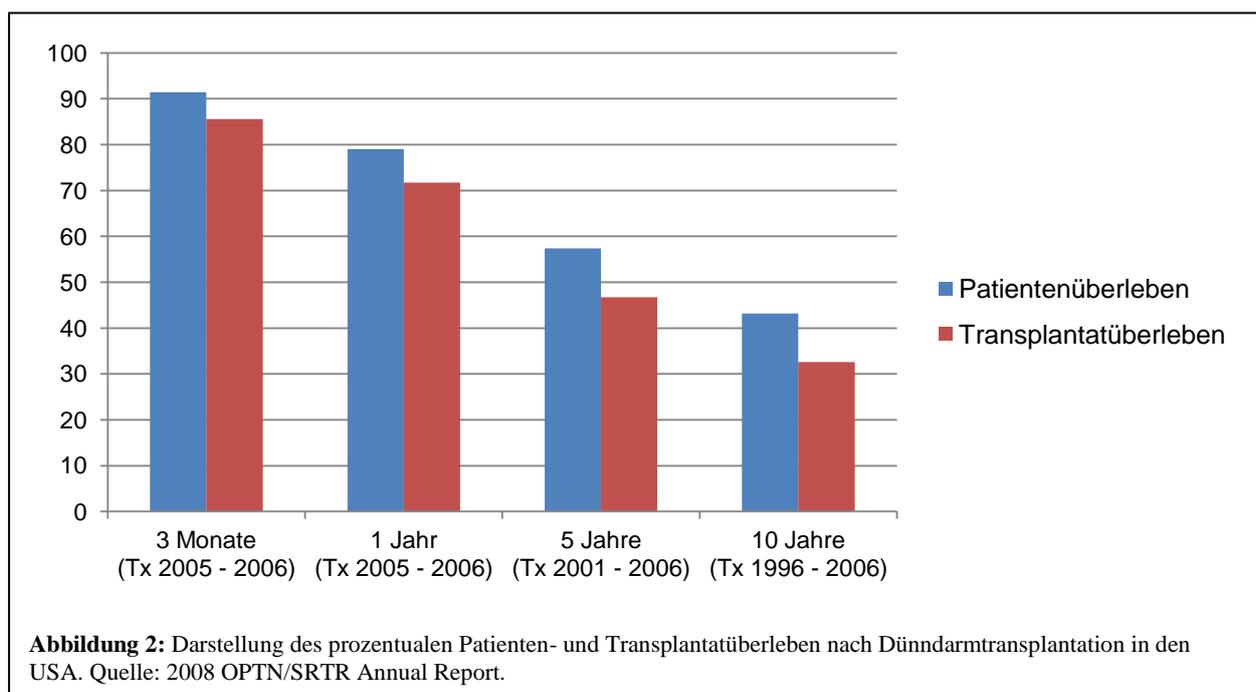
Die Indikation zur DDTx wird sehr streng gestellt. Zu dem irreversiblen intestinalen Versagen aufgrund der oben genannten Ursachen kommt die Entwicklung lebensbedrohlicher Komplikationen. Dazu gehört das Versagen der Ernährungstherapie (Hypoalbuminämie < 3 mg/dl), der (drohende) Verlust von 2 oder mehr zentralvenöser

Zugänge, die (drohende) Entwicklung TPN-induzierten Leberversagens mit Cholestase (Bilirubin > 3 mg/dl) und portaler Hypertension, rezidivierende Katheter-assoziierte septische Episoden mit Hospitalisation und wiederholte schwere Dehydratationen trotz ausreichender intravenöser Supplementation.^{12, 13}

1.1.3 Epidemiologie

In den USA hat sich die Anzahl der jährlich durchgeführten Dünndarmtransplantationen von 70 im Jahr 1998 auf 198 im Jahr 2007 fast verdreifacht. Ebenso hat sich die Anzahl der Patienten auf der Warteliste von 65 (1998) auf 169 (2007) deutlich erhöht.¹⁰ Auch im Bereich von Eurotransplant kam es zu einem Anstieg der Transplantationszahlen von 8 im Jahr 2001 (davon 6 in Deutschland) bis auf 17 im Jahr 2008 (davon 11 in Deutschland).¹⁴

Die Verbesserung der Operationstechniken, die Anwendung gezielterer immunsuppressiver Schemata und die Möglichkeit der effektiveren Behandlung infektiöser Komplikationen führten zu einem verbesserten Patienten- und Transplantatüberleben.¹⁵ Abhängig von der Erfahrung des jeweiligen Transplantationszentrums stieg das Einjahresüberleben der Patienten von 60 % 1994 auf 80 % im Jahr 2007 (vergleiche Abbildung 2), sodass im Jahr 2006 584 Menschen in den USA mit einem funktionierenden Transplantat lebten.



1.1.4 Transplantationsarten

Nur wenn noch keine beziehungsweise eine reversible Leberdysfunktion und eine milde portale Hypertension vorliegen, wird eine isolierte Dünndarmtransplantation durchgeführt.¹⁶

Bei einer progressiven moderaten bis schweren Lebererkrankung wird eine kombinierte Leber- und Dünndarmtransplantation in Betracht gezogen.¹⁷ Vor allem bei Kindern wird eine en-bloc Transplantation von Leber und Dünndarm inklusive Pankreas und Duodenum durchgeführt, um technische Komplikationen wie Anastomoseninsuffizienzen, Biliome und Volvulus um die freiliegende Pfortader zu vermeiden.¹⁸

Im Falle eines kombinierten Organversagens, eines „Frozen Abdomen“ oder eines Gardner-Syndroms (Desmoidtumor und familiäre adenomatöse Polyposis) erfolgt eine Multiorgantransplantation.¹⁹ Diese umfasst Dünndarm, (Leber), Magen, Duodenum und Pankreas en-bloc.²⁰

1.2 Immunologie des Dünndarms

1.2.1 Anatomie des intestinalen Immunsystems

Das Mukosa-assoziierte Lymphgewebe (MALT), welches die Peyer'schen Plaques, mesenteriale Lymphknoten und über 60 % der im Organismus befindlichen Lymphozyten umfasst, ist kontinuierlich der Anwesenheit von Antigenen ausgesetzt. Intraepitheliale Lymphozyten und lymphoide Zellen der Lamina propria sind damit ständig in einem aktivierten Zustand der „kontrollierten Entzündung“, in dem sie sowohl die Antigenpräsentation von Nahrungsbestandteilen als auch von Mikroorganismen filtrieren und als pathogen oder apathogen klassifizieren müssen.²¹ Damit stellt der Dünndarm das größte Reservoir für lymphoide Zellen dar.²²

Der Dünndarm bietet außerdem gegenüber der mikrobiellen Flora im Lumen eine Barrierefunktion. Die Barriere wird als äußerste Schicht aus einer von Becherzellen produzierten Glycocalyx, bestehend aus Glykopeptiden und Muzinen (antibakterielle Peptide/Defensine), gebildet.²³ Diese Schleimschicht bildet einen chemischen Schutz vor Pathogenen und erleichtert die Ausscheidung dieser über den Stuhl. Das darunter liegende Epithel bildet eine physiologische Schranke für nicht-invasive Bakterien und Viren, ermöglicht jedoch den transzellulären Stoffdurchtritt von Nahrungsbestandteilen. Weiterhin liegen intraepitheliale Lymphozyten (IEL, 98 % T-Zellen, CD8+), welche zum

einen zytotoxische Eigenschaften haben^{24, 25}, zum anderen handelt es sich wahrscheinlich auch um T-regulatorische Zellen, die eine lokale immunsuppressive Wirkung ausüben.^{26, 27} Als weiterer Faktor der Barriere gibt es die durch Tight Junctions verbundenen Enterozyten, welche ebenfalls eine aktive Penetration von Pathogenen durch die Epithelschicht verhindern, jedoch eine parazellulären Stoffdurchtritt ermöglichen. In der Lamina propria liegen dann eine heterogene Mischung aus lymphoiden Zellen, die entweder lose verteilt oder organisiert in den Peyer'schen Plaques vorkommen. IgA produzierende Plasmazellen sind dabei der vorherrschende Typ, die restlichen 50 % sind T-Zellen, B-Zellen, Makrophagen und antigen-präsentierende Zellen.²⁸ Die in der Lamina propria angesiedelten Zellen sind damit für die Abwehr schädlicher Keime und für die Toleranz gegenüber Antigenen der Nahrungsbestandteile verantwortlich. Durch die dort vorherrschenden Plasmazellen werden vorwiegend IgA- und IgM-Antikörper sezerniert, welche im Lumen des Dünndarms aufgrund fehlender Komplementaktivierung keine Entzündungsreaktion hervorrufen, jedoch Rezeptoren auf pathogenen Viren und Bakterien besetzen und damit die Bindung dieser an das Epithel verhindern.^{29, 30}

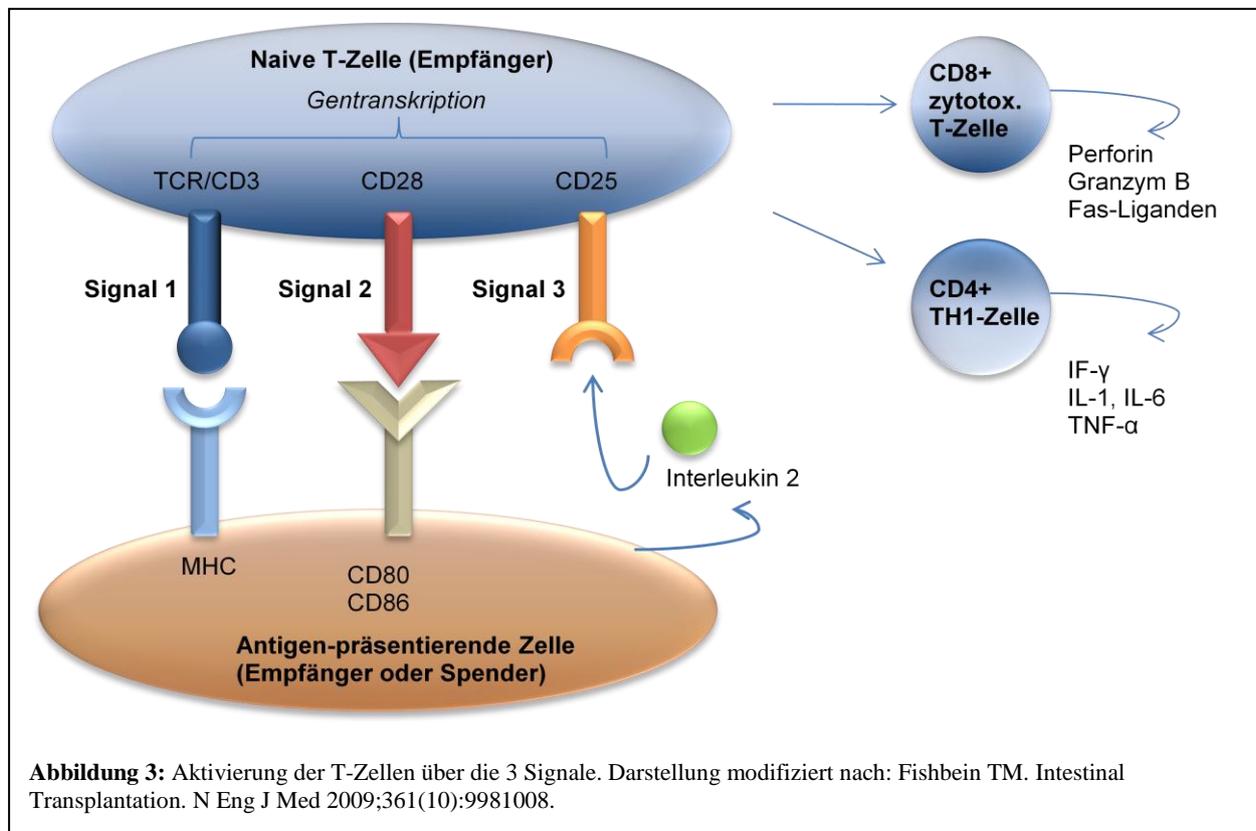
1.2.2 Antigen-abhängige Immunreaktion

Die zweithäufigste Todesursache nach Dünndarmtransplantation ist mit 12 % die Organabstoßung. Bei der antigen-abhängigen Immunreaktion auf allogene Transplantate kommt es zu einem Zusammenwirken von verschiedenen Immunzellen, wie antigen-präsentierende/dendritische Zellen (APC), T-Helferzellen, zytotoxische T-Zellen, Natürliche Killer-Zellen und B-Zellen.

Nach der Dünndarmtransplantation wird das Transplantat entsprechend der hohen notwendigen Besiedelung mit Empfänger-Lymphozyten repopularisiert.³¹ Obwohl eine geringe Anzahl Empfängerenterozyten im Dünndarmtransplantat nachgewiesen werden können, bleibt der Genotyp des neuen Dünndarms der des Spenders, und damit hoch immunogen.³²

Abbildung 3 stellt den Ablauf der T-Zell-Aktivierung dar, welche überwiegend in den Spender-Lymphknoten und in den Peyer'schen Plaques stattfindet. Dendritische Zellen, sowohl vom Empfänger als auch vom Spender, präsentieren phagozytierte Spender-Antigene über den Major Histocompatibility Complex (MHC) an eingewanderte empfängereigene naive T-Zellen.³³ Abhängig davon, ob die naive T-Zelle CD4+ oder

CD8+ ist, erfolgt die Präsentation dem T-Zell-Rezeptor über MHC II beziehungsweise über MHC I. Dieser Vorgang wird als Signal 1 bezeichnet.



Die alleinige Stimulation über dieses Signal führt zur Anergie (Inaktivität) beziehungsweise zur Apoptose der T-Zelle.³⁴ Zur endgültigen T-Zell-Aktivierung sind zwei weitere Signale notwendig. Signal 2 bezeichnet die costimulierende Bindung zwischen CD28 auf der Empfänger-Seite und CD80/CD86 auf der APC-Seite.³⁵ Diese Bindung fördert die Proliferation, das Überleben und die Cytokinproduktion aktivierter T-Zellen.³⁶ Als 3. Signal ist die Bindung von autokrin produziertem IL-2 an den IL-2 Rezeptor (CD25) auf der T-Zelle notwendig.³⁷ Diese drei Signale führen dann zu einer Proliferation mit klonaler Expansion der T-Zell Population.

Aktiviert CD4+ T-Helfer-Zellen rufen durch die Produktion von Cytokinen wie Interferon γ , IL-1, IL-6 und TNF α eine Entzündungsreaktion hervor. Die aktivierten CD8+ T-Zellen differenzieren zu cytotoxischen T-Zellen, entweder nur durch die Antigen-Präsentation und die Co-Stimulierung durch die APCs oder durch gleichzeitige Stimulierung durch CD4+ T-Helfer-Zellen und die von ihnen produzierten Cytokine.³⁸ Cytotoxische T-Zellen

sind nun in der Lage die Spender-Zellen zu attackieren, und diese durch die Produktion von Perforin, Granzym B und Fas-Liganden zu zerstören.

1.2.3 Immunsuppressive Möglichkeiten

Das immunsuppressive Schema nach DDTx umfasst heute zu Tage eine Basis- und Erhaltungstherapie (MainT) und eine Induktionstherapie (IndT), welche die Verabreichung mehrerer Medikamente beinhaltet, wodurch verschiedene Mechanismen der Immunantwort beeinflusst werden. Damit ist es weitestgehend möglich, eine ausreichende Immunsuppression zu erreichen und gleichzeitig die Dosierung der einzelnen Medikamente so zu beschränken, dass die Nebenwirkungen möglichst gering gehalten werden können.

In der Regel wird der Calcineurin-Inhibitor Tacrolimus (Tac), ein aus dem Schimmelpilz *Streptomyces tsukubaensis* gewonnenes makrozyklisches Lakton, als Basis- und Erhaltungstherapie verwendet. Die Wirkung von Tac ist ähnlich der von Cyclosporin A, allerdings 10 bis 100mal potenter.³⁹ Intrazellulär bindet sich Tac an das FK506 binding protein (FKBP) 12, und hemmt in diesem Komplex Calcineurin, eine Calcium- und Calmodulin-abhängige Protein-Phosphatase. Die damit gehemmte Dephosphorylierung verhindert die Aktivierung und Translokation des nuclear factor of activated T-cells (NF-ATc). Dies führt zu einer herab regulierten Produktion von frühen Transkriptionsfaktoren (IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IFN γ , GM-CSF, TNF α), sodass die allogene induzierte Stimulation der T-Zell Proliferation gehemmt wird. Betroffen sind vorwiegend die zytotoxischen T-Zellen, im geringeren Ausmaß auch die zur Beeinflussung der B-Zell-Stimulation und der humoralen Immunantwort befähigten TH-2-Zellen. Die Dosis-Begrenzung dieses potenten Immunsuppressivums liegt vor allem in seiner nephrotoxischen Wirkung.^{40, 41} Weitere Medikamente der MainT sind Sirolimus (Rapamycin) und Steroide (Methylpredisolon).⁴²

Induktionstherapeutika, die das Signal 3 der antigen-abhängigen T-Zell Aktivierung blockieren, sind Sirolimus (Rapamycin), Interleukin-2-Rezeptor-Antagonisten (Daclizumab), Anti-Thymozyten-Globulin (ATG/Thymoglobulin) oder Alemtuzumab (Campath 1-H). Im Falle einer IndT mit Daclizumab sind zur Erhaltungstherapie mit Tac zusätzlich Steroide für 3 – 9 Monate erforderlich, während bei einer IndT mit ATG auf Steroide verzichtet werden kann, was vor allem bei pädiatrischen Patienten zu beachten ist.⁴³⁻⁴⁵

Sirolimus kann sowohl in Kombination mit Tac, als auch als Basistherapie in Kombination mit IL-2-Rezeptor-Antagonisten eine gute Alternative zur alleinigen Tac-Medikation im Falle von sich verschlechternder Nierenfunktion sein.⁴⁶

Im Rahmen von Rejektions-Episoden wird primär die aktuelle Immunsuppression in der Dosierung angehoben. Kombiniert wird dieses mit Steroid-Boli und/oder OKT3.⁴⁷ OKT3 (Muromonab) ist ein potenter CD3-Antikörper.⁴⁸ Im Falle von OKT3 und Steroid resistenter Abstoßung zeigen neuere klinische Untersuchungen die Wirksamkeit von TNF α -Antagonisten (Infiliximab).^{49, 50}

1.2.4 Postoperative Infektion

Kommt es im Rahmen der Transplantation zu einem Ischämie/Reperfusion-Schaden oder zu einer ausgeprägten Immunantwort, können die Tight Junctions rupturieren und das Epithel beschädigt werden, sodass ein bakterielle Translokation von im Lumen physiologischer und pathogener Keime in das Gewebe bis in das Gefäßsystem ermöglicht wird.⁵¹ Dort kommt es von lokalen Entzündungsreaktionen, über ausgedehnte Gewebeschäden bis hin zu systemischen Infektionen, welche in Kombination mit der notwendigen Immunsuppression zu einem fatalen Ausgang führen können.⁵² Nach wie vor bilden Infektionen und die konsekutive Sepsis mit fast 50 % die häufigste Todesursache nach Dünndarmtransplantation.¹¹

1.2.5 Monitoring nach Dünndarmtransplantation

Für eine effiziente Überwachung des Transplantats wird während der Transplantation ein Stoma, vornehmlich im distalen Ileum, angelegt, welches bis zu 6 Monate nach der DDTx verbleibt. Dieses Ileostoma dient als Zugang für endoskopische Untersuchungen und Biopsie-Entnahmen. Zu Beginn werden zweimal wöchentlich, nach 3 Monaten einmal wöchentlich und nach 6 Monaten in größeren Abständen Protokollendoskopien durchgeführt.¹⁹ Diese Biopsien werden dann nach definierten histologischen Kriterien evaluiert.^{53, 54}

Die optische Begutachtung mittels gebräuchlicher Endoskopie liefert keine verlässlichen Aussagen. Klinische und experimentelle Studien zeigen den Vorteil der Zoom-Endoskopie.⁵⁵⁻⁵⁷ Damit ist es möglich die Mukosa in bis zu 100facher Vergrößerung zu betrachten und diese anhand entwickelter Kriterien wie muköses Erythem, Höhe, Breite und Durchblutung der Zotten zu beurteilen.⁵⁸ Es zeigte sich eine bis zu 84 %ige Übereinstimmung mit der histologischen Auswertung.⁵⁹ Da mithilfe der Zoom-

Endoskopie ein größeres Areal genauer eingesehen werden kann, bietet sie sich als zusätzliche Untersuchungsmethode zur gezielteren Probeentnahme an. Dennoch ist das Entnehmen von Biopsien nach wie vor der Gold-Standard.

Die häufigste klinische Erscheinung der Transplantatdysfunktion ist Diarrhoe. Ursache dieses unspezifischen Symptoms können zum einen die allogene Rejektion, zum anderen aber auch infektiöse Enteritiden, medikamenten- und nahrungsmittelinduzierte Reaktionen oder die nekrotisierende Enterokolitis sein.⁶⁰⁻⁶² Leider ist die klinische Symptomatik einer Rejektion meist schon das Ergebnis schwerer intestinaler Veränderungen, welche den Einsatz hoch dosierter Immunsuppressiva erfordert und damit das Risiko postoperativer Infektionen und medikamentenabhängiger Nebenwirkungen erhöht. Zusätzlich ist die Endoskopie mit Biopsie-Entnahme ein invasiver Eingriff, der mit Komplikationen wie Blutungen und Perforationen einhergehen kann.^{63, 64} Der Verschluss des Ileostomas nach etwa 6 Monaten führt zu einem Verlust des einfachen Zugangs, erhöht die Komplikationsrate und erschwert das Monitoring. Trotz der intensiven Suche nach nicht-invasiven serologischen Markern, wie sie in anderen Organtransplantationsmodellen zur Verfügung stehen (Kreatinin, Leberenzyme), sind die Ergebnisse bisher unzureichend, sodass regelmäßige invasive Biopsie-Entnahmen immer noch unverzichtbar sind.^{15, 65}

1.3 Rejektionsmarker

1.3.1 CD3

Bei der Reifung der T-Lymphozyten im Thymus kommt es nach Rekombination verschiedener Gene (Genloci: α , β , γ , δ) des T-Zell-Rezeptors (TCR) zur Expression dieses hochaffinen Rezeptors (bestehend aus $\alpha\beta$ - oder $\gamma\delta$ -Untereinheiten) auf der Oberfläche der T-Zellen.

$\gamma\delta$ -TCR+ T-Zellen können direkt ohne vorherige Antigenaktivierung mit der Produktion von proinflammatorischen Cytokinen wie IF- γ , TNF α und IL-4 reagieren.⁶⁶ Der $\alpha\beta$ -TCR ist antigenspezifisch und stets mit dem CD3-Molekül vergesellschaftet. Der $\alpha\beta$ -TCR-CD3-Komplex bildet das membranständige Signaltransduktionssystem der T-Lymphozyten und befindet sich auf 90 – 99 % der reifen peripheren T-Lymphozyten. Der Komplex ist entweder mit CD4 oder mit CD8 assoziiert.^{67, 68} Nach der Implantation des Transplantats kommt es sowohl mit als auch ohne Tacrolimus zur natürlichen Repopulation des Dünndarms mit diesen T-Lymphozyten.⁶⁹ Untersuchungen zur Rolle

von CD3/CD4+ und CD3/CD8+ T-Zellen zeigten, dass es im Rahmen einer akuten Abstoßung zu einem deutlichen Anstieg dieser Zellen kommt.^{70, 71}

1.3.2 Perforin

Perforin ist ein porenbildendes Protein, welches von aktivierten zytotoxischen T-Zellen und Natürlichen Killerzellen produziert wird. Nach Kontakt mit der Zielzelle wird Perforin aus den Granula der CTLs mittels Exozytose in den Interzellularraum entlassen. An der Zielzelle ermöglicht Perforin mittels Porenbildung den Zugang von Granzym B in das Zellplasma. Intrazellulär induzieren diese Serinproteasen den Zelltod.⁷² Die Rolle von Perforin für die Vorhersage einer akuten Abstoßung ist in Studien nach Nieren-, Pankreas- und Lebertransplantation untersucht worden und weist auf eine Assoziation hin.⁷³⁻⁷⁵ Nach Dünndarmtransplantation sind die Ergebnisse geteilt. Während Corti et al. Perforin als Marker zur Vorhersage betrachten, zeigte sich in Studien von Lauro et al. eher die Rolle in der Detektion eines bereits stattfindenden Geschehens.^{59, 76}

1.3.3 Alpha-1,2-Mannosidase

Alpha-1,2-Mannosidase ist ein Schlüsselenzym, welches im Prozess der N-Glykosylierung von Oligosacchariden an Asparagin beteiligt ist.⁷⁷ Man unterscheidet zwei Klassen der α -Mannosidasen. Die α -1,2-Mannosidase der Klasse I sitzt im Endoplasmatischen Retikulum (ER) und katalysiert die Bildung von $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ durch Hydrolyse von Mannose-Resten von $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$.⁷⁸ Dies signalisiert die Entfernung der Glykanen aus dem ER und den Transport in die Proteasomen zur weiteren Prozessierung, und hat seine Bedeutung in der Entsorgung defekter oder falsch gefalteter Proteine.^{79, 80} Im Golgi Apparat befinden sich die Klasse-II-Mannosidasen, von denen die α -1,2-Mannosidase für die Bildung von $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ zuständig ist. Klasse-II-Mannosidasen verhindern die Akkumulation von hybriden N-Glykanen, sodass die Bildung komplexer Oligosaccharide ermöglicht wird.⁸¹

Dieser Prozess spielt vor allem eine Rolle in den regulatorischen T-Zellen, welche zum einen die Toleranz gegenüber den Selbst-Antigenen und zum anderen die Begrenzung der Reaktion auf ein Fremd-Antigen steuern. Eine Aktivierung regulatorischer T-Zellen durch Allo-Antigen-Kontakt führt zu einer erhöhten Expression von α -1,2-Mannosidase und damit zur veränderten N-Glykosylierung von Zell-Oberflächenproteinen. Dies ermöglicht die Migration der regulatorischen T-Zellen an Orte, in denen das Priming der

Immunantwort erfolgt.⁸² Hier zeigt sich die Bedeutung dieses Enzyms in der Transplantationsimmunologie.

Sawitzki et. al. zeigten, dass α -1,2-Mannosidase während der Induktion und der Aufrechterhaltung von Toleranz gegenüber Allo-Antigen nach Nieren- und Herztransplantation im Tierversuch in konstantem Niveau hoch exprimiert wird, während es im Rahmen einer Organabstoßung zu einer Herabregulation dieses Enzyms kommt. Es wurde eine Korrelation zwischen Transplantatdysfunktion und Abfall der Enzym-Expression in peripheren und Transplantat infiltrierender Leukozyten nachgewiesen bevor die Abstoßung klinisch symptomatisch wurde.⁸³

1.3.4 Tolerance associated gene-1

Das Tolerance associated gene-1 (TOAG-1) ist ein ebenfalls erst kürzlich beschriebener Genmarker. Die entsprechende Aminosäure-Sequenz weist keinerlei Ähnlichkeiten zu den bisher bekannten Peptiden oder Proteinen auf. Es zeigte sich jedoch, dass TOAG-1 ausschließlich in den Mitochondrien lokalisiert ist. In vitro-Versuche mit murinen CD4+-T-Zellen, die zur Überexpression von TOAG-1 stimuliert wurden, führten zu einer erhöhten Apoptose-Rate durch Veränderung des mitochondrialen Membranpotentials.⁸⁴

Unter diesen Gesichtspunkten fanden Versuche bezüglich immunmodulatorischer Therapie bei Psoriasis-Patienten statt. Es wurde eine signifikante Hochregulation von TOAG-1 in peripheren Blut-Leukozyten von Patienten beobachtet, die auf Alefacept, ein genetisch hergestelltes immunsuppressives Medikament, ansprachen, bevor eine klinische Besserung der dermatologischen Symptome zu verzeichnen war. Im Gegensatz dazu fehlte eine entsprechende Veränderung des TOAG-1-Spiegels in Non-Respondern auf die Therapie.⁸⁴

Weiterhin erfolgten ebenfalls Untersuchungen im Rahmen der bereits oben erwähnten Studie von Sawitzki et al., in der eine Assoziation zwischen einer frühen Herabregulation der TOAG-1 Genexpression und der Entwicklung einer akuten Abstoßung nach experimenteller Nieren- und Herztransplantation gezeigt wurde. Die Veränderungen des TOAG-1 Levels waren sowohl im Transplantat als auch in den peripheren Blut-Leukozyten zu verzeichnen, wodurch die potentielle Rolle von TOAG-1 als nicht-invasiver Abstoßungsmarker aufgezeigt wurde.⁸³

1.3.5 Lipopolysaccharide Binding Protein

Das Lipopolysaccharide-Binding-Protein (LBP) gehört zu den Akute-Phase-Proteinen, welches sich mit hoher Affinität an das Lipopolysaccharid (LPS) bindet. Es wird in der Leber gebildet und katalysiert die Bildung von monomerem LPS aus der biologisch inaktiven dreidimensionalen Form. Dieser LPS/LBP-Komplex führt über die Bindung an CD14 Membranrezeptoren auf Monozyten zu deren Aktivierung und folglich zur Ausschüttung proinflammatorischer Mediatoren wie IL-1 β und TNF α sowie zur Komplementaktivierung.^{85, 86}

Bei einer massiven Endotoxin-Ausschüttung im Rahmen eines Systemic inflammatory response syndrome (SIRS) steigt der Blutplasmaspiegel von LBP rasch an.^{87, 88} Die Spezifität, Sensibilität sowie der prognostische Wert von LBP bei einem SIRS werden derzeit noch von Myc et. al. untersucht. Weiterhin fanden Untersuchungen bezüglich der Aussagekraft von LBP im Zusammenhang mit Nierentransplantationen statt. Hier zeigte sich ein deutlicher Anstieg des LPS bindenden Proteins durch das chirurgische Trauma, bei massiver Lymphozytolyse sowie nicht-viralen (bakteriellen) Infektionen. Da es sowohl bei steroid-resistenten als auch bei steroid-sensiblen Abstoßungsreaktionen zu keinem LBP-Level Anstieg kam, gehen Kaden et. al. von einem guten Marker zur Differenzierung zwischen infektiösen und nicht-infektiösen Ereignissen nach Nierentransplantation aus.⁸⁹

Auch im Rahmen von tierexperimentellen Dünndarmtransplantationen wurden LBP-Spiegel untersucht. Hier zeigte sich, im Gegensatz zur Nierentransplantation, eine Assoziation zwischen einem deutlich erhöhten LBP-Level sowie der Entwicklung einer akuten Abstoßungsreaktion.⁹⁰

1.3.6 B-Zell-IgG und Alloantikörper

Der Rolle der B-Zellen in der Immunologie der Transplantation wird seit kürzerer Zeit immer mehr Aufmerksamkeit gewidmet.⁹¹ Bisher ging man eher von einer vorwiegend T-Zell-vermittelten Reaktion aus. Es ist schon lange bekannt, dass die hyperakute Abstoßung durch vorher sensitivierte ABO-Blutgruppen-Inkompatibilität durch von B-Zellen produzierte Antikörper hervorgerufen wird (humorale Immunantwort).⁹² Die Bedeutung der B-Zellen auch in der akuten und chronischen Abstoßung liegt zusätzlich zur Produktion der Antikörper in der zellulären Immunantwort.⁹³ Aufgrund der Möglichkeit zur klonalen Expansion und der Ausbildung eines hoch affinen antigenspezifischen Rezeptors stellen sie den Hauptteil der Antigen-präsentierenden Zellen,

welche für die T-Zell-Aktivierung notwendig sind.^{94, 95} Dies geschieht über die Aktivierung CD8+ T-Zellen entweder direkt oder indirekt über die Aktivierung von CD4+ T-Helfer-Zellen. Weiterhin sind B-Zellen zur Produktion von Cytokinen, wie IL-10, transforming growth factor- β , IL-2 sowie des vascular endothelial growth factor A befähigt. Dies wiederum ermöglicht die Beeinflussung und Mobilisierung von Dendritischen Zellen und regulatorischen T-Zellen.^{96, 97}

Die Bedeutung der B-Zell-Immunantwort stellt sich deutlich in Untersuchungen bezüglich der Wirksamkeit von Rituximab, einem monoklonalen Antikörper gegen CD20+ B-Zellen, nach Nieren- und Herztransplantation dar.^{98, 99} Es zeigte sich eine erfolgreiche Behandlung bei steroidresistenter akuter Abstoßung, sowie ein verbessertes Transplantatüberleben durch Eliminierung von B-Zellen ohne Beeinflussung der T-Zell-Antwort.^{100, 101}

1.4 Aufgabenstellung

Das Monitoring ist nach wie vor die größte Herausforderung nach einer operativ erfolgreichen Dünndarmtransplantation. Klinische Symptome sind unspezifisch und in der Regel die Folge bereits fortgeschrittener Veränderungen. Etablierte noninvasive Screeningmarker existieren nicht. Die einzig sichere Möglichkeit, eine akute oder chronische Abstoßung zu diagnostizieren ist eine invasive Biopsie-Entnahme mit histologischer Auswertung.

In der hier vorliegenden Arbeit wurden die bereits bestehenden histopathologischen Kriterien der akuten und chronischen Abstoßung der humanen Dünndarmtransplantation für das experimentelle Rattentransplantationsmodell übernommen, angepasst und erweitert. Es wurde ein Klassifizierungskonzept entwickelt, welches die Abstoßungsgrade nach Einzelinjektion ansteigender Tacrolimus-Dosierung quantifiziert.

Nach orthotoper DDTx wurden in definierten Zeitabständen Blutproben entnommen. Periphere Blutleukozyten wurden auf CD3, Perforin, α -1,2-Mannosidase, TOAG-1 und B-Zell-IgG untersucht. In den Plasma-Proben wurden der LBP- und der Allo-Antikörper-Spiegel bestimmt.

Das Ziel dieser Arbeit war der Vergleich dieser serologischen Marker mit der histopathologischen Auswertung. Dabei sollte diskutiert werden, ob

1. die entsprechenden Marker äquivalent zur Histologie als Screening-Marker dienen, um möglicherweise gezielter Biopsien durchzuführen.
2. die entsprechenden Marker einen prädiktiven Wert haben, der frühzeitig vor klinischer und histologischer Manifestation eine Aussage bezüglich des Transplantatüberlebens erlaubt.

2 Material und Methoden

2.1 Versuchsaufbau

2.1.1 Modell

Im etablierten allogenen Rattenmodell wurde eine orthotope Dünndarmtransplantation von Dark Agouti auf Lewis Ratten durchgeführt. Die transplantierten Tiere wurden dann in unterschiedlicher Dosierung immunsupprimiert beziehungsweise medikamentös unbehandelt belassen. Nach einem Beobachtungszeitraum von 7, 14 oder 45 Tagen wurden die Tiere getötet und die Organe zur weiteren Aufarbeitung asserviert. Weiterhin wurden den Ratten zu definierten Zeitpunkten Blutproben entnommen, um den zeitlichen Ablauf der zu untersuchenden Biomarker im peripheren Blut zu dokumentieren.

2.1.2 Versuchstiere

In diesem Versuch wurde das Rattenmodell Dark Agouti (DA) auf Lewis Ratten (LEW) genutzt. Ausschließlich unbehandelte männliche Inzuchtratten (Harlan-Winkelmann GmbH, Borchon, Deutschland) wurden verwendet, welche bei Versuchsbeginn etwa 14 Wochen alt waren und 230 – 280 Gramm wogen. Während des gesamten Zeitraumes hatten die Tiere freien Zugang zu Nahrung (Ssniff Spezialdiäten, Soest, Deutschland) und Wasser, und wurden zu je 2 bis 6 Ratten in einem Käfig mit Standardmassen (BHT 40x20x60 cm, Tecniplast, Buguggiate, Italien) gehalten. In der Tierexperimentellen Einrichtung der Charité, Campus Virchow-Klinikum erfolgte die Unterbringung und Betreuung.

2.1.3 Tierschutzrechtliche Genehmigung

Alle Tierexperimente im Rahmen dieser Arbeit wurden mit Genehmigung des zuständigen Landesamts für Gesundheit und Soziales Berlin unter der Nummer G0196/06 durchgeführt.

2.1.4 Gruppeneinteilung

Die Tiere wurden, wie in Tabelle 1 zu sehen ist, folgendermaßen behandelt. Die erste Gruppe (**C5**) wurde nicht transplantiert, jedoch mit Tacrolimus in hoher Dosis behandelt. Bei Tieren der zweiten Gruppe (**D0**) wurde eine allogene Transplantation durchgeführt, sie wurden jedoch nicht immunsupprimiert. Die anderen drei Gruppen wurden ebenfalls

transplantiert, die Immunsuppression erfolgte dann in unterschiedlich hoher Dosierung mit 1 (**D1**), 3 (**D3**) oder 5 (**D5**) mg/kg Körpergewicht.

Gruppe	n	Verfahren	Spezies	Tacrolimus in mg/kg	Organentnahme in Tagen	Symbol
Kontrolle	7	Keine DDTx	LEW	5	7	C5
Unbehandelt	8	ITx	DA→LEW	0	7	D0
Niedrig dosiert	18	ITx	DA→LEW	1	7	D1
Mittel dosiert	18	ITx	DA→LEW	3	7, 14, 45	D3
Hoch dosiert	18	ITx	DA→LEW	5	7, 14, 45	D5

Tabelle 1: Gruppeneinteilung der transplantierten Tiere

2.2 Operation, Applikation und Probenentnahme

2.2.1 Operationsmethode

Die Operation bestand aus einer orthotopen Dünndarmtransplantation nach Standardtechnik¹⁰², wobei die Darmanastomosen End-zu-End und die Mesenterialgefäße End-zu-Seit auf die Aorta bzw. Vena cava inferior anastomosiert wurden. Die Transplantation wurde durch den mikrochirurgisch erfahrenen medizinisch-technischen Assistenten, Herrn Dietrich Polenz, standardisiert durchgeführt.

2.2.2 Explantation

Zur Narkoseeinleitung wurde das Spendertier in einem Narkosezylinder etwa 2 Minuten einem Narkosegasgemisch von 1 l/min O₂/3,5 – 4 Vol % Isofluran ausgesetzt. Nach Rasur und Desinfektion der Bauchdecke wurde unter weiterer Inhalationsanästhesie über eine Narkosemaske (0,3 l/min O₂, 0,2 l/min Luft, 2 Vol% Isofluran) die Laparotomie entlang der Linea alba von der Blase bis zum Processus xiphoideus und lateral in die Flanken durchgeführt.

Der vom Treitz'schen Ligament bis zur Ileocoecalklappe frei präparierte Dünndarm wurde in 37°C warme kochsalzgetränkte Kompressen eingehüllt und nach links aus dem Situs verlagert. Nachdem die Gefäßversorgungen des Pankreas, des Duodenums und der Nieren doppelt legiert und durchtrennt wurden, erfolgten die Ligaturen und Durchtrennung der Gefäßarkaden proximal des duodenalen Transplantatendes sowie distal des ileocoecalen Endes. Das Transplantat konnte jetzt proximal und distal aus dem Spenderdünndarm exzidiert werden.

Die stumpf frei präparierte Aorta wurde proximal des Abganges der Arteria mesenterica superior mit einer Gefäßklemme fixiert und abgeklemmt. Durch eine in der Aorta platzierte Venenverweilkanüle wurden die Gefäße mit einer Heparinlösung (0,1 ml/500 I.E. in 1 ml NaCl) und anschließend mit eiskalter NaCl-Lösung perfundiert. Die Kontrolle der erfolgreichen Perfusion wurde durch die Entfärbung des Organs beobachtet. Jetzt wurde die Pfortader leberrnah und die Aorta nach geschlossener Ligatur proximal und distal des Abganges der A. mesenterica superior durchtrennt. Das Transplantat wurde in einer kochsalzgetränkten Mullkompressen bei 8°C gelagert.

2.2.3 Implantation

Die OP-Vorbereitung erfolgte wie schon beim Spendertier beschrieben durch Narkoseeinleitung in der Plexiglas-Trommel, Rasur und Desinfektion der Bauchdecke. Bei dem Empfängertier wurde die Laparotomie nur von der Blase entlang der Linea alba bis zum Processus xiphoideus durchgeführt und dann durch Bauchklemmen offen gehalten. Der Darm wurde freigelegt und in feuchtwarme Kompressen eingehüllt.

Nach Durchtrennung des Treitz'schen Bandes wurden die Vena cava inferior und die Aorta freigelegt und von einer atraumatischen Klemme umschlossen.

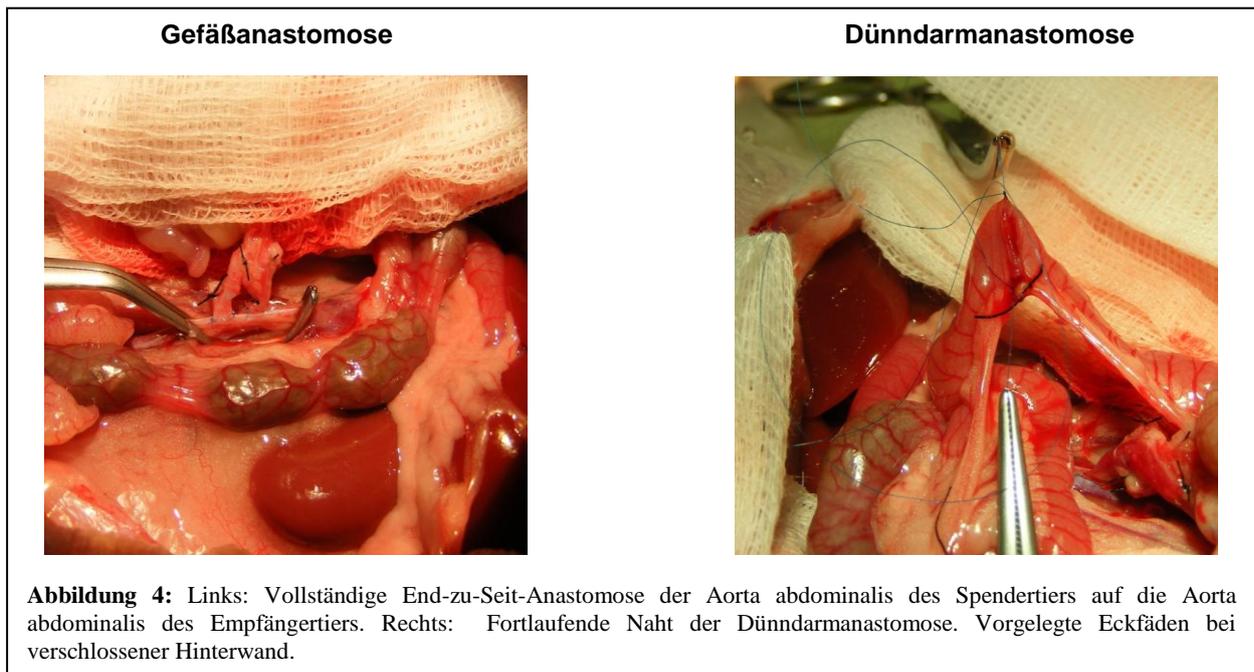
Durch eine 27D-Kanüle wurde die Gefäße mit NaCl ausgespült und längs eröffnet, so dass der Schnitt ein Drittel größer ist als das End-zu-Seit zu anastomosierende Gefäß. Danach wurden die Eckfäden mit Prolene 8-0 vorgelegt und das Präparat nah der Anastomose positioniert.

Die Gefäßnähte erfolgten bei der Aorta fortlaufend und straff, bei der Vene fortlaufend und locker (Abbildung 4, links). Nachdem die Klemme geöffnet wurde, konnte bei korrekter Anastomose die Rosafärbung des Transplantates beobachtet werden.

Nun erfolgte die Resektion des Empfängerdünnarms. Dazu wurden die mesenterialen Gefäße des Jejunums und des Ileums unterbunden und distal der Ligatur durchtrennt. Ebenso wurden die parallel zum Dünndarm verlaufenden Gefäßarkaden des duodenalen Resektates legiert und distal der Ligatur durchtrennt, ebenso wie die des coecalen Endes legiert und proximal der Ligatur durchtrennt wurden. Jetzt wurde der Empfängerdünnarm 2 cm nach Beginn des Jejunums bis etwa 2 cm vor Beginn des Coecums aus dem Empfängerdünnarm resiziert.

Die Dünndarmanastomosierung erfolgte End-zu-End. Zuerst wurden die Eckfäden mit Prolene 7-0 zwischen dem proximalen Ende des Transplantates und dem duodenalen Ende des Empfängerdarms vorgelegt. Der Dünndarm wurde aufgespannt und dann

durch eine fortlaufende Naht von beiden Seiten vernäht (Abbildung 4, rechts). Bevor die Anastomosierung des distalen Transplantatendes an den coecalen Empfängerdarm erfolgte, wurden noch einmal etwa 5 Millimeter des Empfängerdünndarms frisch abgesetzt. Durch leichten Druck auf die im Empfängertier verbliebenen Darmabschnitte wurde Kot vorsichtig durch die Anastomose gepresst um die Durchgängigkeit beziehungsweise die Stabilität zu überprüfen.



Nach Spülung des Bauchsitus mit 37°C warmer Kochsalzlösung erfolgten fortlaufend der Faszienverschluss sowie die Hautnaht mit resorbierbarem, geflochtenem Faden der Stärke 4-0.

2.2.4 postoperative Therapie

Die Empfängertherapie erfolgte eine Stunde postoperativ durch eine intramuskuläre Injektion von Tacrolimus in einer Dosierung von 1, 3 oder 5 mg/kg Körpergewicht in den Musculus gastrocnemius; beziehungsweise durch ein intramuskuläre Injektion von 0,9 %iger Kochsalzlösung bei nicht immunsupprimierten Tieren.

Zur direkt postoperativen Schmerzprophylaxe erhielten die Versuchstiere 0,2 ml einer Tramallösung (100 mg auf 10 ml NaCl) je 100 g Körpergewicht. Weiterhin wurden 40 Tropfen Novaminsulfon in 750 ml Trinkwasser gelöst.

Die Tiere verblieben nach der Operation für etwa 3 Stunden unter einer Rotlichtlampe und für 24 Stunden in einem Einzelkäfig.

2.2.5 Beobachtungszeitraum und Probenentnahme

Der Beobachtungszeitraum betrug in diesem Projekt 45 Tage. Es wurden in diesem Zeitraum den Tieren einen Tag vor der Operation sowie am postoperativen Tag 3, 5, 7, 10, 14 und 45 Blut entnommen und ihr Gewicht bestimmt. Um die Genmarker im peripheren venösen Blut an den oben genannten Zeitpunkten zu bestimmen, wurden die Tiere zur Blutentnahme mit dem Isofluran/Sauerstoff-Gemisch narkotisiert. Aus der lateralen Schwanzvene wurden circa 200 – 250 µl Blut entnommen, welches in 0,5 ml EDTA-Monovetten zur Weiterverarbeitung aufgefangen wurde. Zusätzlich wurde den Tieren an den Tagen 3, 5 und 10 in gleicher Sitzung circa 100 µl Blut mit einem BD Microtainer® EDTA-Röhrchen entnommen, welches im Transplantationslabor der Charité, Campus Virchow Klinikum auf den jeweiligen Tacrolimus-Spiegel untersucht wurde.

Nach Abschluss des Beobachtungszeitraumes wurden die Tiere in Narkose getötet und proximale und distale Dünndarmproben entnommen. Bei nicht-immunsupprimierten (D0, n=8), niedrigdosierten (D1, n=6) und nicht-transplantierten jedoch hochdosiert mit Tac behandelten Tieren (C5, n=7) erfolgte die Organentnahme nach 7 Tagen. Jeweils 6 der mittel-(D3) und hochdosierten (D5) Tiere wurden nach einem Zeitraum von 7, 14 oder 45 Tagen getötet (vergleiche Tabelle 1). Dazu wurden die Tiere ebenfalls mit dem Isofluran/Sauerstoff-Gemisch narkotisiert und dann eröffnet. Durch Punktion der Aorta abdominalis proximal der iliakalen Gefäßverzweigung mit einer Venenverweilkanüle wurden der Ratte etwa 10 ml Blut entnommen und davon 3 ml in einem BD Vacutainer® EDTA-Röhrchen zur Weiterverarbeitung abgefüllt. Anschließend wurde die Aorta abdominalis proximal des Truncus coeliacus abgeklemmt und die visceralen Organe durch die liegende Flexüle mit 20 ml eisgekühlter NaCl-Lösung gespült. Aus dem Dünndarm wurden jeweils vom proximalen und vom distalen Ende sechs etwa einen Zentimeter lange Proben genommen. Davon wurden vier Proben in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80 °C gelagert und zwei Proben in 4%iger Formalinlösung asserviert. Durch einen Zwerchfellschnitt und Durchtrennung der großen Herzgefäße verstarb das Tier in Narkose.

2.3 Realtime Reverse-Transkriptase-PCR

2.3.1 Leukozytenisolierung

Das entnommene Blut wurde bei 3000 U/min 10 Minuten bei 18 °C zentrifugiert, das Plasma in Eppendorf-Tubes abpipettiert und bei -80 °C gelagert. Von dem Sediment wurden etwa 250 µl mit 3 ml Lysepuffer in ein 15 ml Tube überführt und 8 Minuten inkubiert. Nach der 10 minütigen Zentrifugation bei 1800 U/min konnte der Überstand verworfen und die Erythrozyten erneut lysiert und abzentrifugiert werden. Nachfolgend wurde das Leukozytenpellet zwei Mal mit PBS gewaschen (Zentrifugation 10 min, 1800 U/min), dann in ein 2 ml Eppendorf-Tube überführt und entweder sofort weiter verarbeitet oder bei -80°C tiefgefroren.

2.3.2 RNA-Isolierung

Die RNA-Isolierung erfolgte mit dem Absolutely RNA® Miniprep Kit von Stratagene.

Das aus den Blutproben gewonnene Leukozytenpellet wurde dazu in 300 µl Lysispuffer (GITC-Lösung) plus 21 µl β-Mercaptoethanol suspendiert, lysiert und durch einen Prefilter Cup bei MaxSpeed 5 Minuten zentrifugiert. Von den tiefgefrorenen Organproben wurde ein 3 – 4 mm langes Stück mit einem sterilen Skalpell abgetrennt und sofort in 500 µl Lysispuffer plus 35 µl β-Mercaptoethanol mit einer Schwingmühle homogenisiert. Die Suspension wurde anschließend mit Lysispuffer/β-Mercaptoethanol auf 1:2 verdünnt und ebenfalls durch einen Prefilter Cup zentrifugiert.

Der Prefilter konnte mit den enthaltenen groben Verunreinigungen verworfen werden.

Um vorhandene Salzreste zu entfernen, wurde das Zentrifugat mit dem gleichen Volumen 70 %igen Ethanol/DEPC aqua versetzt und durch einen Binding-Filter zentrifugiert. An der Silica-basierten Fibernmatrix des Filters bindet die zu isolierende RNA. Der Filter wurde anschließend mit 600 µl Low-Salt-Buffer gewaschen und zwei Minuten trocken zentrifugiert.

Zur Spaltung der verbliebenen DNA wurde pro Probe 50 µl DNase Digestion Buffer plus 5 µl RNase free DNase direkt auf den Filter gegeben und bei 37 °C für 30 Minuten inkubiert. Das einmalige Waschen mit 600 µl High-Salt-Buffer und das zweimalige Waschen mit 600 µl Low-Salt-Buffer dienten zur Denaturierung der DNase und anderer Proteine.

Im letzten Schritt konnte durch die Zugabe von 40 µl Low-Ionic-Strength-Buffer (auf 60 °C erwärmt) hoch konzentrierte RNA aus dem Filter eluiert werden. Die Aufbewahrung erfolgte bei -80 °C.

Zur Quantifizierung des RNA-Gehaltes der Organproben wurden diese mit dem Agilent 2100 Bioanalyser System untersucht und dafür das Agilent RNA 6000 Nano Kit verwendet.

2.3.3 cDNA-Synthese der Organproben

Aus der mit dem Agilent gemessenen RNA-Konzentration pro Organprobe konnte das zu verwendende Volumen für die cDNA-Synthese bestimmt werden. Die maximale RNA-Menge pro Ansatz ist 2 µg, so dass ein Ansatz bei RNA-Konzentrationen von über 100 ng/µl mit der entsprechenden Menge DEPC-Wasser auf 21,5 µl verdünnt werden musste. Nach Zugabe von 2 µl OdT-Primer (0,1 mg/ml) wurde die Probe 10 Minuten bei 75°C inkubiert. Danach wurden pro Ansatz 8 µl First Strand Buffer/Dithiothreitol (FSB/DTT 0,1 M), 4 µl dNTP (2,5 M), 0,5 µl RNase-Inhibitor (RI 40 U/µl) und 2 µl RNase-free DNase (2 U/µl) hinzugefügt und 30 Minuten bei 37 °C ein weiterer DNA-Verdau durchgeführt. Zur DNase-Spaltung wurde der Ansatz für 5 Minuten auf 75 °C erhitzt. Durch die Zugabe von RNase-Inhibitor und Reverser Transkriptase (200 U/µl) wurde die Transkription gestartet und lief eine Stunde bei 42 °C. Zum Schluss wurden die Proben für 5 Minuten auf 94 °C erhitzt, um die Enzyme zu denaturieren. Die gewonnene cDNA konnte nun bei -20 °C gelagert oder weiter verwendet werden.

2.3.4 cDNA-Synthese der Blutproben

Zur cDNA-Synthese der Blutproben wurde das Quantitect Reverse Transcription Kit von Quiagen verwendet.

Der erste Schritt diente zur Eliminierung von noch vorhandener genomischer DNA. Dazu wurden pro Ansatz 2 µl gDNA Wipeout Buffer zu 12 µl RNA pipettiert und 2 – 10 Minuten bei 42 °C inkubiert. Im zweiten Schritt findet die Reverse Transkription statt. Es wurde ein Mix angesetzt, bestehend aus 4 µl RT Buffer (enthält die dNTPs), 1 µl RT Primer Mix (Primer + Oligo-dT) und 1 µl Quantiscript Reverse Transkriptase (Reverse Transkriptase + RNase-Inhibitor), welcher zu dem 14 µl RNA-Ansatz hinzugefügt wurde. Die Inkubationszeit betrug 30 Minuten bei 42 °C und weitere 3 Minuten bei 95 °C zur Inaktivierung der Enzyme. Die gewonnene cDNA konnte bei -20 °C gelagert werden.

2.3.5 Primer und Sonden

In Tabelle 2 findet sich die Auflistung der entsprechenden forward und reverse Primer sowie die dazugehörigen Sonden. Verwendet wurde β -Actin als house-keeping Gen, sowie CD3, Perforin, α -1,2-Mannosidase, TOAG-1, IL-6 und IgG.

β -Actin	Forward	GTA-CAA-CCT-CCT-TGC-AGC-TCC-T
	Reverse	TTG-TCG-ACG-ACG-AGC-G
	Sonde	CGC-CAC-CAG-TTC-GCC-ATG-GAT
CD3	Forward	CAA-AGA-AAC-TAA-CAT-GGA-GCA-GGG
	Reverse	CTT-TTT-GCT-GGG-CCA-TGG-T
	Sonde	AGG-TTT-GGC-TGG-CCT-CTT-CTT-GGT-G
Perforin	Forward	GGT-GGA-GTG-GAG-GCT-TTT-GTC
	Reverse	CCG-AGA-AGG-CCC-ATC-AGG
	Sonde	CCA-GGC-GAA-AAC-TGT-ACA-TGC-GAC-ACT
Mannosidase	Forward	TCT-GAC-CCA-TGA-TCC-CAA-GTA-CA
	Reverse	CGT-CAT-AAC-TCT-CAT-GGG-CAA-TG
	Sonde	TTT-CTA-GGG-CCT-CTA-CGG-CTT-CCC-AGG
TOAG-1	Forward	CCC-GCC-CTC-AGA-GTC-TGA-GT
	Reverse	CCG-AGA-GGG-CTG-GGA-TAT-TAA-A
	Sonde	TGA-TCC-TCA-GCA-GGT-ATG-CAC-CAA-GCT-TG
IL-6	Forward	CCA-CTG-CCT-TCC-CTA-CTT-CA
	Reverse	ACA-GTG-CAT-CAT-CGCTGT-TC
B-Zell-IgG		TaqMan Gene Expression Assays, Applied Biosystems

Tabelle 2: Forward und reverse Primer und die entsprechenden Sonden

2.3.6 Messung

Der Mix für einen 24 μ l-Ansatz (MM) wurde aus folgenden Komponenten pipettiert: 12 μ l TaqMan Universal PCR MasterMix, 4 μ l Primer des jeweiligen Gens, 1 μ l Sonde des jeweiligen Gens und 7 μ l H₂O/DEPC.

Es wurde mindestens eine Doppelwert-Bestimmung für jedes Gen jeder Probe durchgeführt. CD3, Perforin, α -1,2-Mannosidase und die Intronbestimmung im Bezug zu β -Actin wurden jeweils in einem 13 μ l-Ansatz (12 μ l MM + 1 μ l cDNA) und TOAG-1 im Bezug zu β -Actin wurde in einem 25 μ l-Ansatz (23 μ l MM + 2 μ l cDNA) gemessen.

Zur Messung wurde das 7500 Realtime PCR System mit der Sequence Detection Software v1.4 verwendet. Im ersten Schritt wurden die Wells für 2 Minuten bei 50°C zur Aktivierung der Uracil-n-Glycosylase erhitzt. Dieses im MasterMix enthaltene Enzym eliminiert eventuell vorausgegangene Amplifikationen durch Hydrolyse eingebauter

dUTP-Nukleotide und verhindert damit falsch positive Ergebnisse der PCR.¹⁰³ In dem folgenden 10 minütigen Schritt wurde bei 95°C die Uracil-n-Glycosylase denaturiert und die DNA Polymerase aktiviert. Die Amplifikation erfolgte in 40 Zyklen, wobei ein Zyklus aus einer Temperaturphase von 95°C über 15 Sekunden und einer folgenden Phase von 60°C über eine Minute besteht. Der Zyklus, bei dem die Reporter-Fluoreszenz-Kurve den cycle threshold (CT-Wert) kreuzt, wurde zur quantitativen Messung der Zielkopien bestimmt. Die Genexpression wurde in Bezug zu dem house-keeping Gen β -Actin errechnet.

2.4 Morphologie

2.4.1 Schnittanfertigung

Die für mindestens 72 Stunden in Formalin fixierten Dünndarmproben wurden im Hypercenter XP entwässert und anschließend in der Einbettstation in Paraffin eingebettet. Die bei -20°C gelagerten Blöcke wurden dann am Mikrotom mit einer Schnittstärke von 2 μ m geschnitten.

Die Färbung erfolgte frühestens nach 24 Stunden Trocknungszeit bei Raumtemperatur.

2.4.2 Hämatoxylin – Eosin Färbung

Die Schnitte wurden zuerst in einem Paraclearbad für 2 x 10 min entparaffiniert und danach in einer absteigenden Alkoholreihe (5 min 100 %, 2 min 96 %, 2 min 80 %, 2 min 70 %) rehydriert. Die Hämatoxylinfärbung erfolgte für 20 Minuten auf dem Schüttler. Für weitere 10 Minuten wurden die gefärbten Schnitte unter lauwarmem Leitungswasser gespült und anschließend in Eosin (frisch gefiltert, Zugabe von 100 μ l Eisessig) für 2 Minuten gefärbt. Nach Dehydrierung in einer aufsteigenden Alkoholreihe (1 min 80 %, 2 min 96 %, 5 min 100 %) und 2 x 10 minütiger Verweildauer im Paraclearbad konnten die Schnitte mit Entellan fixiert werden.

2.4.3 Auswertung

Die Auswertung der Morphologie-Schnitte erfolgte in Kooperation mit dem Institut für Pathologie CBF, ohne Kenntnis der Gruppenzugehörigkeit des Organs. Dabei wurden bisher beschriebene histopathologische Merkmale durch neue Eigenschaften ergänzt und präzisiert.^{104, 105} Die Zuordnung erfolgte durch ein Scoring-System (Tabelle 3).

	0	1	2	3
Zellinfiltration	Keine Infiltration	Vereinzelte infiltrative Zellen in Darmwand und Mesenterium	Entzündung und Infiltration v. a. im mesenterialen Fettgewebe	Massiv entzündliche Zellinfiltration in Darmwand und Mesenterium
Zotten-morphologie	Normale Darmwand-architektur	Leicht gestörte Architektur, dezentes Zottenödem	Becherzellverlust, Zottenödem, verplumpte Zotten, leichte Fibrosierung, beginnende Vaskulitis	Komplette oder anitmesenteriale Darmwandnekrose, starke Fibrosierung im Mesenterium, ausgeprägte Vaskulitis Bakterientranslokation
Apoptosen	Keine Apoptosen	Vereinzelte Darm-epithelzellapoptosen	Mehr als 3 Apoptosen/Querschnitt	

Tabelle 3: Scoring-System der histologischen Auswertung

Durch das Scoring konnten die Versuchstiere histologisch verschiedenen Gruppen zugeordnet werden: Tiere, die keine Zeichen einer Abstoßung aufwiesen; Tiere mit Zeichen akuter zellulärer Abstoßung; Tiere mit Zeichen schwerer chronischer Abstoßung und Tiere mit moderater chronischer Abstoßung (vergleiche Tabelle 4).

	Score	Merkmal
Keine Rejektion	0 – 3	
Akute zelluläre Rejektion	4 – 7	entzündliche Zellinfiltration im Mesenterium, antimesenteriale Darmwandnekrose, Bakterientranslokation
Schwere chronische Rejektion	5 – 8	starke Fibrosierung des Mesenteriums, Vaskulitis, komplette Darmwandnekrose
Moderate chronische Rejektion	3 – 5	leichte Fibrosierung, beginnende Vaskulitis

Tabelle 4: Einteilung des Grades der Abstoßung

2.5 Immunhistochemische Färbung mittels APAAP

2.5.1 Schnittanfertigung

Die schockgefrorenen und bei -80°C gelagerten Dünndarmproben wurden nach Einbettung in tissue freezing medium am Mikrotom-Kryostat in 5 µm Dicke geschnitten. Nach dem Schneiden wurden die Gefrierschnitte 24 Stunden bei Raumtemperatur

luftgetrocknet und anschließend 10 Minuten in Aceton fixiert. Die Schnitte wurden nun entweder zur längeren Aufbewahrung bei -80°C eingefroren oder direkt gefärbt.

2.5.2 Färbung

Die Schnitte wurden zuerst mit DakoCytomation Pen (Dako) umrundet, um das Abfließen der Lösungen vom Objektträger zu verhindern. Dann folgte die 30 minütige Inkubation mit Verdünnungslösung, bestehend aus Waschpuffer (0,9 g Tris-Base + 6,85 g Tris-HCl + 8,78 g NaCl auf 1 l Aqua dest) und 1 %iges Bovines Serum Albumin (BSA, Fa. Sigma), zur Reduzierung der Hintergrundfärbung. Anschließend wurde der Primärantikörper in der entsprechenden Verdünnung (mit Verdünnungslösung) aufgetragen und 90 Minuten abgedeckt stehen gelassen. Die folgenden Antikörper mit ihrer Spezifität wurden in der jeweiligen Verdünnung verwendet:

- mouse anti-rat ED1 (1:400),
- mouse anti-rat CD4 (1:100),
- mouse anti-rat CD8 (1:200),
- mouse anti-RT1.BU/MHCII (1:200).

Nach drei maligen Waschen mit dem Waschpuffer wurde der Sekundärantikörper (Rabbit-anti-Mouse-Ig) in der Verdünnung 1:150 aufgetragen, die Inkubationszeit betrug 60 Minuten. Die Schnitte wurden erneut drei Mal gewaschen, dann 60 Minuten mit dem 1:100 verdünnten APAAP-Komplex inkubiert und anschließend wieder drei Mal gewaschen. Das zur Färbung benötigte Neu-Fuchsin-Substrat für je eine Küvette wurde vor der Färbung frisch hergestellt, bestehend aus Pufferlösung, Propandiol-Lösung, Levamisol, Naphtol-AS-Bi-Phosphat, Dimethylformamid, Natriumnitrit, Aqua dest. und Neu-Fuchsin-Lösung. Nach Einstellung eines pH-Wertes von 8,8 wurde die Lösung vor der Verwendung noch einmal filtriert.

Die Färbung mit dem Neu-Fuchsin-Substrat erfolgte für 10 Minuten auf einem Schüttler und, nach drei maligen Waschen in Leitungswasser, für 2 Minuten mit Hämatoxylin. Nach abschließendem Waschen konnten die Organschnitte mit Kaisers Glyceringelatine eingedeckt werden.

2.5.3 Auswertung

Die Auswertung erfolgte lichtmikroskopisch durch Auszählen der speziell gefärbten Zellen in 20 Feldern pro Schnitt bei 400facher Vergrößerung.

2.6 Lipopolysaccharid Binding Protein Messung

2.6.1 ELISA Ansatz

Zur Quantifizierung des Akuten-Phase-Proteins Lipopolysaccharid Binding Protein (LBP) wurde das LBP ELISA Kit von Hycult biotechnology genutzt.

Entsprechend den Hersteller-Hinweisen wurde zuerst die Standard-Verdünnungsreihe aus dem humanen LBP erstellt. Die entsprechenden Plasma-Proben der Versuchstiere wurden wie folgt mit dem Verdünnungspuffer verdünnt: Proben mit Abnahmezeitpunkt vor der Transplantation (Tag -1, C5: alle Proben) 1:200 und Proben mit Abnahmezeitpunkt nach der Transplantation (Tag 3 – 45, D0/D1/D3/D5) 1:2000. Zwischen den folgenden Schritten erfolgte jeweils ein viermaliger Waschgang mit dem entsprechenden Waschpuffer.

Jeweils 100 µl der Aliquots aus Standardreihe, Kontrolle (nur Puffer) und der Proben wurden doppelt in die Vertiefungen (Wells) pipettiert, und abgedeckt bei Raumtemperatur für 1 Stunde stehen gelassen. Danach wurde in jedes Well 100 µl des Tracers hinzugefügt. Nach einer weiteren Stunde Inkubationszeit erfolgte die Zugabe von 100 µl des Streptavidin-Peroxidase-Konjugats mit erneuter einstündiger Inkubation. Anschließend wurde für die Farbreaktion 100 µl des farblosen Tetramethylbenzidin (TMB) hinzugegeben. Nach 20 bis 30 Minuten wurde durch Zugabe von 100 µl Schwefelsäure der Katalyse-Prozess von dem farblosen in ein gefärbtes Substrat gestoppt.

2.6.2 Auswertung

Die Absorption wurde bei 450 nm mit dem Tecan GENios Microplate Reader gemessen. Falls sich die Doppelwerte um mehr als 15 % unterschieden haben, wurde die Probe erneut getestet. Anschließend konnte mithilfe der Standardkurve die Konzentration des LBP jeder Probe errechnet werden.

2.7 LPS-Vollblut-Stimulation

2.7.1 Stimulation

Blutproben von naiven Ratten wurden mit Na-Citrat-Vacutainern® entnommen und anschließend 1:5 in RPMI-Lösung verdünnt. Die Proben wurden dann, wie in Tabelle 5 zu sehen ist, entweder unbehandelt oder behandelt für 12 Stunden inkubiert. Die Behandlung beinhaltete 10 mg/ml LPS, 10 ng/ml LBP und/oder eine Tacrolimus-

Dosierung entsprechend der Konzentrationen gemessen im Blutplasma (2, 7 oder 10 ng/ml).

Symbol	Behandlung
C_LPS	Kontrolle/unbehandelt
LPS	10 mg/ml LPS
LL	10 mg/ml LPS + 10 ng/ml LBP
LL2	10 mg/ml LPS + 10 ng/ml LBP + 2 ng/ml Tacrolimus (entspricht 1 mg/kg KG Dosis)
LL7	10 mg/ml LPS + 10 ng/ml LBP + 7 ng/ml Tacrolimus (entspricht 3 mg/kg KG Dosis)
LL10	10 mg/ml LPS + 10 ng/ml LBP + 10 ng/ml Tacrolimus (entspricht 5 mg/kg KG Dosis)

Tabelle 5: Gruppen der Vollblutstimulation

2.7.2 Auswertung

Zur Überprüfung der erfolgreichen LPS-Stimulation wurden die Proben auf IL-6 Genexpression mittels RT PCR untersucht. Darauffolgend wurde dann die TOAG-1 Genexpression ebenfalls mithilfe der RT PCR ermittelt.

2.8 Alloantikörper-Screening der Rattenserum

2.8.1 FACS-Ansatz

Die von den transplantierten Ratten gebildeten Alloantikörper (IgG) konnten an Ratten-Thymozyten mittels Durchflusszytometrie (FACS: fluorescence activated cell sorting) bestimmt werden.

Dazu wurden isolierte Thymozyten aufgrund ihrer reichlichen Antigenpräsentation von jungen, unbehandelten Dark Agouti Ratten verwendet. Zur Isolation wurde der entnommene Thymus zerkleinert und durch ein 100 µm Sieb, falls nötig noch zusätzlich durch ein 40 µm Sieb gerieben. Nach einem zweimaligen Waschgang mit PBS (10 min, 1200 rpm, 4°C) wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 20 ml FACS-Puffer aufgenommen. Die Bestimmung der Zellzahl pro Milliliter Ansatz erfolgte mittels Färbung mit Trypanblau und Auszählung in der Fuchs-Rosenthal-Zählkammer. Um eine Konzentration von 1×10^6 Zellen pro FACS-Tube zu erhalten wurde der Ansatz entsprechend mit FACS-Puffer verdünnt. Der Thymozyten-Ansatz wurde zentrifugiert (5 min, 1200 rpm, 4°C) und der Überstand bis zum Zellpellet abgesaugt.

Nun erfolgte die Zugabe des ersten Antikörpers (Testserum enthaltene Immunglobuline gegen DA). Dazu wurden die Seren der Versuchstiere vorher 1:10 und 1:100 mit FACS-

Puffer verdünnt. Jeweils 50 µl dieser Aliquots wurden zum Thymozyten-Pellet hinzugegeben und 45 Minuten bei 4°C inkubiert. Nach einem zweimaligen Waschgang mit 1 ml FACS-Puffer (5 Minuten, 1200 rpm, 4°C) wurden dem Zellpellet 40 µl des 1:50 verdünnten zweiten Antikörpers (Fluorchrom-gekoppelter AK: STAR 69, Goat-anti-Rat-Fab2-IgG-FITC) hinzugefügt und 30 Minuten bei 4°C inkubiert. Anschließend erfolgte nach einem weiteren Waschgang mit 1 ml FACS-Puffer (5 Minuten, 1200 rpm, 4°C) die Fixierung des Zellpellets mit 200 µl 1 %igen Paraformaldehyds.

2.8.2 Auswertung

Die Messung der mit Fluoreszeinisothiocyanat (FITC; $\lambda=530$ nm; grün) gefärbten Zellen erfolgte im FACS-Gerät. Die Kalibrierung wurde mit Positiv-Kontrollen des Fluorchroms (FITC) durchgeführt. Anschließend erfolgte die Messung und Auswertung der Zellsuspensionen mit der FACS® Software.

2.9 Statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung wurde die Software „GraphPad Prism Version 5“ für Windows verwendet. Die Varianzanalyse zur Überprüfung auf Normalverteilung und Varianzhomogenität innerhalb der Gruppen erfolgte mittels Two way ANOVA-Test.

Abhängig davon wurde für die Analyse der einzelnen Proben untereinander entweder der ungepaarte T-Test oder der Mann-Whitney-U-Test verwendet. Zur Überprüfung, ob ein linearer Zusammenhang zwischen der Histologie und den Biomarkern zu einzelnen Zeitpunkten besteht, wurde der Pearson'sche Korrelationskoeffizient ermittelt.

Das Signifikanzniveau wurde für $p<0,5$ mit „*“, $p<0,01$ mit „**“ und $p<0,001$ mit „***“ definiert.

2.10 Material

OP-Instrumente	
Mikropinzetten	Fine Science Tools, Heidelberg, Deutschland
Mikroschere	Fine Science Tools, Heidelberg, Deutschland
Mikrogefäßklemmen	Fine Science Tools, Heidelberg, Deutschland
Mikronadelhalter	Codman, Norderstedt, Deutschland
Narkosezylinder/-maske	Eigenbau
Operationsmikroskop	Leica, Wetzlar, Deutschland
Präparierschere	Fine Science Tools, Heidelberg, Deutschland

Laborgeräte	
7500 Realtime PCR System	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
Agilent 2100 Bioanalyzer System	Agilent Technologies, Palo Alto, USA
Ausgießstation	Microm-Laborgeräte, Walldorf, Deutschland
Cryotom (HM 500)	Microm-Laborgeräte, Walldorf, Deutschland
Durchflußzytometer (FACSCalibur®II)	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
FACS® Software (CellQuest® Pro 5.2.1.)	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
Feinwaage (AC121A)	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Fuchs-Rosenthal-Zählkammer	Science Service GmbH, München, Deutschland
Mikrotom (HM 3555)	Microm-Laborgeräte, Walldorf, Deutschland
pH-Meter (CG840)	Schott, Mainz, Deutschland
Schüttler	Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland
Schwingmühle (MM 300)	Retsch, Haan, Deutschland
Sequence Detection Software 1.4.	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
Shandon Hypercenter XP	Shandon, Astmoor, Runcorn, U.K.
Statistiksoftware GraphPad Prism 5.0	Graftpad Software Inc., San Diego, CA, USA
Tecan GENios Microplate Reader	Tecan, Männedorf, Switzerland
Tischmikroskop Olympus BX41	Olympus Europa GmbH, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge Heraeus Megafuge 11K	Thermo Scientific Germany, Braunschweig, BRD

Tabelle 6: Auflistung der verwendeten OP-Instrumente und der Laborgeräte

Verbrauchsmaterial	
BD EDTA-Monovetten, 0,5 ml	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
BD Microtainer® EDTA-Röhrchen, 0,8 mg	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
BD Vacutainer® EDTA-Röhrchen	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
BD Vacutainer® Na-Citrat Röhrchen	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
BD Venflon™ Pro 22GA, 20GA	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Cryogefäß, 1,8 ml (Nalgene® Cryogenic Vial)	Nalgene Nunc, Rochester, NY, USA
DAKOCytomation-Pen	Dako, Glostrup, Daenemark
Einbettkasten	Sanowa, Leimen, Deutschland
FACS-Röhrchen, 5 ml	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
Faden Prolene® 2-0 / PDSII®	Ethicon, Norderstedt, Deutschland
Kompressen 10 * 10 cm	Lohmann Rauscher, Rengsdorf, Deutschland
Kunststoffröhrchen, 14 ml (Falcon®-Tube)	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Pipettenspitzen, versch. Größen	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Spritzen und Kanülen, versch. Größen	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Super frost plus-Objekttraeger	R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland
Zellsieb, 100 µm, 40 µm (Falcon® Cell Strainer)	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
Pharmaka	
0,9%ige NaCl-Lösung, steril	Braun Melsungen, Melsungen, Deutschland
Heparin (Heparin-Na-5000-ratiopharm® 0,2 ml)	Ratiopharm, Ulm, Deutschland
Isofluran (Forene®)	Abbott, Wiesbaden, Deutschland
Metamizol (Novaminsulfon-ratiopharm® 1 g/2 ml)	Ratiopharm, Ulm, Deutschland
Panthenol Augensalbe Jenapharm®	Jenapharm, Jena, Deutschland
Tacrolimus (Prograf® 2 mg/vial)	Astellas Pharma, Muenchen, Deutschland
Tramalhydrochlorid (Tramal® 100 mg/2 ml)	Grünenthal, Aachen, Deutschland

Tabelle 7: Auflistung der verwendeten Verbrauchsmaterialien und Pharmaka

Allgemeine Reagenzien	
Aceton	J. T. Baker, Deventer, Niederlande

Aqua dest.	Fresenius, Bad Homburg, Deutschland
Ethanol, 100 Vol%, denaturiert	Herbeta, Berlin, Deutschland
Flüssiger Stickstoff (N ₂)	Linde, Wiesbaden, Deutschland
Formaldehyd-Lösung, 4%, gepuffert	Herbeta, Berlin, Deutschland
LPS	?
Lyse-Puffer: NH ₄ Cl-Lösung 0,16M, 9 ml Tris-Lösung 0,17M, 1 ml	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
PBS-Lösung: Aqua dest., 1000 ml GIBCO™ Phosphate-Buffered Saline (10x), 10 ml	Fresenius, Bad Homburg, Deutschland Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
RPMI-Medium: RPMI-Lösung (RPMI 1640), 500 ml Natriumpyruvat (MEM 100MM), 5 ml Non essential amino acids, 15 ml L-Glutamin, 5 ml Pen-Strep, 5 ml β-Mercaptoethanol (0,25 ml), 1 ml	PAA, Pasching, Deutschland Invitrogen, Carlsbad, CA, USA Invitrogen, Carlsbad, CA, USA Invitrogen, Carlsbad, CA, USA Biochrome, Cambridge, Grossbritannien Biosciences, La Jolla, CA, USA
RPMI/FCS-Lösung: RPMI-Medium, 100 ml FCS, 10 ml	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Reagenzien für die rtPCR	
Absolutely RNA® Miniprep Kit	Stratagene, La Jolla, CA, USA
Agilent RNA 6000 Nano Kit	Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA
DEPC-Wasser: Diethylpyrocarbonat-Lösung, 1 ml Aqua dest., 1000 ml	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland Fresenius, Bad Homburg, Deutschland
dNTP, 2,5 M	Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden
First Strand Buffer/Dithiothreitol (FSB/DTT), 0,1 M	GibcoBRL, Paisley, UK
oDT-Primer	GibcoBRL, Paisley, UK
Primer: β-Actin fw/rev CD3 fw/rev Perforin fw/rev Mannosidase fw/rev TOAG-1 Intron IL-6	Metabion, München, Deutschland Metabion, München, Deutschland Metabion, München, Deutschland MWG Biotech AG, Ebersberg, Deutschland MWG Biotech AG, Ebersberg, Deutschland Metabion, München, Deutschland Metabion, München, Deutschland
Quantitect Reverse Transcription Kit	Qiagen, Valencia, CA, USA
Reverse Transkriptase, 200 U/μl	GibcoBRL, Paisley, UK
RNase-free DNase, 2 U/μl	Ambion, Austin, TX, USA
RNase-Inhibitor, 40 U/μl	Promega, Madison, WI, USA
Sonden: β-Actin fw/rev CD3 fw/rev Perforin fw/rev Mannosidase fw/rev TOAG-1 Intron IL-6	Eurogentec Oligold, Köln, Deutschland Eurogentec Oligold, Köln, Deutschland
TaqMan Gene Expression Assays für B-Zell-IgG	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland

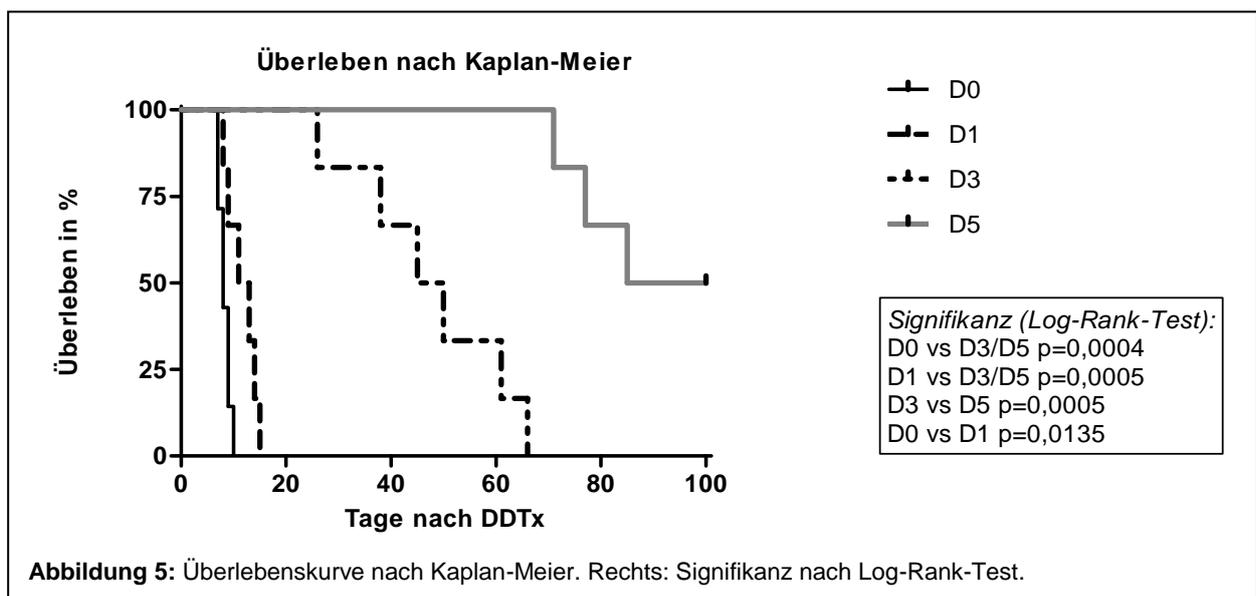
TaqMan Universal PCR MasterMix	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
Reagenzien für die H&E-Färbung	
Eisessig	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Eosin-Lösung	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Entellan	Merck, Berlin, Deutschland
Hämatoxylin-Lösung	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Paraclear®	Quartett, Berlin, Deutschland
Paraplast-Plus Paraffin	Sherwood, St. Louis, MO, USA
Reagenzien für die Immunhistofärbung	
Antikörper: mouse anti rat ED1, 1:400 mouse anti rat CD4, 1:100 mouse anti rat CD8, 1:200 mouse anti-RT1.BU/MHCII, OX3, 1:200 APAAP, mouse, monoclonal	AbD Serotec, Düsseldorf, Deutschland AbD Serotec, Düsseldorf, Deutschland AbD Serotec, Düsseldorf, Deutschland AbD Serotec, Düsseldorf, Deutschland Dako, Glostrup, Daenemark
BSA- Verdünnungslösung: Waschpuffer, 10 ml Bovines Serumalbumin, 96%ig, 0,1 g	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Harris Hämatoxylin Lösung	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Kaisers Glyceringelatine	Merck, Darmstadt, Deutschland
Neufuchsin-Substrat: Waschpuffer, 105 ml 1,3-Propandiol-Lösung, 0,2 M, 37,5 ml Levamisol, 0,06 g Naphtol-AS-Bi-Phosphat, 0,075 g N,N-Dimethylformamid, 900 µl Natriumnitrid, 0,03 g Neufuchsin-Lösung, 300 µl	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Tissue freezing medium	Leica, Nussloch, Deutschland
Waschpuffer: Trizma® Base, 0,9 g Trizma® Hydrochlorid, 6,85 g Natriumchlorid, 8,78 g Aqua dest., 1 l	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland Merck, Darmstadt, Deutschland Fresenius, Bad Homburg, Deutschland
Reagenzien für die Alloantikörper-Messung	
Antikörper: Goat-anti-Rat-Fab2-IgG-FITC (STAR 69)	AbD Serotec, Düsseldorf, Deutschland
FACS-Puffer: PBS (1x), 1000 ml FCS, 10 ml Natrium-Acid, 0,5 g	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Paraformaldehyd, 1%ig	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Trypanblau	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Reagenzien für die LBP-Messung	
LBP ELISA Kit	Hycult biotechnology, Uden, Niederlande

Tabelle 8: Auflistung der verwendeten Reagenzien und Kits

3 Ergebnisse

3.1 Überleben

Während unbehandelte (D0) und niedrigdosierte Tiere (D1) im Mittel 8,3 beziehungsweise 11,7 Tage überlebten, resultierten eine mittlere (D3) und eine hohe (D5) Tacrolimus-Dosierung in einer signifikant verlängerten Überlebenszeit (siehe Abbildung 5, $p < 0,001$). Wie in Tabelle 9 zu sehen ist, überlebten Tiere der D3-Gruppe im Mittel 47,7 Tage, Tiere der D5-Gruppe zeigten eine durchschnittliche Überlebenszeit von 102,2 Tagen.



Der erste Untersuchungszeitpunkt (Tag 7) wurde nach dem mittleren Überleben der D0- und D1-Gruppe gewählt. Da das mittlere Überleben der D3-dosierten Tiere am 45. Tag 50 % und der das der D5-dosierten Tiere 100 % betrug, wurde dieser Tag als letzter Untersuchungszeitpunkt bestimmt.

Gruppe	Überlebenszeit nach			Mittlere Überlebenszeit (Tage ± Standardabweichung)
	7 Tagen	14 Tagen	45 Tagen	
D0	71,4 %	0 %	0 %	8,3 ± 1,1
D1	100 %	16,7 %	0 %	11,7 ± 2,8
D3	100 %	100 %	50 %	47,7 ± 14,8
D5	100 %	100 %	100 %	102,2 ± 29,7

Tabelle 9: Überlebensrate in % nach 7, 14 und 45 Tagen. Mittlere Überlebenszeit.

3.2 Histologie

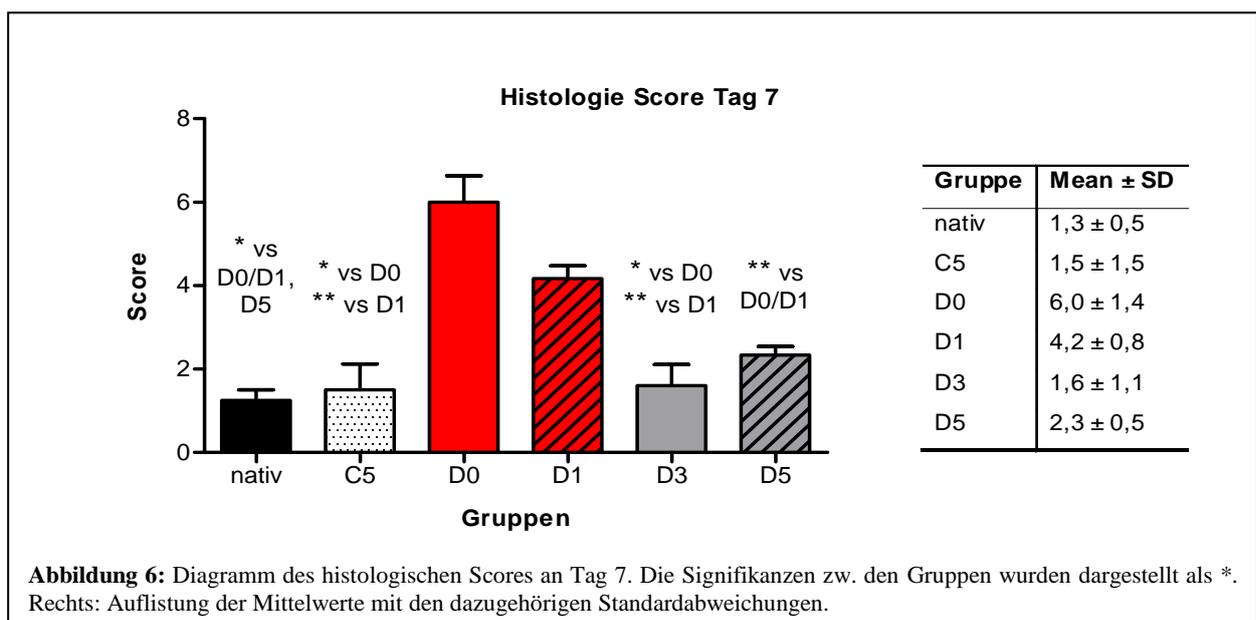
3.2.1 Tag 7

Die H&E gefärbten Organschnitte wurden histomorphologisch nach den obengenannten Kriterien begutachtet und daraufhin in verschiedene Kategorien der Abstoßung eingeordnet (siehe Tabelle 3 und Tabelle 4; Seite 27).

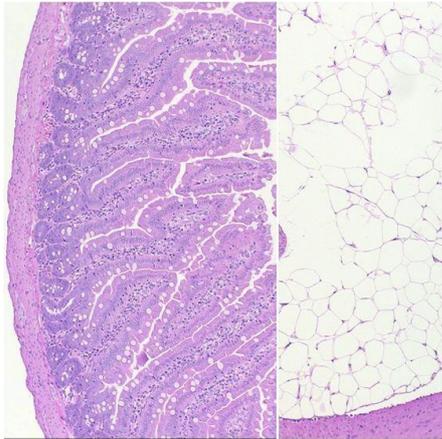
Nichttransplantierte/Tac behandelte Tiere (C5) glichen dem Normalbefund, wie er bei Schnitten von nativen DA-Ratten gefunden wurde. Es zeigte sich eine intakte Architektur der Dünndarmwand, bestehend aus Mukosa, Submukosa, Muscularis propria und Serosa. Das Mesenterium zeigte keine wesentliche Zellinfiltration (Abbildung 7; C5).

Organschnitte von unbehandelten (D0) und niedrigdosierten Tieren (D1) zeigten am 7. postoperativen Tag signifikant mehr morphologische Veränderungen als die von mittel- (D3) und hochdosierten (D5) Tieren (Abbildung 6; D0 vs D3: $p=0,0112$; D0 vs D5: $p=0,0075$; D1 vs D3: $p=0,0015$; D1 vs D5: $p=0,0073$). Hervorstechend waren hierbei die antimesenteriale Darmwandnekrose mit dem Verlust intestinaler Darmwandmuskulatur, Bakterientranslokationen sowie eine massive Zellinfiltration im Mesenterium (Abbildung 7, D0 und D1). Somit wurden diese Schnitte, welche histopathologisch in einem Score-Bereich von 4 – 7 lagen, einer akuten Abstoßung zugeordnet.

Die Präparatschnitte von D3- und D5-behandelte Tieren lagen in einem Bereich zwischen 0 – 3 (Abbildung 6, Abbildung 7, D3 und D5), und wurden daher als nicht abstoßend klassifiziert.



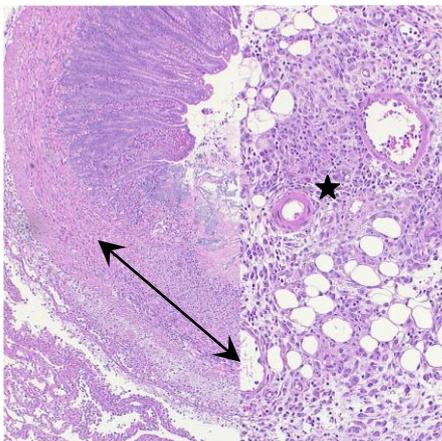
C5 – keine Veränderungen



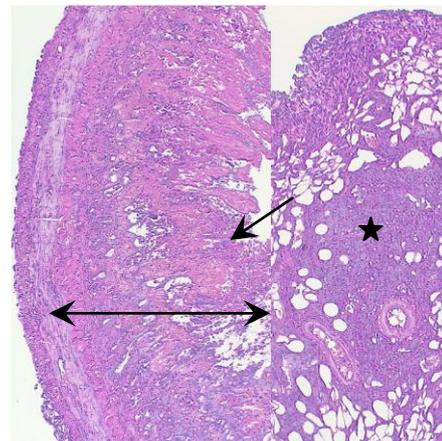
D5-Toxizität



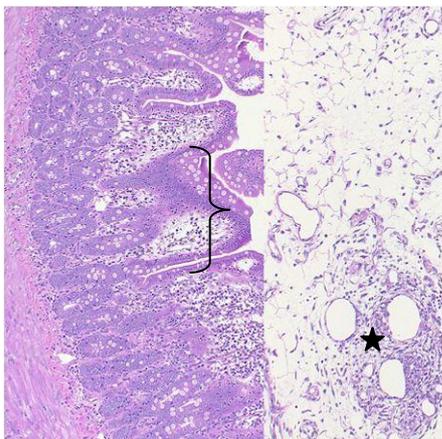
D0 – akute Abstoßung



D1 – akute Abstoßung



D3 – keine Abstoßung



D5 – keine Abstoßung

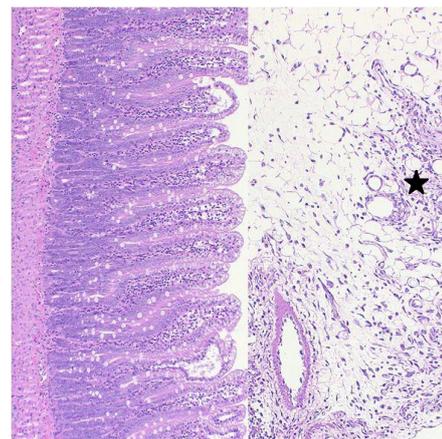
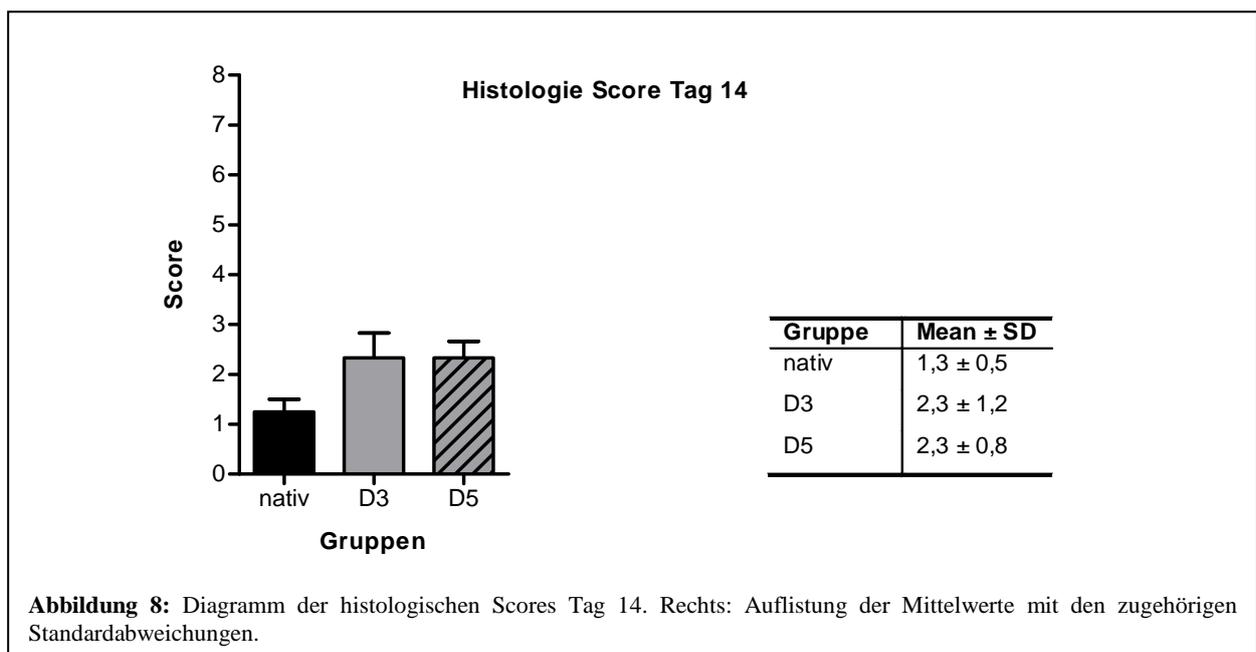


Abbildung 7: Histologische Darstellung der Organschnitte an Tag 7 der jeweiligen Gruppe. Legende: \leftrightarrow antimesenteriale Darmwandnekrose, \star Zellinfiltration im Mesenterium, \leftarrow Bakterientranslokation durch die Darmwand, $\}$ verplumpte Zotten, \circ Zottenödem/leere Lamina propria. (H&E-Färbung, 100fache Vergrößerung)

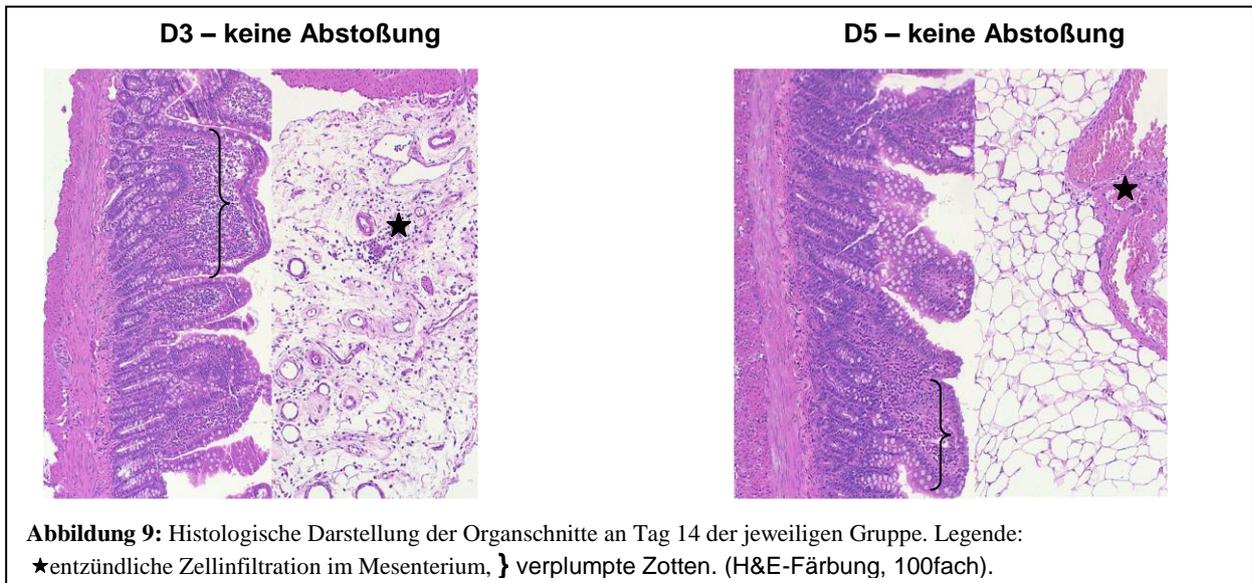
Allerdings zeigte je ein Schnitt der C5- und der D5-Gruppe eine deutliche Verplumpung der Zotten, Becherzell- und Kryptenverlust sowie ein ausgeprägtes Zottenödem ohne mesenteriale Beteiligung. Diese Erscheinung wurde als Tacrolimus-Toxizität gewertet (Abbildung 7, D5-Toxizität). Dies spiegelte sich auch im histologischen Score wider. So zeigte sich, wie in Abbildung 6 zu sehen ist, ein signifikant höherer Score in Schnitten von D5-behandelten Tieren als in den Nativkontrollen ($p=0,0302$).

3.2.2 Tag 14

Am 14. postoperativen Tag zeigte sich statistisch kein signifikanter Unterschied zwischen Nativkontrollen und D3- und D5-behandelten Ratten (Abbildung 9), obwohl auch hier in der Hochdosis-Gruppe verplumpte Zotten als Zeichen der Tacrolimus-Toxizität gefunden wurden. Beide Gruppen wiesen einen Score im Bereich zwischen 0 – 3 auf, so dass hier definitionsgemäß keine Abstoßung vorlag (Abbildung 8, rechts).

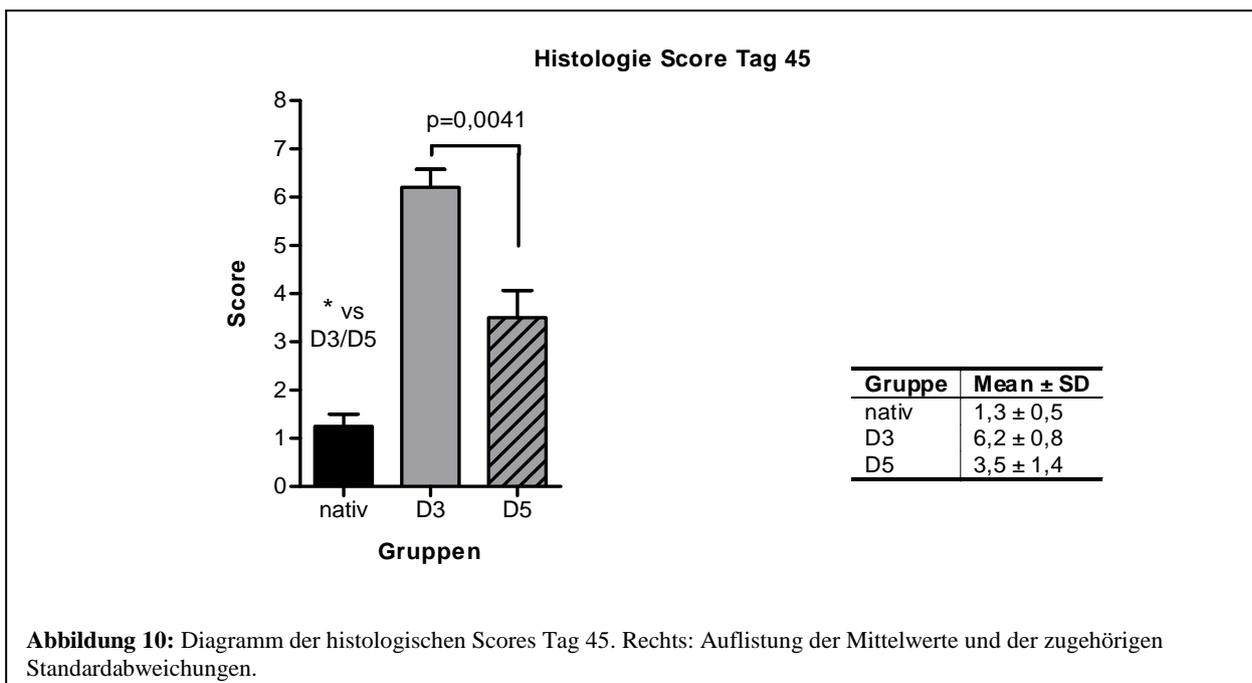


Histologisch fanden sich nur geringfügige entzündliche Infiltrate im Mesenterium und in der Darmwand der Transplantatempfänger. In beiden Gruppen zeigten sich außerdem vereinzelte ballonierte Zotten (Abbildung 9, D3 und D5).



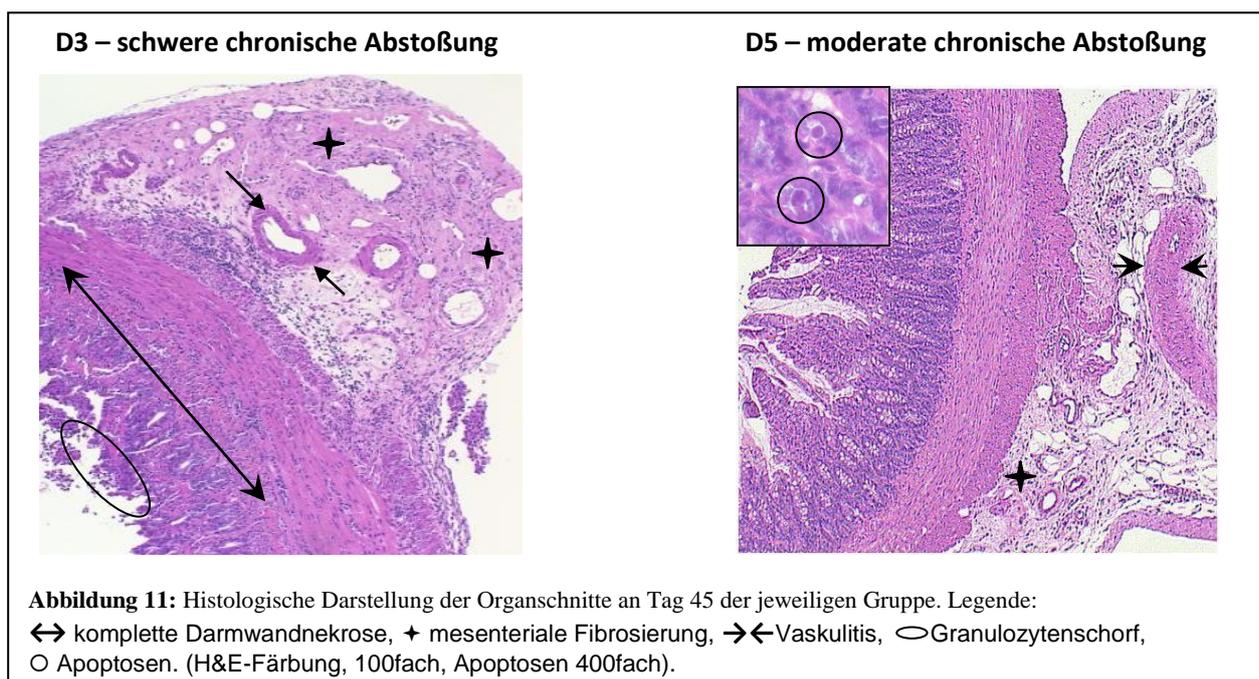
3.2.3 Tag 45

45 Tage nach der Dünndarmtransplantation zeigte sich im Vergleich zu Nativkontrollen ein signifikant erhöhter histologischer Score sowohl in der Mittel- als auch in der Hochdosis-Gruppe (Abbildung 10, nativ vs D3: $p=0,0189$; nativ vs D5: $p=0,0230$). Weiterhin war zu diesem Zeitpunkt nach DDTx mit $p=0,0041$ ein signifikanter Unterschied auch zwischen den D3- und D5-Behandlungsgruppen zu erkennen, wobei die D3-behandelten Ratten deutlichere strukturelle Veränderungen aufwiesen.



Organschnitte von D3-behandelten Tieren zeigten starke Entzündungsreaktionen mit ausgeprägter Fibrosierung im Mesenterium, wobei das mesenteriale Fettgewebe in myxoide Strukturen umgewandelt wurde. Weiterhin war um die Gefäße eine deutliche Vaskulitis zu erkennen. Die Darmwandarchitektur war weitestgehend zerstört und wies größtenteils eine komplette Darmwandnekrose mit vermehrten Granulozytenschorf auf den Erosionen der Zotten auf. Da der histologische Score in einem Bereich zwischen 5 – 8 lag, wurden diese Schnitte einer schweren chronischen Abstoßung zugeordnet (Abbildung 10, rechts).

Histologische Schnitte von Ratten der Hochdosis-Gruppe (D5) zeigten am 45. postoperativen Tag weniger ausgeprägte Veränderungen. Auffällig war dennoch ein Zottenverlust und vermehrte Apoptosen im Zottenepithel. Im Mesenterium war eine leichte Fibrosierung und an den mesenterialen Gefäßen eine beginnende Vaskulitis zu erkennen. Bei einem Score, der im Bereich zwischen 3 – 5 lag, wurden Organschnitte dieser Gruppe als moderate chronische Abstoßung definiert (Abbildung 10, rechts).



3.3 Immunhistochemie

Sieben Tage nach der Dünndarmtransplantation konnte eine signifikant reduzierte Zellinfiltration und MHC Klasse II Expression in mittel- und hochdosiert immunsupprimierten Tieren im Gegensatz zu akut abstoßenden Tieren (D0 und D1)

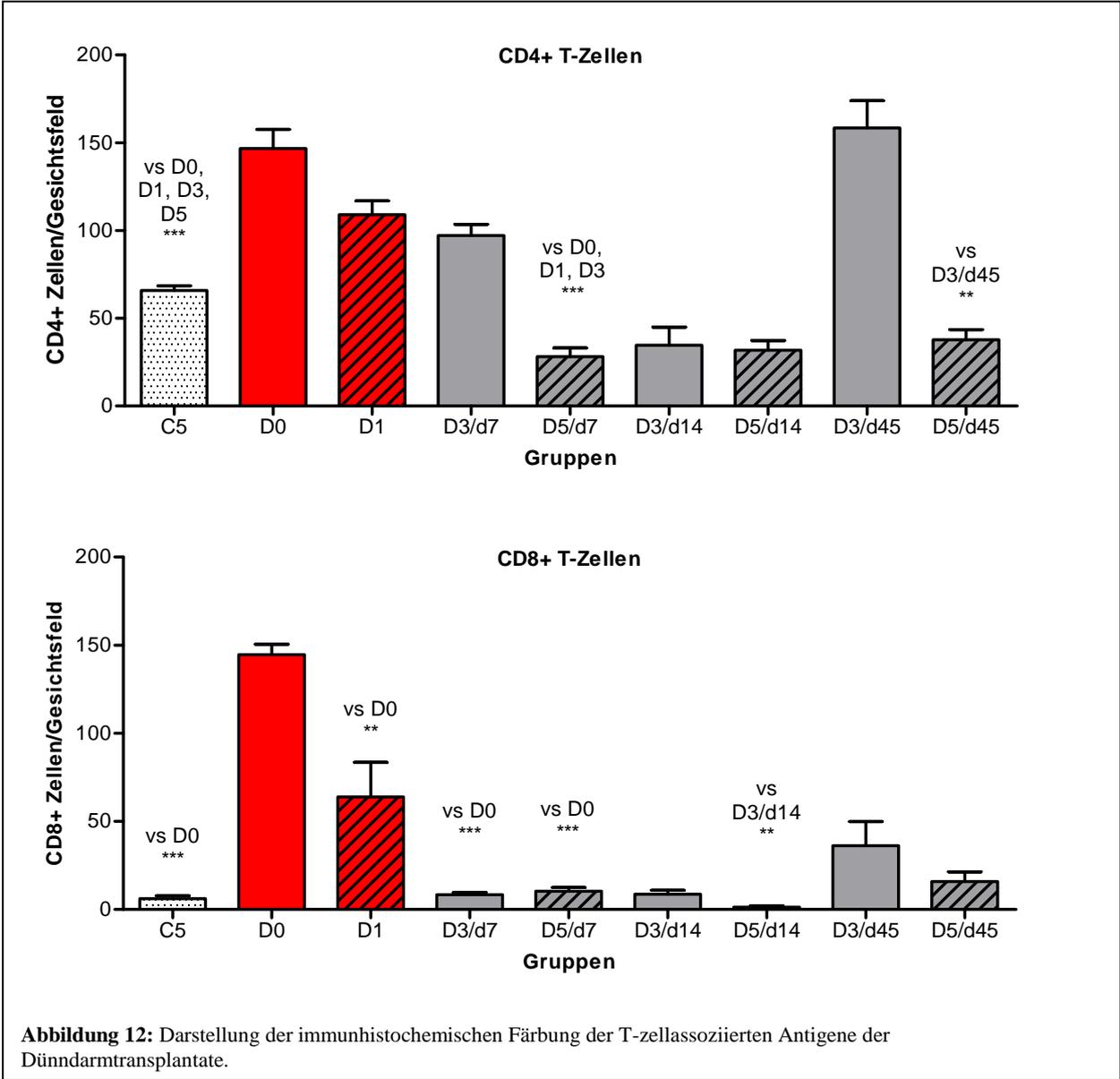
beobachtet werden (Abbildung 12, CD4: D5 vs D0/D1 $p < 0,0001$, CD8: D5/D3 vs D0 $p < 0,0001$; Abbildung 13, ED1: D0 vs D3/D5 $p < 0,0001$, D1 vs D3/D5 $p < 0,01$, MHC II: D0 vs D3/D5 $p < 0,001$, D1 vs D3/D5 $p < 0,01$). Ebenfalls zu diesem Zeitpunkt zeigte sich nach D3-Dosierung eine deutlich höhere Zellinfiltration als nach D5-Dosierung (Abbildung 12, CD4: D3 vs D5 $p < 0,0001$; Abbildung 13, ED1: D3 vs D5 $p = 0,0026$, MHC II: D3 vs D5 $p < 0,0001$).

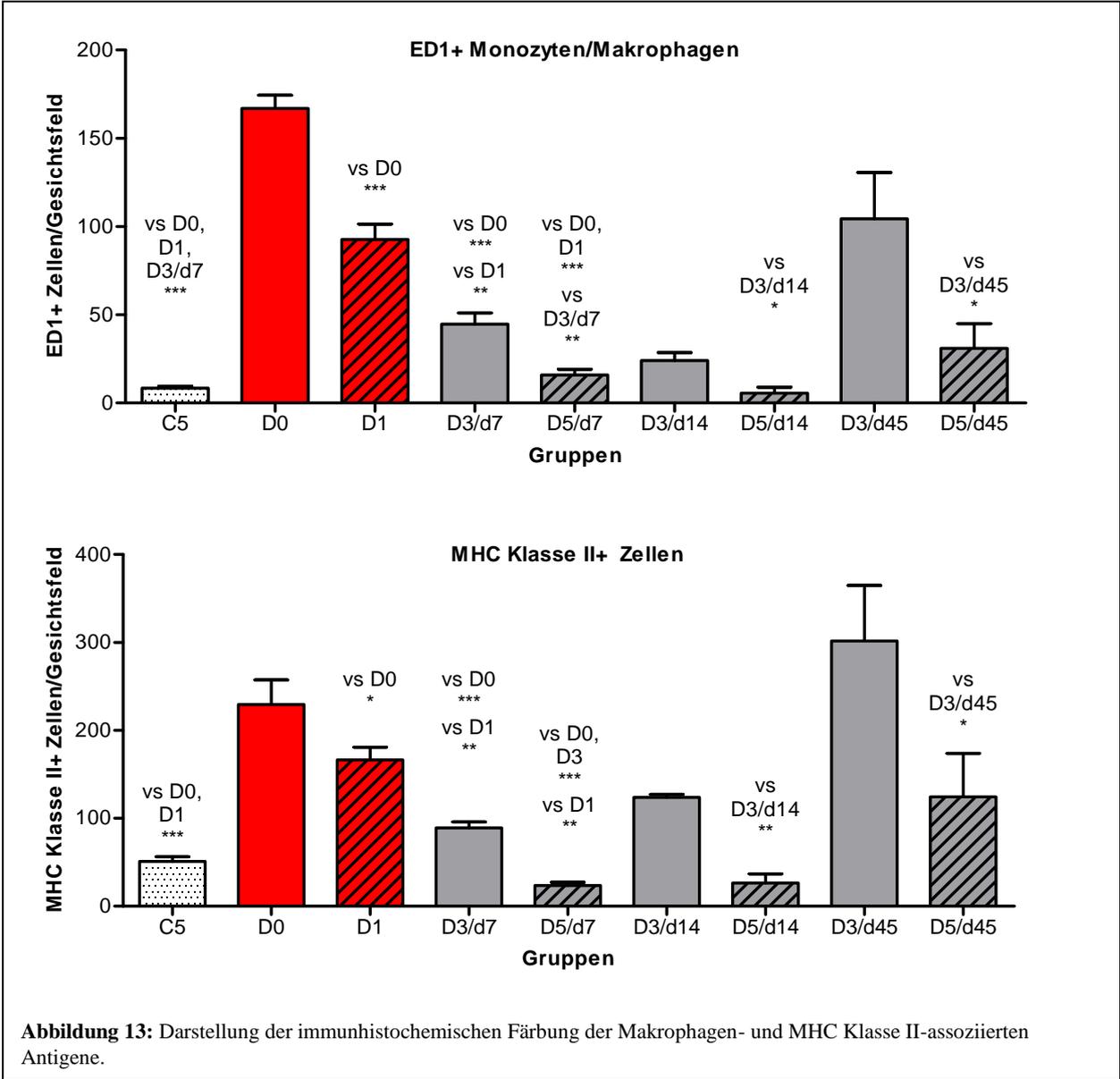
Die immunhistochemische Auswertung der Kryoschnitte vom 14. postoperativen Tag zeigten vor allem nach der Färbung für Makrophagen und MHC II Expression einen deutlichen Unterschied zwischen der D3- und der D5-Gruppe. Dabei war die Expression in der mitteldosierten Gruppe signifikant höher (Tabelle 10, Abbildung 13, ED1: D3 vs D5 $p = 0,0173$, MHC II: D3 vs D5 $p = 0,0022$).

Am Tag 45 nach der Dünndarmtransplantation zeigte auch die Immunhistochemie den deutlichen Unterschied zwischen Transplantaten, die eine schwere chronische Abstoßung entwickelten und Transplantaten, die eine moderate chronische Abstoßung aufwiesen. So konnte in hochdosierten Tieren eine signifikant reduzierte Zellinfiltration und MHC II Expression nachgewiesen werden (Tabelle 10, Abbildung 12, CD4: D3 vs D5 $p = 0,0095$; Abbildung 13, ED1: D3 vs D5 $p = 0,0303$, MHC II: D3 vs D5 $p = 0,0411$).

Gruppe	CD4	CD8	ED1	MHC Klasse II
C5	65,90 ± 6,30	6,13 ± 4,15	8,45 ± 2,53	50,87 ± 13,15
D0	146,70 ± 24,36	144,50 ± 13,45	166,90 ± 16,58	229,50 ± 62,31
D1	109,00 ± 17,83	63,88 ± 48,04	92,70 ± 21,45	166,50 ± 32,30
D3/d7	97,20 ± 15,37	8,37 ± 3,33	44,62 ± 15,82	88,99 ± 16,53
D5/d7	28,18 ± 11,94	10,40 ± 5,05	15,88 ± 7,99	23,48 ± 8,30
D3/d14	34,63 ± 25,11	8,63 ± 5,81	24,05 ± 10,99	123,80 ± 8,35
D5/d14	31,76 ± 12,48	1,37 ± 1,69	5,64 ± 7,56	26,48 ± 25,61
D3/d45	158,40 ± 31,06	36,26 ± 15,83	104,40 ± 64,4	301,80 ± 154,70
D5/d45	37,75 ± 14,10	30,40 ± 13,56	31,02 ± 31,12	124,30 ± 121,30

Tabelle 10: Immunhistochemische Färbung der T-zell-, Makrophagen- und MHC II-assozierten Antigene der Dünndarmtransplantate aller Gruppen. Darstellung der Mittelwerte ± Standardabweichung.

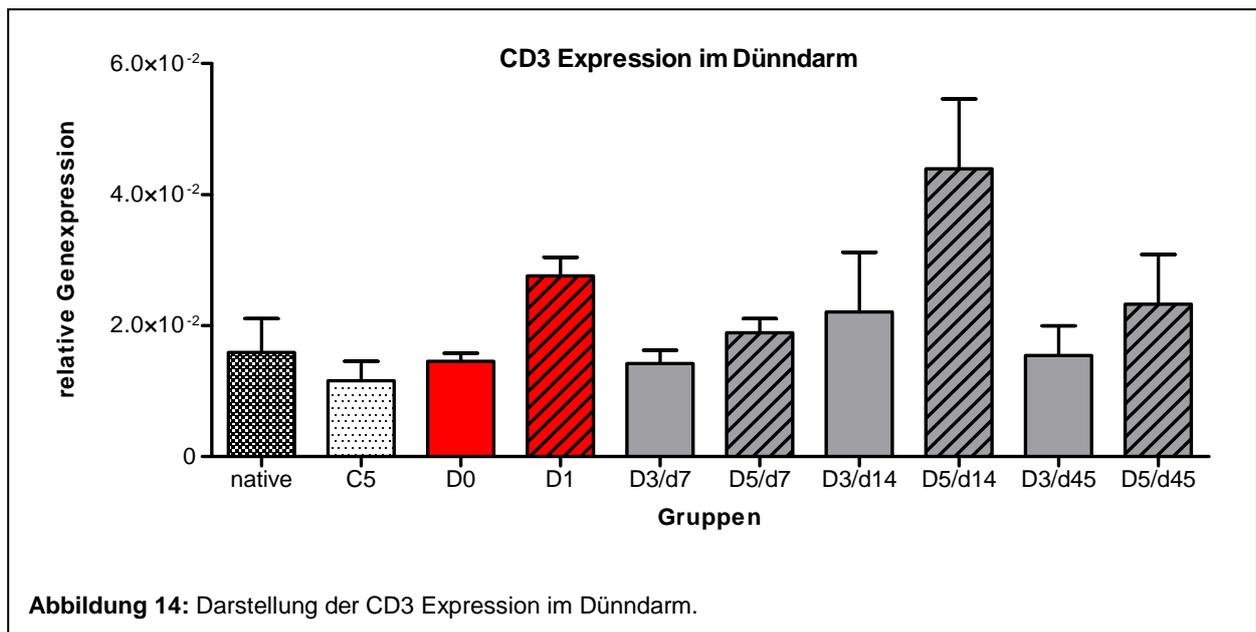




3.4 rtPCR der Organproben

3.4.1 CD3-Expression im Dünndarmtransplantat

Die Analyse der CD3 Genexpression im Dünndarmtransplantat erbrachte, wie in Abbildung 14 zu sehen ist, keine relevanten Unterschiede. Es konnte zwar eine Erhöhung des CD3-Levels in der D1-, D3- und der D5-Gruppe beobachtet werden, jedoch erreichte diese keine statistische Signifikanz. Somit war es nicht möglich mithilfe von PCR-Analysen der CD3 Expression in den Organproben eine Aussage bezüglich des Grades der Abstoßung zu treffen.

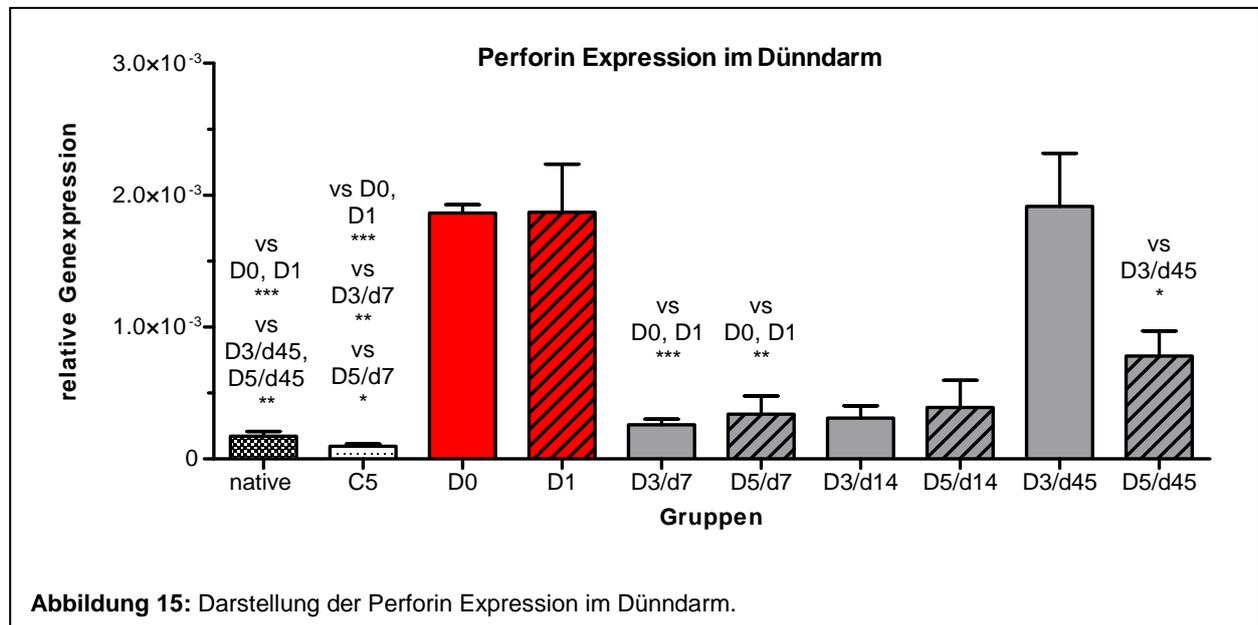


3.4.2 Perforin Expression im Dünndarmtransplantat

Die Analyse der Perforin Expression am 7. postoperativen Tag zeigte einen signifikant höheren Perforinspiegel in niedrigdosierten und nicht-immunsupprimierten Tieren (D0/D1) im Vergleich zu Nativkontrollen und mittel- und hochdosierten Tieren (D3/D5), wobei letztere vergleichbar waren mit den Nativkontrollen (Abbildung 15, D0/D1 vs D3/D5 $p < 0,01$, D0/D1 vs nativ $p < 0,001$, D5 vs nativ $p = 0,2727$).

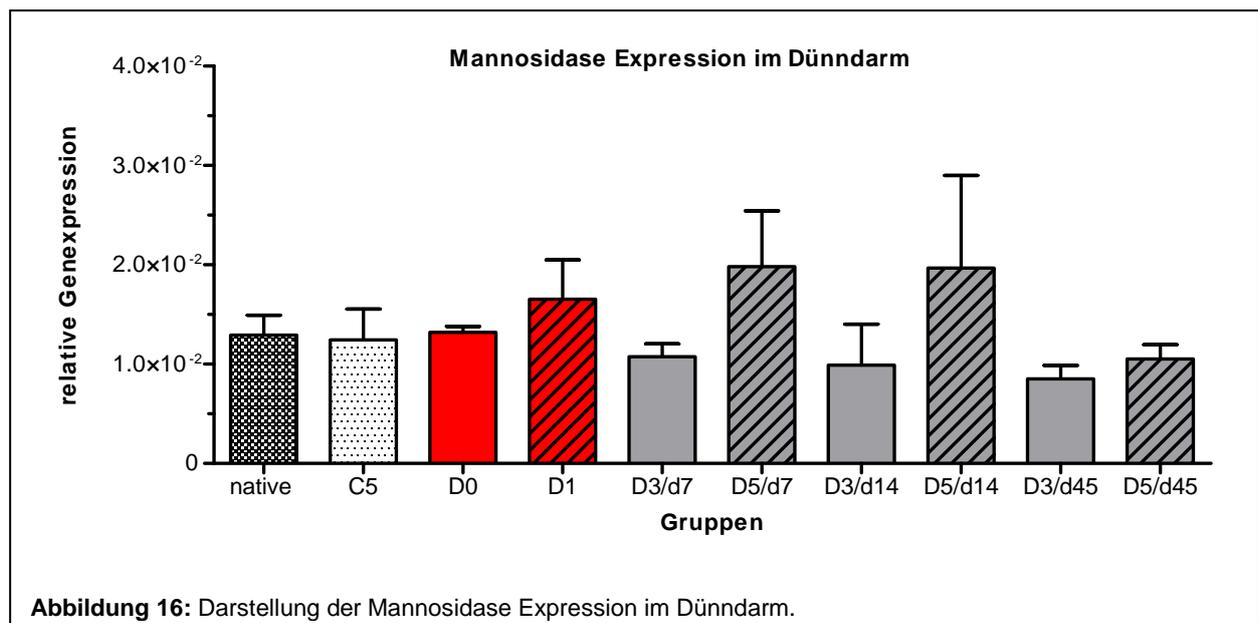
Während keine frühzeitige (Tag 7 und 14) Diskriminierung zwischen den chronisch abstoßenden Gruppen (D3 und D5) und Nativkontrollen möglich war, konnte am 45. postoperativen Tag eine signifikant höhere Perforin Expression sowohl in der D3- als auch in der D5-Gruppe gemessen werden (Abbildung 15, D3 vs nativ $p = 0,0015$, D5 vs nativ $p = 0,0072$). Zusätzlich wiesen die Organproben aus der D3-Gruppe zu diesem Zeitpunkt ein deutlich höheres Perforin-Level auf als Proben der D5-Gruppe (Abbildung

15, D3 vs D5 $p=0,0408$), wodurch am Tag 45 eine Unterscheidung zwischen schwer und moderat chronisch abstoßenden Tieren möglich war.



3.4.3 Alpha-1,2-Mannosidase Expression im Dünndarmtransplantat

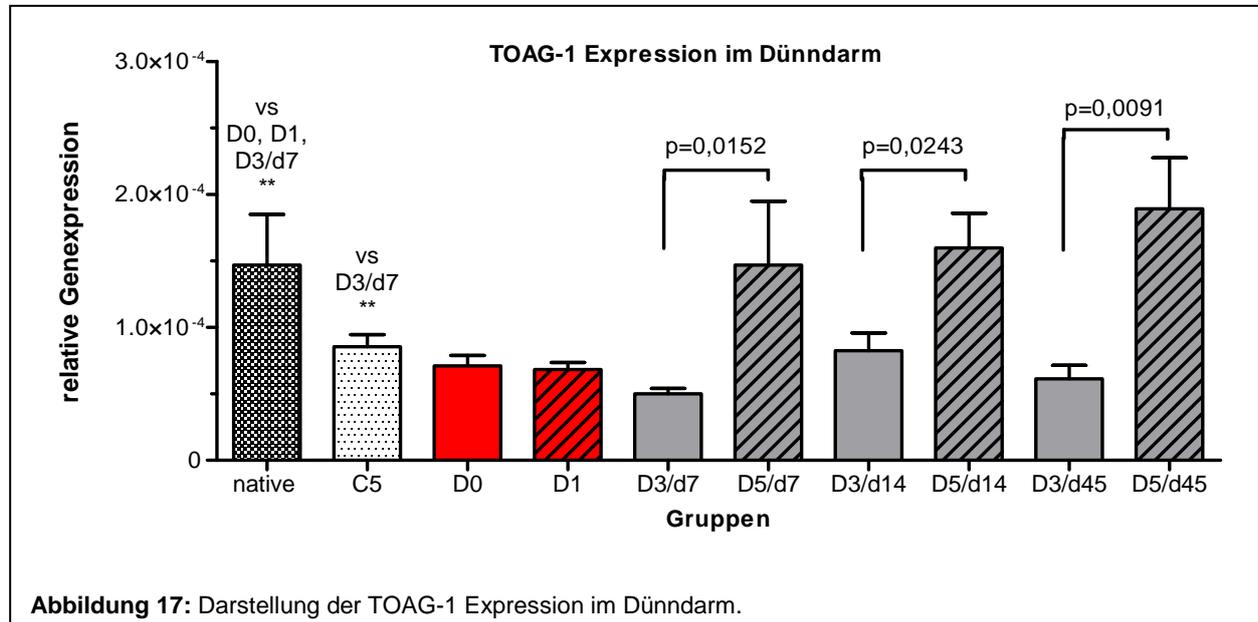
In den Dünndarmtransplantatproben konnte über den gesamten Beobachtungszeitraum keine signifikante Veränderung der α -1,2-Mannosidase Expression in den unterschiedlichen Gruppen beobachtet werden.



Es zeigte sich zwar vor allem eine reduzierte Genexpression in den mitteldosierten (D3) gegenüber den hochdosierten Gruppen (D5) zu allen Zeitpunkten, jedoch wiesen sie keine statistische Signifikanz auf. Es konnte somit keine Korrelation zu den histologischen Ergebnissen gefunden werden, sodass es mithilfe von α -1,2-Mannosidase-PCR-Analysen in den Organen nicht möglich war, eine Aussage bezüglich des Abstoßungsgrades zu treffen.

3.4.4 TOAG-1 Expression im Dünndarmtransplantat

Schon an Tag 7 konnte eine signifikant reduzierte TOAG-1 Genexpression in Proben von D0-, D1- und D3-Tieren nachgewiesen werden, wohingegen der TOAG-1-Spiegel in hochdosierten Tieren über den gesamten Beobachtungszeitraum stabil blieb (Abbildung 17, nativ vs D0/D1 $p < 0,01$, nativ vs D3/d7 $p = 0,0043$, nativ vs D5/d7 $p = 0,999$). Die Genexpression von TOAG-1 in Proben von mitteldosierten Tieren (D3) erreichte das Ausmaß von akut abstoßenden Tieren und war sowohl an Tag 7, als auch an Tag 14 und 45 signifikant geringer als die von Transplantatempfängern der Hochdosis-Gruppe (Abbildung 17).

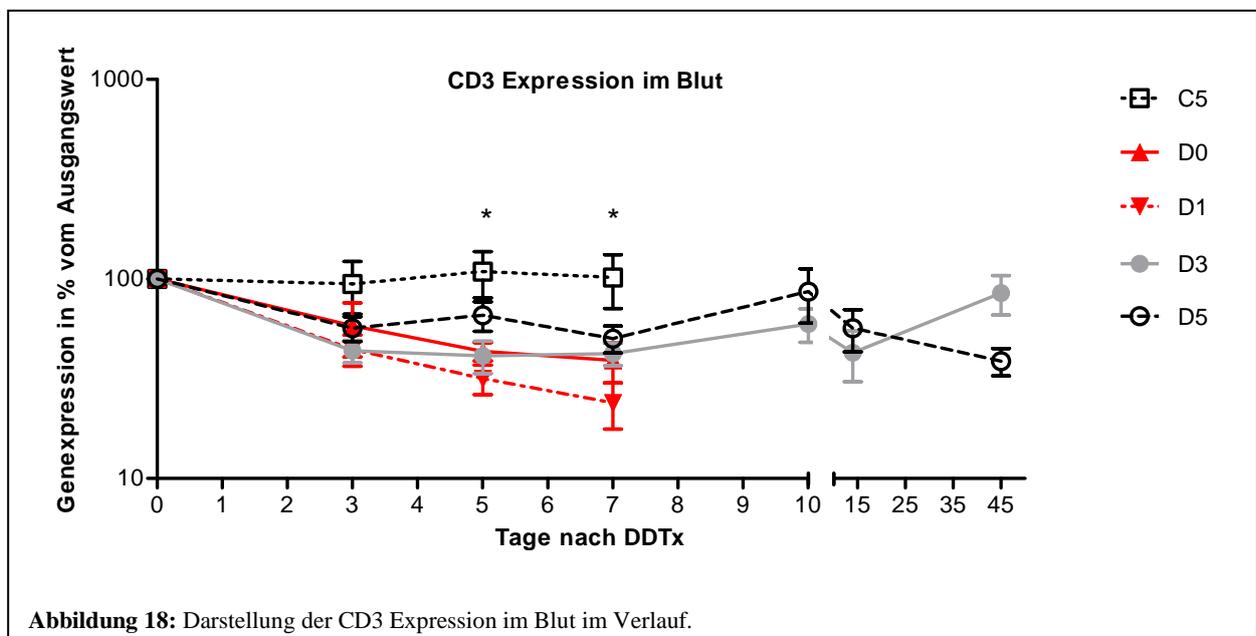


Im Vergleich zu Perforin zeigten Analysen von TOAG-1 somit schon eine frühzeitigere Veränderung der Genexpression und damit einen Unterschied sowohl zwischen akut und moderat chronisch abstoßenden Tieren (D0/D1 vs D5) als auch zwischen schwer chronisch und moderat chronisch abstoßenden Tieren (D3 vs D5).

3.5 rtPCR der Blutproben

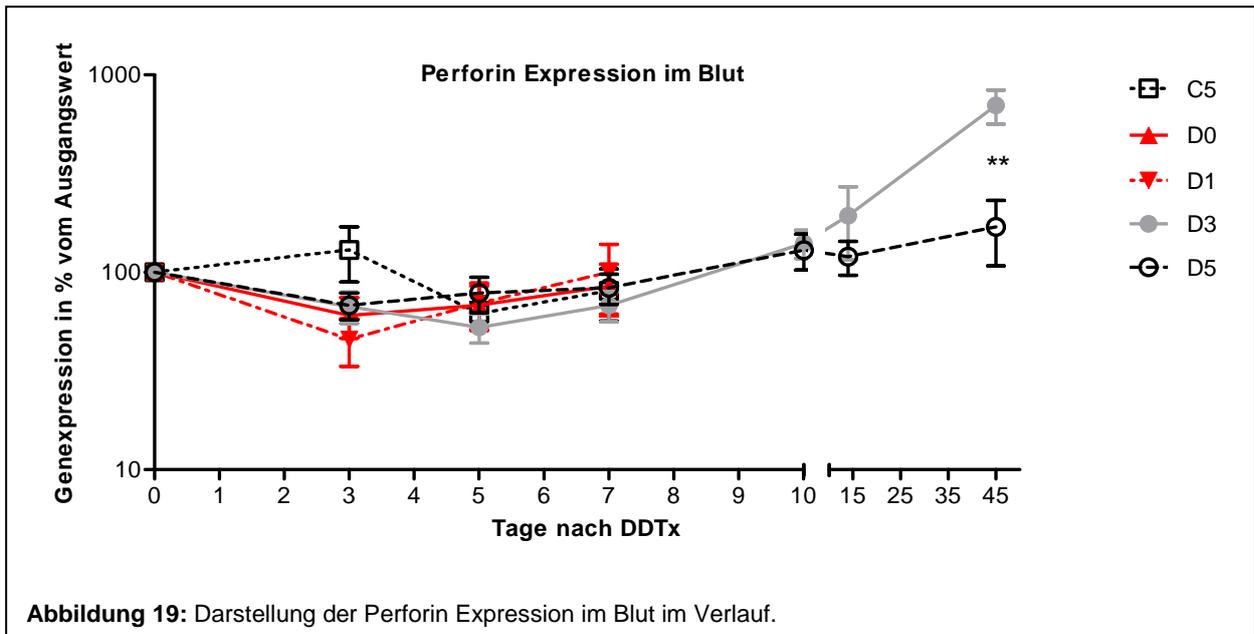
3.5.1 CD3 Expression in peripheren Blutproben

In den ersten 7 postoperativen Tagen konnte eine Herabregulation der CD3 Genexpression in allen Gruppen beobachtet werden. Eine signifikante Reduktion des CD3-Spiegels zeigte sich in den Gruppen D0, D1 und D3 im Vergleich zur Kontrollgruppe an Tag 5 und 7 (Abbildung 18, Tag 5: C5 vs D0/D3 $p < 0,05$, C5 vs D1 $p < 0,01$; Tag 7: C5 vs D1 $p = 0,0023$, C5 vs D3 $p = 0,0129$). Dies erhärtet die Rolle von CD3 in der akuten Abstoßung. Es war jedoch zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied zwischen der D3 und der D5 Gruppe zu eruieren, sodass eine Differenzierung mittels CD3-Evaluation zwischen der schwer und moderat chronisch abstoßenden Gruppe nicht möglich war.



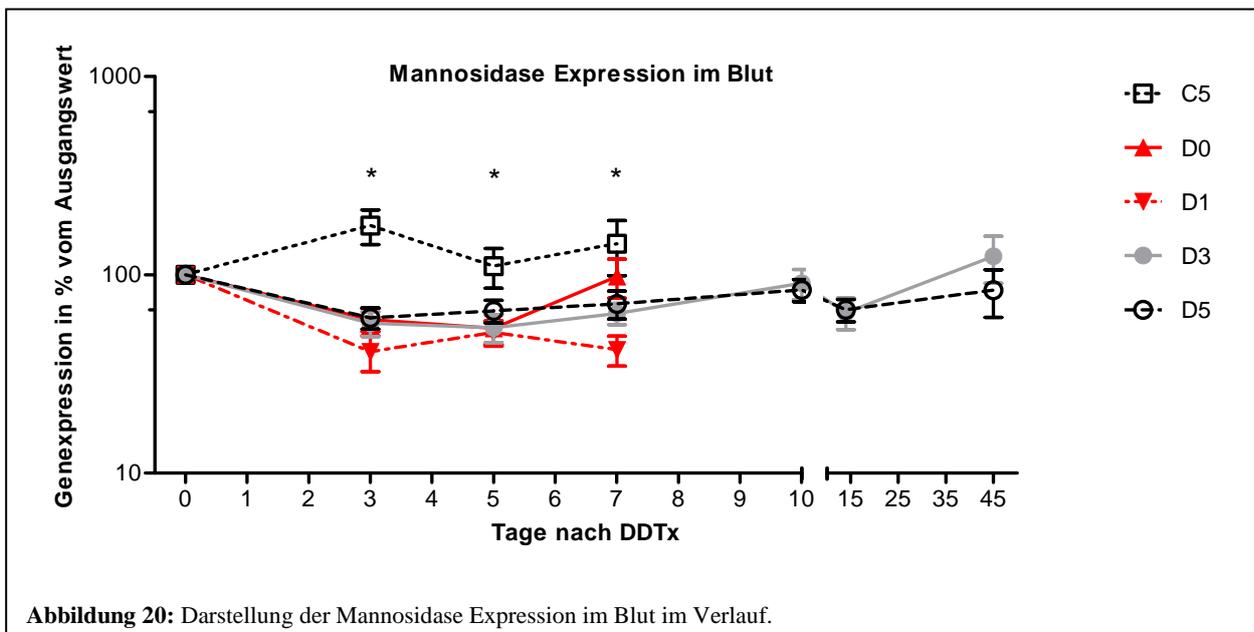
3.5.2 Perforin Expression in peripheren Blutproben

In den ersten 14 Tagen war aufgrund der Analyse der Perforin Genexpression im Blut keine Differenzierung zwischen akut und chronisch abstoßenden Tieren möglich. Erst zum Ende des Beobachtungszeitraumes war ein signifikanter Anstieg des Perforin-Spiegels in der D3-Gruppe erkennbar (Abbildung 19, Tag 45: D3 vs D5 $p = 0,0022$). Die Perforin-Analyse bietet somit die Möglichkeit der Unterscheidung und Detektion von schwer oder moderat chronischer Abstoßung während der manifesten Abstoßungsreaktion, jedoch konnte keine Korrelation zwischen der frühen Perforin Expression und der späteren Histologie ermittelt werden.



3.5.3 Alpha-1,2-Mannosidase Expression in peripheren Blutproben

Die Untersuchung der α -1,2-Mannosidase Expression erbrachte über die ersten sieben Tage eine signifikante Reduzierung aller transplantierten Gruppen gegenüber der Kontrollgruppe (Abbildung 20, Tag 3: C5 vs D0/D5 $p < 0,05$, C5 vs D1/D3 $p < 0,01$; Tag 5: C5 vs D0/D1/D3/D5 $p < 0,05$; Tag 7: C5 vs D1/D3 $p < 0,01$, C5 vs D5 $p < 0,05$).



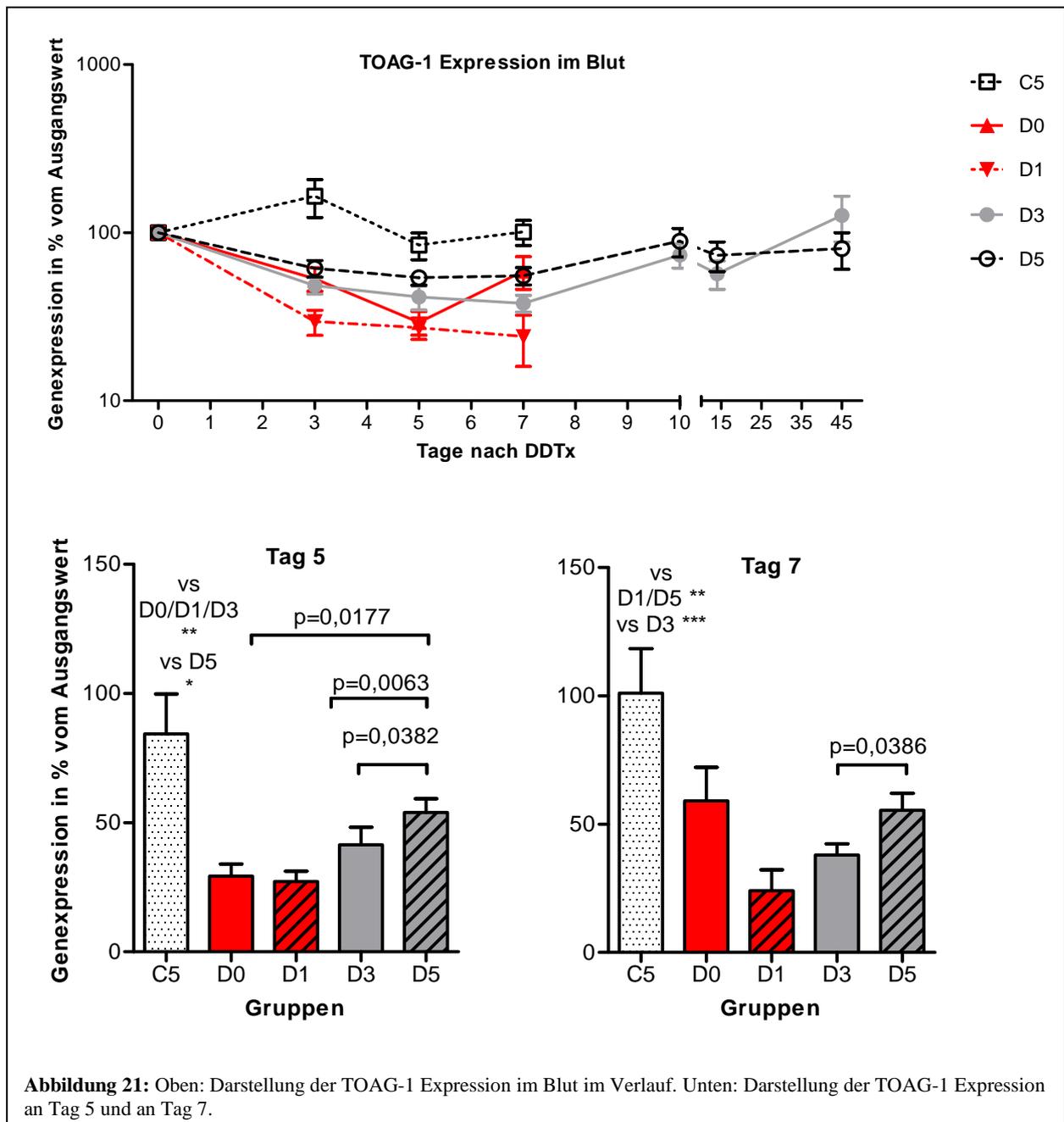
Zwischen den akut und chronisch abstoßenden Tieren konnte jedoch kein Unterschied gemessen werden. Alle transplantierten Tiere entwickelten im Laufe des

Beobachtungszeitraumes eine Abstoßung, dennoch konnte zu keinem Zeitpunkt eine lineare Korrelation zwischen der α -1,2-Mannosidase Expression und der Histologie ermittelt werden.

3.5.4 TOAG-1 Expression in peripheren Blutproben

Vergleichbar mit α -1,2-Mannosidase erbrachten auch die TOAG-1-Analysen in den ersten sieben Tagen eine signifikant reduzierte Genexpression in allen transplantierten Gruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abbildung 21, Tag 3: C5 vs D0 $p < 0,05$, C5 vs D1/D3 $p < 0,01$, C5 vs D5 $p < 0,001$; Tag 5: C5 vs D0/D1/D3 $p < 0,01$, C5 vs D5 $p < 0,05$; Tag 7: C5 vs D1/D3/D5 $p < 0,05$).

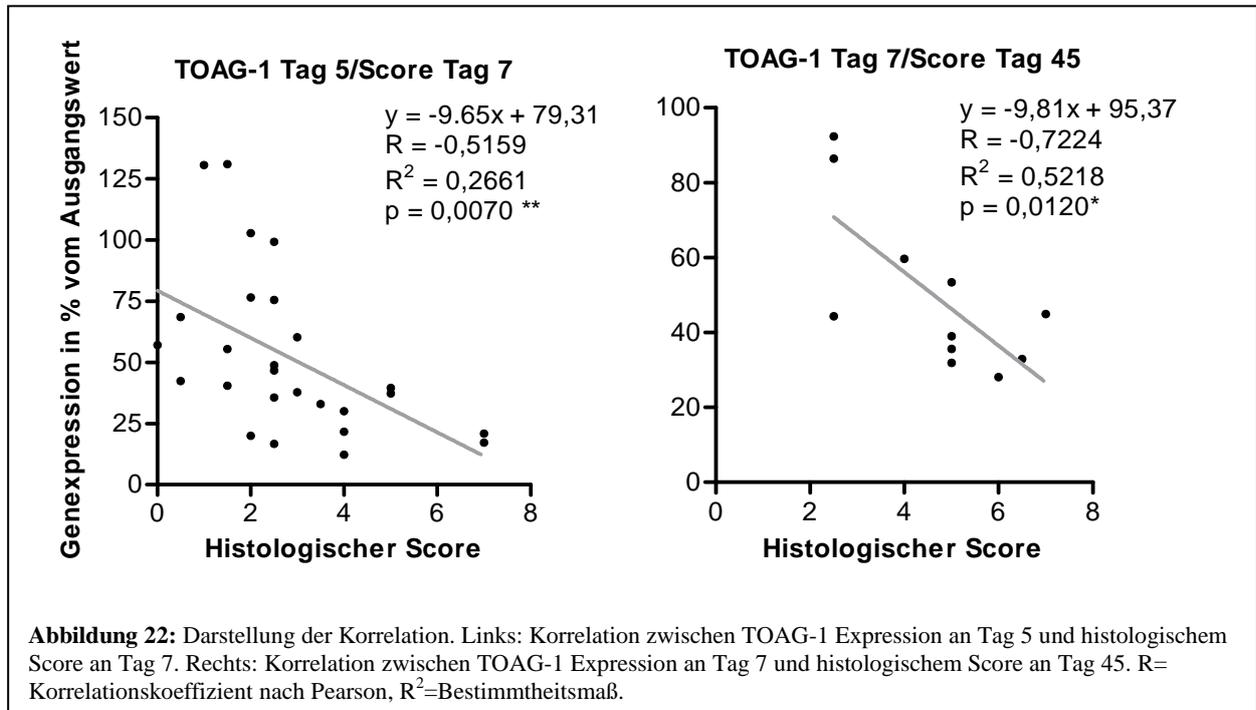
Wie in Abbildung 21 zu sehen ist, konnte besonders an Tag 5 nach DDTx trotz gleichzeitiger Reduktion der TOAG-1 Genexpression in der D5-Gruppe ein signifikant geringerer Spiegel in der D0-, D1- und D3-Gruppe gegenüber der Hochdosis-Gruppe gemessen werden (Tag 5: D5 vs D0 $p = 0,0177$, D5 vs D1: $p = 0,0063$, D3 vs D5 $p = 0,0382$). Auch an Tag 7 konnte ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der schwer chronischen und der moderat chronischen Gruppe gemessen werden (Abbildung 21, Tag 7: D3 vs D5 $p = 0,0386$), obwohl zu diesem Zeitpunkt histologisch kein Unterschied zwischen diesen beiden Gruppen erkennbar war. Somit erscheint TOAG-1 als ein Rejektionsmarker, der sowohl die frühe Vorhersage der Entwicklung einer Abstoßung als auch die Differenzierung zwischen akut, schwer chronisch und moderat chronisch ermöglichen könnte.



Die in Abbildung 22 dargestellten Korrelationen verdeutlichen die Bedeutung als Rejektionsmarker. Mit einem Korrelationskoeffizient von $-0,5159$ besteht bei einer Signifikanz von $p=0,007$ ein linearer negativer Zusammenhang zwischen TOAG-1 an Tag 5 und dem histologischen Score an Tag 7, womit am 5. postoperativen Tag eine Aussage mithilfe der TOAG-1 Genexpression bezüglich der histologischen Entwicklung in der akuten Phase gemacht werden kann.

Weiterhin besteht, wie die rechte Seite der Abbildung 22 zeigt, eine signifikante negative lineare Korrelation ($p=0,0120$) mit einem Korrelationskoeffizienten von $-0,7224$

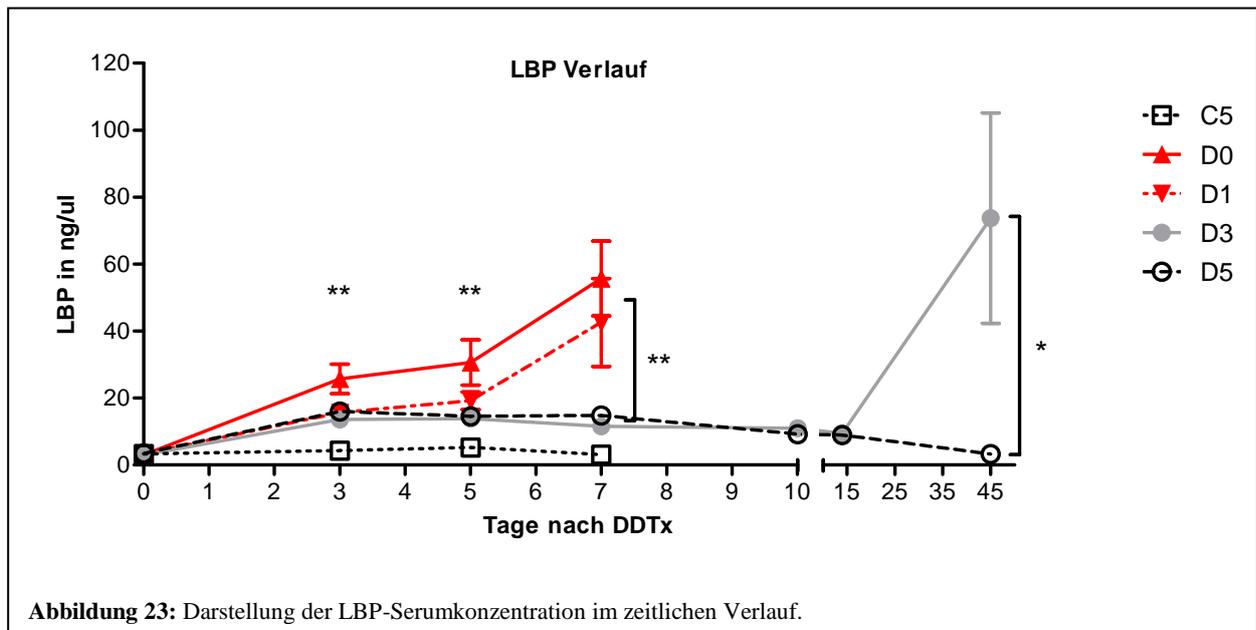
zwischen der peripheren TOAG-1 Expression und dem histologischen Score an Tag 45, sodass sieben Tage nach der Dünndarmtransplantation eine Aussage bezüglich der Entwicklung einer schwer oder moderat chronischen Abstoßung im Langzeitüberleben getroffen werden kann.



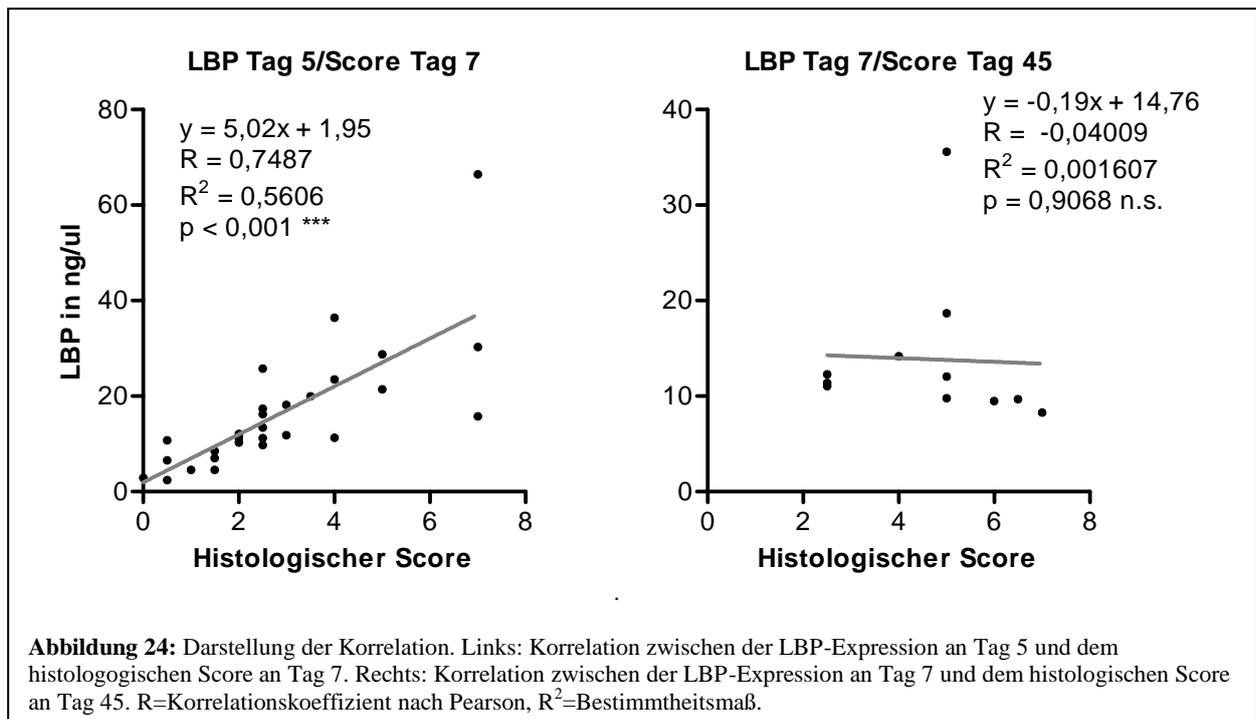
3.6 Lipopolysaccharid binding protein

In den ersten fünf postoperativen Tagen fand sich ein statistisch signifikanter Anstieg der LPB-Serumkonzentration in allen transplantierten Gruppen (Abbildung 23, Tag 3: C5 vs D0/D1/D5 $p < 0,001$, C5 vs D3 $p < 0,01$, Tag 5: C5 vs D0/D3/D5 $p < 0,01$, C5 vs D1 $p < 0,001$). Während am 3. Tag nach DDTx noch kein Unterschied zwischen den transplantierten Gruppen zu sehen war, zeigte sich am 5. und vor allem am 7. Tag nach DDTx ein deutlich stärkerer Anstieg der LBP-Konzentration in akut abstoßenden Tieren im Vergleich zu einem moderateren Anstieg in mittel- und hochdosierten Transplantatempfängern (Abbildung 23, Tag 7: D0 vs D3/D5 $p < 0,001$, D1 vs D3/D5 $p < 0,01$). Zwischen D0- und D1-behandelten Tieren bestand bis zum 7. Tag kein Unterschied (Tag 7: $p = 0,4644$), ebenso zwischen D3- und D5-behandelten Ratten in den ersten 2 Wochen (Abbildung 23, Tag 5: $p = 0,7154$, Tag 14: $p = 0,7442$).

Jedoch konnte zum Ende des Beobachtungszeitraums ein signifikant angestiegener LBP-Spiegel in Serumproben von schwer chronisch abstoßenden Tieren gemessen werden, während die LBP-Konzentration von Tieren mit moderater chronischer Abstoßung annähernd dem Ausgangswert entsprach (Abbildung 23, Tag 45, D3 vs D5: $p=0,0349$).



Während bezüglich der frühen histologischen Entwicklung eine signifikante positive lineare Korrelation besteht (Abbildung 24, links), konnte diese an Tag 7 für die spätere Entwicklung nicht nachgewiesen werden (Abbildung 24, rechts). Somit eignet sich die LBP-Messung für das frühzeitige Screening auf eine akute Abstoßung, jedoch nicht für die chronische Rejektion. Diese kann erst zu einem späteren Zeitpunkt detektiert werden (Abbildung 23, Tag 45).

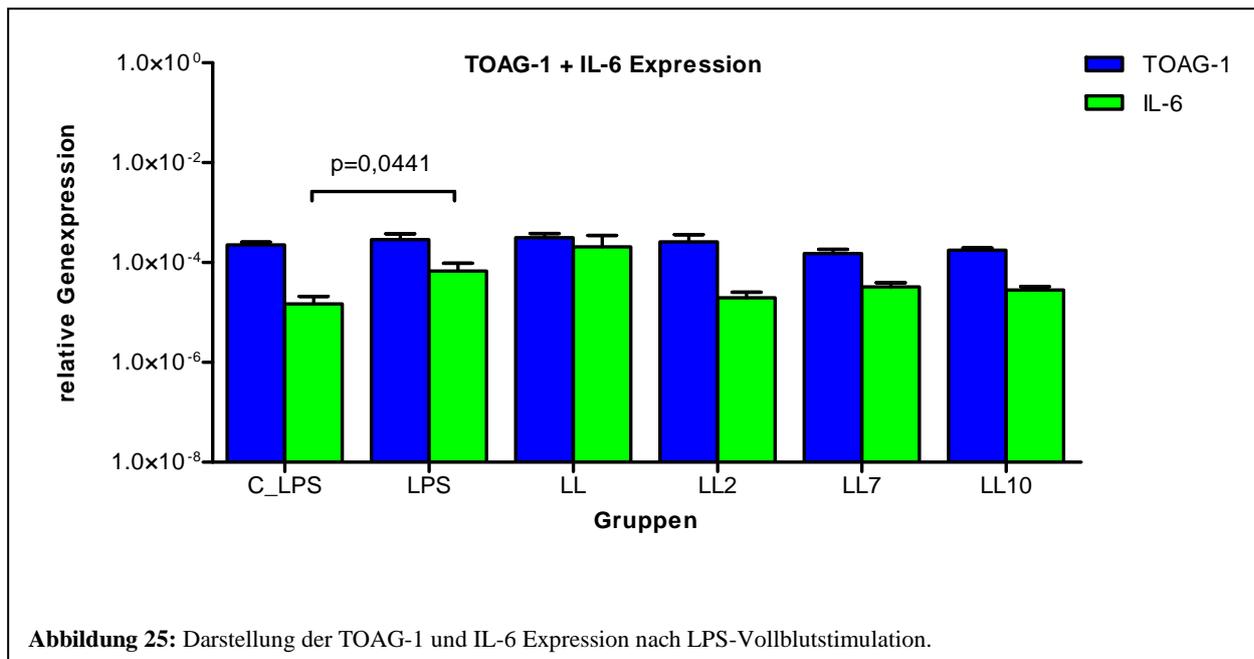


3.7 LPS-Vollblutstimulation

Die Vollblutstimulation mit dem Lipopolysaccharid führte zu einer signifikant erhöhten IL-6-Expression (Abbildung 25, IL-6, C_LPS vs LPS: $p=0,0441$), wohingegen weder nach LPS noch nach kombinierter LPS/LBP-Stimulation eine signifikante Herabregulation der TOAG-1 Genexpression gemessen werden konnte.

Die *in vitro* Tacrolimus Behandlung mit der jeweiligen im Blut bestimmten Konzentration der einzelnen Gruppen hatte keinen Einfluss auf die TOAG-1 Expression (Abbildung 25, TOAG-1).

Dies lässt vermuten, dass weder septisch entzündliche Vorgänge noch die Tacrolimus Behandlung selbst eine Veränderung der TOAG-1 Expression bewirken, sodass dieser Marker als spezifisch für alloimmune Reaktionen anzusehen wäre.

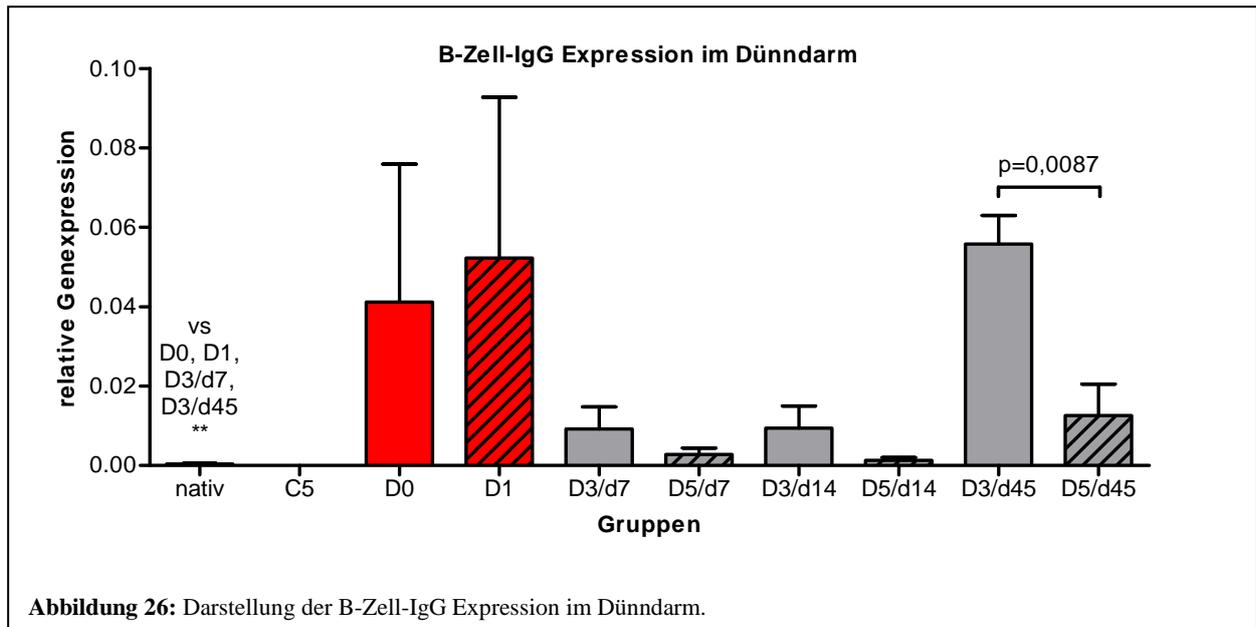


3.8 Humorale Immunantwort

3.8.1 rtPCR der B-Zell-IgG Expression in den Organproben

In den ersten sieben Tagen nach DDTx zeigte sich in Dünndarmproben von Tieren, die niedrig-, mitteldosiert oder nicht immunsupprimiert wurden ein signifikanter Anstieg der B-Zell-IgG Expression, während hochdosiert behandelte Tiere keinen Unterschied zu Nativkontrollen aufwiesen (Abbildung 26, nativ vs D0/D1/D3 $p < 0,01$, nativ vs D5/d7 $p = 0,5476$). Weder an Tag 7 noch an Tag 14 war eine Differenz in den Organproben der D3- und der D5-Gruppe zu messen (Abbildung 26, Tag 7: D3 vs D5 $p = 0,2468$; Tag 14: D3 vs D5 $p = 0,1797$). Erst zum Ende des Beobachtungszeitraumes wies die D3-Gruppe ein gegenüber der Nativkontrolle und der D5-Gruppe signifikant gestiegenen B-Zell-IgG-Spiegel auf, sodass hier auch die Differenzierung zwischen schwer chronisch und moderat chronisch erfolgen konnte (Abbildung 26, Tag 45: D3 vs nativ $p = 0,0079$, D3 vs D5 $p = 0,0087$).

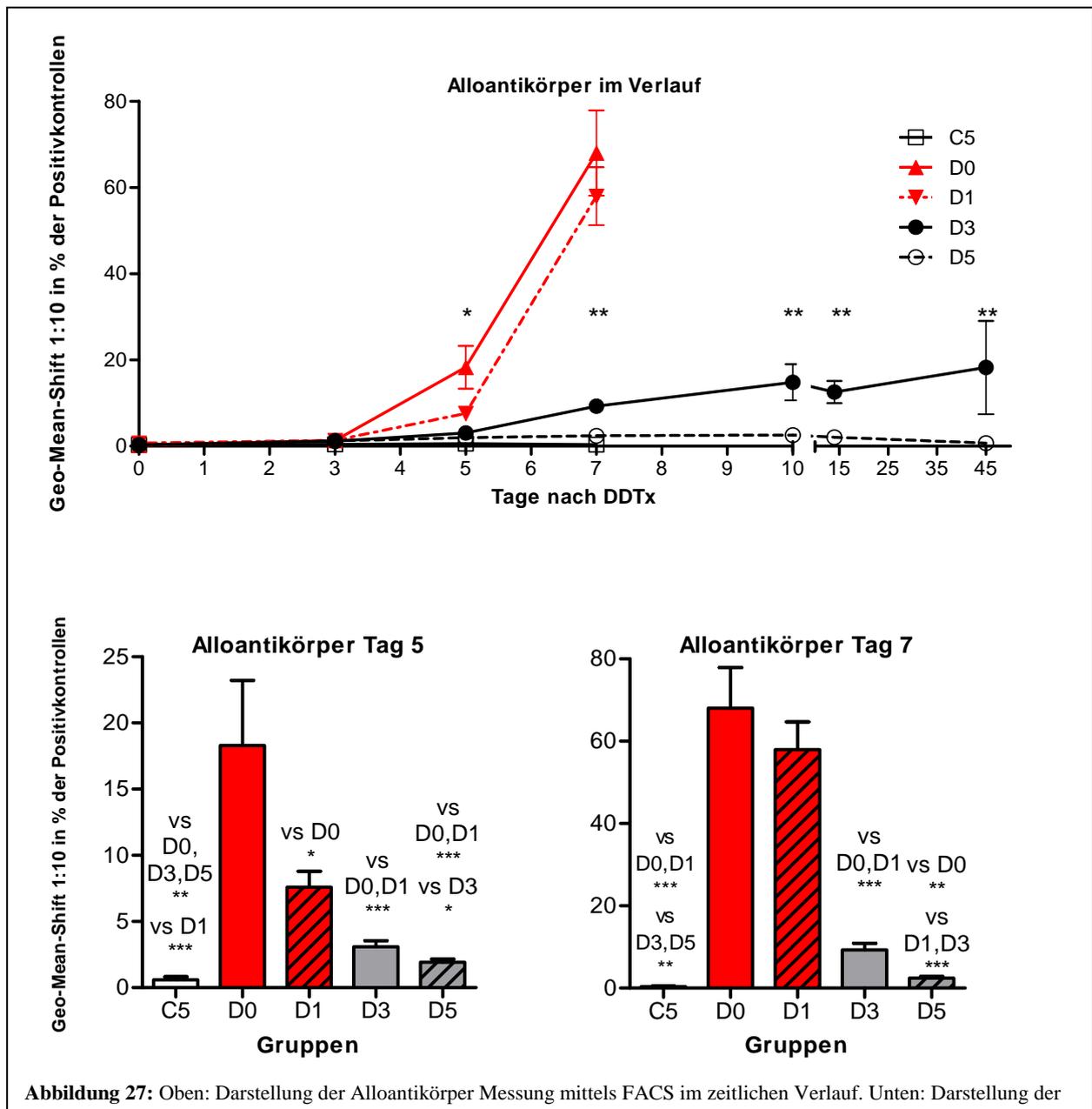
Da während des gesamten Beobachtungszeitraumes kein signifikanter Anstieg der hochdosierten Gruppe zu detektieren war, diese aber trotzdem an Tag 45 histologische Zeichen einer moderaten Abstoßung aufwies, eignet sich die Messung der B-Zell-IgG Expression eher als Screening und weniger als Vorhersageparameter.



3.8.2 FACS-Messung der Alloantikörper in peripheren Plasmaproben

Beginnend ab dem 5. postoperativen Tag (Abbildung 27, oben) war der Spiegel der Alloantikörper in den akut abstoßenden Gruppen D0 und D1 signifikant höher als in den nichttransplantierten/Tac behandelten Tieren und den chronisch abstoßenden Gruppen D3 und D5 (Abbildung 27, Tag 5: C5 vs D0/D1 $p < 0,01$, D3/D5 vs D0/D1 $p < 0,001$). Weiterhin war zu diesem frühen Zeitpunkt auch schon ein deutlich erhöhter Spiegel in den beiden chronisch abstoßenden Gruppen zu beobachten, obwohl zu diesem Zeitpunkt noch kein histologisches Korrelat zu sehen war (Abbildung 27, Tag 7: C5 vs D3 $p = 0,004$, C5 vs D5 $p = 0,0014$).

Zusätzlich konnte ab dem 5. Tag nach DDTx zwischen der mittel- und hochdosierten Gruppe ein signifikanter Unterschied der Alloantikörper Expression über den gesamten Zeitraum beobachtet werden (Abbildung 27, oben, Tag 7: D3 vs D5 $p = 0,0001$, Tag 14: D3 vs D5 $p = 0,0005$, Tag 45: D3 vs D5 $p = 0,0161$), ohne histopathologische Veränderungen an Tag 7 und 14.



Die Möglichkeit der frühen Vorhersage einer akuten oder chronischen Abstoßung verdeutlicht die Abbildung 28. Zu erkennen ist eine signifikante positive Korrelation zwischen dem Alloantikörperspiegel an Tag 5 und dem histologischen Befund an Tag 7 (Abbildung 28, links, $R=0,609$, $p=0,0006$) sowie zwischen dem Alloantikörperspiegel an Tag 7 und dem histologischen Befund an Tag 45 (Abbildung 28, rechts, $R=0,6779$, $p=0,0347$).

Dies ermöglicht die frühe Vorhersage und die Differenzierung zum einen zwischen akuter und chronischer und zum anderen auch zwischen schwer chronischer und moderat chronischer Abstoßung.

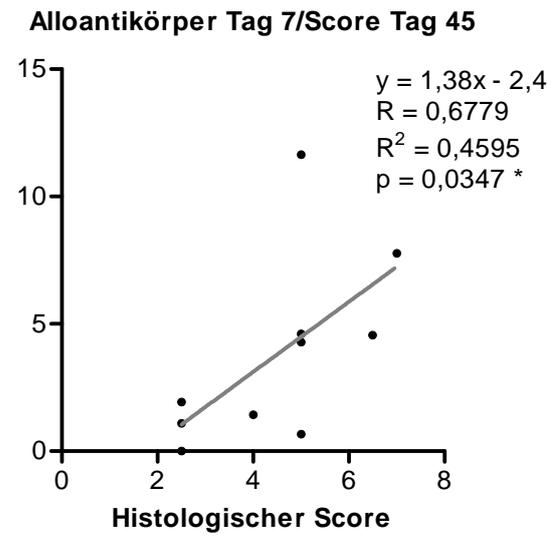
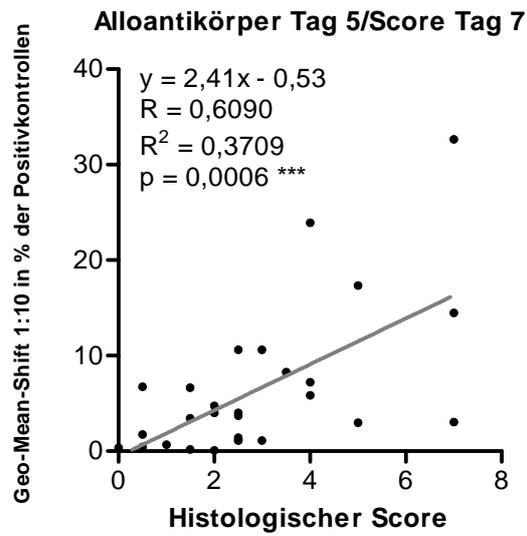


Abbildung 28: Darstellung der Korrelation. Links: Korrelation zwischen der Alloantikörpermessung an Tag 5 und dem histologischen Score an Tag 7. Rechts: Korrelation zwischen der Alloantikörpermessung an Tag 7 und dem histologischen Score an Tag 45. R=Korrelationskoeffizient nach Spearman, R^2 =Bestimmtheitsmaß.

4 Diskussion

4. 1 Diskussion der angewandten Methodik

Das postoperative Monitoring nach Nieren- und Lebertransplantation umfasst die Spiegelbestimmung der Basisimmunsuppression und die regelmäßige Kontrolle der Nierenretentionsparameter wie Harnstoff, Kreatinin und die glomeruläre Filtrationsrate beziehungsweise der Leberenzyme wie ASAT, ALAT, γ GT, AP sowie Bilirubin. Diese ermöglichen auch ohne Biopsie-Entnahme eine Einschätzung der Transplantatfunktion anhand serologisch gewonnener Ergebnisse.

Bisher gibt es jedoch keinen etablierten Screening-Test nach Dünndarmtransplantation. Hier besteht das frühe postoperative Monitoring hauptsächlich aus mehrfach wöchentlich durchzuführenden Protokollbiopsien über das diagnostische Ileostoma um histologisch eine akute zelluläre Abstoßung so zeitig wie möglich zu erkennen. Nach Verschluss des Ileostomas, in der Regel 6 Monate nach der DDTx, muss eine totale Koloskopie zur Verdachtssicherung durchgeführt werden. Die endoskopischen Untersuchungen sind invasive Eingriffe, welche eine entsprechende Koloskopie-Vorbereitung erfordern und mit Komplikationen wie Blutungen, Infektionen und vor allem Darmperforationen einhergehen können. Sowohl der Eingriff als auch die möglichen Komplikationen stellen zum einen eine Belastung für den Patienten und zum anderen einen erheblichen Kostenaufwand dar.

Hinzu kommt, dass das Hauptsymptom der Organdysfunktion, die Diarrhoe, ein sehr unspezifisches klinisches Zeichen ist, welches sowohl auf eine Rejektion als auch auf eine infektiöse Gastroenteritis, medikamenten-toxische oder nekrotisierende Enterokolitis hinweisen kann.

Dies alles zeigt die Notwendigkeit eines noninvasiven serologischen Markers, welcher frühzeitig eine Organdysfunktion bei einer akuten oder chronischen Abstoßung detektiert oder idealerweise eine Vorhersage trifft, ob es in dem Transplantatempfänger zu einer Immuntoleranz kommt oder nicht. Damit könnte zum einen das Monitoring nach DDTx vereinfacht und verbessert und zum anderen die Überlebensrate der Patienten und der Transplantate deutlich erhöht werden.

In dieser Arbeit war es möglich, durch quantitative Auswertung verschiedener Biomarker eine frühzeitige Diagnose akuter oder chronischer Abstoßung nach Dünndarmtransplantation im Rattenmodell zu treffen.

Als Grundlage dafür diente eine allogene orthotope Dünndarmtransplantation von Dark

Agouti auf Lewis-Ratten. Pro Versuchsgruppe wurde die Anzahl der Empfänger-/Spendertiere auf 8 Tiere festgelegt. Tiere, die kurzfristig aufgrund technischer Fehler oder postoperativer Komplikationen verstarben, wurden ausgeschlossen, sodass pro Gruppe ein Pool von 6-8 Tieren verblieb.

Nach erfolgter Explantation wurden die Gefäße des Spenderdünndarms mit einer Heparinlösung und anschließend eiskalten NaCl-Lösung perfundiert. Auf die Nutzung einer speziellen Konservierungslösung wurde aufgrund der kurzen Ischämiezeit (circa 30 Minuten) verzichtet. In der humanen orthotopen Dünndarmtransplantation wird eine durchschnittliche Ischämiezeit von 4-8 Stunden toleriert. An dem Berliner Transplantationszentrum liegt die mittlere Ischämiezeit bei circa 5 Stunden.¹⁹ Damit ist das hier gewählte Transplantationsmodell nur eingeschränkt vergleichbar mit der klinischen Realität. Dennoch ist eine Beeinflussung der Ergebnisse durch mögliche Ischämie-/Reperfusionsschäden letztendlich nicht auszuschließen. Für eine bessere Aussagekraft der Ergebnisse wäre eine zusätzliche Versuchsgruppe, in der eine isogene Dünndarmtransplantation von Lewis- auf Lewis-Ratten mit entsprechender Auswertung der Organ- und Blutproben durchgeführt worden wäre, notwendig gewesen.

Als immunsuppressives Monotherapeutikum wurde Tacrolimus gewählt, da es sich hierbei um das bisher potenteste Medikament nach tierexperimenteller Dünndarmtransplantation handelt.¹⁰⁶⁻¹⁰⁸ Ohne Immunsuppression betrug die mittlere Überlebenszeit 8,3 Tage. Nach humaner Dünndarmtransplantation erfolgt, sofern Tacrolimus als Immunsuppressivum gewählt wird, eine lebenslange Gabe als Basis- und Erhaltungstherapie. In dem hier gewählten Protokoll erhielten die Empfängertiere aus praktikablen Gründen nur eine single-shot Dosis Tacrolimus in drei unterschiedlichen Dosierungen. Guo et al.¹⁰⁹ zeigten jedoch, dass eine Vorbehandlung und eine postoperative low-dose Therapie signifikant verbesserte Überlebenszeiten erbrachten. Inwieweit sich eine realitätsnähere Gabe des Immunsuppressivums auf die histopathologischen Veränderungen beziehungsweise den Verlauf der untersuchten Biomarker auswirkt, müsste sicher in weiteren Untersuchungen eruiert werden. Hierbei sollte ein regelmäßiges Monitoring der Tacrolimusspiegel eine Rolle spielen.

Zur Bestimmung der jeweiligen Abstoßungsgrade war eine strukturierte Darstellung der histopathologischen Veränderungen nötig. Die Pathologie der humanen allogenen

Transplantatabstoßung beruht weitestgehend auf dem Konsens des Pathologie-Workshops des VIII International Small Bowel Transplant Symposium.⁵⁴ Derartige Leitlinien gibt es für Tiermodelle der DDTx aktuell nicht. Anhand der von uns durchgeführten Analyse der Organschnitte war es möglich, charakteristische Merkmale der akuten und chronischen Dünndarmabstoßung herauszufiltern, mit bisherigen Erkenntnissen zu vergleichen und zusammenzufassen.

Im Fall der akuten Abstoßung dominierte eine komplette Infiltration des Mesenteriums durch entzündliche Zellen, einhergehend mit einem ausgeprägten Zottenödem. Dies entspricht den Ergebnissen von Rosemurgy et al.¹⁰⁵ Zusätzlich zeigte sich in unseren Untersuchungen eine antimesenteriale Darmwandnekrose. Das Phänomen der antimesenterialen Darmwandnekrose wurde bisher nur nach Strahlenbelastung beschrieben.¹¹⁰ Im Rahmen des Ischämie-Reperfusionsschaden zeigten sich ebenfalls antimesenteriale Darmwandveränderungen.^{111, 112} In unseren Untersuchungen konnten diese Veränderungen typisch in Organproben von akut abstoßenden Empfängertieren beschrieben werden. Wie bereits erwähnt, ist ein Ischämie-/Reperfusionsschaden als ursächlich nicht sicher auszuschließen, jedoch waren die antimesenterialen Veränderungen in Organproben von Tieren, die eine chronische Rejektion entwickelten und der gleichen Ischämie-/Reperfusion-Zeit ausgesetzt waren, nicht zu beobachten. Charakteristisch für die chronische Abstoßung wurden in bisherigen Studien die mesenteriale Fibrose sowie eine ausgeprägte Vaskulitis mit vaskulärer Sklerose hervorgehoben.^{104, 113} Beide Erscheinungen zeigten sich ebenfalls in unseren Untersuchungen, sodass das hier gewählte Modell die klinisch beschriebenen Veränderungen widerspiegelt und damit zur Untersuchung der nicht-invasiven Marker geeignet ist.

Den beschriebenen histopathologischen Veränderungen wurde je nach Ausprägung ein Punktwert zugeordnet, sodass anhand dieser Scores eine Einteilung in verschiedene Schweregrade der Abstoßung erfolgen konnte. Dies ermöglichte eine anschaulichere Darstellung und Vereinfachung der histologischen Auswertung.

Zusätzlich zur Histologie analysierten wir die Immunhistologie. Im Rahmen einer Abstoßungsreaktion zeigte sich eine deutliche infiltrative Zunahme von ED1+ Monozyten/Makrophagen, CD4+/-, CD8+-T-Zellen und MHC-Klasse-II+-Zellen. Dies entspricht auch bisherigen Studien.^{70, 114} Hier konnte jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen akuter und chronischer Abstoßung getroffen werden, sodass die

Quantifizierung dieser immunhistochemischen Marker im Rahmen der histologischen Auswertung nur einen unterstützenden Stellenwert einnahm.

Zur Bestimmung der unterschiedlichen Biomarker wurden für TOAG-1, α -1,2-Mannosidase, Perforin und CD3 die Realtime Reverse-Transkriptase-PCR angewendet. Die RNA-Isolierung erfolgte mit dem Absolutely RNA® Miniprep Kit von Stratagene, basierend auf der von Chomczynski et al. entwickelten single-step-Methode mit Guanidinium-Isothiocyanat (GITC), einem chaotropen Salz zur RNase-Inhibition.¹¹⁵ Da die konventionelle cDNA-Synthese, wie sie für die Organproben angewendet wurde, nicht sensibel genug für die gering konzentrierten Blutproben war (<100 ng/ul), wurde hier das Quantitect Reverse Transcription Kit von Quiagen verwendet.

Wie eingangs erwähnt stellt sich in der Literatur das Akute-Phase-Protein Lipopolysaccharid Binding Protein als weiterer möglicher Biomarker für die Beurteilung einer Rejektion dar.^{89, 90} Zur Quantifizierung dessen wurde das standardisierte LBP ELISA Kit von Hycult biotechnology genutzt.

Aufgrund der vielversprechenden Ergebnisse des Tolerance associated gene-1 bezüglich der quantitativen Veränderungen während beziehungsweise vor einer Rejektion bestand zusätzlich die Frage, inwieweit dieser Genmarker durch septische Vorgänge beziehungsweise durch das Immunsuppressivum Tacrolimus beeinflusst wird. Hierzu wurde *in vitro* Vollblut von naiven Ratten mit dem von gramnegativen Bakterien produzierten Endotoxin Lipopolysaccharid inkubiert um damit eine künstliche Sepsis zu schaffen. Parallel dazu wurde Tacrolimus in den von uns verwendeten unterschiedlichen Dosierungen hinzugefügt. Anschließend wurden mittels rtPCR der IL-6-Spiegel zum Nachweis einer erfolgreichen Sepsis-Induktion und parallel dazu der Einfluss auf den TOAG-1-Spiegel bestimmt.

Ein weiterer möglicher Anwendungsbereich des noninvasiven Bio-Monitorings ist die humorale Immunantwort. Hierfür erfolgte eine entsprechende Quantifizierung der nach Transplantation produzierten B-Zellen durch die Methodik der rtPCR sowie der Alloantikörper mittels Durchflusszytometrie.

4. 2 Diskussion der Ergebnisse

Die gewonnenen histologischen Ergebnisse und die damit verbundene Einteilung in drei definierte Gruppen der Abstoßung – akut (D0 und D1), schwer chronisch (D3) oder

moderat chronisch (D5) – verglichen wir mit den Auswertungen der vorgestellten biologischen Marker.

Hervorstechend war hierbei vor allem TOAG-1. In den Organproben von Tieren, welche eine akute oder schwer chronische Abstoßung entwickelten, detektierten wir bereits am 7. postoperativen Tag eine frühzeitige Herabregulation der TOAG-1 Genexpression. Im Gegensatz dazu konnte jedoch in Organproben von Tieren, welche nur eine moderate chronische Abstoßung zeigten und demnach ein deutlich höheres Langzeitüberleben aufwiesen, ein konstant hoher TOAG-1-Spiegel in den ersten Tagen beobachtet werden. Demnach könnte dieses Gen ein vielversprechender Marker bei der Untersuchung der Protokollbiopsien in den ersten Wochen nach DDTx sein, da sich hier frühzeitig eine mögliche Vorhersage über akute oder schwere chronische Abstoßung machen lässt.

Zusätzlich untersuchten wir die Veränderung der TOAG-1 Genexpression in peripher gewonnenen Blutproben, zur Klärung der Rolle als nicht-invasiver Marker nach DDTx. In allen transplantierten Gruppen sahen wir einen Abfall der TOAG-1 Transkription während der ersten 7 postoperativen Tage. Interessanterweise war die Herabregulation signifikant stärker in Blutproben von Empfängertieren mit akuter und schwer chronischer Abstoßung als in Tieren mit moderat chronischer Abstoßung. Die frühen Veränderungen (Tag 5 und Tag 7) der TOAG-1-Spiegel korrelieren signifikant mit dem histologischen Erscheinungsbild zu späteren Zeitpunkten (entsprechend Tag 7 und Tag 45, Abbildung 22). Somit könnte im Monitoring nach Dünndarmtransplantation die Analyse von TOAG-1 Genexpressionsmustern in peripheren Blutproben einen hohen Stellenwert erlangen als potentieller prädiktiver Marker für akute und chronische Abstoßung bevor eine histologische oder klinische Ausprägung manifest wird.

Dies geht einher mit den Ergebnissen nach Nieren- und Herztransplantation.⁸³ In den Untersuchungen von Sawitzki et al kam es jedoch bei Tieren mit hohem Langzeitüberleben zur keiner Herabregulation der TOAG-1 Expression in den ersten Tagen. Aufgrund der verschiedenen Basisimmunsuppression entwickelten diese Tiere allerdings eine Immuntoleranz ohne Zeichen einer Abstoßung, während die Empfängertiere in unserer Studie trotz Hochdosis-Therapie zu einem späteren Zeitpunkt eine Rejektion zeigten.

Da vorallem in den Biopsien der akut abgestoßenen Transplantate eine hohe bakterielle Translokation erkennbar war und gerade in dieser Gruppe eine starke Erniedrigung des TOAG-1-Spiegels vorlag, stellte sich die Frage, inwieweit die sich entwickelnde Sepsis

die TOAG-1 Genexpression beeinflussen würden. Um dies zu beurteilen führten wir *in vitro*-Experimente mit LPS und LBP durch, welche zeigten, dass die Genexpression von TOAG-1 nicht durch mikrobielle Einflüsse verändert wurde. Ebenfalls wurde in dieser *in vitro*-Untersuchung ausgeschlossen, dass das Immunsuppressivum Tacrolimus in niedriger oder hoher Dosierung einen Einfluss auf den TOAG-1-Spiegel hat. Es bleibt also weiterhin die Vermutung, dass TOAG-1 allein durch immunologische Vorgänge beeinflusst wird.⁸⁴

Die Veränderungen der peripheren TOAG-1-Spiegel in den verschiedenen Transplantationsgruppen sind somit nicht auf die bakterielle Translokation zurückzuführen, sondern resultieren aus der entstehenden Rejektion.

Für die Genexpression von α -1,2-Mannosidase und die Transplantatfunktion nach Herz- und Nierentransplantation auf immunsuppressiver Basis von nicht-depletierendem Anti-CD4-Antikörper wurde eine ähnliche negative Korrelation wie bei TOAG-1 von Sawitzki et. al. nachgewiesen.⁸³ Nach unserer tierexperimentellen Dünndarmtransplantation zeigte sich in den Organproben kein signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen Behandlungsgruppen und den Nativproben, sodass sich keine Aussage bezüglich der Rejektionsvorgänge machen ließ. In den peripheren Blutleukozyten kam es nach Transplantation zwar zu einer Herabregulation des α -1,2-Mannosidase-Spiegels, jedoch konnte auch hier zwischen den verschiedenen Gruppen kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

Wie schon beschrieben, führt der Kontakt zwischen regulatorischen T-Zellen und dem Alloantigen zu einer Erhöhung der α -1,2-Mannosidase Expression.⁸² Es zeigte sich jedoch in einigen Studien, dass eine immunsuppressive Therapie mit Calcineurininhibitoren, wie Cyclosporin A oder Tacrolimus, einen repressiven Effekt auf zirkulierende regulatorische T-Zellen hat.^{116, 117} Dies führt im Gegensatz zu Rapamycin oder Mycophenolat mofetil zu einem Abfall dieser Zellen, wodurch die Rolle von Tacrolimus bei der Entwicklung einer möglichen Immuntoleranz eher fraglich ist.¹¹⁸ Da in unserer Versuchsreihe Tacrolimus als Immunsuppressivum gewählt wurde, ist es wahrscheinlich, dass der hemmende Effekt der Calcineurininhibitoren auf regulatorische T-Zellen und damit die ausbleibende Stimulierung der α -1,2-Mannosidase Genexpression ursächlich ist für die fehlende Veränderung der Genexpression in den unterschiedlichen Gruppen. Somit konnte keine Aussage bezüglich Rejektion oder Toleranz mithilfe dieses Genmarkers getroffen werden.

In bisherigen Studien wurde LBP eher als Marker für eine systemische Inflammation genutzt. Cicalese et al. stellten jedoch einen Zusammenhang zwischen einer akuten intestinalen Abstoßung und einem Anstieg der LBP-Level her. Tatsächlich konnten auch wir einen Anstieg des Plasma-LBP-Spiegels in Empfängern, die eine akute Abstoßung entwickelten, detektieren. Die hier vorliegenden Ergebnisse sind vergleichbar mit bisherigen Studien und legen damit die Möglichkeit dar, LBP als Screening-Marker in Kombination oder als mögliche Alternative zu endoskopischen Untersuchungen zu nutzen. Leider zeigten Transplantatempfänger, bei denen es zu einer schweren chronischen Abstoßung kam, erst ein Anstieg des Plasma-LBP-Spiegels, als bereits klinisch und histologisch Anzeichen eines Abstoßungsprozesses vorlagen. Somit erreicht die LBP-Spiegel-Bestimmung keinen prognostischen Stellenwert bei der Vorhersage einer chronischen Abstoßung.

Die Rolle von Enzymen wie Granzyme B und Perforin, welche von aktivierten cytotoxischen T-Lymphozyten sezerniert werden wurden bereits in Modellen für Nieren- und Herztransplantation dargelegt.^{73, 119} In vereinzelt Studien wird diesen möglichen Markern auch ein prognostischer Wert bei der Vorhersage von Rejektionsepisoden nach Dünndarmtransplantation zugesprochen.¹²⁰ In unseren Versuchen sahen wir, ähnlich wie bei den LBP-Spiegeln, einen deutlichen Anstieg der Perforin-Genexpression bei der akuten und bei der schweren chronischen Abstoßung. Jedoch war dieser ebenfalls erst zu registrieren, als bereits ausgeprägte histologische Veränderungen zu sehen waren. Somit sehen wir Perforin als sinnvollen Marker bei der Detektion eines stattfindenden Abstoßungsprozesses. Ein prognostischer Stellenwert für die Vorhersage einer chronischen Rejektion ergibt sich jedoch auch hier nicht.

Es stellte sich für uns als nächstes die Frage, inwieweit eine Bestimmung der humoralen Immunantwort sinnvoll ist, beziehungsweise wie zeitnah nach Transplantation eine Toleranz oder eine Abstoßung erkannt werden kann. In tierexperimentellen Studien mit B-Zell defizienten Knock-Out-Mäusen wurde gezeigt, dass B-Lymphozyten und die produzierten Alloantikörper eine wichtige Rolle in der Entwicklung einer Abstoßungsreaktion haben.^{121, 122} Zudem wurde bereits in einigen Falldarstellungen ein erfolgreicher Einsatz des monoklonalen Antikörpers Rituximab bei therapierefraktären Abstoßungsreaktionen nach Nieren- und Herztransplantation aufgezeigt.^{98, 100} Somit erscheint das Monitoring der humoralen Immunantwort durchaus notwendig. In unseren Untersuchungen zeigte sich ein signifikanter Anstieg der B-

Zellen während der akuten und schweren chronischen Rejektion. Der B-Zell-Spiegel in der hochsupprimierten Gruppe mit Langzeitüberleben war zu den untersuchten Zeitpunkten vergleichbar mit dem in nichttransplantierten unbehandelten Tieren. Obwohl es in der hochdosierten Gruppe im Langzeitverlauf zu einer Transplantatabstoßung kam, konnte in den ersten 45 Tagen keine signifikante Veränderung der B-Zell-Infiltration registriert werden. Die Quantifizierung der B-Zellen ermöglicht damit zwar ein Screening auf eine stattfindende Abstoßung, jedoch keine frühe Vorhersage einer möglichen Toleranz- oder Rejektionsentwicklung. Diese Ergebnisse sind vergleichbar mit denen einer Studie aus Pittsburgh, worin ein Anstieg einer B-Zell-Population mit einer Tendenz zu Entwicklung einer Abstoßungsreaktion nach Dünndarmtransplantation bei Kindern assoziiert war.¹²³ Aufgrund der zunehmenden erfolgreichen Anwendung von Rituximab bei der steroidresistenten akuten Transplantatabstoßung gewinnt das Monitoring der B-Zellen immer mehr an Bedeutung.^{124, 125} Die Quantifizierung des B-Zell-IgG in den Organproben ist damit eine sinnvolle und aussagekräftige Methode.

Die im Rahmen der humoralen Immunantwort produzierten Alloantikörper können zusätzlich aus dem Serum der peripheren Blutproben gewonnen werden. Es wurde bereits in einigen Studien gezeigt, dass den Alloantikörpern eine wichtige pathogenetische Rolle im Rahmen des chronischen Transplantatversagens zukommt. Hierbei wird vor allem der endotheliale Gefäßschaden als ursächlich diskutiert.¹²⁶⁻¹²⁸ In der Alloantikörpermessung zeigte sich ab Tag 5 über den gesamten Beobachtungszeitraum ein deutlicher Unterschied in allen Gruppen, sowohl in Bezug zur nichttransplantierten als auch in den transplantierten Gruppen untereinander. Bereits zu diesem Zeitpunkt konnte ein deutlich erhöhter Serumspiegel sowohl in den Empfängern, welche eine akute als auch in denen, welche eine chronische Abstoßung entwickelten, detektiert werden. Obwohl so frühzeitig noch keine histologischen Veränderungen der mittel- und hochdosierten Gruppe zu verzeichnen waren, sahen wir hier schon signifikant erhöhte Level der Antikörper gegenüber nichttransplantierten Tieren. Es ergab sich hier, ähnlich wie bei der TOAG-1-Genexpression, eine eindeutige Korrelation zwischen dem frühen Anstieg der Antikörper-Spiegel und der späteren Entwicklung einer akuten und auch chronischen Abstoßung. Vergleichbar auch mit Studienergebnissen nach Herz-, Lungen- und Nierentransplantation, sehen wir das Monitoring der Alloantikörper nach Dünndarmtransplantation als sinnvoll an, um

möglichst zeitig Patienten mit erhöhtem Risiko einer zukünftigen Rejektion systematisch herauszufiltern.¹²⁹⁻¹³¹

In anderen Studien wurden zwei weitere interessante Marker bezüglich ihrer Aussagekraft untersucht. Calprotectin, eins dieser Marker, ist ein humanes Protein, welches bis zu 45 % des Zytoplasmas von Monozyten, Granulozyten und Epithelzellen ausmacht.¹³² Man geht davon aus, dass durch die intrazelluläre Bindung von Zink und Calcium an Calprotectin ein antimikrobieller Schutz durch Inhibierung bakterieller Enzyme entsteht.^{133, 134} Durch die chemotaktisch getriggerte Leukozytenmigration durch die Mukosa kommt es zu einem Anstieg des Calprotectin-Spiegels in den Faeces, wodurch sich die Bedeutung als Marker bei entzündlichen Vorgängen erklärt.^{135, 136} Da es jedoch Teil der unspezifischen Immunabwehr ist, ist eine Differenzierung der Entzündungsgenese hiermit nicht möglich. Die Bedeutung von Calprotectin wurde ausführlich im Rahmen chronisch entzündlicher Darmerkrankungen, vor allem beim Morbus Crohn, untersucht.¹³⁷⁻¹³⁹ Akpınar et al. zeigten, dass der Spiegel dieses Proteins auch im Rahmen einer stattfindenden Abstoßung nach Dünndarmtransplantation ansteigt.¹⁴⁰ Generell ist es jedoch nicht spezifisch für eine zelluläre Abstoßung, sondern auch bei anderen entzündlichen Vorgängen wie virale Gastroenteritiden, Schwangerschaft, Multipler Sklerose und Strahlenschäden erhöht.¹⁴¹⁻¹⁴³ Im Gegensatz zum TOAG-1 handelt es sich beim Calprotectin also um einen relativ unspezifischen Marker. Eine ablaufende Rejektion kann damit zwar detektiert werden, jedoch eine Vorhersage durch einen frühzeitigen Anstieg wie durch TOAG-1 oder die Alloantikörper ist nicht möglich.

Die nicht-proteinogene Aminosäure Citrullin ist ebenfalls ein Marker zum Monitoring nach Dünndarmtransplantation, welcher in den letzten Jahren immer mehr Aufmerksamkeit geschenkt wurde. Citrullin wird vorwiegend in den Enterozyten des Dünndarms produziert. Sowohl im Rahmen eines Kurzdarmsyndroms, bei atrophischen Störungen, Morbus Crohn als auch bei Abstoßungsreaktionen nach Dünndarmtransplantation reflektiert ein Abfall dieser Aminosäure eine massive Enterozytenreduktion.¹⁴⁴ Speziell bei einer schweren Dünndarmtransplantatabstoßung konnte eine signifikante Reduktion des Citrullins bis zu 30 Tage im Voraus beschrieben werden. Jedoch war es nicht möglich einen statistisch relevanten Unterschied zwischen den Citrullinspiegeln aus abstoßungsfreien Biopsien und milden Rejektionsepisoden zu

ermitteln.¹⁴⁵ In diesen Fällen war eine frühe Vorhersage nicht möglich. Weiterhin konnte nach einem Ischämie/Reperfusionsschaden ein initialer Anstieg des Citrullins aufgrund erfolgreicher Rekompensation beschrieben werden, sodass hier keine Rückschlüsse bezüglich der Transplantatfunktion beziehungsweise Abstoßungsreaktion zulässig waren.¹⁴⁶

5 Zusammenfassung

Heutzutage ist die einzige kausale Therapie des Kurzdarmsyndroms beziehungsweise des funktionellen intestinalen Versagens eine Dünndarmtransplantation. Es gibt jedoch keine etablierten nichtinvasiven Biomarker zur frühzeitigen Beurteilung einer möglichen Organabstoßung. Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, das diagnostische Potential von sieben Biomarkern (CD3, Perforin, TOAG-1, α -1,2-Mannosidase, LBP, B-Zell-IgG und Alloantikörper), die sowohl aus peripheren Blutleukozyten als auch aus Organproben isoliert wurden, zu bestimmen. Hierzu wurde in einem tierexperimentellen Modell eine orthotope DDTx von Dark Agouti auf Lewis Ratten durchgeführt. Es erfolgte eine immunsuppressive Therapie mit Tacrolimus in unterschiedlicher Dosierung (0, 1, 3, 5 mg/kg KG). Zu definierten Zeitpunkten wurden Blutproben (-1, 0, 3, 5, 7, 14, 45 Tage) sowie Organproben (7, 14, 45) entnommen. CD3, Perforin, α -1,2-Mannosidase, TOAG-1 und B-Zell-IgG-Spiegel wurden mittels RT-PCR, LBP durch ELISA und die Alloantikörper mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Die H&E gefärbten Schnitte der Organproben wurde nach einem Scoring-System histologisch in vier Abstoßungsgrade (keine Rejektion, akut, schwer chronisch, moderat chronisch) eingeteilt. Mittel- (D3) und hochdosierte (D5) Tiere zeigten eine signifikant verlängerte Überlebenszeit im Vergleich zu unbehandelten (D0) und niedrigdosierten (D1) Tieren. In Organproben der D0- und D1-Gruppe war bereits nach 7 Tagen eine schwere akute zelluläre Abstoßung zu sehen. Nach 45 Tagen zeigte sich zudem ein deutlich schwerer chronischer Zellschaden in Organproben von D3-behandelten Tieren als bei D5-behandelten (moderat chronische Abstoßung) Ratten. Die Genexpression von CD3, Perforin, B-Zell-IgG sowie der Plasma-LBP-Spiegel zeigten einen signifikanten Anstieg im Rahmen einer ablaufenden akuten oder chronischen Abstoßungsreaktion. Es konnte jedoch keine relevante Korrelation zwischen dem Plasma-Spiegel im frühen Stadium nach DDTx und dem histologischen Bild einer später ablaufenden Rejektion beschrieben werden. Im Gegensatz dazu konnte für Alpha-1,2-Mannosidase und TOAG-1 in allen transplantierten Gruppen eine frühzeitige Reduktion der Genexpression sowie für die Alloantikörper eine zeitnahe Elevation des Spiegels detektiert werden. Da sich bei TOAG-1 bereits an Tag 5 ein signifikant geringerer Spiegel in der D3-Gruppe als in der D5-Gruppe und bei den Alloantikörpern an Tag 7 ein signifikant höherer Spiegel in der D3 als in der D5-Gruppe zeigte, erscheint besonders bei diesen beiden Markern ein deutliches Potential zur frühzeitigen Vorhersage einer moderaten oder schweren chronischen Rejektion zu liegen.

6 Abstract

Nowadays the only causal therapy of short bowel syndrome or functional intestinal failure is an intestinal transplantation (ITx). Despite intensive efforts there is still a lack of early noninvasive rejection markers. In this context, we investigated the diagnostic potential of seven markers (CD3, perforin, TOAG-1, α -1,2-mannosidase, LBP, B-Cell-IgG and alloantibodies), isolated from peripheral blood leucocytes as well as from organ samples. Therefore an orthotopic ITx from Dark Agouti into Lewis rats was performed. Tacrolimus in different dosages (0, 1, 3, 5 mg/kg) served as immunosuppressive therapy. Blood samples were collected at different time points after ITx (day -1, 0, 3, 5, 7, 14, 45). Grafts were recovered after 7, 14, and 45 days. CD3, perforin, α -1,2-mannosidase, TOAG-1, and B-cell-IgG gene expression were evaluated by real-time RT-PCR, LBP by ELISA, and alloantibodies by flow cytometry. H&E dyed sections of the organ samples were divided into four grades of rejection (no rejection, acute, severe chronic, moderate chronic) based on a newly developed scoring system. Medium (D3) and high (D5) dose treated recipients revealed a significantly prolonged graft survival in contrast to untreated (D0) and low dose treated animals. The latter showed signs of severe acute rejection as early as day 7 post-transplantation. 45 days after ITx, severe chronic structural changes had developed in medium dose animals whereas animals of the D5 treated group showed just signs of a moderate chronic rejection. Gene expression of CD3, perforin, and B-Cell-IgG, as well as plasma LBP level revealed a significant increase during an ongoing acute or chronic rejection. However, there was no relevant correlation between plasma levels early after ITx and histological changes described during chronic rejection. In contrast α -1,2-mannosidase and TOAG-1 gene expression were decreased in all groups shortly after ITx. Accordingly, an early increase of peripheral alloantibody levels could have been detected. Since we observed a significantly lower TOAG-1 gene level on the 5th postoperative day as well as significantly higher alloantibody levels in D3 than in D5 treated recipients at day 7, especially these two markers promise to have a diagnostic potential concerning an early prediction of a moderate or severe chronic rejection.

7 Literatur

1. Kirkman RL. Small bowel transplantation. *Transplantation* 1984;37(5):429-33.
2. Cohen Z, Wassef R, Nordgren SR, et al. Experimental and clinical intestinal transplantation. *Scand J Gastroenterol Suppl* 1985;117:63-7.
3. Starzl TE, Rowe MI, Todo S, et al. Transplantation of multiple abdominal viscera. *Jama* 1989;261(10):1449-57.
4. Deltz E, Schroeder P, Gebhardt H, et al. [First successful clinical small intestine transplantation. Tactics and surgical technic]. *Chirurg* 1989;60(4):235-9.
5. Niv Y, Mor E, Tzakis AG. Small bowel transplantation--a clinical review. *Am J Gastroenterol* 1999;94(11):3126-30.
6. Goulet O, Revillon Y, Jan D, et al. Small-bowel transplantation in children. *Transplant Proc* 1990;22(6):2499-500.
7. Grant D, Wall W, Zhong R, et al. Experimental clinical intestinal transplantation: initial experience of a Canadian centre. *Transplant Proc* 1990;22(6):2497-8.
8. Klintmalm GB. FK 506: an update. *Clin Transplant* 1994;8(2 Pt 2):207-10.
9. Abu-Elmagd KM, Reyes J, Fung JJ, et al. Evolution of clinical intestinal transplantation: improved outcome and cost effectiveness. *Transplant Proc* 1999;31(1-2):582-4.
10. OPTN / SRTR Annual Report: Transplant Data 1998-2007. (Accessed at [http://optn.transplant.hrsa.gov/ar2008/.](http://optn.transplant.hrsa.gov/ar2008/))
11. Intestinal Transplant Registry Data. (Accessed at www.intestinaltransplant.org.)
12. Fishbein TM, Gondolesi GE, Kaufman SS. Intestinal transplantation for gut failure. *Gastroenterology* 2003;124(6):1615-28.
13. Goulet O, Lacaille F, Jan D, et al. Intestinal transplantation: indications, results and strategy. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2000;3(5):329-38.
14. Eurotransplant International Foundation: Annual Report 2008. (Accessed at http://www.eurotransplant.nl/files/annual_report/ar_2008.pdf.)
15. Ruiz P, Kato T, Tzakis A. Current status of transplantation of the small intestine. *Transplantation* 2007;83(1):1-6.
16. Fishbein TM, Kaufman SS, Florman SS, et al. Isolated intestinal transplantation: proof of clinical efficacy. *Transplantation* 2003;76(4):636-40.
17. Fishbein T, Florman S, Gondolesi G, et al. Noncomposite simultaneous liver and intestinal transplantation. *Transplantation* 2003;75(4):564-5.
18. Sudan DL, Iyer KR, Deroover A, et al. A new technique for combined liver/small intestinal transplantation. *Transplantation* 2001;72(11):1846-8.
19. Pascher A, Klupp J, Schulz RJ, et al. [Clinical results of intestinal and multivisceral transplantation at the Charite, Berlin. A case series]. *Dtsch Med Wochenschr* 2005;130(8):387-92.
20. Starzl TE, Todo S, Tzakis A, et al. The many faces of multivisceral transplantation. *Surg Gynecol Obstet* 1991;172(5):335-44.
21. Wells JM, Loonen LM, Karczewski JM. The role of innate signaling in the homeostasis of tolerance and immunity in the intestine. *Int J Med Microbiol* 2010;300(1):41-8.
22. Mowat AM, Viney JL. The anatomical basis of intestinal immunity. *Immunol Rev* 1997;156:145-66.
23. Patsos G, Corfield A. Management of the human mucosal defensive barrier: evidence for glycan legislation. *Biol Chem* 2009;390(7):581-90.
24. Croitoru K, Ernst PB. Leukocytes in the intestinal epithelium: an unusual immunological compartment revisited. *Reg Immunol* 1992;4(2):63-9.

25. Guy-Grand D, Vassalli P. Gut intraepithelial T lymphocytes. *Curr Opin Immunol* 1993;5(2):247-52.
26. Kiyono H, Fujihashi K, Taguchi T, et al. Regulatory functions for murine intraepithelial lymphocytes in mucosal responses. *Immunol Res* 1991;10(3-4):324-30.
27. Fujihashi K, Yamamoto M, McGhee JR, et al. Function of alpha beta TCR+ intestinal intraepithelial lymphocytes: Th1- and Th2-type cytokine production by CD4+CD8- and CD4+CD8+ T cells for helper activity. *Int Immunol* 1993;5(11):1473-81.
28. Mayer L. Mucosal immunity and gastrointestinal antigen processing. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2000;30 Suppl:S4-12.
29. Macpherson AJ, McCoy KD, Johansen FE, et al. The immune geography of IgA induction and function. *Mucosal Immunol* 2008;1(1):11-22.
30. Brandtzaeg P. The human intestinal immune system: basic cellular and humoral mechanisms. *Baillieres Clin Rheumatol* 1996;10(1):1-24.
31. Clark CL, Cunningham AJ, Crane PW, et al. Lymphocyte infiltration patterns in rat small-bowel transplants. *Transplant Proc* 1990;22(6):2460.
32. Tryphonopoulos P, Icardi M, Salgar S, et al. Host-derived enterocytes in intestinal grafts. *Transplantation* 2002;74(1):120-38.
33. Gasser M, Lenhard SM, Otto C, et al. Modulation of the immune response with major histocompatibility class II peptides via the indirect pathway of allorecognition after kidney and small bowel transplantation. *Transplant Proc* 2002;34(6):2244-5.
34. Gatzka M, Walsh CM. Apoptotic signal transduction and T cell tolerance. *Autoimmunity* 2007;40(6):442-52.
35. Jenkins MK, Taylor PS, Norton SD, et al. CD28 delivers a costimulatory signal involved in antigen-specific IL-2 production by human T cells. *J Immunol* 1991;147(8):2461-6.
36. Lenschow DJ, Walunas TL, Bluestone JA. CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu Rev Immunol* 1996;14:233-58.
37. Letourneau S, Krieg C, Pantaleo G, et al. IL-2- and CD25-dependent immunoregulatory mechanisms in the homeostasis of T-cell subsets. *J Allergy Clin Immunol* 2009;123(4):758-62.
38. Abbas AK, Murphy KM, Sher A. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 1996;383(6603):787-93.
39. Jiang H, Kobayashi M. Differences between cyclosporin A and tacrolimus in organ transplantation. *Transplant Proc* 1999;31(5):1978-80.
40. Ojo AO, Held PJ, Port FK, et al. Chronic renal failure after transplantation of a nonrenal organ. *N Engl J Med* 2003;349(10):931-40.
41. Plosker GL, Foster RH. Tacrolimus: a further update of its pharmacology and therapeutic use in the management of organ transplantation. *Drugs* 2000;59(2):323-89.
42. Mueller AR, Pascher A, Platz KP, et al. Immunosuppression following intestinal transplantation. *Transplant Proc* 2004;36(2):325-8.
43. Bond GJ, Mazariegos GV, Sindhi R, et al. Evolutionary experience with immunosuppression in pediatric intestinal transplantation. *J Pediatr Surg* 2005;40(1):274-9; discussion 9-80.
44. Reyes J, Mazariegos GV, Abu-Elmagd K, et al. Intestinal transplantation under tacrolimus monotherapy after perioperative lymphoid depletion with rabbit anti-thymocyte globulin (thymoglobulin). *Am J Transplant* 2005;5(6):1430-6.

45. Lauro A, Zanfi C, Ercolani G, et al. Twenty-five consecutive isolated intestinal transplants in adult patients: a five-yr clinical experience. *Clin Transplant* 2007;21(2):177-85.
46. Fishbein TM, Florman S, Gondolesi G, et al. Intestinal transplantation before and after the introduction of sirolimus. *Transplantation* 2002;73(10):1538-42.
47. Abu-Elmagd K, Reyes J, Bond G, et al. Clinical intestinal transplantation: a decade of experience at a single center. *Ann Surg* 2001;234(3):404-16; discussion 16-7.
48. Wilde MI, Goa KL. Muromonab CD3: a reappraisal of its pharmacology and use as prophylaxis of solid organ transplant rejection. *Drugs* 1996;51(5):865-94.
49. Pascher A, Radke C, Dignass A, et al. Successful infliximab treatment of steroid and OKT3 refractory acute cellular rejection in two patients after intestinal transplantation. *Transplantation* 2003;76(3):615-8.
50. Pascher A, Klupp J, Langrehr JM, et al. Anti-TNF-alpha therapy for acute rejection in intestinal transplantation. *Transplant Proc* 2005;37(3):1635-6.
51. Mueller AR, Pascher A, Schulz RJ, et al. Clinical small bowel transplantation: focus on mucosal barrier function. *Transplant Proc* 2002;34(3):926-8.
52. Cucchetti A, Siniscalchi A, Bagni A, et al. Bacterial translocation in adult small bowel transplantation. *Transplant Proc* 2009;41(4):1325-30.
53. Transplant Pathology Internet Services. (Accessed at <http://tpis.upmc.com/TPIShome/>.)
54. Ruiz P, Bagni A, Brown R, et al. Histological criteria for the identification of acute cellular rejection in human small bowel allografts: results of the pathology workshop at the VIII International Small Bowel Transplant Symposium. *Transplant Proc* 2004;36(2):335-7.
55. Kato T, O'Brien CB, Nishida S, et al. The first case report of the use of a zoom videoendoscope for the evaluation of small bowel graft mucosa in a human after intestinal transplantation. *Gastrointest Endosc* 1999;50(2):257-61.
56. Timmermann W, Hoppe H, Otto C, et al. Videomicroscopic imaging of graft mucosa for monitoring immunosuppressive therapy after small intestinal transplantation in rats. *Transplantation* 1999;67(12):1555-61.
57. Misra MV, Bhattacharya K, Nompleggi DJ, et al. Magnification endoscopy as a reliable tool for the early diagnosis of rejection in living related small bowel transplants: a case report. *Transplant Proc* 2006;38:1738-9.
58. Kato T, Gaynor JJ, Nishida S, et al. Zoom endoscopic monitoring of small bowel allograft rejection. *Surg Endosc* 2006;20(5):773-82.
59. Lauro A, Altimari A, Di Simone M, et al. Acute cellular rejection monitoring after intestinal transplant: utility of serologic markers and zoom videoendoscopy as support of conventional biopsy and clinical findings. *Transplant Proc* 2008;40(5):1575-6.
60. Eisengart LJ, Chou PM, Iyer K, et al. Rotavirus infection in small bowel transplant: a histologic comparison with acute cellular rejection. *Pediatr Dev Pathol* 2009;12(2):85-8.
61. Parizhskaya M, Walpusk J, Mazariegos G, et al. Enteric adenovirus infection in pediatric small bowel transplant recipients. *Pediatr Dev Pathol* 2001;4(2):122-8.
62. Pascher A, Radke C, Dignass A, et al. Late graft loss after intestinal transplantation in an adult patient as a result of necrotizing enterocolitis. *Am J Transplant* 2003;3(8):1033-5.

63. Sigurdsson L, Reyes J, Putnam PE, et al. Endoscopies in pediatric small intestinal transplant recipients: five years experience. *Am J Gastroenterol* 1998;93(2):207-11.
64. Luning TH, Keemers-Gels ME, Barendregt WB, et al. Colonoscopic perforations: a review of 30,366 patients. *Surg Endosc* 2007;21(6):994-7.
65. Fishbein TM. The current state of intestinal transplantation. *Transplantation* 2004;78(2):175-8.
66. Beetz S, Wesch D, Marischen L, et al. Innate immune functions of human gammadelta T cells. *Immunobiology* 2008;213(3-4):173-82.
67. Moretta A, Ciccone E, Pantaleo G, et al. Surface molecules involved in the activation and regulation of T or natural killer lymphocytes in humans. *Immunol Rev* 1989;111:145-75.
68. Alarcon B, Gil D, Delgado P, Schamel WW. Initiation of TCR signaling: regulation within CD3 dimers. *Immunol Rev* 2003;191:38-46.
69. Murase N, Demetris AJ, Matsuzaki T, et al. Long survival in rats after multivisceral versus isolated small-bowel allotransplantation under FK 506. *Surgery* 1991;110(1):87-98.
70. Guo WH, Tian L, Chan KL, et al. Role of CD4+ and CD8+ T cells in early and late acute rejection of small bowel allograft. *J Pediatr Surg* 2001;36(2):352-6.
71. He G, Hart J, Kim OS, et al. The role of CD8 and CD4 T cells in intestinal allograft rejection: a comparison of monoclonal antibody-treated and knockout mice. *Transplantation* 1999;67(1):131-7.
72. Voskoboinik I, Smyth MJ, Trapani JA. Perforin-mediated target-cell death and immune homeostasis. *Nat Rev Immunol* 2006;6(12):940-52.
73. Simon T, Opelz G, Wiesel M, et al. Serial peripheral blood perforin and granzyme B gene expression measurements for prediction of acute rejection in kidney graft recipients. *Am J Transplant* 2003;3(9):1121-7.
74. Cashion AK, Sabek OM, Driscoll CJ, et al. Serial peripheral blood cytotoxic lymphocyte gene expression measurements for prediction of pancreas transplant rejection. *Transplant Proc* 2006;38(10):3676-7.
75. Zhang SG, Wu MC, Tan JW, et al. Expression of perforin and granzyme B mRNA in judgement of immunosuppressive effect in rat liver transplantation. *World J Gastroenterol* 1999;5(3):217-20.
76. Corti B, Altamari A, Gabusi E, et al. Two years' experience of acute rejection monitoring of intestinal transplant recipients by real-time PCR assessment of granzyme B and perforin up-regulation: considerations on diagnostic accuracy. *Transplant Proc* 2006;38(6):1726-7.
77. Shah N, Kuntz DA, Rose DR. Comparison of kifunensine and 1-deoxymannojirimycin binding to class I and II alpha-mannosidases demonstrates different saccharide distortions in inverting and retaining catalytic mechanisms. *Biochemistry* 2003;42(47):13812-6.
78. Tremblay LO, Herscovics A. Cloning and expression of a specific human alpha 1,2-mannosidase that trims Man9GlcNAc2 to Man8GlcNAc2 isomer B during N-glycan biosynthesis. *Glycobiology* 1999;9(10):1073-8.
79. Daniel PF, Winchester B, Warren CD. Mammalian alpha-mannosidases--multiple forms but a common purpose? *Glycobiology* 1994;4(5):551-66.
80. Yang M, Omura S, Bonifacino JS, et al. Novel aspects of degradation of T cell receptor subunits from the endoplasmic reticulum (ER) in T cells: importance of oligosaccharide processing, ubiquitination, and proteasome-dependent removal from ER membranes. *J Exp Med* 1998;187(6):835-46.

81. Herscovics A. Importance of glycosidases in mammalian glycoprotein biosynthesis. *Biochim Biophys Acta* 1999;1473(1):96-107.
82. Long ET, Baker S, Oliveira V, et al. Alpha-1,2-mannosidase and hence N-glycosylation are required for regulatory T cell migration and allograft tolerance in mice. *PLoS One* 2010;5(1):e8894.
83. Sawitzki B, Bushell A, Steger U, et al. Identification of gene markers for the prediction of allograft rejection or permanent acceptance. *Am J Transplant* 2007;7(5):1091-102.
84. Keeren K, Friedrich M, Gebuhr I, et al. Expression of tolerance associated gene-1, a mitochondrial protein inhibiting T cell activation, can be used to predict response to immune modulating therapies. *J Immunol* 2009;183(6):4077-87.
85. Holst O, Ulmer AJ, Brade H, et al. Biochemistry and cell biology of bacterial endotoxins. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1996;16(2):83-104.
86. Van Gucht S, Van Reeth K, Nauwynck H, et al. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection increases CD14 expression and lipopolysaccharide-binding protein in the lungs of pigs. *Viral Immunol* 2005;18(1):116-26.
87. Myc A, Buck J, Gonin J, et al. The level of lipopolysaccharide-binding protein is significantly increased in plasma in patients with the systemic inflammatory response syndrome. *Clin Diagn Lab Immunol* 1997;4(2):113-6.
88. Ramadori G, Meyer zum Buschenfelde KH, Tobias PS, et al. Biosynthesis of lipopolysaccharide-binding protein in rabbit hepatocytes. *Pathobiology* 1990;58(2):89-94.
89. Kaden J, Zwerenz P, Lambrecht HG, et al. Lipopolysaccharide-binding protein as a new and reliable infection marker after kidney transplantation. *Transpl Int* 2002;15(4):163-72.
90. Cicalese L, Freeswick PD, Watkins SC, et al. Use of CD14 and lipopolysaccharide binding protein mRNA expression as markers for acute rejection in rat small bowel transplantation. *Transplant Proc* 1996;28(5):2470.
91. Michaels PJ, Fishbein MC, Colvin RB. Humoral rejection of human organ transplants. *Springer Semin Immunopathol* 2003;25(2):119-40.
92. Colman RW, Braun WE, Busch GJ, et al. Coagulation studies in the hyperacute and other forms of renal-allograft rejection. *N Engl J Med* 1969;281(13):685-91.
93. Brandle D, Joergensen J, Zenke G, et al. Contribution of donor-specific antibodies to acute allograft rejection: evidence from B cell-deficient mice. *Transplantation* 1998;65(11):1489-93.
94. Batista FD, Iber D, Neuberger MS. B cells acquire antigen from target cells after synapse formation. *Nature* 2001;411(6836):489-94.
95. Fleire SJ, Goldman JP, Carrasco YR, et al. B cell ligand discrimination through a spreading and contraction response. *Science* 2006;312(5774):738-41.
96. Angeli V, Ginhoux F, Llodra J, et al. B cell-driven lymphangiogenesis in inflamed lymph nodes enhances dendritic cell mobilization. *Immunity* 2006;24(2):203-15.
97. Moore C, Sauma D, Reyes PA, et al. Dendritic cells and B cells cooperate in the generation of CD4(+)CD25(+)FOXP3(+) allogeneic T cells. *Transplant Proc* 2010;42(1):371-5.
98. Alausa M, Almagro U, Siddiqi N, et al. Refractory acute kidney transplant rejection with CD20 graft infiltrates and successful therapy with rituximab. *Clin Transplant* 2005;19(1):137-40.
99. Kaczmarek I, Deutsch MA, Sadoni S, et al. Successful management of antibody-mediated cardiac allograft rejection with combined immunoadsorption and anti-

- CD20 monoclonal antibody treatment: case report and literature review. *J Heart Lung Transplant* 2007;26(5):511-5.
100. Lehnhardt A, Mengel M, Pape L, et al. Nodular B-cell aggregates associated with treatment refractory renal transplant rejection resolved by rituximab. *Am J Transplant* 2006;6(4):847-51.
 101. Genberg H, Hansson A, Wernerson A, et al. Pharmacodynamics of rituximab in kidney allotransplantation. *Am J Transplant* 2006;6(10):2418-28.
 102. Lee KK, Schraut WH. Structure and function of orthotopic small bowel allografts in rats treated with cyclosporine. *Am J Surg* 1986;151(1):55-60.
 103. Kwok S, Higuchi R. Avoiding false positives with PCR. *Nature* 1989;339(6221):237-8.
 104. Orloff SL, Yin Q, Corless CL, et al. A rat small bowel transplant model of chronic rejection: histopathologic characteristics. *Transplantation* 1999;68(6):766-79.
 105. Rosemurgy AS, Schraut WH. Small bowel allografts. Sequence of histologic changes in acute and chronic rejection. *Am J Surg* 1986;151(4):470-5.
 106. Pech T, Fujishiro J, Finger T, et al. Effects of immunosuppressive therapy after experimental small bowel transplantation in rats. *Transpl Immunol* 2011;25(2-3):112-8.
 107. Zhu Y, Wei W, Li Y. FK506 treatment in a Long-term chronic rejection rat model of small bowel transplantation. *Clin Invest Med*;33(3):E168-73.
 108. Lee KK, Stangl MJ, Todo S, et al. Comparison of short-term immunosuppressive therapy with cyclosporine and FK 506 in small-bowel transplantation. *Transplant Proc* 1990;22(6):2485-6.
 109. Guo WH, Tian L, Yuen ZW, et al. Recipient FK506 pretreatment regimens in rat small bowel transplantation: allograft survival, function, and systemic infection. *J Pediatr Surg* 2000;35(11):1600-5.
 110. Peck JW, Gibbs FA, Jr., Dethlefsen LA. Localized hyperthermia and X-irradiation of murine jejunum in situ: a new method. *Int J Hyperthermia* 1986;2(3):277-98.
 111. Higa OH, Parra ER, Ab'Saber AM, et al. Protective effects of ascorbic acid pretreatment in a rat model of intestinal ischemia-reperfusion injury: a histomorphometric study. *Clinics (Sao Paulo)* 2007;62(3):315-20.
 112. Parks DA, Granger DN. Contributions of ischemia and reperfusion to mucosal lesion formation. *Am J Physiol* 1986;250(6 Pt 1):G749-53.
 113. Heeckt PF, Halfter WM, Schraut WH, et al. Small bowel transplantation and chronic rejection alter rat intestinal smooth muscle structure and function. *Surgery* 1993;114(2):449-56; discussion 56-7.
 114. Schaefer N, Tahara K, von Websky M, et al. Role of resident macrophages in the immunologic response and smooth muscle dysfunction during acute allograft rejection after intestinal transplantation. *Transpl Int* 2008;21(8):778-91.
 115. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987;162(1):156-9.
 116. Demirkiran A, Sewgobind VD, van der Weijde J, et al. Conversion from calcineurin inhibitor to mycophenolate mofetil-based immunosuppression changes the frequency and phenotype of CD4+FOXP3+ regulatory T cells. *Transplantation* 2009;87(7):1062-8.
 117. van de Wetering J, Koumoutsakos P, Peeters A, et al. Discontinuation of calcineurin inhibitors treatment allows the development of FOXP3+ regulatory T-cells in patients after kidney transplantation. *Clin Transplant* 2011;25(1):40-6.

118. Segundo DS, Ruiz JC, Izquierdo M, et al. Calcineurin inhibitors, but not rapamycin, reduce percentages of CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells in renal transplant recipients. *Transplantation* 2006;82(4):550-7.
119. Keslar K, Rodriguez ER, Tan CD, et al. Complement gene expression in human cardiac allograft biopsies as a correlate of histologic grade of injury. *Transplantation* 2008;86(9):1319-21.
120. Corti B, Altimari A, Gabusi E, et al. Potential of real-time PCR assessment of granzyme B and perforin up-regulation for rejection monitoring in intestinal transplant recipients. *Transplant Proc* 2005;37(10):4467-71.
121. Rifle G, Mousson C, Martin L, et al. Donor-specific antibodies in allograft rejection: clinical and experimental data. *Transplantation* 2005;79(3 Suppl):S14-8.
122. Nozaki T, Rosenblum JM, Ishii D, et al. CD4 T cell-mediated rejection of cardiac allografts in B cell-deficient mice. *J Immunol* 2008;181(8):5257-63.
123. Ashokkumar C, Bentlejewski C, Sun Q, et al. Allospecific CD154+ B cells associate with intestine allograft rejection in children. *Transplantation* 2010;90(11):1226-31.
124. Clatworthy MR. Targeting B cells and antibody in transplantation. *Am J Transplant*;11(7):1359-67.
125. Zarkhin V, Lovelace PA, Li L, et al. Phenotypic evaluation of B-cell subsets after rituximab for treatment of acute renal allograft rejection in pediatric recipients. *Transplantation*;91(9):1010-8.
126. Wu GD, Jin YS, Salazar R, et al. Vascular endothelial cell apoptosis induced by anti-donor non-MHC antibodies: a possible injury pathway contributing to chronic allograft rejection. *J Heart Lung Transplant* 2002;21(11):1174-87.
127. Wu T, Abu-Elmagd K, Bond G, et al. A clinicopathologic study of isolated intestinal allografts with preformed IgG lymphocytotoxic antibodies. *Hum Pathol* 2004;35(11):1332-9.
128. Cecka JM, Zhang Q, Reed EF. Preformed cytotoxic antibodies in potential allograft recipients: recent data. *Hum Immunol* 2005;66(4):343-9.
129. Kimball PM, Baker MA, Wagner MB, et al. Surveillance of alloantibodies after transplantation identifies the risk of chronic rejection. *Kidney Int* 2011;79(10):1131-7.
130. Nath DS, Basha HI, Mohanakumar T. Antihuman leukocyte antigen antibody-induced autoimmunity: role in chronic rejection. *Curr Opin Organ Transplant*;15(1):16-20.
131. Terasaki PI, Cai J. Human leukocyte antigen antibodies and chronic rejection: from association to causation. *Transplantation* 2008;86(3):377-83.
132. Johne B, Fagerhol MK, Lyberg T, et al. Functional and clinical aspects of the myelomonocyte protein calprotectin. *Mol Pathol* 1997;50(3):113-23.
133. Sohnle PG, Hunter MJ, Hahn B, et al. Zinc-reversible antimicrobial activity of recombinant calprotectin (migration inhibitory factor-related proteins 8 and 14). *J Infect Dis* 2000;182(4):1272-5.
134. Steinbakk M, Naess-Andresen CF, Lingaas E, et al. Antimicrobial actions of calcium binding leucocyte L1 protein, calprotectin. *Lancet* 1990;336(8718):763-5.
135. Summerton CB, Longlands MG, Wiener K, et al. Faecal calprotectin: a marker of inflammation throughout the intestinal tract. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2002;14(8):841-5.
136. Sudan D, Vargas L, Sun Y, et al. Calprotectin: a novel noninvasive marker for intestinal allograft monitoring. *Ann Surg* 2007;246(2):311-5.

137. Gisbert JP, Bermejo F, Perez-Calle JL, et al. Fecal calprotectin and lactoferrin for the prediction of inflammatory bowel disease relapse. *Inflamm Bowel Dis* 2009;15(8):1190-8.
138. D'Inca R, Dal Pont E, Di Leo V, et al. Can calprotectin predict relapse risk in inflammatory bowel disease? *Am J Gastroenterol* 2008;103(8):2007-14.
139. Langhorst J, Elsenbruch S, Koelzer J, et al. Noninvasive markers in the assessment of intestinal inflammation in inflammatory bowel diseases: performance of fecal lactoferrin, calprotectin, and PMN-elastase, CRP, and clinical indices. *Am J Gastroenterol* 2008;103(1):162-9.
140. Akpınar E, Vargas J, Kato T, et al. Fecal calprotectin level measurements in small bowel allograft monitoring: a pilot study. *Transplantation* 2008;85(9):1281-6.
141. Feng C, Tao Y, Shang T, Yu M. Calprotectin, RAGE and TNF-alpha in hypertensive disorders in pregnancy: expression and significance. *Arch Gynecol Obstet* 2009;283(2):161-6.
142. Berg-Hansen P, Vandvik B, Fagerhol M, et al. Calprotectin levels in the cerebrospinal fluid reflect disease activity in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2009;216(1-2):98-102.
143. Hille A, Schmidt-Giese E, Hermann RM, et al. A prospective study of faecal calprotectin and lactoferrin in the monitoring of acute radiation proctitis in prostate cancer treatment. *Scand J Gastroenterol* 2008;43(1):52-8.
144. Crenn P, Messing B, Cynober L. Citrulline as a biomarker of intestinal failure due to enterocyte mass reduction. *Clin Nutr* 2008;27(3):328-39.
145. David AI, Gaynor JJ, Zis PP, et al. An association of lower serum citrulline levels within 30 days of acute rejection in patients following small intestine transplantation. *Transplant Proc* 2006;38(6):1731-2.
146. David AI, Selvaggi G, Ruiz P, et al. Blood citrulline level is an exclusionary marker for significant acute rejection after intestinal transplantation. *Transplantation* 2007;84(9):1077-81.

8 Glossar

*	p<0,05
**	p<0,01
***	p<0,001
ACR	Acute cellular rejection, Akute zelluläre Abstoßung
AK	Antikörper
APAAP	Alkalische Phosphatase Anti-Alkalische Phosphatase
APC	Antigen-präsentierende/dendritische Zellen
CD	Cluster of differentiation
cDNA	complementary desoxyribonucleic acid, Komplementär-DNA
CT-Wert	cycle threshold
d7	7. postoperativer Tag
d14	14. postoperativer Tag
d45	45. postoperativer Tag
DA	Dark Agouti
DDTx	Dünndarmtransplantation
DNA	Desoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FACS®	Fluorescence activated cell sorting
FKBP	FK506 binding protein
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
GM-CSF	Granulocyte macrophage colony-stimulating factor
GITC	Guanidinium-Isothiocyanat
GVHD	Graft-versus-Host-Disease
H&E	Hämatoxylin-Eosin
IEL	Intraepitheliale Lymphozyten
IFN γ	Interferon gamma
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IndT	Induktionstherapie
ITx	Intestinal transplantation
KDS	Kurzdarmsyndrom
LBP	Lipopolysaccharid binding protein

LEW	Lewis
LPS	Lipopolysaccharid
MainT	Maintenance therapy, Basis- und Erhaltungstherapie
MCR	Moderate chronic rejection, moderate chronische Abstoßung
Mean	Mittelwert
MHC	Major Histocompatibility Complex
NF-ATc	Nuclear factor of activated T-cells
NTP	Nukleosidtriphosphat
OdT	Oligo-dT
RNA	Ribonucleic acid, Ribonukleinsäure
RPMI	Roswell Park Memorial Institute (Medium)
RT PCR	Realtime polymerase chain reaction, auch realtime Reverse- Transkriptase-PCR
SCR	Severe chronic rejection, schwere chronische Abstoßung
SD	Standard Deviation, Standardabweichung
SIRS	Systemic inflammatory response syndrome
Tac	Tacrolimus
TCR	T-Zell-Rezeptor
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF α	Tumornekrosefaktor alpha
TOAG-1	Tolerance associated gene-1
TPN	Total parenterale Ernährung
UTP	Uraciltriphosphat

9 Lebenslauf

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

10 Eidesstattliche Versicherung

Ich, Maren Dreißas, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Frühe Vorhersage akuter und chronischer Abstoßung nach Dünndarmtransplantation in Tacrolimus behandelten Ratten“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

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

Datum

Unterschrift

11 Danksagung

Diese Promotion wurde in der Forschungseinrichtung der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin angefertigt. Hiermit möchte ich Herrn Prof. Dr. med. Peter Neuhaus für die Möglichkeit danken, dass ich diese Doktorarbeit in der unter seiner Leitung stehenden Klinik durchführen konnte.

Mein großer Dank gilt Herrn Dr. med. Andreas Pascher für die Überlassung des Themas, die ermutigende Betreuung und die kritische Durcharbeitung meiner Arbeit.

Da diese Doktorarbeit in Kooperation mit dem Institut für Medizinische Immunologie durchgeführt wurde, geht ein besonderer Dank an Prof. Dr. Birgit Sawitzki, für die geduldige Unterstützung bei vielen methodischen und inhaltlichen Fragen.

Zudem möchte ich ganz herzlich Dr. Anja Reutzel-Selke, Anke Jurisch, Katrin Vogt, Stefanie Ahrlich und Dietrich Polenz für die Hilfe und Einarbeitung in allgemeine und spezielle Labortechniken, die Durchführung der Transplantationen sowie für die freundliche Atmosphäre während der praktischen Arbeit danken.

Mein privater Dank gilt meiner Familie, die mich in jeder Lebenslage unterstützt und immer wieder motiviert hat. Ein besonderes Dankeschön geht an meinen Bruder Tobias Klöpfel für die Bearbeitung meiner Fotos sowie an meinen Ehemann Riccardo Dreißas für die liebevolle Motivation bei der schriftlichen Aufarbeitung dieser Dissertation.