

**Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik
Tübingen
Abteilung Innere Medizin I**

**Verlauf nach Darmtransplantation – Der Zusammenhang
von Transporterbesatz im Darm, Elektrolytresorption und
Nierenfunktion**

**Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Reiner, Johannes Franz

2017

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. H.-G. Lamprecht

2. Berichterstatter: Privatdozent D. N. Heyne

3. Berichterstatter: Professor Dr. A. Pascher

Tag der Disputation: 16.06.2017

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS.....	I
ABKÜRZUNGEN	IV
EINLEITUNG.....	1
1.1 EINFÜHRUNG.....	1
1.2 DARMVERSAGEN UND DARMTRANSPLANTATION.....	2
1.2.1 <i>Darmversagen</i>	2
1.2.2 <i>Darmtransplantation</i>	2
1.2.2.1 Indikation der Darmtransplantation.....	3
1.2.2.2 Zeitlicher Ablauf der Darmtransplantation	5
1.2.2.3 Immunsuppression	6
1.2.2.4 Nierenfunktion nach Darmtransplantation	7
1.3 WASSER- UND ELEKTROLYTRESORPTION DES GASTROINTESTINALTRAKTES	8
1.3.1 <i>Allgemeines zu transepithelialen Elektrolytbewegungen</i>	8
1.3.2 <i>DRA und PAT-1</i>	9
1.3.3 <i>NHE3</i>	10
1.3.4 <i>CFTR</i>	11
1.4 FRAGESTELLUNG DER ARBEIT	12
2. MATERIAL UND METHODEN	13
2.1 PROBENMATERIAL.....	13
2.2 ZELLKULTUR.....	13
2.3 RNA-ISOLIERUNG.....	14
2.4 RNA-NACHWEIS.....	15
2.4.1 <i>Gelektrophorese</i>	15
2.5 REVERSE TRANSKRIPTION.....	15
2.6 QUANTITATIVE ECHTZEIT-PCR	16
2.6.1 <i>Theorie der qRT-PCR</i>	16
2.6.1.1 Cycle threshold Werte	16

2.6.1.2 Histon 3.3A.....	17
2.6.2 Auswahl der Primer	17
2.6.3 Konzentrationsoptimierung der Primer.....	18
2.6.4 Durchführung der qRT-PCR.....	18
2.7 KLINISCHE DATEN.....	20
2.7.1 Erstellung einer Datenbank	20
2.7.2 Datengewinnung.....	20
2.7.3 Abstoßungsdiagnostik	20
2.7.4 Berechnung der GFR mittels MDRD-Formel.....	20
2.7.5 Statistische Tests.....	21
3. ERGEBNISSE	22
3.1 PATIENTENKOLLEKTIV	22
3.2 IMMUNSUPPRESSION.....	24
3.3 TRANSPORTEREXPRESSION IM EPITHEL DES TERMINALEN ILEUM.....	26
3.3.1 Transporterexpression im Kontroll-Ileum.....	26
3.3.2 Transporterexpression im transplantierten Darm.....	27
3.3.2.1 Expressionsverlauf von NHE3.....	28
3.3.2.2 Expressionsverlauf von DRA.....	29
3.3.2.3 Expressionsverlauf von CFTR.....	31
3.3.2.4 Regressionsanalyse der Transporterexpressionen untereinander	32
3.4 VERLAUF DER TRANSPORTEREXPRESSION AN EINZELPATIENTEN	34
3.4.1 Verlauf bei Patient 1.....	34
3.4.2 Verlauf bei Patient 2.....	36
3.5 NIERENFUNKTION IM TÜBINGER TRANSPLANTATIONSKOLLEKTIV	38
3.5.1 Nierenfunktion nach Darmtransplantation.....	38
3.6 TACROLIMUS-EFFEKTE IM ZELLKULTURMODELL.....	40
4. DISKUSSION	42
4.1 DARMTRANSPLANTATION IN DER THERAPIE DES DARMVERSAGENS	42

4.2 ENTWICKLUNG DER DARMTRANSPLANTATION IN DEN ZURÜCKLIEGENDEN 20 JAHREN	43
4.3 EINE RELATIV WENIG INTENSIVE IMMUNSUPPRESSION KANN NACH DARMTRANSPLANTATION ERREICHT WERDEN	44
4.4 IM TRANSPLANTIERTEN DARM HERRSCHT EINE DYSREGULATION ZWISCHEN ABSORBIERENDEN UND SEZERNIERENDEN IONENTRANSPORTERN	45
4.5 TACROLIMUS BEEINFLUSST DEN TRANSPORTERBESATZ IM DARM UND TRÄGT DAMIT ZU VERSCHLECHTERTER NIERENFUNKTION BEI.....	48
4.6 MÖGLICHKEITEN UND LIMITIERUNGEN DIESER STUDIE	51
5. ZUSAMMENFASSUNG.....	52
6. LITERATURVERZEICHNIS	53
7. ANHANG	60
7.1 ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	60
7.2 TABELLENVERZEICHNIS	61
7.3 ERKLÄRUNG ZUM EIGENANTEIL	62
7.4 DANKSAGUNGEN.....	63

ABKÜRZUNGEN

cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
ATG	Antithymozytenglobulin
ATP	Adenosintriphosphat
CD	cluster of differentiation
cDNA	complementary DNA
CFTR	cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
CMV	Cytomegalie-Virus
CP	crossing Point
Ct	cycle threshold
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DRA	down regulated in adenoma
dsDNA	Doppelstrang-DNA
DTT	Dithiothreitol
DV	Darmversagen
EBV	Epstein-Barr-Virus
eNaC	epithelial Na ⁺ Channel
FBS	fecal bovine serum
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
GI	Gastrointestinal
H3F3A	Histon 3.3A
HUGO	Human Genome Organisation
IFALD	intestinal failure-associated liver disease
IL	Interleukin
KDS	Kurzdarmsyndrom
MDRD	Modification of Diet in Renal Disease
MMF	Mycophenolatmofetil

mTOR	mammalian target of rapamycin
NaCl	Natriumchlorid
NEC	Nekrotisierende Enterokolitis
NHE3	sodium hydrogen exchanger isoform 3
NHERF	sodium hydrogen exchanger regulatory factor 1
NOD2	nucleotide oligomerization domain
PAT-1	putative anion transporter-1
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PKA	Proteinkinase A
PTLD	post-transplant lymphoproliferative disorder
qPCR	quantitative PCR
qRT-PCR	quantitative Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion
RNA	ribonucleic acid
SGLT	sodium-dependent glucose cotransporters
Slc/SLC	solute carrier (HUGO-Nomenklatur)

EINLEITUNG

1.1 Einführung

Die Darmtransplantation ist eine neue Behandlungsoption des chronischen Darmversagens (DV) / Kurzdarmsyndroms (KDS) (Fishbein, 2009). Die genaue Rolle der Darmtransplantation in der Langzeitbehandlung des Darmversagens wird derzeit noch kontrovers diskutiert. So ist in den letzten Jahren klar geworden, dass die Indikation zur Darmtransplantation sehr streng zu stellen ist. Vor allem beim irreversiblen chronischen Darmversagen mit lebensbedrohlichen Komplikationen durch die parenterale Ernährung sollte derzeit eine Darmtransplantation erwogen werden (Lamprecht et al., 2014). Die strenge Indikationsstellung ergibt sich hauptsächlich aus der Vielzahl an möglichen Komplikationen und Nebenwirkungen: Perioperative Komplikationen, akute und chronische Abstoßungsreaktionen, Lymphoproliferative Erkrankungen (PLTD), Infektionen und andere unerwünschte Arzneimittelwirkungen der Immunsuppressiva stellen die wichtigsten Problemfelder im Management nach Darmtransplantation dar. Eine allgemeine, wichtige Nebenwirkung der Immunsuppression nach Organtransplantation ist die Schädigung der Nierenfunktion durch den Calcineurin-Inhibitoren Tacrolimus (FK506) (Group, 1994; Ojo et al., 2003). Auffällig ist, dass ein chronisches Nierenversagen nach Darmtransplantation, verglichen mit Transplantation anderer Organe, außergewöhnlich häufig auftritt (Ojo et al., 2003). Dies kann einerseits teilweise durch hohe Tacrolimus-Wirkspiegel erklärt werden (Watson et al., 2008). Andererseits könnte auch eine verminderte Wasser- und Elektrolytaufnahme des transplantierten Darmes zur ausgeprägteren Verschlechterung der Nierenfunktion beitragen im Vergleich mit Transplantationen anderer solider Organe (außer der Niere). In der hier vorliegenden Arbeit sollen die Zusammenhänge zwischen Immunsuppression, intestinaler Wasser- und Elektrolytaufnahme sowie Nierenfunktion nach Darmtransplantation untersucht werden.

1.2 Darmversagen und Darmtransplantation

1.2.1 Darmversagen

Laut aktueller S3-Leitlinie bezeichnet Darmversagen „die Unfähigkeit, wegen einer eingeschränkten, resorptiven Kapazität des Darms (Obstruktion, Dysmotilität, chirurgische Resektion, kongenitale Erkrankung, krankheitsverminderte Absorption), die Protein-, Energie-, Flüssigkeits- und Mikronährstoffbilanz aufrechtzuerhalten“ (Lamprecht et al., 2014). Dagegen wird das Kurzdarmsyndrom abgegrenzt, welches ein „Darmversagen nach ausgedehnter Resektion mit der Unfähigkeit wegen einer eingeschränkten, resorptiven Kapazität des Darms (Obstruktion, Dysmotilität, chirurgische Resektion, kongenitale Erkrankung, krankheitsverminderte Absorption), die Protein-, Energie-, Flüssigkeits- und Mikronährstoffbilanz mit einer konventionellen Diät aufrechtzuerhalten“ (Lamprecht et al., 2014) bezeichnet.

Kurzdarmsyndrom und Darmversagen erfordern häufig eine parenterale Ernährung, welche langfristig mit erheblichen Komplikationen einhergehen kann (Buchman et al., 2003). Wiederholte Infektionen von zentralvenösen Kathetern für die Ernährung, Verlust von zentralvenösen Zugängen, wiederholte Elektrolytentgleisungen sowie die Entwicklung einer intestinal failure-associated liver disease (IFALD) verschlechtern die Prognose des Kurzdarmsyndroms / Darmversagens erheblich (Fishbein, 2009).

1.2.2 Darmtransplantation

Bereits in den 1960er Jahren gab es erste Untersuchungen und Versuche zur Multiviszeraltransplantation (inklusive Dünndarm) am Menschen (Lillehei et al., 1967). Erst 1987 gelang jedoch Kieler Chirurgen die weltweit erste erfolgreiche isolierte Darmtransplantation (Deltz et al., 1989). Sukzessive Verbesserungen im perioperativen Management und vor allem in der Langzeitversorgung haben die Darmtransplantation in spezialisierten Zentren zu einer Behandlungsmethode des chronischen Darmversagens gemacht.

Die Darm- oder Multiviszeraltransplantation ist heute ein interdisziplinäres Gebiet mit Beteiligung von Chirurgie, Gastroenterologie, Anästhesie, Ernährungsmedizin, Nephrologie, Virologie und medizinischer Mikrobiologie. Durch Verbesserungen in der Infektions- und Abstoßungsdiagnostik sowie -therapie, der Immunsuppressionsregimes und der chirurgischen Techniken ist die Darmtransplantation zu einer Option in der Therapie des Darmversagens geworden. So haben sich die Ein-Jahres-Überlebensraten von Transplantat und Patienten deutlich gebessert: Während sie 1997 noch bei 52 % und 69 % lagen, sind sie bis 2005 auf 75 % und 79 % angestiegen und sind damit vergleichbar mit den Überlebensraten nach anderen Organtransplantationen wie Pankreas, Lunge oder Leber (Hanto et al., 2005; Mazariegos et al., 2010).

Die Langzeitüberlebensrate ist jedoch immer noch niedrig. So liegt das 10-Jahres-Überleben bei isolierter Darmtransplantation bei 40-50 % und das Transplantat-Überleben sogar bei nur ~30 % (Ceulemans et al., 2015; Grant et al., 2015; Mazariegos et al., 2010). Insbesondere vor diesem Hintergrund hat sich in den letzten Jahren der Konsens zu einer strengeren Patientenselektion für die Darmtransplantation entwickelt (Goulet, 2012; Lamprecht et al., 2014).

1.2.2.1 Indikation der Darmtransplantation

Die Strenge der Indikationsstellung wird bis heute kontrovers diskutiert und unterscheidet sich zwischen Europäischen Ländern und den USA (Ceulemans et al., 2015; Grant et al., 2015; O'Keefe, 2006). Angezeigt ist die Darmtransplantation vor allem beim Darmversagen, wenn die parenterale Ernährung zu scheitern droht. Bei Kindern zählt das Darmversagen infolge von Darmresektionen, z.B. bei nekrotisierender Enterokolitis, Volvulus, Gastroschisis oder infolge seltener angeborener Enterozytendysfunktionen zu den wesentlichen Indikationen. Bei Erwachsenen wird die Darmtransplantation vor allem beim chronischen Darmversagen / Kurzdarmsyndrom bei Morbus Crohn, infolge ausgedehnter Tumoroperationen oder vaskulärer Ereignisse sowie nach chirurgischen

Komplikationen oder einem ausgedehnten Ileus durchgeführt (Fishbein, 2009; Grant et al., 2015) (Abbildung 1).

Im Falle eines chronischen Darmversagens stellen die Irreversibilität mit wesentlichen Komplikationen, wiederholte bzw. lebensbedrohliche Septikämien, Verlust von zentralen venösen Zugängen, wiederholte und therapierefraktäre Störungen des Flüssigkeits-, Elektrolyt- und Säure/Basenhaushalts und eine cholestatische Lebererkrankung Transplantationsindikationen dar (Lamprecht et al., 2014).

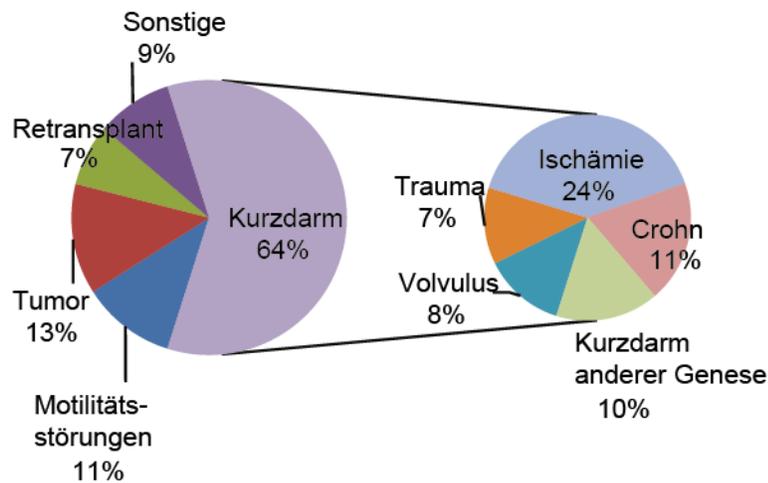


Abbildung 1: Indikationen zur Darmtransplantation. Dem Darmversagen zugrunde liegende Erkrankungen im aktuellen Gesamttransplantationskollektiv in den USA. Modifiziert nach (Grant et al., 2015).

Ob eine isolierte (Abbildung 2. A), kombinierte Leber- und Darm- (Abbildung 2. B) oder Multiviszeraltransplantation (Abbildung 2. C) indiziert ist, ergibt sich aus dem Ausmaß der Schädigung der anderen Organe. Sind z.B. die Leber bei IFALD, der Magen nach Bypass-Chirurgie, die Bauchspeicheldrüse bei chronischer Pankreatitis oder das Kolon bei Morbus Crohn stark geschädigt, wird eine Mittransplantation der entsprechenden Organe sinnvoll bzw. technisch unumgänglich. Es hat sich herausgestellt, dass Transplantate, die mitsamt einem Kolonsegment transplantiert werden, einen günstigeren Verlauf haben (Matsumoto

et al., 2011). Ebenso ist die Mittransplantation von Leberanteilen mit einem besseren Überleben assoziiert (K. Abu-Elmagd, 2015).

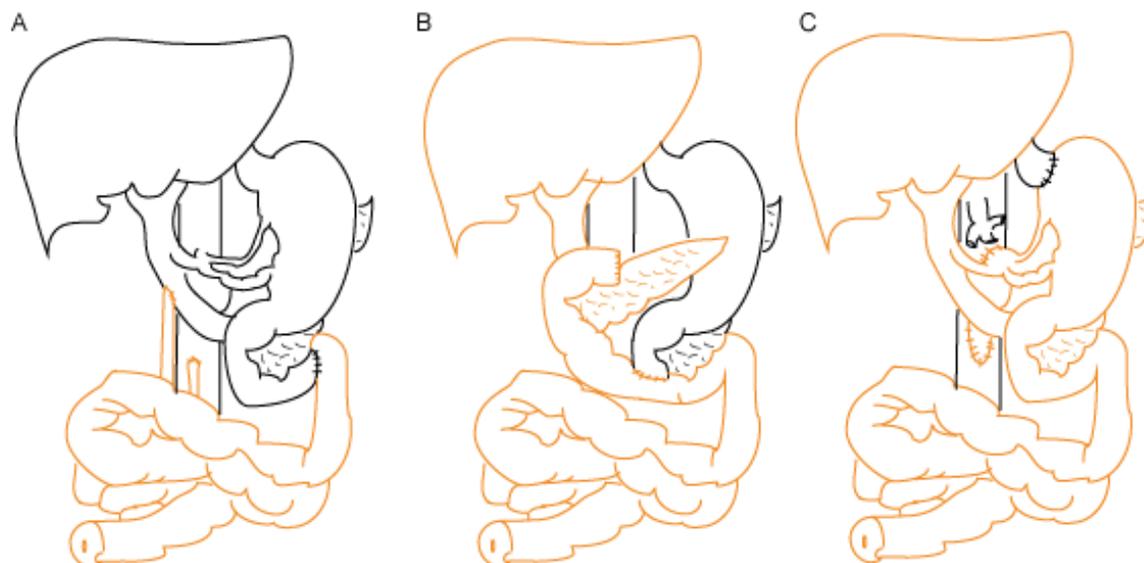


Abbildung 2: Drei Verschiedene Transplantationsmodi. A: Isolierte Dünndarmtransplantation, B: kombinierte Leber-Dünndarmtransplantation, C: Multiviszeraltransplantation.

1.2.2.2 *Zeitlicher Ablauf der Darmtransplantation*

Die Chirurgie der Darmtransplantation hat sich in Technik und begleitender Immunsuppression seit 1989 stark verändert. Auf die Beschreibung genauer OP-Techniken soll hier verzichtet werden. Perioperativ erhalten Patienten heute eine intensive initiale Immunsuppression, die im folgenden Absatz genauer beschrieben ist. Unmittelbar nach der Operation wird eine Ernährungssonde gelegt, um enterale Ernährung postoperativ bereits früh zu gewährleisten. Der Patient wird von der enteralen Ernährung entwöhnt und beginnt, Nahrung oral aufzunehmen. Ein Ileostoma wird angelegt, um regelmäßige Kontrollendoskopien durchführen zu können, die eine frühe und regelmäßige Abstoßungsdiagnostik am Darm erlauben. Die Langzeitimmunsuppression wird mit den Leitsubstanzen Prednison/Prednisolon und Tacrolimus geführt (Fishbein, 2009). Dabei wird unter Kontrolle auf mögliche Abstoßungsreaktionen versucht, Prednisolon (weitgehend) auszuschleichen und die Tacrolimuszielspiegel so niedrig wie möglich zu halten.

Bei akuten Abstoßungsepisoden kann MMF gegeben werden. Um die Tacrolimus-Talspiegel und damit die Nephrotoxizität zu senken, kann ein mTOR-Inhibitor (Sirolimus oder Everolimus) gegeben werden (Fishbein et al., 2002). Schließlich kann bei längerer klinischer Stabilität das Ileostoma rückverlegt werden, wenn die Anatomie dies zulässt.

1.2.2.3 *Immunsuppression*

Im Dünndarm laufen viele noch unverstandene immunologische Prozesse ab. Neben seiner Hauptaufgabe der Nahrungsaufnahme werden Mukosa und Submukosa mit einem hochkomplexen Mikrobiom konfrontiert. Um das Mikrobiom in Schach zu halten, ist die Darmwand mit einer Vielzahl an Immunzellen besetzt. Nach Transplantation werden die im transplantierten Darm residierenden Immunzellen des Spenders langsam durch einwandernde Immunzellen des Empfängers ersetzt (Iwaki et al., 1991). Diese Balance zwischen Mikrobiom, Stützgerüst der Darmwand und Immunzellen gilt es nach Darmtransplantation im Rahmen der Immunsuppression zu kontrollieren.

Die Standardimmunsuppression wird unterschieden in Induktions- und Erhaltungstherapie. Zur Induktionstherapie werden Antikörper gegen T-Zellen gegeben. Wurden initial häufiger polyklonale T-Zell-Antikörper wie ATG oder Thymoglobulin eingesetzt, kommen heute eher monoklonale Antikörper gegen T-Zellen wie Basiliximab (gegen den IL-2-Rezeptor) oder Alemtuzumab (gegen CD52) zur Anwendung (K. M. Abu-Elmagd, Costa, et al., 2012). In der Langzeittherapie kommt Tacrolimus als Leitmedikament zum Einsatz. Begleitend werden Glucocorticoide in kleiner Dosierung gegeben. Tacrolimus-Talspiegel von 10-15 ng/ml unmittelbar nach Transplantation und 5-10 ng/ml ab 3 Monaten nach Transplantation sind von anderen Arbeitsgruppen als effektiv eingeschätzt worden (Reyes et al., 2005). Wenn angezeigt, sind Mycophenolatmofetil (MMF) oder mTOR-Inhibitoren zur Ergänzung der Immunsuppression möglich (Fishbein, 2009).

1.2.2.4 Nierenfunktion nach Darmtransplantation

Niereninsuffizienz ist eine bekannte und häufige Komplikation nach Organtransplantation, die den Behandlungserfolg erheblich beeinflusst. So wurde etwa nach Leber-, Herz- und Lungentransplantationen eine Verbindung zwischen schlechter Nierenfunktion und schlechtem Outcome festgestellt (Gonwa et al., 2001; Rocha et al., 2005; Rubel et al., 2004). Ojo et al. stellten insbesondere fest, dass das relative Sterberisiko bei dialysepflichtiger chronischer Niereninsuffizienz nach Organtransplantation vierfach erhöht war (Ojo et al., 2003). Vor allem in der Zeit nach Darmtransplantation nimmt die Niere eine zentrale Stellung ein. Einerseits kann sie den Behandlungserfolg und die Überlebensrate der Transplantation empfindlich beeinflussen (Herlenius et al., 2008; Kaldas et al., 2007; Ueno et al., 2006; Watson et al., 2008). Andererseits können auch Faktoren bedingt durch die Darmtransplantation die Nierenfunktion im Verlauf erheblich verschlechtern. Als Risikofaktoren für eine chronische Niereninsuffizienz nach Darmtransplantation wurden verschiedene Gegebenheiten festgestellt: So wurden z.B. eine bestehende Vorschädigung der Niere, ein Aufenthalt auf der Intensivstation zum Zeitpunkt der Transplantation, Alter >18 J oder Hochdosis-Tacrolimus als Risikofaktoren für eine verschlechterte Nierenfunktion beschrieben (Watson et al., 2008). Die genaue Pathogenese der Niereninsuffizienz insbesondere nach einer Darmtransplantation ist jedoch nicht geklärt. Daten von Herlenius et al. lassen auf eine multifaktorielle Genese schließen (Herlenius et al., 2008). Neben der Nephrotoxizität durch Tacrolimus werden wiederholte große abdominelle Eingriffe nach der Transplantation, wiederholte Infektionen und andere nephrotoxische Medikamente diskutiert. Ebenfalls denkbar wäre, dass eine gestörte Elektrolytresorptionsfähigkeit einen Einfluss auf die Nierenfunktion hat. Dies ist bis heute nicht untersucht. Unklar bleibt, warum die Rate an chronischem Nierenversagen unter allen Organtransplantierten bei den Darmtransplantierten am höchsten ist (Ojo et al., 2003).

1.3 Wasser- und Elektrolytresorption des Gastrointestinaltraktes

1.3.1 Allgemeines zu transepithelialen Elektrolytbewegungen

Der Gastrointestinaltrakt spielt in der Regulation des Wasser- und Elektrolythaushalts des Körpers eine wichtige Rolle. Die genauen Mechanismen des transmukosalen Transports sind, trotz jahrhundertelanger Forschung, die 1889 mit dem Schotten Edward Reid begonnen wurde (Bell & Parsons, 1976), noch nicht vollständig aufgeklärt. Es sind viele Elemente und Proteine beschrieben, die in intestinale Resorptions- und Sekretionsprozesse involviert sind.

Der Darm resorbiert täglich eine große Menge Flüssigkeit. Man geht davon aus, dass der menschliche Darm 9 Liter pro Tag aufnimmt. Diese 9 Liter setzen sich zusammen aus 1,5-2,0 Liter oral zugeführter Flüssigkeit und 7-7,5 Litern Sekret aus Speicheldrüsen, Magen, Gallenblase, Pankreas oder dem Darm selbst (Kato & Romero, 2011). Da im menschlichen Körper kein aktiver Transportmechanismus für Wasser zur Verfügung steht, kommt bei der Bewältigung des Transports dieser großen Menge Flüssigkeit der Natriumchloridabsorption und -sekretion als treibender Kraft eine zentrale Bedeutung zu.

Für Elektrolytbewegungen dieser beiden Ionen sind verschiedene Mechanismen bekannt:

1. Nährstoff-gekoppelte Na^+ -Resorption, auf die hier nicht näher eingegangen werden soll (v.a. SGLT, Slc6, Slc38, etc.)
2. elektroneutrale NaCl -Resorption,
3. elektrogene Cl^- -Sekretion und
4. elektrogene Na^+ -Resorption durch den epithelialen Natrium-Kanal (eNaC), spezifisch für das distale Kolon (Kunzelmann & Mall, 2002; Turnamian & Binder, 1989), auf die hier ebenfalls nicht näher eingegangen werden soll.

Für all diese Mechanismen baut eine basolateral gelegene Na^+/K^+ -ATPase mit Hilfe von Chlorid- und Kalium-Kanälen (Nakamura et al., 1999; Partiseti et al., 1998) einen elektrochemischen Gradienten für Natrium Richtung Zellinneres auf.

Elektroneutraler NaCl-Transport im Dün- und Dickdarm kann durch diesen Gradienten apikal sekundär aktiv und elektroneutral (Mahnensmith & Aronson, 1985) über Na^+/H^+ - (v.a. durch den Transporter NHE3 aus der Slc9-Familie) (Hoogerwerf et al., 1996; Schultheis et al., 1998) sowie $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ - Austausch (v.a. durch PAT-1 und DRA aus der Slc26-Familie) (Alper et al., 1999; Moseley et al., 1999) gewährleistet werden.

Elektrogene Chloridsekretion mit konsekutiv parazellulärem Na^+ - Strom Richtung luminal wird vor allem durch CFTR (Riordan et al., 1989) bei intrazellulärer cAMP, oder cGMP- Erhöhung vermittelt (Barrett & Keely, 2000). Diese Art der Sekretion ist für den gesamten Dün- und Dickdarm nachgewiesen (Kato & Romero, 2011).

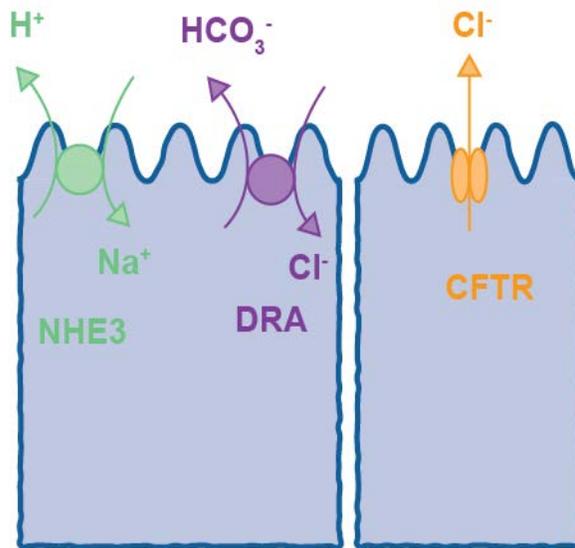


Abbildung 3: Transzelluläre NaCl-Bewegungen intestinal.
Elektroneutraler NaCl-Transport (links) und elektrogene Cl^- -Sekretion (rechts).

1.3.2 DRA und PAT-1

Bis heute sind vor allem zwei $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ - Austauscher bekannt (Gawenis et al., 2004; Seidler et al., 2008; Walker et al., 2008), welche die Chloridresorption und Bikarbonatsekretion im menschlichen Darm leisten. Das Slc26A3-Transkript, DRA, down regulated in adenoma, stellt einen der beiden $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ - Austauscher im menschlichen Darm dar. Es wurde in Kolon-Adenomen niedrig exprimiert gefunden (Schweinfest et al., 1993) und wird im gesamten Darm exprimiert. Besonders

große Expression findet man jedoch in Duodenum und Kolon (Jacob et al., 2002). Slc26A3 wurde durch immunhistochemische Färbungen an der apikalen Membran von oberflächlichen und kryptalen Enterocyten lokalisiert.

Slc26a6, ein elektrogener $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher (Ko et al., 2002; Mount & Romero, 2004; Shcheynikov et al., 2006; Xie et al., 2002) wird von PAT-1 kodiert und wurde im Gegensatz zu DRA in vielen anderen Organen, wie Niere, Pankreas, Herz oder Plazenta nachgewiesen. Während intestinal die stärkste Expression im Dünndarm messbar ist, wird nur eine geringe Expression im Dickdarm gefunden. Auch hier wurde immunhistochemisch nachgewiesen, dass die Transporter apikal in Parietalzellen des Magens (Petrovic et al., 2002), Enterozyten des Darms (Wang et al., 2002) und im Bereich des proximalen Nierentubulus (Kujala et al., 2005) lokalisiert sind. Eine wichtige Rolle spielen Slc26A3 und Slc26A6 in der basalen Bikarbonatsekretion des Duodenums, wobei Slc26A6 hier offenbar der wichtigere Transporter ist (Wang et al., 2005). DRA überwiegt hingegen bei der cAMP-stimulierten duodenalen HCO_3^- -Sekretion (Walker et al., 2009). Distal des Duodenums sind beide Transporter wichtig für die Chloridresorption mit einer leichten Dominanz von Slc26A3 (Walker et al., 2008). Im Kolon spielt DRA außerdem in der Chloridresorption eine große Rolle (Schweinfest et al., 2006; Zhang et al., 2007). Aktuell wird davon ausgegangen, dass Slc26A3 wohl den Verlust von Slc26A6 kompensieren kann, neque vice versa (Kato & Romero, 2011). Slc26A6 nimmt weiter am duodenalen SO_4^{2-} -Transport (Xie et al., 2002), sowie an der duodenalen (Wang et al., 2005) und ilealen Oxalat-Ausscheidung teil (Freel et al., 2006).

1.3.3 NHE3

NHE3, Sodium Hydrogen Exchanger 3, auch als Slc9A3 bezeichnet, spielt als intestinaler, elektroneutraler apikaler Na^+/H^+ -Austauscher (Mahnensmith & Aronson, 1985) eine herausragende Rolle für den GI-Trakt. In Slc9A3^{-/-}-Mäusen wurden eine leichte Diarrhoe, milde Azidose, niedriger Blutdruck, Vergrößerung des Darms und reduzierte jejunale Natriumresorption (Gawenis et al., 2002;

Walker et al., 2008) mit kompensatorisch erhöhter Expression von eNaC und Na^+/K^+ -ATPase festgestellt (Schultheis et al., 1998). Dass der Natriumtransport durch Glucocorticoide beeinflusst wird, wurde bereits 1983 von Foster et. al nachgewiesen (Foster et al., 1983). Erst über 10 Jahre später wurde dies durch eine Arbeitsgruppe in Baltimore quantifiziert (Wormmeester et al., 1998; Yun et al., 1993).

1.3.4 CFTR

Der Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) ist ein ABC-Protein und Ionenkanal, der im menschlichen Darm Chlorid, Bikarbonat und kleinere Mengen anderer Ionen sezerniert und dadurch einen elektrischen, Lumen-negativen Gradienten für Natrium und Wasser aufbaut (Frizzell & Hanrahan, 2012). Die Bedeutung von CFTR in der Flüssigkeitssekretion wird bei Defekten im CFTR-Gen bei der Mukoviszidose deutlich, die in erniedrigter Flüssigkeits- und Chloridsekretion in entsprechenden Epithelien resultieren (Frizzell & Hanrahan, 2012). CFTR wird durch cAMP-/PKA-abhängige Phosphorylierung (Frizzell & Hanrahan, 2012) stimuliert und stellt den wichtigsten Mechanismus für die agonistenabhängige Chloridsekretion dar.

1.4 Fragestellung der Arbeit

1. Verändert sich die Expression der Ionentransporter NHE3, DRA und CFTR im Epithel des transplantierten Ileum?
2. Korrelieren klinische Ereignisse mit einer Änderung der Transporterexpression?
3. Trägt eine Dysregulation des Transporterbesatzes im transplantierten Dünndarm durch Tacrolimus zu der hohen Inzidenz von Niereninsuffizienz nach Darmtransplantation bei?

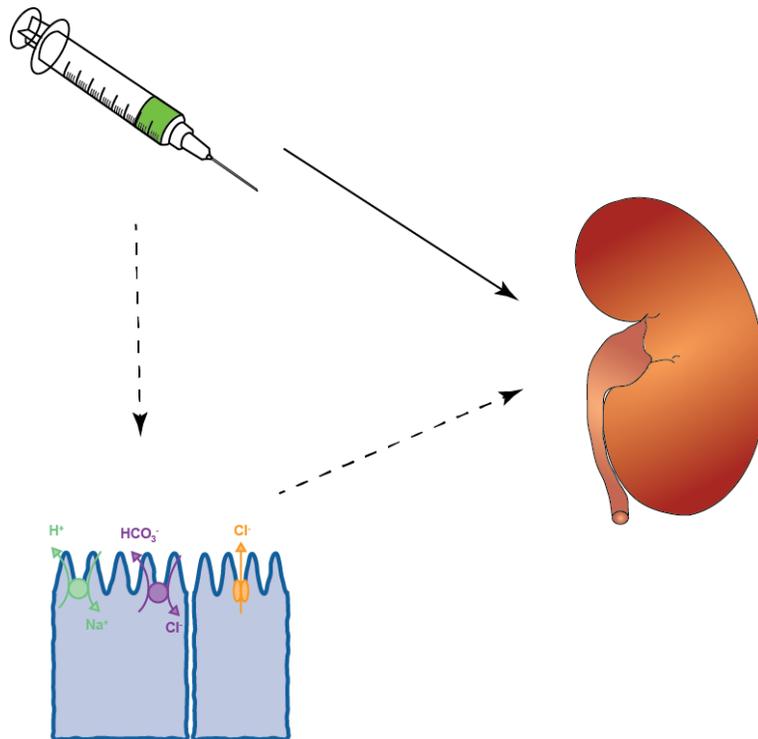


Abbildung 4: Fragestellung dieser Arbeit. In dieser Studie untersucher Zusammenhang von intestinalem Epithel, Tacrolimus und Nierenfunktion.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Probenmaterial

Schriftliches Einverständnis wurde von allen an der Studie teilnehmenden Patienten eingeholt. Zunächst wurden von 7 gesunden Kontrollpatienten im Rahmen von Darmkrebs-Vorsorge-Koloskopien Zangenbiopsien des Ileums entnommen und die ΔC_T -Werte ermittelt. Bei den darmtransplantierten Patienten wurde über einen mittleren Beobachtungszeitraum von 787 Tagen im Rahmen von Kontrollendoskopien (oder wann immer klinisch indiziert) Biopsieproben von ca. 1-2 mm³ mittels Zangenbiopsie aus dem distalen Ileum entnommen. Diese wurden direkt nach Entnahme in RNAlater RNA Stabilization Agent (Ambion Europe Ltd., Huntington, Ambridgeshire, UK) bei 4 °C konserviert. Anschließend wurde das makroskopische Gewebe aus der RNAlater-Lösung in 400 µl Lysis Puffer (Ambion Europe Ltd., Huntington, Ambridgeshire; UK) gegeben und darin mithilfe eines Plastikmörser s lysiert und bei -80 °C bis zur weiteren Verarbeitung tiefgefroren. Zur Endanalyse wurden 397 Proben mit einbezogen, da bei den übrigen Proben die nötige Menge RNA aufgrund von technischen Problemen nicht erfolgreich isoliert werden konnte.

2.2 Zellkultur

Eine aus Patientengewebe gewonnene Kolonkarzinom-Zelllinie, HROC113 (Maletzki et al., 2012), wurde für die in vitro Studien kultiviert. Die Aussaat für die Untersuchungen zum Einfluss von Tacrolimus auf die Transporterexpression erfolgte zwischen Passage 49 und 57. Die Kultivierung erfolgte in DMEM/Ham-F12 Medium (Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland) mit 5 % FBS (Gibco BRL, Paisley, Schottland) und Penicillin/Streptomycin. Für die in vitro-Versuche wurden die Zellen in 6-Well-Zellkulturplatten (Corning, Lowell, MA, USA) ausgesät. Nach Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen noch für 4 Tage kultiviert. Vor der RNA-Isolierung wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen.

2.3 RNA-Isolierung

RNA wurde mithilfe des RNA-Extraktionskit „RNAqueous® - Small Scale Phenol-Free Total RNA Isolation Kit“ Katalog #1912 (Ambion Europe Ltd., Huntington, Ambridgeshire, UK) isoliert.

Nachdem die Probe mindestens einen Tag bei -80 °C tiefgefroren war, wurde sie auf Eis aufgetaut und bei 4 °C und 15 000 rpm für 15 min zentrifugiert. Anschließend wurde die Flüssigkeit aus dem Mikroreaktionsgefäß unter Zurücklassen des am Gefäßbodens sitzenden Zell- und Gewebedetritus abgesaugt und in ein leeres Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben. Es wurde anschließend 400 µl 64 %iges Ethanol (Merck, Darmstadt, Deutschland) zugegeben. Im nächsten Schritt wurde die Probe mithilfe eines Rotationsschüttlers für mindestens 15 min vermengt.

Dann wurde die Probe in eine Ambion-Extraktionsfiltersäule (Ambion Europe Ltd., Huntington, Ambridgeshire, UK) in einem Mikroreaktionsgefäß gegeben und zunächst bei 25 °C und 2000 rpm für 3 min zentrifugiert. Das Filtrat im Mikroreaktionsgefäß wurde entfernt. War noch unfiltrierte Flüssigkeit in der Filtersäule, wurde die Drehzahl um 1000 rpm erhöht und eine weitere Minute zentrifugiert. Es wurde sukzessive zunächst 700 µl Washsolution #1, 700 µl Washsolution #2/3 und nochmals Washsolution #2/3 (Ambion Europe Ltd., Huntington, Ambridgeshire, UK) in die Filtersäule gegeben. Nach Zugabe der jeweiligen Washsolution wurde durch Zentrifugieren (zuerst 4000 rpm, dann 6000 rpm und schließlich 8000 rpm bei 25 °C, jeweils 1 min) filtriert und das Filtrat verworfen. Schließlich wurden die Säulen bei 14000 rpm und 25 °C für 3 min zentrifugiert, um überschüssige Washsolution zu entfernen. Die Filtrationssäule wurde nun in ein neues Mikroreaktionsgefäß der Firma Ambion transferiert und es wurde auf den Filter 50 µl Elutionspuffer (Ambion Europe Ltd., Huntington, Ambridgeshire, UK), der zuvor auf 70-80 °C erhitzt wurde, zugegeben. Anschließend wurde für 15 min inkubiert, dann bei 12000 rpm 1 min lang bei 25 °C zentrifugiert und zuletzt nochmals in gleicher Weise mit Elutionspuffer inkubiert und zentrifugiert. Die isolierte RNA wurde bei -20 °C gelagert.

2.4 RNA-Nachweis

2.4.1 Gelelektrophorese

Zur Bestimmung der Qualität der RNA-Isolation wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt. Dazu wurde 1,5 %iges Agarosegel (Gibco BRL, Paisley, Schottland) mit TRIS-Borat-EDTA-Puffer (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) gegossen und 10 mg/ml Ethidiumbromid (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) zugegeben. Das Gel wurde mit Gemischen aus je 5 µl RNA-Isolat und 2,5 µl Formaldehyd-Ladepuffer aus dem Ambion-Extraktionskit (Ambion Europe Ltd., Huntington, Ambridgeshire, UK) beladen. Die Auftrennung erfolgte bei 90-100 V für ca. 60 min.

Zur Auswertung wurden die Gele unter UV-Licht beurteilt und auf die Intaktheit des typischen 18S und 28S-Bandenmusters untersucht.

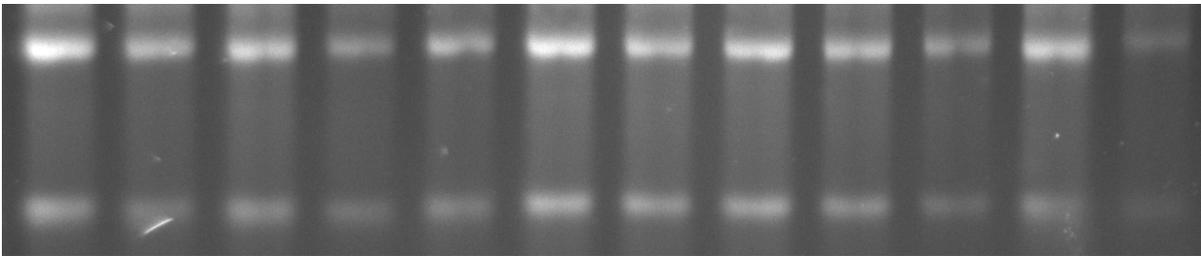


Abbildung 5: RNA-Banden unter UV-Licht. Im dargestellten Beispiel ist das typische 18S und 28S Bandenmuster als Zeichen für die Isolation intakter RNA sichtbar.

Photometrische Konzentrationsbestimmungen der isolierten RNA wurden mittels Nano Drop 2000 Spectrophotometer von Thermo Scientific (Peqlab, Erlangen, Deutschland) durchgeführt.

2.5 Reverse Transkription

Zur Herstellung von cDNA wurde das „RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit #K1632“ (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) verwendet. Zum Primer-Annealing wurden 15 µl RNA, der Isolat-Konzentration entsprechend 100 ng bis max. 5 µg RNA, mit 0,75 µl oligo(dT)₁₈-Primer versetzt und bei 70 °C für 15 min im GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) inkubiert. Auf Eis wurde anschließend 7,5 µl Mastermix (4 µl Puffer, 2 µl DTT, 0,75 µl dNTP Mix, 0,75 µl „RevertAid™ H Minus M-MuLV Reverse Transcriptase“)

zugesezt und schließlich für 90 min bei 42 °C im Heizblock umgeschrieben. Zuletzt erfolgte die Inaktivierung der Enzyme bei 72 °C für 5 min.

2.6 Quantitative Echtzeit-PCR

2.6.1 Theorie der qRT-PCR

Die Kombination der reversen Transkription (RT) mit nachfolgender quantitativer Echtzeit-PCR (qPCR) als qRT-PCR zu Nachweis oder Quantifizierung von mRNA ist heute eines der wichtigsten Verfahren zur Transkriptionsanalyse (Bustin et al., 2005). Bei der qRT-PCR wird mittels Fluoreszenzmessung am Ende jedes Amplifikationszyklus die Zunahme der Target-DNA bestimmt. Dazu kann z.B. ein interkalierender Farbstoff wie SYBR™ Green I eingesetzt werden, der mit doppelsträngiger DNA einen Komplex bildet, welcher dann bei einer charakteristischen Absorptions- und Emissionswellenlänge fluoresziert. Die Fluoreszenzintensität der Lösung steigt mit Zunahme der dsDNA an und ist somit ein Maß für die Zunahme der dsDNA.

2.6.1.1 Cycle threshold Werte

Zur Quantifizierung der Startmenge werden statt absoluter DNA-Konzentrationen sog. C_t - oder CP Werte herangezogen. Diese entsprechen der Anzahl an PCR-Zyklen, die durchlaufen werden müssen, um ein definiertes Fluoreszenzniveau zu erzielen. Aus den C_t -Werten werden ΔC_t -Werte berechnet, indem der C_t -Wert einer Target-DNA vom C_t -Wert einer Referenz-DNA subtrahiert wird. Der Betrag des ΔC_t -Wert gibt an, wie viele Zyklen mehr ($C_t > 0$) oder weniger ($C_t < 0$) benötigt werden, um die gleiche Menge an DNA zu erhalten wie die Referenz-DNA. Geht man von einer Verdopplung der DNA pro Zyklus aus, kann der relative Expressionsunterschied E berechnet werden. Dieser gibt an, in welchem Verhältnis die Target-DNA zur Referenz-DNA vorliegt:

$$\Delta C_t = C_{t\text{-Referenzgen}} - C_{t\text{-Zielgen}}$$

$$\text{rel. Expressionsunterschied } E = 2^{-\Delta C_t}$$

Um den relativen Expressionsunterschied E eines Zielgens zwischen einem Probenmaterial und einer Kontrolle anzugeben, wird der $\Delta\Delta C_t$ -Wert berechnet:

$$\Delta\Delta C_t = \Delta C_{t\text{-Probe}} - \Delta C_{t\text{-Kontrolle}}$$

Aus dem $\Delta\Delta C_t$ -Wert kann wiederum der relative Expressionsunterschied E ermittelt werden:

$$\text{rel. Expressionsunterschied } E = 2^{-\Delta\Delta C_t}$$

Ist der $\Delta\Delta C_t$ -Wert >1 , so wird das Zielgen im Probenmaterial im Vergleich zur Kontrollprobe vermehrt exprimiert et vice versa.

2.6.1.2 Histon 3.3A

Histon 3.3A diente für die qRT-PCR als Referenzgen, da es als "Housekeeping gene" während des Zellzyklus auf konstanten Leveln exprimiert wird und keinen zellzyklusbedingten Schwankungen unterliegt. Histone sind basische Proteine, die als Teil des Chromatins in der Konservierung der DNA die entscheidende Rolle spielen. Histon 3.3A ist häufig eingesetztes Referenzgen und ist in mehrfachen Evaluationen von qRT-PCR-Referenzgenen als eines der effektivsten und zuverlässigsten ermittelt worden (Hruz et al., 2011; Nijhof et al., 2009). Es wurde in der Analyse von Ionentransportern im Dünndarm von Kaninchen, Ratte und Mensch erfolgreich eingesetzt (Jacob et al., 2002; Rossmann et al., 1999).

2.6.2 Auswahl der Primer

Die Auswahl der Primer erfolgte mit Hilfe der Primer-Express 2.0-Software (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Die ausgewählten Primersequenzen waren:

Histon 3.3A

Sense: 5'-TTCCAGAGCGCAGCTATCG-3'

Antisense: 5'-TCTTCAAAAAGGCCAACCAGAT-3'

DRA

Sense: 5'-GTGTCCTTTCTTGATGTTTCTTCAGT-3'

Antisense: 5'-CGGTTAAGCTTCTCAATGAAGTCA-3'

CFTR

Sense: 5'-GGAAAAGGCCAGCGTTGTC-3'

Antisense: 5'-CCAGGCGCTGTCTGTATCCT-3'

NHE3

Sense: 5'-CTGTCCCTCTACGGCGTCTT-3'

Antisense: 5'-GCTGCCAAACAGGAGGAAGTC-3'

2.6.3 Konzentrationsoptimierung der Primer

Zur Ermittlung der optimalen Konzentration der Primerpaare wurde eine Kalibrierkurve erstellt und anschließend die optimale cDNA-Konzentration mittels Plasmiden ermittelt. Die einzelnen Konzentrationen können Tabelle 1 entnommen werden:

Tabelle 1: Optimierte Primerkonzentrationen für die Reverse Transkription.

Zielgen	Sense Primer [nM]	Antisense Primer [nM]
Histon 3.3A	300	300
DRA	200	200
PAT1	300	300
CFTR	250	250
NHE3	100	300

2.6.4 Durchführung der qRT-PCR

Zur Quantifizierung der umgeschriebenen cDNA wurde die quantitative Echtzeit-PCR der qRT-PCR mit dem Abi Prism 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) durchgeführt. Da die Ziel- und Referenzgene nicht im selben Reaktionsbehältnis gemessen wurden, wurde jeweils Ziel- und

Referenzgenen in dreifacher Ausführung amplifiziert. Es wurde das „DyNAmo Flash SYBR™ Green qPCR Kit“ (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) verwendet. Dazu wurden auf einer Platte (12*8 Reaktionsbehälter) maximal 6 verschiedene Patienten-Proben mit den 3*5 Zielgenen gemessen. Zuerst erfolgte die Konfiguration der Software Abi Prism 7000 SDS 1.2.3 und die Erstellung des Pipettierschemas. Ein Mastermix mit der adäquaten Menge für die zu messende Probenanzahl wurde hergestellt. Wie oben beschrieben, waren die Primerkonzentrationen bereits optimiert. Anschließend wurde die cDNA auf 10 ng/µl verdünnt und die Arbeitsfläche für die PCR vorbereitet. Jeweils 5 µl RNA und 15 µl Mastermix ergaben zusammen ein Reaktionsvolumen von 20 µl. Die Platte wurde mit einer Klebefolie abgedeckt, bei 4000 rpm für 1-2 min zentrifugiert und in das Abi Prism 7000 Sequence Detection System eingesetzt. Das Gerät wurde mit der Software Abi Prism 7000 SDS angesteuert und ausgelesen. Der Ablauf der qPCR ist in Abbildung 6 dargestellt.

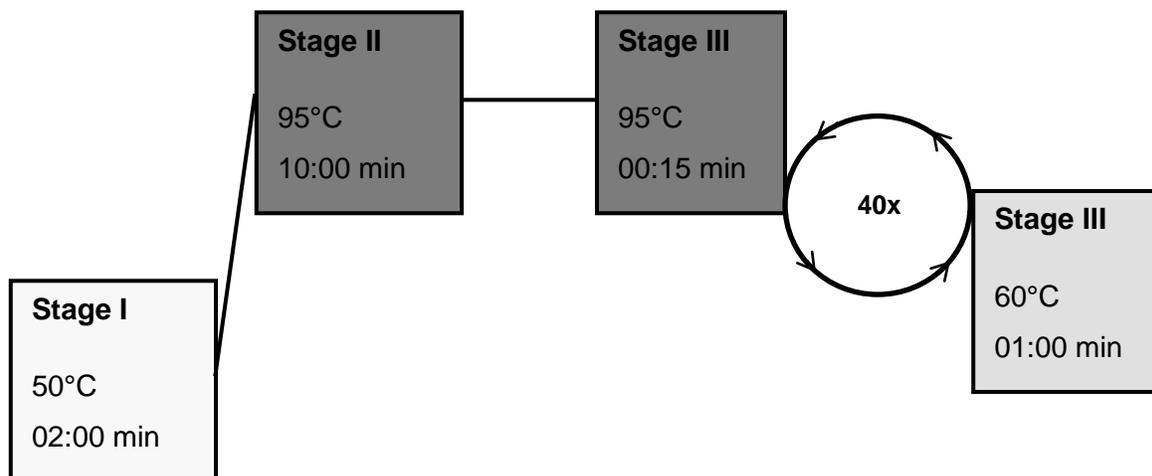


Abbildung 6: PCR-Einstellungen am Abi Prism 7000 SDS.

2.7 Klinische Daten

2.7.1 Erstellung einer Datenbank

Mithilfe des relationalen Datenbankmanagementsystems Microsoft Access wurde eine Datenbank erstellt, die Informationen zu endoskopisch und histologisch diagnostizierten Abstoßungsepisoden, dem Biopsieort, Komplikationen oder besonderen Ereignissen, CMV- und EBV-PCR aus dem Blut, Nierenfunktion, Immunsuppression und zum Körpergewicht der Patienten enthält. Die Rohdaten der quantitativen Real-Time-PCR wurden in einer separaten Tabelle im Access gespeichert und mittels Abfragen mit den klinischen Daten korreliert.

2.7.2 Datengewinnung

Die klinischen Daten wurden retrospektiv erhoben und händisch per Eingabeformular oder direkt in Tabellen in Microsoft AccessTM eingegeben. Bei jeder Endoskopie fand zugleich eine Erhebung klinischer und laborchemischer Basisparameter statt.

2.7.3 Abstoßungsdiagnostik

Die Patienten erhielten wie auch in anderen Zentren praktiziert (Horslen, 2006) nach einem festen Schema Kontrollendoskopien, um Abstoßungsreaktionen frühzeitig zu erkennen. Diese fanden zunächst im Abstand von 3 Tagen, später dann zwischen immer längeren Intervallen statt. Bei diesen wurde mittels Zoomendoskopie die Dünndarmschleimhaut nach dem von Sasaki entwickelten Schema beurteilt (Sasaki et al., 2002). Biopsien wurden entnommen und am pathologischen Institut der Universität Tübingen histologisch begutachtet. Abstoßungsreaktionen wurden als mild, moderat oder schwer klassifiziert.

2.7.4 Berechnung der GFR mittels MDRD-Formel

Um die Nierenfunktion zu beurteilen, wurde die glomeruläre Filtrationsrate bestimmt. Diese wurde mittels vereinfachter MDRD-Formel aus den im Zentrallabor der Universität Tübingen bestimmten Serumkreatininwerten folgendermaßen berechnet:

Für männliche Patienten: $GFR = 186 \cdot \left(\frac{S_{crea}}{0,95}\right)^{-1,154} \cdot \text{Alter}^{-0,203}$

Für weibliche Patienten: $GFR = 186 \cdot \left(\frac{S_{crea}}{0,95}\right)^{-1,154} \cdot \text{Alter}^{-0,203} \cdot 0,742$

2.7.5 Statistische Tests

Statistische Tests wurden mit der Statistik-Software JMP – Version 11.1.1 (SAS Institute, Cary, NC, USA) durchgeführt. Signifikanzniveaus und die jeweils verwendeten statistischen Testarten sind in den jeweiligen Abbildungen angegeben. Auf Normalverteilung wurde mittels Kolmogorov-Smirnov-Test sowie graphischer Darstellung in Histogrammen geprüft. Bei parametrischer Verteilung wurde mit student's t-test auf Signifikanz getestet. Bei nicht-parametrischer Verteilung fand der Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test Anwendung.

3. ERGEBNISSE

Ein Teil der hier vorgelegten Ergebnisse wurde bereits publiziert in (Reiner et al., 2016).

3.1 Patientenkollektiv

Für die vorliegende Studie wurden 10 Patienten untersucht, die im Zeitraum 2006-2011 am Universitätsklinikum Tübingen in der Abteilung Allgemeine, Viszeral- und Transplantationschirurgie darmtransplantiert wurden (Tabelle 2). Der Beobachtungszeitraum war 2006-2012. Die untersuchten Patienten waren im Mittel etwa 50 Jahre alt. Die heimparenterale Ernährung war vor Transplantation häufig sehr lange durchgeführt worden. Die Ursachen für irreversibles chronisches Darmversagen waren Morbus Crohn, Mesenterialischämie, Karzinom und Volvulus. Vor Transplantation war die Nierenfunktion bereits in 40 % der Fälle stark vermindert. Die Inzidenz von Mutationen im NOD2-Gen als Risikofaktor für die Entwicklung eines Darmversagens (Schäffler et al., 2013) lag bei 33 %. Indikationen für die Transplantation waren immer basiert auf lebensbedrohlichen Komplikationen, welche auf die parenterale Ernährung zurückzuführen waren. Dies waren intestinal failure-associated liver disease (IFALD) in 50 %, Verlust zentraler Zugangswege in 30 % und wiederholte Septitiden in 20 % der Fälle. Eine isolierte Darmtransplantation wurde bei 60 % und eine Multiviszeraltransplantation bei 40 % der Patienten durchgeführt. Eine Mittransplantation des Kolon ascendens erfolgte in 40 % der Fälle. Eine schwere Transplantatdysfunktion trat in 20 % der Fälle auf, welche den Verlust des Transplantats zur Folge hatte. Ein Patient entwickelte ein chronisches Transplantatversagen, welches die Transplantatentfernung nach 1315 Tagen notwendig machte. Die zweite Transplantatentfernung in einem anderen Patienten wurde nach 119 Tagen aufgrund protrahierter akuter Abstoßung und Sepsis notwendig. Ein Patient entwickelte in der frühen posttransplant-Phase eine schwere Graft-versus-Host-Reaktion, der er 47 Tage nach Transplantation erlag.

Tabelle 2: Tübinger Darmtransplantationskohorte 2006-2012. * Standardabweichung; ‡ Range. Modifiziert nach (Reiner et al., 2016).

Patienten	
männlich/weiblich	6/4
Alter bei Transplantation [in Jahren]	50,4 ± 7,49 *
Dauer der Parenteralen Ernährung vor Transplantation [in Monaten]	129 (17 – 363)
Follow up [in Tagen]	787 (47 – 1508) ‡
Ursachen für Darmversagen (Crohn/Volvulus/Ischämie/Karzinom)	(6/1/2/1)
Nierenversagen vor Transplantation	4
NOD2-Mutation (hetero-/homozygot)	2/1
Transplantationsindikationen	
Verlust zentraler Zugangswege	3
Wiederholte Septitiden	2
intestinal failure-associated liver disease (IFALD)	5
Transplantat	
Isolierter Dünndarm	6
Multiviszeral	4
Kolon ascendens mittransplantiert	4
Immunsuppression	
Induktion (Alemtuzumab/ATG/Basiliximab)	2/3/3
Tacrolimus zur Erhaltung	10
Prednisolon	10
Mycophenolat zu Beginn	6
Intermittierend mTOR-Inhibitor	5
Klinisches Outcome	
Bioptisch gesicherte Abstoßung	1
Transplantatverlust	2
Tod	1

3.2 Immunsuppression

Alle Patienten erhielten eine immunsuppressive Induktionstherapie. Eingesetzt wurde entweder ATG (200 mg), Thymoglobulin (2x 75 mg), Basiliximab (2x 20 mg) oder Alemtuzumab (20 mg). Zusätzlich erhielten alle Patienten ein initiales Immunsuppressionsregime, welches Tacrolimus (Zielspiegel: 10-15 ng/ml) und Hochdosis-Prednisolon beinhaltete. 6/10 Patienten erhielten Mycophenolatmofetil. mTOR-Inhibitoren (Rapamycin oder Everolimus) wurden eingesetzt, um die Nephrotoxizität zu senken. Da jedoch kein positiver Effekt auf die Nierenfunktion festgestellt werden konnte und zusätzlich unerwünschte Arzneimittelwirkungen auftraten, wurden die mTOR-Inhibitoren nur intermittierend eingesetzt. Ein Jahr nach Transplantation bei allen Patienten eine relativ einfache Immunsuppression bestehend aus Tacrolimus und niedrig dosiertem Prednisolon erreicht werden (Abbildung 7 und Abbildung 8).

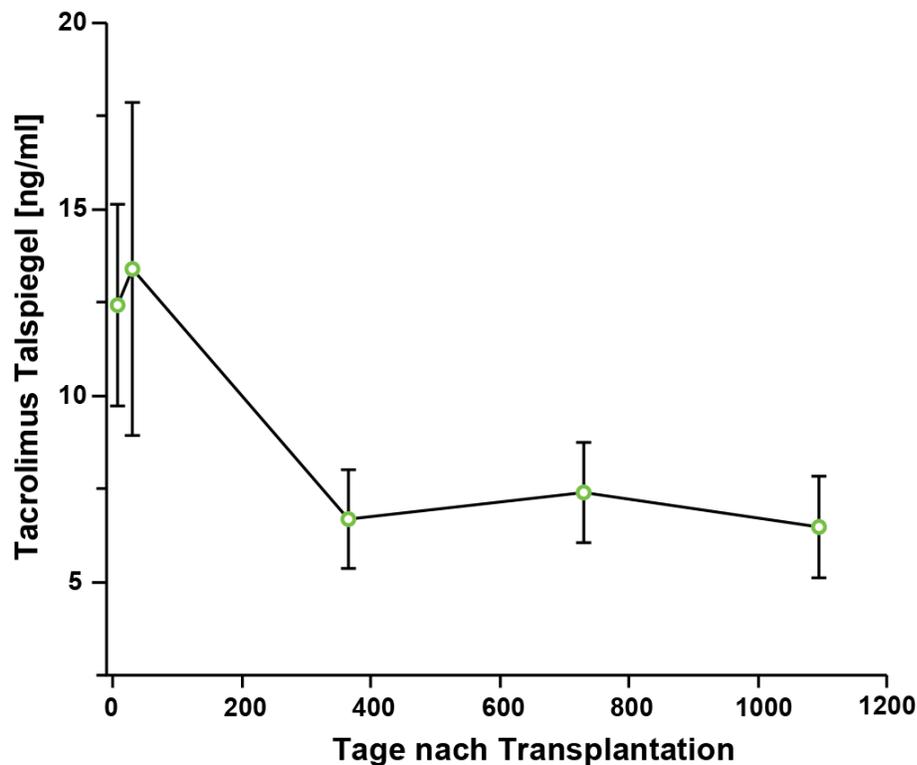


Abbildung 7: Mittlere Tacrolimusspiegel nach Transplantation. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung des Mittelwerts an.

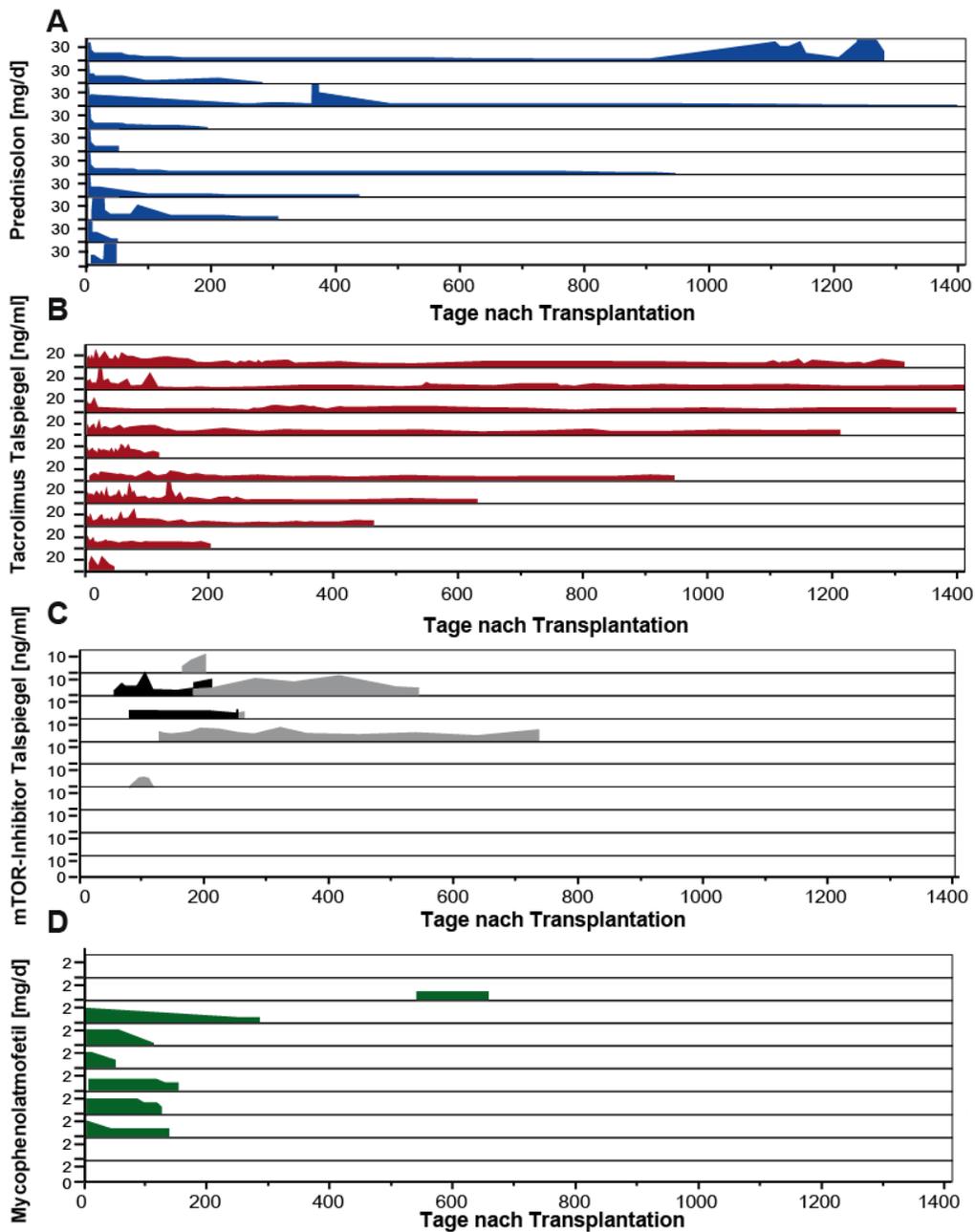


Abbildung 8: Immunsuppression nach Transplantation im Zeitverlauf. Jede Zeile zeigt den Verlauf für einen einzelnen Patienten an. Die Patienten sind von oben nach unten sortiert nach Datum der Transplantation. A) Prednisolontagesdosis im Verlauf. B) Tacrolimustalspiegel im Verlauf. Beim ersten Patienten zeigte sich ein Transplantatversagen bei chronischer Abstoßung. Das Transplantat wurde an Tag 1315 explantiert. Bei Patient 5 wurde das Transplantat an Tag 119 aufgrund einer protrahierten akuten Abstoßungsreaktion und Sepsis explantiert. C) Intermittierende mTOR-Inhibitor-Gabe erfolgte, um die Nephrotoxizität zu senken. D) Die MMF-Gabe erfolgte bei 6 Patienten initial und wenn indiziert. Modifiziert nach Reiner et al., 2016.

3.3 Transporterexpression im Epithel des terminalen Ileum

Um untersuchen zu können, ob sich die Expression der Ionentransportproteine im Dünndarm ändert, wurde zunächst Proben von 7 gesunden Patienten, die im Rahmen einer Kolonkarzinomvorsorge koloskopiert wurden, aus dem distalen Ileum entnommen. Aus diesen Proben wurde RNA isoliert und mittels qRT-PCR die Expression der Gene Histon 3.3A, DRA, NHE3 und CFTR bestimmt. Histon 3.3A wurde bereits in vorangehenden Studien als Referenzgen im Duodenum verwendet (Jacob et al., 2002) und dient auch in der vorliegenden Arbeit als Referenz, um die relative Expression der vier Ionentransportproteine zu ermitteln.

3.3.1 Transporterexpression im Kontroll-Ileum

Um den Transporterbesatz im transplantierten Darm beurteilen zu können, wurden zunächst Standardexpressionswerte für die vier Ionentransporter ermittelt. Dazu wurde im Rahmen von Kolonkarzinom-Vorsorgekoloskopien bei 7 gesunden Kontrollpatienten Zangenbiopsien entnommen und die Expression der Transporter mittels qRT-PCR im Gewebe ermittelt. Als Referenzgen wurde Histon 3.3A verwendet. Bezogen darauf waren die aus den Messergebnissen berechneten ΔC_t -Werte für die Kontrollgruppe im Einzelnen $-2,05 \pm 0,17$ für DRA; $4,36 \pm 0,71$ für CFTR und $1,18 \pm 0,33$ für NHE3. Diese Werte zeigen eine niedrige Variabilität und sind somit gut als Kontrollwerte geeignet (siehe Tabelle 3).

Tabelle 3: ΔC_t -Werte aus Kontroll-Ileum. n=7

	DRA	CFTR	NHE3
Ø ΔC_t -Werte	-2,05	4,36	1,18
Standardabweichung	0,173	0,716	0,334

3.3.2 Transporterexpression im transplantierten Darm

Um den Transporterbesatz der Epithelzellen im transplantierten Darm zu bestimmen wurde wie bei den Kontroll-Biopsien die Expression der Transportproteingene mittels qRT-PCR ermittelt und mit der Expression von Histon 3.3A verglichen. Anschließend wurde die relative Expression (bezogen auf Proben aus dem Ileum gesunder Kontrollprobanden) mittels $\Delta\Delta C_t$ -Methode bestimmt (siehe 2.6.1.1 *Cycle threshold Werte*).

Im ersten Jahr nach Transplantation war im transplantierten Ileum die mediane relative Expression von NHE3 auf 21,9 %, von DRA auf 43,0 % und von CFTR auf 48,0 % vermindert. Im zweiten Jahr nach Transplantation waren die relativen Expressionslevel von NHE3 (58.9 %) und DRA (59.5 %) statistisch signifikant verbessert. Die CFTR-Expression war mit 53.8 % im Vergleich zu den Werten im ersten Jahr nicht statistisch signifikant verändert.

Während sich der Trend zur verbesserten Expression für NHE3 (67,3 %) und DRA (65,4%) im dritten Jahr fortsetzte, war die CFTR-Expression mit 56,8 % auch im dritten Jahr kaum verändert im Vergleich zu den Jahren 1 und 2 nach Transplantation (Abbildung 9). Zusammengefasst war die Expression aller 3 untersuchten Ionentransportproteine nach Transplantation vermindert. Eine signifikante Erholung der Expressionslevel war nur bei NHE3 und DRA zu beobachten. Während die CFTR-Expression ebenfalls vermindert war, konnten keine signifikanten Veränderungen im Zeitverlauf beobachtet werden.

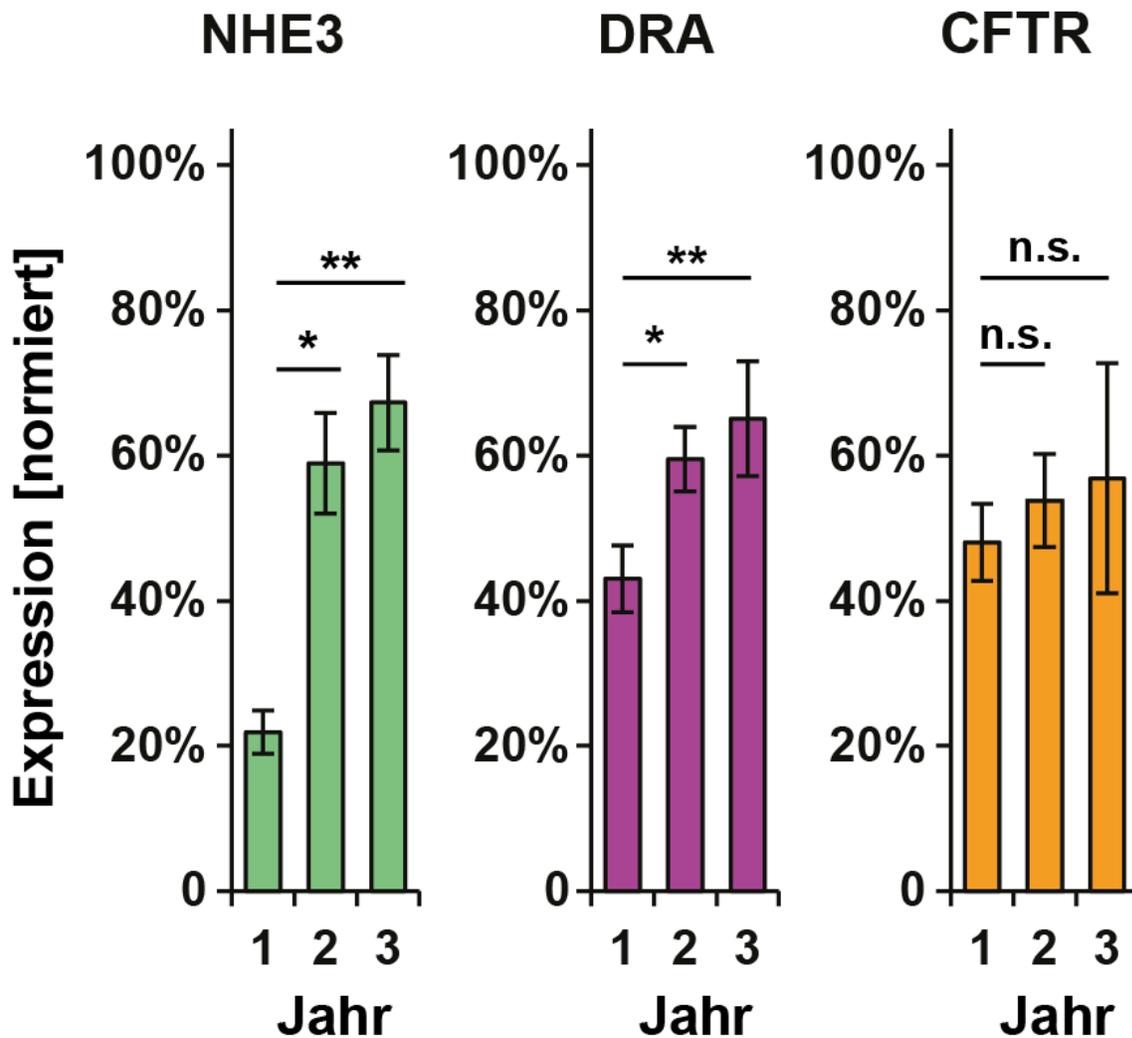


Abbildung 9: RNA-Expression der Ionentransporter im Gesamtbeobachtungszeitraum. Im ersten Jahr nach Transplantation war die Expression im Vergleich zur Kontrolle aus gesundem, nicht transplantierten Darm von NHE3 (21.9%), DRA (43.0%) und CFTR (~ 48,0%) stark erniedrigt. Danach erholten sich die Expressionslevel und variierten weniger stark (NHE3: 58.9%; DRA: 59.5%; CFTR: 53.8%; median ± SEM). * und ** p<0,05; n.s. nicht signifikant; Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test. Modifiziert nach Reiner et al., 2016.

3.3.2.1 Expressionsverlauf von NHE3

NHE3 wird in Ileum-Epithel und besonders stark in den Enterozyten der Villusspitze exprimiert (Hoogerwerf et al., 1996; Singh et al., 2012). Dadurch können Veränderungen der NHE3-Expression vermutlich vor allem auf die Veränderungen der Genexpressionsaktivität in den apikalen Enterozyten zurückgeführt werden. Die Genexpression in den hier untersuchten Biopsien aus

dem transplantierten Ileum erschien insgesamt vermindert. Bemerkenswerterweise war die Expression zu Beginn stark reduziert und zeigte starke Schwankungen. Insbesondere kurz nach Transplantation lag die Mehrheit der Messwerte deutlich unter dem Referenzbereich (Abbildung 10). Mit der Zeit, vor allem im Zeitraum >1 Jahr nach Transplantation schien sich die Expression bei leicht erniedrigten Werten zu erholen (Abbildung 10).

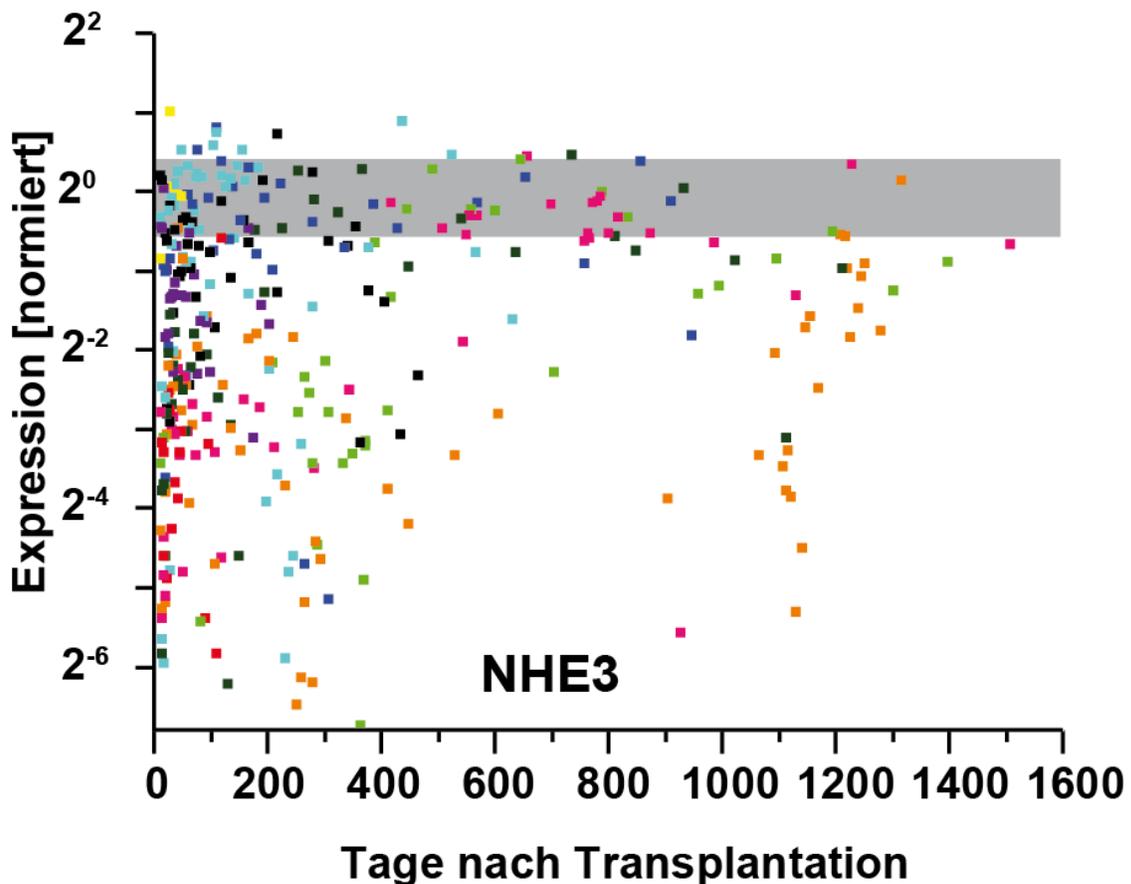


Abbildung 10: Relative NHE3-Expression über den Beobachtungszeitraum. Verschiedene Farben der Punktwolke zeigen verschiedene Patienten an. Der graue Bereich zeigt die Schwankungsbreite der Referenzgruppe an. Zu Beginn war die Expression stark reduziert und schwankend. Im Laufe der Zeit näherte sich die Expression den Referenzwerten an. Modifiziert nach Reiner et al., 2016.

3.3.2.2 *Expressionsverlauf von DRA*

DRA wird wie auch NHE3 im Dünndarm exprimiert. Jedoch wird angenommen, dass DRA im Dünndarm nicht so stark villusbetont wie NHE3 exprimiert wird,

sondern auch kryptennah eine starke Transkription von DRA stattfindet (Walker et al., 2009). Änderungen in der Gesamt-Expressionsaktivität sind demnach wahrscheinlich sowohl auf Änderungen in villus-, als auch in kryptennahen Enterozyten zurückzuführen. Die Analyse von DRA im Langzeitverlauf zeigte ähnlich wie NHE3 eine starke Herabregulation mit großer Schwankungsbreite zu Beginn. Insbesondere kurz nach Transplantation lag die Mehrheit der Messwerte deutlich unter dem Referenzbereich (Abbildung 11). Mit der Zeit schien sich die reduzierte Expression zu erholen und zu Werten nahe 1 zurückzukehren.

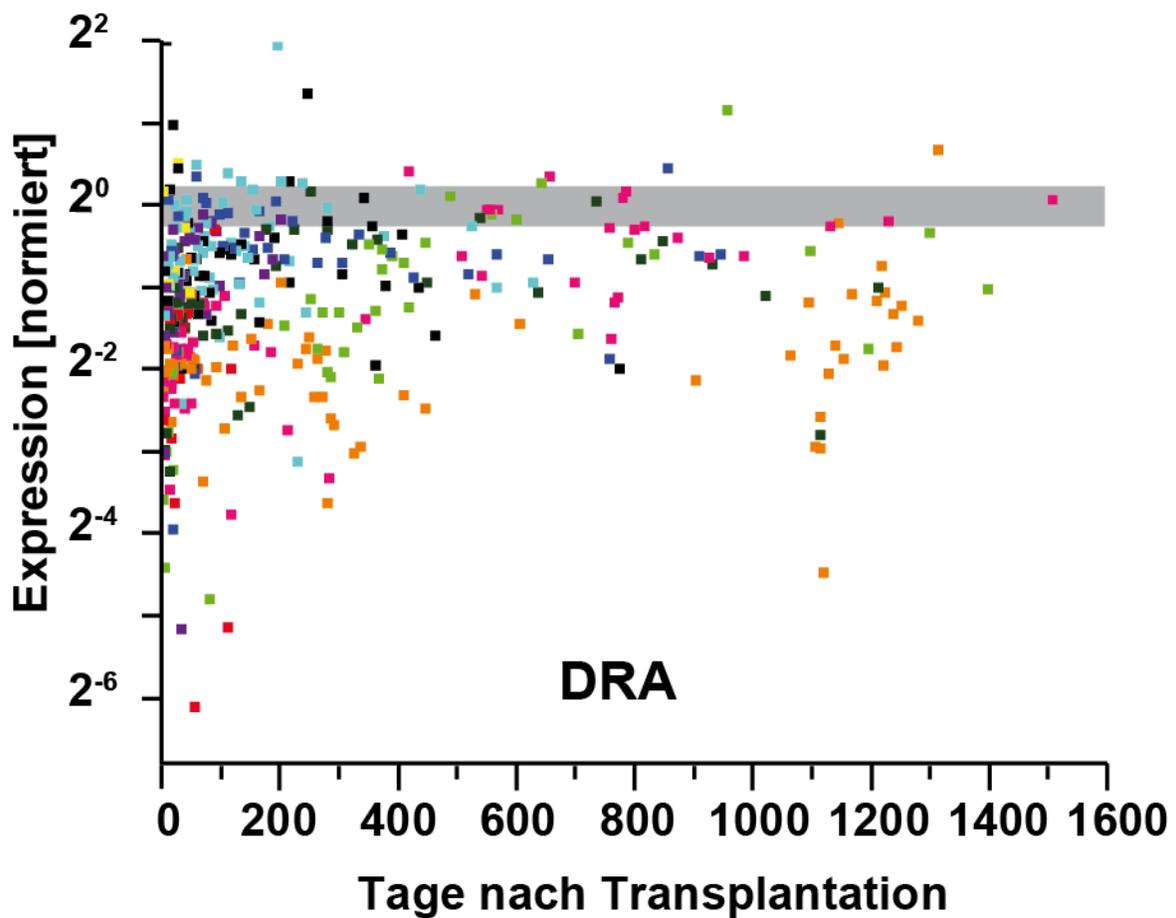


Abbildung 11: Relative DRA-Expression über den Beobachtungszeitraum. Verschiedene Farben der Punktwolke zeigen verschiedene Patienten an. Der graue Bereich zeigt die Schwankungsbreite der Referenzgruppe an. Die Expression war zu Beginn stark reduziert und schwankend. Im Laufe der Zeit näherte sich die Expression den Referenzwerten an. Modifiziert nach Reiner et al., 2016.

3.3.2.3 Expressionsverlauf von CFTR

Da die elektroneutrale Natriumchloridabsorption mutmaßlich auch durch das wichtigste Chlorid-sezernierende Protein beeinflusst wird, wurde hier auch der Chloridtransporter Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) untersucht. Die CFTR-Expression war genau wie die von NHE3 und DRA statistisch hochsignifikant vermindert. Die Herabregulation war jedoch weniger ausgeprägt als für die absorbierenden Ionentransporter. Die Schwankung im ersten Jahr fiel bei der CFTR-Expression ebenfalls auf. Im Vergleich zu NHE3 und DRA zeigten die Referenzwerte von CFTR aus gesunden Kontrollprobanden eine größere Schwankungsbreite (Abbildung 12). Die CFTR-Expression schien sich auf einem leicht verminderten Level in der Schwankungsbreite der Kontrollgruppe zu stabilisieren.

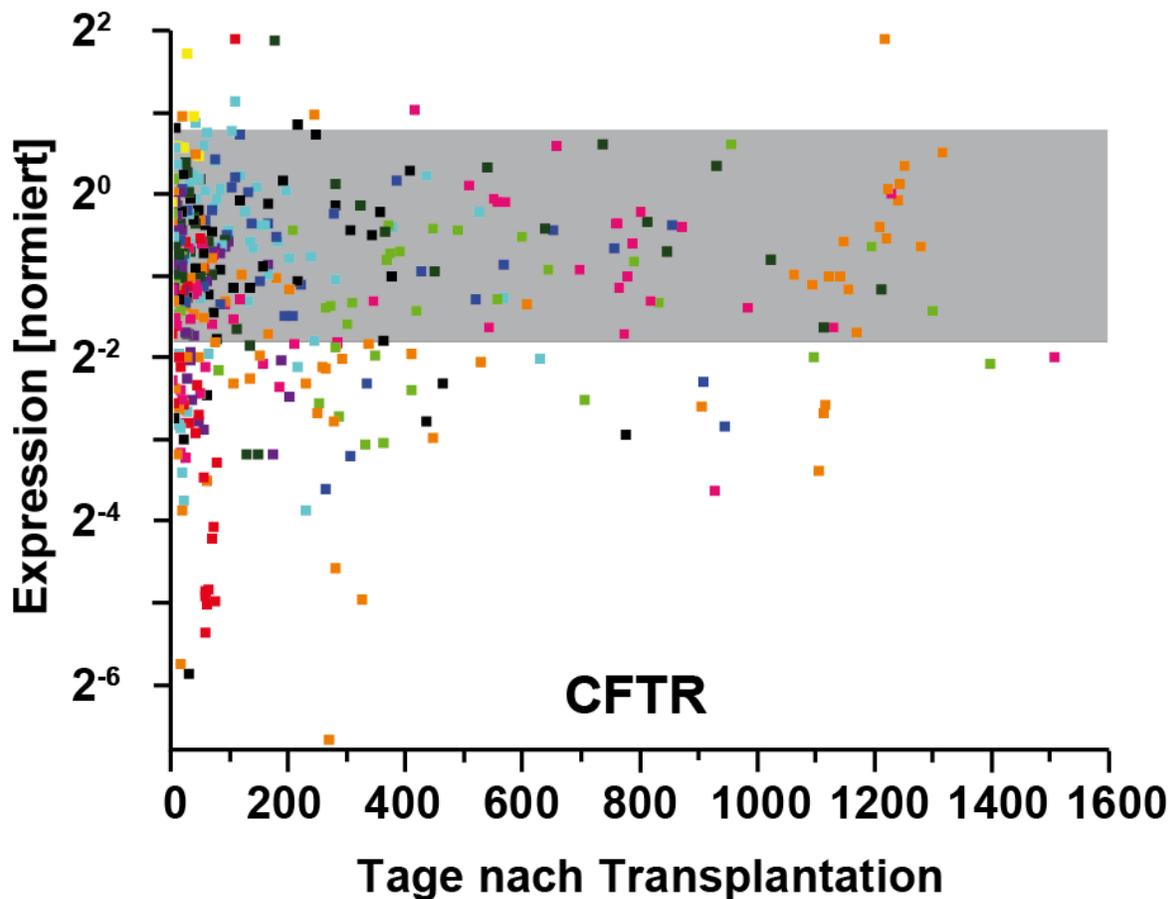


Abbildung 12: Relative CFTR-Expression über den Beobachtungszeitraum. Verschiedene Farben der Punktwolke zeigen verschiedene Patienten an. Der graue Bereich zeigt die Schwankungsbreite der Referenzgruppe an. Zu Beginn schien die Expression reduziert und stark schwankend. Im Laufe der Zeit näherte sich die Expression den Referenzwerten an. Deutlich erkennbar befanden sich viele Messwerte innerhalb der Schwankungsbreite der Referenzgruppe. Modifiziert nach Reiner et al., 2016.

3.3.2.4 *Regressionsanalyse der Transporterexpressionen untereinander*

Eine gemeinsame Regulation der verschiedenen Ionentransporter erscheint wahrscheinlich. So wird für CFTR eine gegenregulatorische Wirkung mit sowohl NHE3 (Favia et al., 2006) als auch DRA (Ko et al., 2002) angenommen. Für NHE3 und DRA wird eine gemeinsame Regulation angenommen (Malakooti et al., 2011). Diese gemeinsame Regulation von NHE3 und DRA könnte bereits bei der gemeinsamen Transkriptionsregulation beginnen, aber auch noch die Regulation der Aktivität umfassen. Hinweise hierfür sind das gemeinsame Vorkommen in Lipid Rafts und ähnliches Bindungsverhalten zu Adapterproteinen der NHERF-Familie. Mit der hier angewandten Methodik kann nur eine Aussage über die Expressionsaktivität gemacht werden. Darum wurden die relativen Expressionen der untersuchten Transporter gegeneinander in einer Regressionsanalyse korreliert. Eine starke Korrelation konnte für NHE3 mit DRA festgestellt werden (Spearman-Korrelationskoeffizient $r_s = 0,7185$). Zwischen NHE3 und CFTR ($r_s = 0,6699$) und DRA und CFTR ($r_s = 0,5143$) wurde ebenfalls eine mittelstarke bis starke Korrelation ermittelt (Abbildung 13). Interessant war dabei, dass die Korrelation zwischen NHE3 und DRA am stärksten war. Ob daraus eine stärkere gemeinsame Regulation abgeleitet werden kann, wird in der Diskussion näher erläutert.

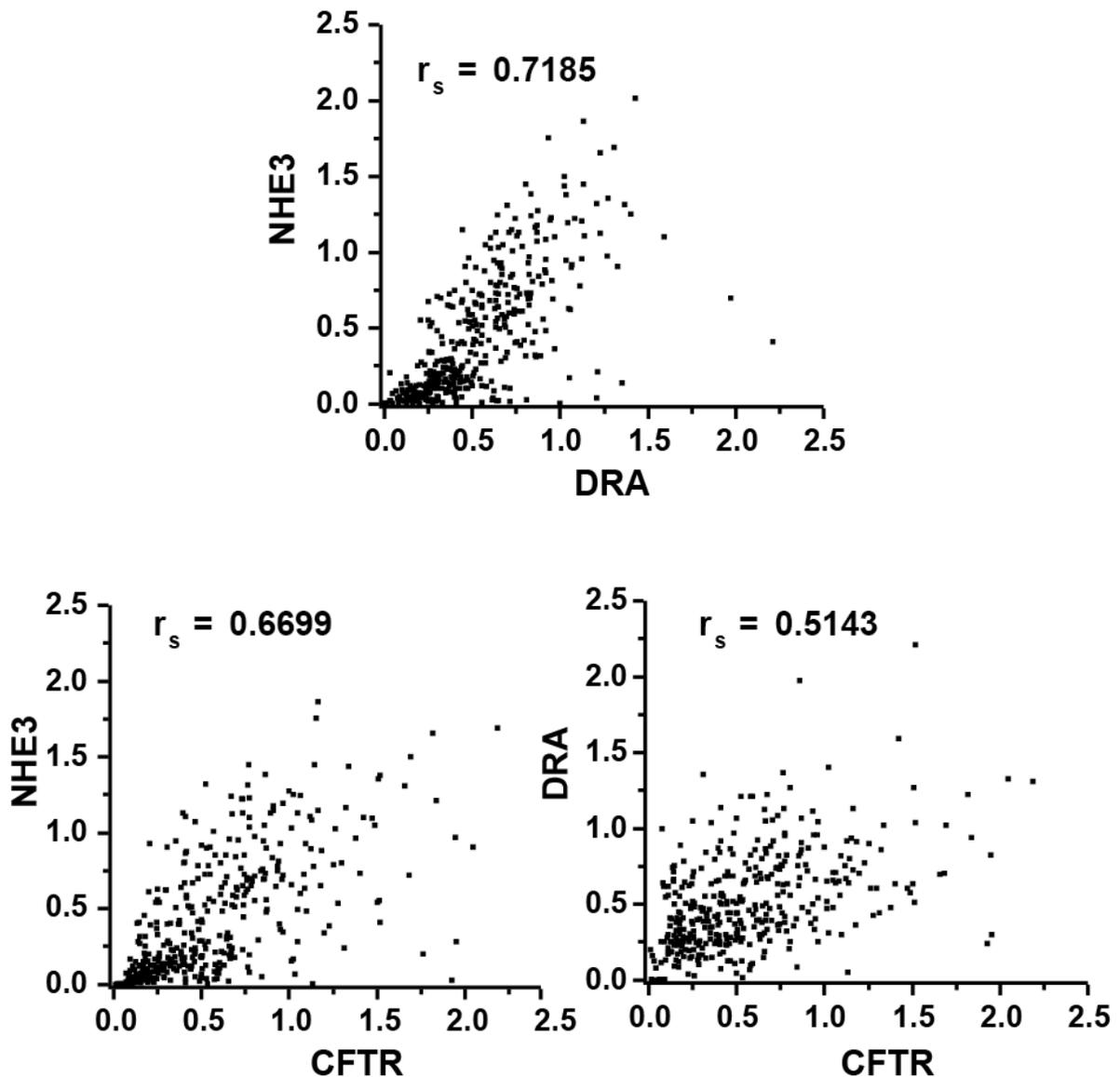


Abbildung 13: Regressionsanalyse der Ionentransporter untereinander. Die Korrelierung der relativen Expression von NHE3 mit DRA (oben) zeigte einen starken Zusammenhang. Die Korrelation von NHE3 mit CFTR (unten links) und von DRA mit CFTR (unten rechts) war etwas schwächer. Dennoch waren alle Korrelationskoeffizienten >0.5 und die einzelnen Parameter somit als stark korrelierend zu werten. Modifiziert nach Reiner et al., 2016.

3.4 Verlauf der Transporterexpression an Einzelpatienten

Um die Änderung der Transporterexpression im Langzeitverlauf besser beurteilen zu können, wurden die einzelnen Expressionsverläufe nach den jeweiligen Patienten aufgeschlüsselt und analysiert. Die Verläufe zweier charakteristischer Patienten werden hier aufgezeigt.

3.4.1 Verlauf bei Patient 1

Um Veränderungen in der Genexpression klinischen Ereignissen zuordnen zu können, wurde die relative Expression von NHE3, DRA und CFTR gegen die Zeit aufgetragen (Abbildung 14).

Wie auch in der Gesamtpopulation festgestellt, wurde bei Patient 1 unmittelbar nach Transplantation eine deutliche Reduktion der Genexpression von NHE3 und DRA festgestellt. Nach etwa einem Jahr schien sich die Genexpression zu erholen und der Vergleichsgruppe anzunähern. Interessanterweise trat diese Erholung nach einer akuten Abstoßungsperiode auf. Ob die Expression mit dieser Abstoßungsperiode zusammenhängt, bleibt jedoch unklar.

In der Abstoßungsperiode schien NHE3 stark reprimiert und DRA etwas schwächer unterdrückt. Für CFTR war in der hier vorliegenden Abstoßungsperiode, verglichen mit den perirejektiven Werten, keine deutliche Veränderung in der mRNA-Expression feststellbar. Im Langzeitverlauf schien sich die Expression aller drei untersuchten Transporter auf ein leicht erniedrigtes Niveau zu erholen.

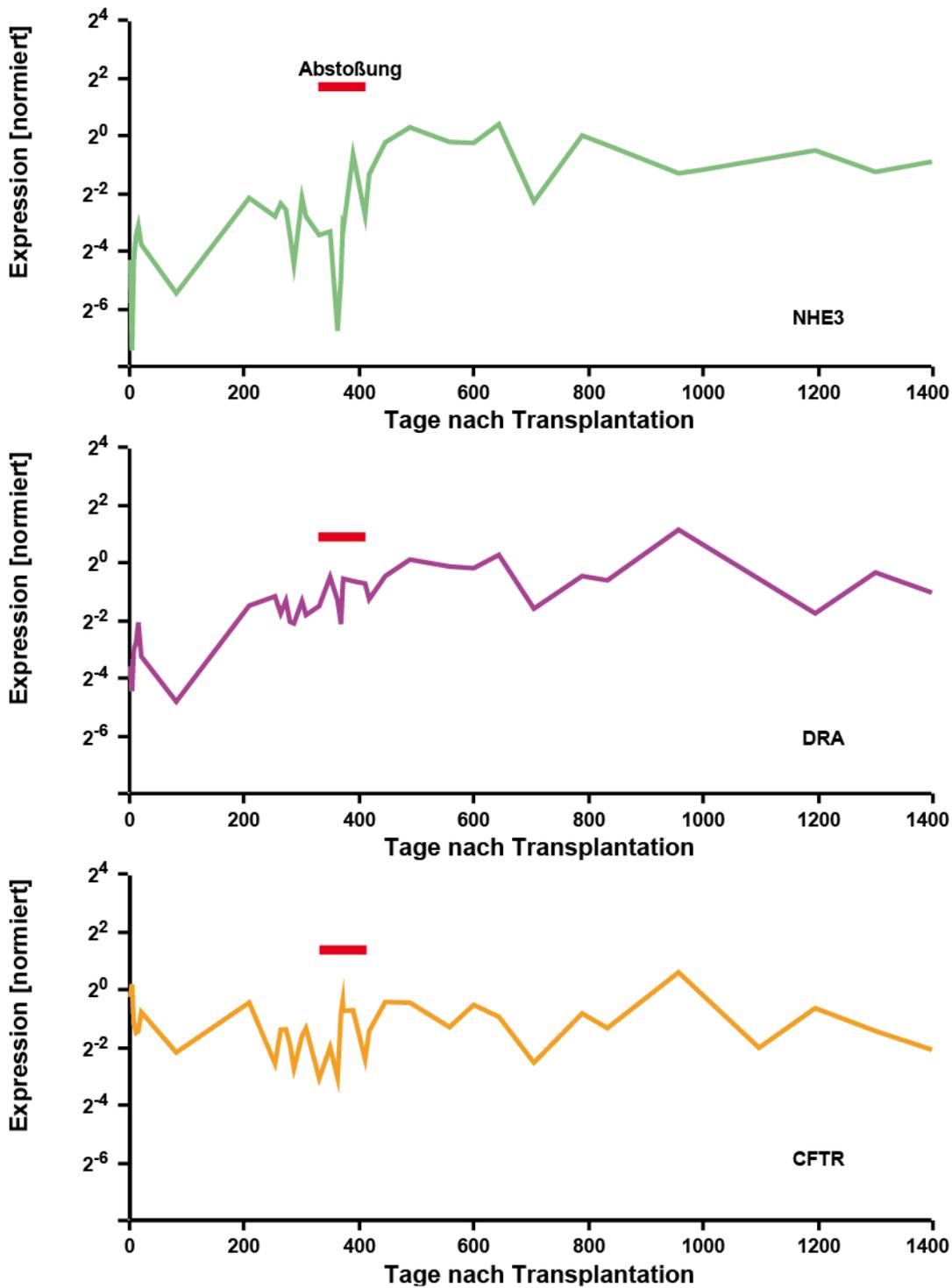


Abbildung 14: Verlauf von NHE3, DRA und CFTR-Expression bei Patient 1. Die relative Expression von NHE3 und DRA war unmittelbar nach Transplantation deutlich erniedrigt und schien sich im Verlauf, v.a. nach etwa >1 Jahr zu erholen. CFTR schien hier dauerhaft auf ein niedriges Level exprimiert zu sein. Beachte die logarithmische Skalierung der y-Achse (Expression).

3.4.2 Verlauf bei Patient 2

Patient 2 war der erste darmtransplantierte Patient am Universitätsklinikum Tübingen. Wie bei Patient 1 und im Gesamtkollektiv beobachtet, zeigte auch Patient 2 unmittelbar postoperativ eine deutliche Reduktion der relativen Expression von NHE3, DRA und CFTR (Abbildung 15). Die Expression schien sich bei diesem Patienten nicht so ausgeprägt zu erholen, wie es bei anderen Patienten zu beobachten war. Auffällig im Verlauf von Patient 2 war vor allem die stark ausgeprägte Repression von NHE3 und CFTR im Rahmen einer *Campylobacter*-Enteritis etwa 300 Tage nach Transplantation. DRA schien ebenfalls reprimiert, jedoch in geringerem Ausmaß. Nach etwas mehr als 3 Jahren traten wiederholte Abstoßungsepisoden auf, die zunächst von erniedrigter NHE3- und DRA-Expression begleitet waren. Interessanterweise waren die wiederholten Episoden nicht von deutlichen Veränderungen in der Transporterexpression begleitet. Der Schaden am Transplantat war schließlich zu groß, so dass die Explantation den Beobachtungszeitraum für diesen Patienten beendete.

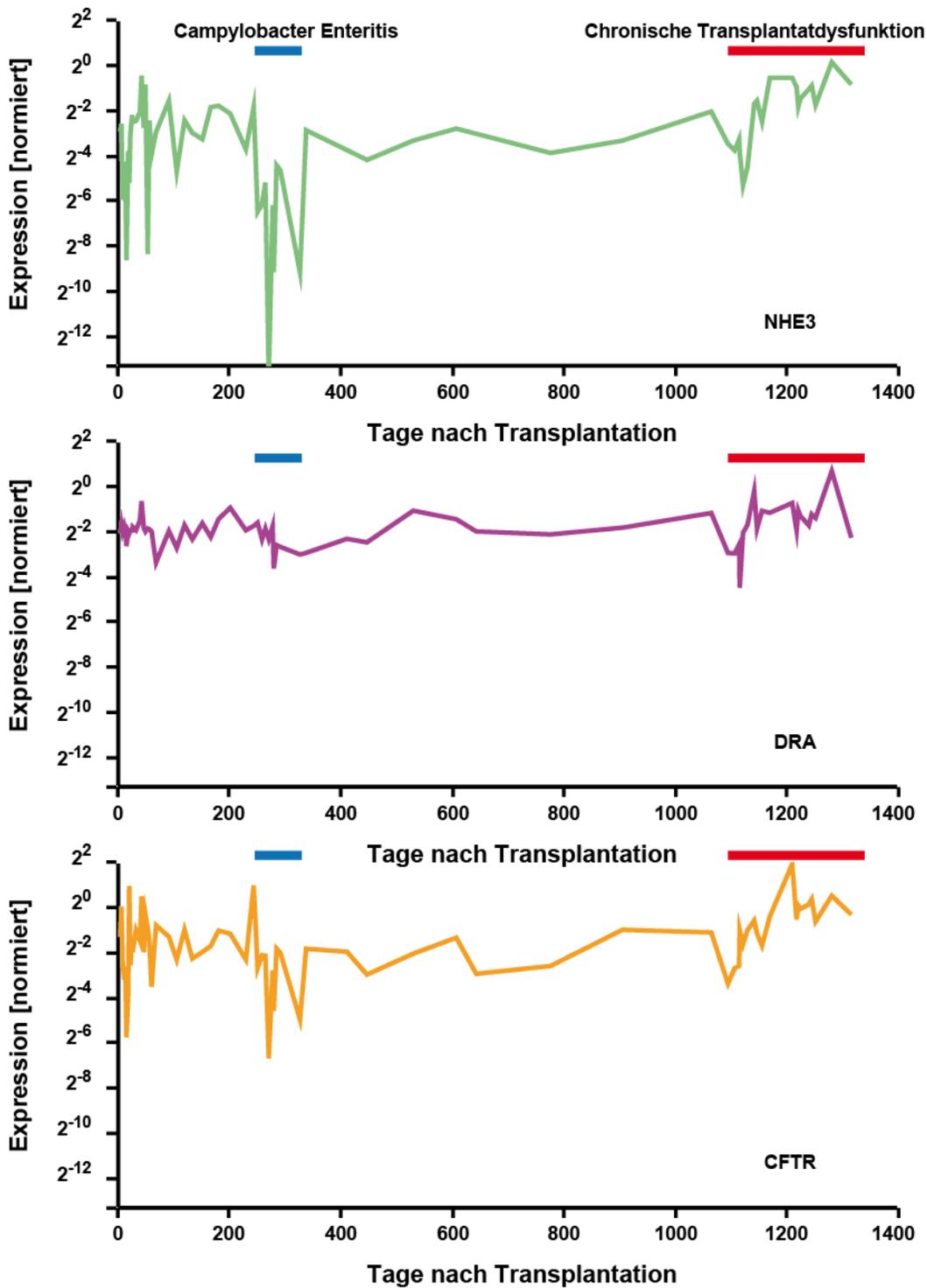


Abbildung 15: Verlauf von NHE3, DRA und CFTR-Expression bei Patient 2. Die relative Expression von NHE3 und DRA war unmittelbar nach Transplantation deutlich erniedrigt. Während einer Campylobacter-Enteritis etwa 300 Tage nach Transplantation war die Expression aller 3 Ionentransporter erniedrigt. Beachte die veränderte Skalierung der y-Achse.

3.5 Nierenfunktion im Tübinger Transplantationskollektiv

Die Nierenfunktion ist ein kritischer Faktor in der Zeit nach der Darmtransplantation. Sie muss unbedingt in der Steuerung der Immunsuppression berücksichtigt werden und beeinflusst den Langzeitbehandlungserfolg und die Letalität erheblich (Watson et al., 2008). Da unklar ist, ob die drastische Verschlechterung nach Darmtransplantation alleine auf die Nephrotoxizität der Immunsuppressiva zurückzuführen oder auch eine veränderte NaCl-Aufnahme im Darm mitverantwortlich ist, wurde hier zunächst die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) als Indikator für die Nierenfunktion bestimmt.

3.5.1 Nierenfunktion nach Darmtransplantation

Im Rahmen von Kontrolluntersuchungen wurde routinemäßig der Serum-Kreatinin-Wert erhoben und daraus die GFR wie unter 2.7.4 beschrieben, nach der MDRD-Formel errechnet. Alle Patienten zeigten eine deutliche Abnahme der GFR (nicht einzeln dargestellt), was sich auch im Mittelwert des Kollektivs zu den Zeitpunkten 0, 1, 2 und 3 Jahre nach Transplantation widerspiegelt.

Die mittlere GFR fiel von $82,60 \pm 36,03$ ml/min vor Transplantation auf Werte um 40 ml/min (Mittelwert 1 Jahr nach Transplantation: $40,36 \pm 13,42$ ml/min). Nach diesem starken Abfall um etwa 52 % stabilisierte sich die GFR bei niedrigen Werten (mittlere GFR 2 Jahre nach Transplantation: $37,09 \pm 9,61$ ml/min; nach 3 Jahren: $42,52 \pm 10,59$ ml/min). Dieser initial rapide Verlust an Nierenfunktion war zeitlich begleitet von hohen Tacrolimusspiegeln (Abbildung 16). Zeitlich korrelierend zur Reduzierung der Tacrolimuslevel verminderte sich der progrediente GFR-Abfall. Ab 1 Jahr post transplantationem kam der Verfall der glomerulären Filtrationsrate sogar zum Stillstand. Dies war zeitlich begleitet von niedrigeren Tacrolimus-Talspiegeln.

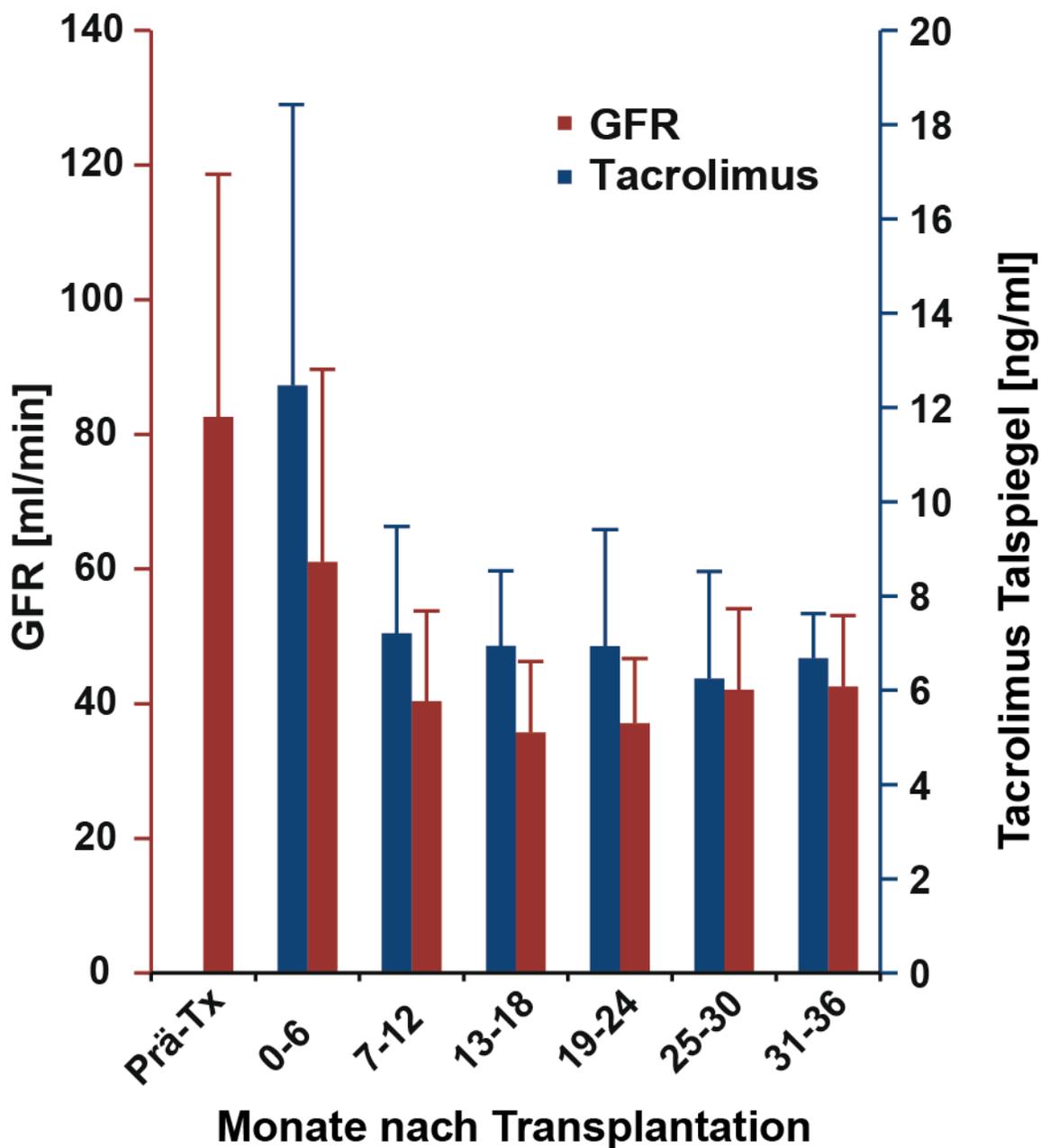


Abbildung 16: Nierenfunktion und Tacrolimus-Talspiegel nach Darmtransplantation.
 Die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) wurde zur Beurteilung der Nierenfunktion nach der MDRD-Formel berechnet. Nach Transplantation fällt die GFR deutlich auf Werte um 40 ml/min. Der über das erste Jahr stattfindende, besonders ausgeprägte Verlust an Nierenfunktion war begleitet von hohen Tacrolimus-Talspiegeln. Ab 1 Jahr post transplantationem stabilisierten sich sowohl die Tacrolimus-Talspiegel als auch die Nierenfunktion. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung des Mittelwerts an. Modifiziert nach Reiner et al., 2016.

3.6 Tacrolimus-Effekte im Zellkulturmodell

Nach Transplantation wurden die Tacrolimus-Wirkspiegel langsam abgesenkt. In auffälliger Weise war damit eine Erholung der Expressionslevel von NHE3 und DRA assoziiert. Um der Frage nachzugehen, inwieweit Tacrolimus intestinale Epithelzellen direkt beeinflusst, wurden in vitro-Experimente an einer kürzlich etablierten Zelllinie (Maletzki et al., 2012) durchgeführt, welche NHE3, DRA und CFTR in ähnlicher Weise wie Epithel des Ileums exprimiert (Beobachtung von C. Straarup, P. Bodammer). Andere verfügbare Zelllinien, die zur Charakterisierung des intestinalen Ionentransports bereits eingesetzt wurden, wie z.B. Caco-2 oder HEK-Zellen, zeigen keine ähnlichen endogenen Expressionslevel wie Epithel des Ileums (Lamprecht et al., 2009). Sie scheinen damit weniger geeignet für die genannte Fragestellung als die HROC113-Zellen.

Inkubation von HROC113-Zellen mit Tacrolimus in Konzentrationen, die den Wirkspiegeln im Blut der darmtransplantierten Patienten entsprechen, führte zu klar abgrenzbaren Effekten. In dosisabhängiger Weise reduzierte Tacrolimus die Expressionslevel von NHE3 auf bis zu 49,1 % (verglichen mit Inkubation in Tacrolimus-freiem Medium). Die Expression von DRA war auf bis zu 39,4 % vermindert. Die Expression von CFTR dagegen war (statistisch nicht signifikant) auf nur 84,5 % vermindert (Abbildung 17).

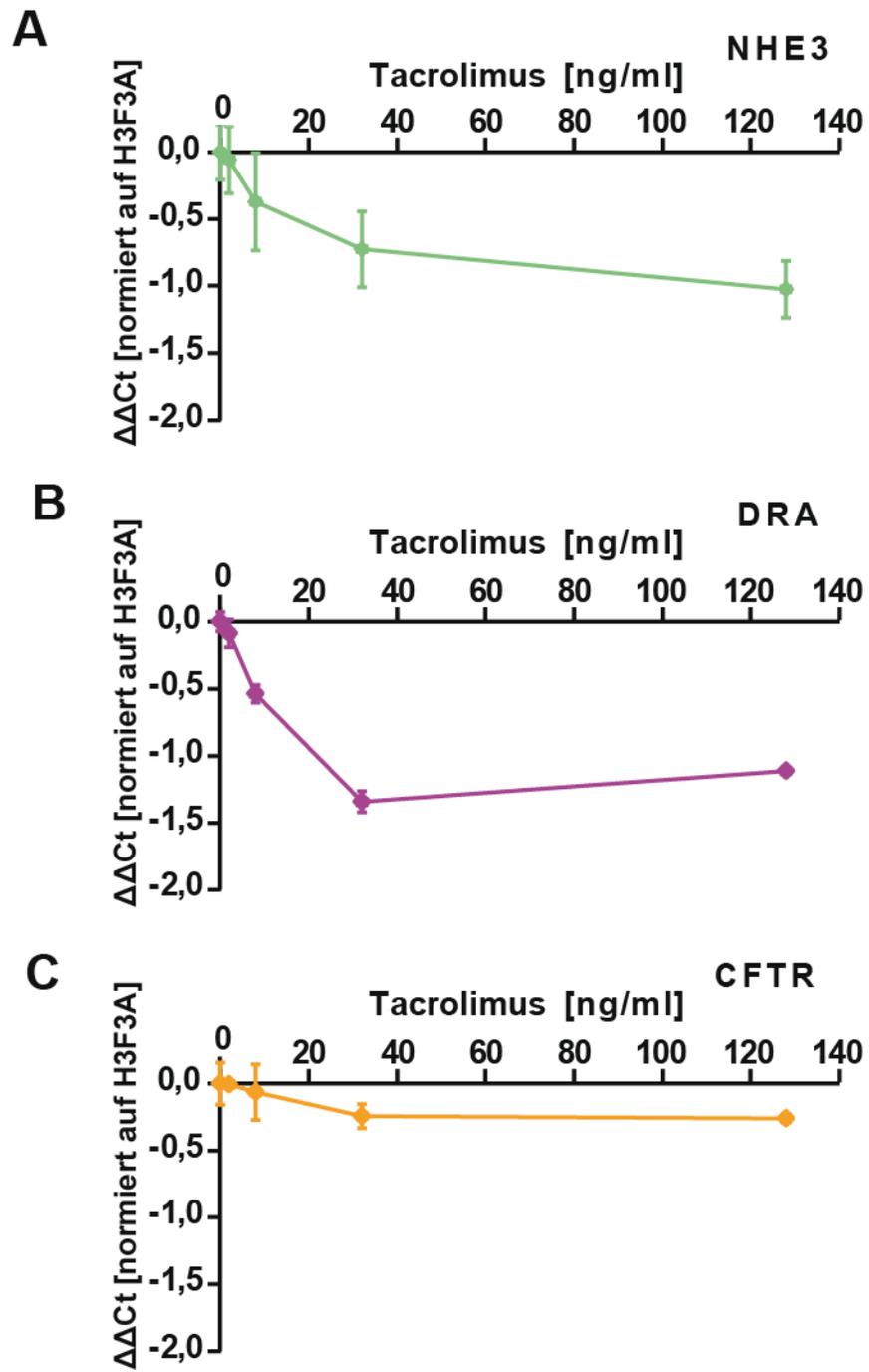


Abbildung 17: Tacrolimus-Wirkung auf HROC113-Zellen. Tacrolimus reduzierte die Expression von NHE3 und DRA. Die Expression von CFTR wurde kaum beeinflusst. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung des Mittelwerts an. N=3 pro Versuchsbedingung. Modifiziert nach Reiner et al., 2016.

4. DISKUSSION

4.1 Darmtransplantation in der Therapie des Darmversagens

Das chronische Darmversagen ist ein schwerwiegendes, oft hochkomplikatives Krankheitsbild. Meist wird nach ausgedehnter Dünndarmresektion zunächst ein Kurzdarmsyndrom manifest. Dabei werden typischerweise drei Phasen durchlaufen: Die erste, hypersekretorische Phase ist charakterisiert durch sehr hohen Dünndarm-Output, sehr schlechte Resorption aller Nährstoffe sowie Hypergastrinämie und Hyperbilirubinämie. Die bis zu 2 Jahre anhaltende, nach frühestens 48 h postoperativ beginnende Adaptationsphase ist durch zunehmende intestinale Resorption geprägt und abhängig vom luminalen Nährstoffangebot. Bei Erreichen der maximalen Adaptation ist die chronisch adaptierte, stabile Phase erreicht. Es kann eine orale Autonomie mit und ohne parenterale Supplementierung erreicht oder eine weitgehend vollständige parenterale Flüssigkeits- und Ernährungstherapie notwendig werden.

Chronisches Darmversagen tritt ein, wenn in der chronisch adaptierten, stabilen Phase die vollständige parenterale Flüssigkeits- und Ernährungstherapie notwendig wird. Verglichen mit der Prognose nach einer Darmtransplantation ist die Prognose von Patienten, die aufgrund von Darmversagen eine komplikationsarme parenterale Ernährung erhalten, gut (DeLegge et al., 2007; Goulet, 2012; Pironi et al., 2012; Pironi et al., 2011). Darum ist ein chronisches Darmversagen per se keine Indikation zur Darmtransplantation. Erst beim drohenden Scheitern der parenteralen Ernährung (v.a. durch IFALD, Verlust zentralvenöser Zugänge oder wiederholte Septikämien) und wenn rehabilitative Maßnahmen ausgeschöpft sind, kann eine Darmtransplantation vorteilhaft werden (Lamprecht et al., 2014).

4.2 Entwicklung der Darmtransplantation in den zurückliegenden 20 Jahren

Obwohl das Transplantatüberleben nach 10 Jahren immer noch bei nur etwa 30 % liegt (K. M. Abu-Elmagd, Costa, Bond, Soltys, et al., 2009) haben sich seit der ersten erfolgreichen Darmtransplantation 1987 (Deltz et al., 1989) die Kurz- und Langzeitüberlebensraten sukzessiv verlängert (Mazariegos et al., 2010). Vielfältige Verbesserungen und Erweiterungen der chirurgischen Verfahren erlauben heute einen auf die individuelle Situation angepassten Transplantationsmodus (Hashimoto et al., 2015). Viele chirurgische Therapiestrategien bleiben dennoch kontrovers. Eine Strategie der frühen Transplantation zur Vermeidung eines ausgedehnten Leberschadens hat in den USA zur selteneren Mittransplantation von Lebersegmenten geführt. Neuere Daten hingegen deuten darauf hin, dass die Mittransplantation eines Lebersegmentes protektiv wirkt (Grant et al., 2015). Klarer sind die Daten zur Miteinbeziehung von Kolonanteilen. Bei Mittransplantation von Kolon ascendens-Segmenten wird bei gleichen Überlebensraten weniger parenterale Ernährung benötigt (Grant et al., 2015; D. Sudan, 2006). In welchem Ausmaß das mittransplantierte Kolonsegment spezifisch die Absorption von Wasser und Elektrolyten verbessert ist noch unerforscht.

Einen weiteren wichtigen Beitrag zur Verbesserung des Transplantatüberlebens leisten Optimierungen der medikamentösen Immunsuppression. Während Tacrolimus und niedrig dosierte Glucocorticoide das Rückgrat der langfristigen Immunsuppression darstellen, haben neu entwickelte Antikörper wie Alemtuzumab oder Basiliximab als Induktionstherapeutika die Transplantatüberlebensrate verbessert (K. M. Abu-Elmagd, Costa, et al., 2012; D. L. Sudan et al., 2002). mTOR-Inhibitoren additiv, oder um die Tacrolimus-Toxizität nach Darmtransplantation zu reduzieren, tragen ebenfalls zu verbessertem Transplantatüberleben bei (Fishbein et al., 2002). Die größte Herausforderung nach der Darmtransplantation bleibt, die Balance aus genügend starker Immunsuppression und möglichst geringer unerwünschter Arzneimittelwirkung zu

finden. Häufige limitierende Nebenwirkungen der immunsuppressiven Therapie sind opportunistische Infektionen, Diabetes mellitus, arterielle Hypertonie oder Verschlechterung der Nierenfunktion und zwingen oft zu einer „partiellen Toleranz“ (K. M. Abu-Elmagd, Costa, Bond, Wu, et al., 2009).

Obwohl die meisten Patienten bald nach der Darmtransplantation eine orale Autonomie erzielen (K. M. Abu-Elmagd, Kosmach-Park, et al., 2012; Grant et al., 2005; O'Keefe et al., 2007) und dadurch nierenschädigende Phasen der Dehydratation seltener sein sollten, als bei komplett parenteraler Ernährung (Buchman et al., 1993), bleibt der chronische Nierenfunktionsverlust eine häufige Komplikation nach der Darmtransplantation (Lauro et al., 2014). Der jährliche Nierenfunktionsverlust ist nach der Darmtransplantation sogar größer als bei langfristiger parenteraler Ernährung im Darmversagen (Pironi et al., 2014). Die Ursachen für die häufig auftretenden Nierenfunktionseinschränkungen nach der Transplantation sind vielfältig. Die lang anhaltende Volumendepletion vor der Transplantation trotz parenteraler Supplementierung spielt wahrscheinlich ebenso eine Rolle wie fortbestehende Volumendepletion nach der Transplantation durch hohe Stoma-Verluste (Boncompain-Gerard et al., 2000; Lauverjat et al., 2006; Suzuki et al., 2012). Die Rolle des intestinalen Epithels im transplantierten Darm ist in diesem Zusammenhang noch nicht untersucht, obwohl das Dünndarmepithel durch transepithelialen NaCl-Transport die Wasseraufnahme regelt (Kato & Romero, 2011). Ein anderer großer Anteil am Nierenfunktionsverlust ist der nephrotoxischen Immunsuppression zuzuschreiben (Buchman et al., 2003). In der hier vorliegenden Arbeit wurde der Zusammenhang zwischen Immunsuppression, intestinalem NaCl-Transport und Nierenfunktion nach der Darmtransplantation untersucht.

4.3 Eine relativ wenig intensive Immunsuppression kann nach Darmtransplantation erreicht werden

Die Immunsuppression spielt im Management nach der Darmtransplantation eine herausragende Rolle. Es gilt einerseits das Empfänger-Immunsystem soweit zu

unterdrücken, dass keine Abstoßung des Transplantats erfolgt. Andererseits muss das Immunsystem noch in der Lage sein, die Abwehr von Pathogenen zu gewährleisten. Verglichen mit anderen Organtransplantationen wie Herz, Lunge oder Leber scheint der Darm eine Sonderstellung einzunehmen, da hier im Transplantat zusätzlich noch die Balance zwischen dem residenten und transienten Mikrobiom und der Darmwand aufrechterhalten werden muss (Alegre et al., 2014; Oh et al., 2012).

Von sehr hohen Wirkspiegeln der stark nephrotoxischen Calcineurin-Inhibitoren ist man heute jedoch abgekommen und die Zielspiegel liegen im ähnlichen Bereich wie nach Herz- oder Lebertransplantation (Wallemacq et al., 2009). Vergleichbare Spiegel wurden auch im hier vorliegenden Beobachtungszeitraum angestrebt. Zusätzliche Immunsuppressiva wie Mycophenolsäurederivate oder mTOR-Inhibitoren wurden nur gelegentlich zur Therapie von Abstoßungsepisoden oder um die Nephrotoxizität zu senken gegeben. Da sich die Nierenfunktion oft nicht wesentlich verbesserte, oder aufgrund von Komplikationen, wurden diese jedoch nicht lange eingesetzt.

Diese Beobachtungen lassen darauf schließen, dass eine relativ schwache Immunsuppression in Form niedriger Tacrolimusspiegel mit niedriger Prednisolon-Tagesdosis zum Einsatz in der Immunsuppression nach Darmtransplantation geeignet ist.

Dies ist auch in Bezug auf die Nierenfunktion günstig, da Tacrolimus nicht nur durch direkte nephrotoxische Effekte, sondern auch durch indirekte Toxizität auf das intestinale Epithel für die höhere Inzidenz der chronischen Niereninsuffizienz nach der Darmtransplantation verantwortlich zu sein scheint.

4.4 Im transplantierten Darm herrscht eine Dysregulation zwischen absorbierenden und sezernierenden Ionentransportern

Das intestinale Epithel ist eine hochkomplexe Struktur, deren molekulare Zusammensetzung und Regulation nur unvollständig verstanden ist. Als Grenzschicht spielt es eine wichtige Rolle in der Balance zwischen den luminalen

Nahrungsbestandteilen und Mikroorganismen einerseits und der Mucosa andererseits. Das Darmepithel unterliegt kontinuierlichen Flüssigkeitsbewegungen in Form von Resorption und Sekretion, die durch das Epithel selbst moduliert werden können. Angenommen werden Regulationsmöglichkeiten über den aktiven Transport durch die Zellen (transzellulär) einerseits und die parazelluläre Barriere andererseits (Clayburgh et al., 2006).

Da im Ileum von einer NaCl-resorptiven Funktion von NHE3 und DRA ausgegangen wird, wurde hier die Expression im transplantierten Dünndarm untersucht. Verglichen mit gesunden Kontrollpatienten zeigt sich eine insgesamt reduzierte Genexpression im transplantierten Dünndarm für beide Transportproteine.

Der Grund für diese Reduktion ist unklar und scheint komplexen, multifaktoriellen Mechanismen zu unterliegen. So konnte zum Beispiel im Ileum von Hasen eine Aktivitätszunahme von NHE3 nach Glucocorticoid-Gabe beobachtet werden (Wormmeester et al., 1998). In einer anderen kürzlich veröffentlichte Studie wurde eine erniedrigte Expression von CFTR, jedoch keine Veränderung von DRA nach Darmtransplantation in Mäusen festgestellt (Song et al., 2013). Die Mäuse in dieser Studie erhielten jedoch keinerlei Immunsuppression und es bleibt fraglich, inwieweit das dort etablierte Transplantationsmodell auf die klinische Darmtransplantation im Menschen übertragen werden kann.

Interessanterweise war in dem hier vorliegenden Transplantationskollektiv die NHE3-Expression besonders zu Beginn erniedrigt, als die Prednisondosis hoch war. Dies schließt einen Einfluss der Glucocorticoide auf die NHE3-Aktivität nicht aus; es scheinen jedoch andere Einflüsse stärker auf die NHE3-Expression im transplantierten menschlichen Ileum zu wirken. So hat zum Beispiel eine kürzlich erschienene Arbeit den Effekt von mTOR-Inhibition auf epitheliale Ionentransporter im Detail analysiert (Yang et al., 2015).

Diese Studie legt den Schluss nahe, dass durch mTOR-Inhibition induzierte Autophagie die intestinale NHE3-Expression reduziert wird.

Im hier beobachteten Transplantationskollektiv wurde vor allem eine Tacrolimus-basierte Immunsuppression gegeben. Die zunächst stark schwankenden, hohen Tacrolimusspiegel wurden mit der Zeit reduziert. Dieser Zeitverlauf war in auffälliger Weise begleitet von einer sich erholenden NHE3- und DRA-Expression. Um diese zeitliche Assoziation auf Kausalität zu überprüfen, wurde die Wirkung von Tacrolimus auf die Expressionslevel der einzelnen Ionentransporter im Zellkulturmodell untersucht. Da in verfügbaren Zelllinien die Expressionslevel von NHE3 und DRA nicht vergleichbar mit den Leveln in Biopsien aus dem terminalen Ileum sind, wurde die erst kürzlich charakterisierte Zelllinie HROC113 verwendet (Maletzki et al., 2012). In diesen Zellen ähnelt das Expressionsniveau der drei untersuchten Transporter dem Expressionsniveau in Ileumbiopsien.

Tacrolimus führte in diesen Zellen zu einer dosisabhängigen Reduzierung der Expressionslevel von NHE3 und DRA. Die CFTR-Expression war hingegen kaum beeinflusst. Diese Veränderungen spielten sich dosisabhängig in einem Konzentrationsbereich ab, der den Tacrolimus-Spiegeln im Blut und wahrscheinlich auch den Tacrolimus-Spiegeln in der Darmwand entspricht. Obwohl unklar bleibt, in welchem Ausmaß die hier eingesetzten Tacrolimus-Konzentrationen den tatsächlichen Gewebespiegeln ähneln, deuten diese *in vitro* Daten gemeinsam mit den *in vivo* Daten der zeitlichen Korrelation der Tacrolimusspiegel und der Transporterexpression darauf hin, dass Tacrolimus in therapeutischer Dosierung die Kapazität zur intestinalen NaCl-Aufnahme einschränkt.

Über die funktionellen Konsequenzen dieser Dysregulation lässt sich nur spekulieren. Das terminale Ileum hat eine primär resorptive Funktion. Deshalb erscheint plausibel, dass die Inhibition von NHE3 und DRA eine stärkere Funktionseinschränkung im Hinblick auf die NaCl-Absorption zur Folge hat als die nur schwach ausgeprägte Inhibition des primär sezernierenden CFTR auf die ohnehin schwach ausgeprägte sekretorische Komponente im Ileum. Ob die beobachtete schwächere Korrelation von CFTR mit DRA und NHE3 tatsächlich hinweisgebend für eine Entkopplung von DRA und NHE3 einerseits und CFTR andererseits ist, bleibt offen.

Interessanterweise konnte bei der Analyse der einzelnen Patienten unter bestimmten Bedingungen eine distinkte Veränderung von einzelnen Transportern festgestellt werden. So war während einer Campylobacter-Enteritis die Expression von NHE3 und CFTR extrem stark erniedrigt bis zum zeitweise kompletten Verlust der Expression. Bemerkenswerterweise war die DRA-Expression in deutlich schwächerem Ausmaß unterdrückt. Ebenso konnte während einzelner Abstoßungsepisoden eine deutliche Reduktion der Ionentransporterexpression festgestellt werden. Andererseits war etwa bei Patient 2 in späten, chronischen Episoden der Transplantatdysfunktion keine deutliche Reduktion der Expression mehr zu bestimmen. Diese Episoden spielten sich also nicht auf epithelialer Ebene ab, was zum makroskopischen Befund des schließlich entnommenen Transplantates passt, welches vor allem den Aspekt einer starken Schrumpfung zeigte.

Zusammengenommen lässt sich schließen, dass die Expression bei bestimmten Zuständen (z.B. Campylobacter-Enteritis, akute Abstoßung) im transplantierten Ileum besonders stark erniedrigt war. Um die relative Expression von Ionentransportproteinen als klinisch aussagekräftigen Marker für Abstoßungs- oder Infektionsereignisse heranzuziehen wären jedoch weitere bestätigende Untersuchungen notwendig.

4.5 Tacrolimus beeinflusst den Transporterbesatz im Darm und trägt damit zu verschlechterter Nierenfunktion bei

Das intestinale Epithel trägt durch seine resorptive und sekretorische Kapazität zum Wasser-Elektrolythaushalt bei. In welchem Ausmaß die transzelluläre elektroneutrale Natriumchloridresorption zum Wasser-Elektrolythaushalt beiträgt, ist unklar. Wie der spezifische Transporterbesatz im Darm den Wasser-Elektrolythaushalt beeinflussen kann ist ebenfalls unbekannt. Daten einer kürzlich erschienenen Studie legen nahe, dass durch die Hemmung von NHE3 mittels eines spezifischen Inhibitors die Natriumaufnahme empfindlich beeinflusst werden kann (Spencer et al., 2014). Da die Niereninsuffizienz nach Darmtransplantation

eine besonders häufige und den Behandlungserfolg gefährdende Komplikation (Herlenius et al., 2008; Watson et al., 2008) darstellt und der Transporterbesatz im transplantierten Dünndarm offensichtlich verändert ist, stellt sich die Frage, ob eine verminderte NaCl-Resorption zur erhöhten Inzidenz der chronischen Niereninsuffizienz nach Darmtransplantation beiträgt. Hierzu wurde zunächst die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) als Indikator für die Nierenfunktion im Beobachtungszeitraum bestimmt. Ähnlich wie von anderen Arbeitsgruppen berichtet (Herlenius et al., 2008; Watson et al., 2008), war die mittlere GFR unmittelbar vor Darmtransplantation leicht erniedrigt. So hatten Herlenius et al. die Gesamttransplantationskohorte in eine Darmversagen-Kohorte und in eine Kohorte mit neuroendokrinen Tumoren des Pankreas aufgeteilt. In der Darmversagen-Kohorte (vergleichbar mit dem hier vorliegenden Kollektiv) wurde eine etwas niedrigere GFR als die hier bestimmte ermittelt. Watson et al. hingegen hatten etwas höhere GFR-Werte unmittelbar vor Transplantation festgestellt.

Absolute GFR-Werte sind unter den Studien aufgrund der unterschiedlichen Bestimmungsmethoden der GFR jedoch nicht gut vergleichbar.

Ähnlich wie in den beiden Studien von Herlenius und Watson fiel die GFR innerhalb des ersten Jahres um 52 % auf niedrige Level ab. Dies zeigte eine sich entwickelnde Einschränkung der Nierenfunktion nach der Darmtransplantation an. Für die Nierenschädigung wird eine multifaktorielle Genese angenommen, wobei die weiteren belastenden Faktoren neben hohen Tacrolimus-Spiegeln noch ungeklärt sind (Herlenius et al., 2008).

Interessanterweise korrelierte im Tübinger Transplantationskollektiv der rapide Abfall zeitlich mit dem stark schwankenden, erniedrigten Transporterbesatz im transplantierten Ileum.

Auffälligerweise stabilisierte sich die Nierenfunktion nach dem initialen Abfall in einem Bereich von ~40ml/min. Diese Stabilisierung der Nierenfunktion war begleitet von niedrigeren Tacrolimusspiegeln und einer verbesserten intestinalen NHE3 und DRA-Expression. Gemeinsam mit den Zellkulturexperimenten sprechen diese Daten für einen indirekten nephrotoxischen Effekt von Tacrolimus. Dieser

scheint vermittelt durch eine Beeinträchtigung der prärenalen Komponente zusätzlich zur unmittelbar auf das Nierenparenchym wirkenden Toxizität.

Im hier untersuchten Kollektiv waren relativ niedrige Tacrolimusspiegel (vergleichbar mit anderen Organtransplantationen (Wallemacq et al., 2009)) nach Darmtransplantation anwendbar. Auch andere Arbeitsgruppen empfehlen niedrige Tacrolimusspiegel (Reyes et al., 2005). Zusammen genommen ergeben sich damit folgende wichtige Erkenntnisse für die Nierenfunktion nach Darmtransplantation: 1) Die zeitliche Korrelation von dys- und herabregulierten Natriumchlorid-aufnehmenden Transportern mit dem rapiden Abfall der Nierenfunktion legt nahe, dass eine Störung der NHE3/DRA-vermittelten Natriumchloridresorption zur Schädigung der Niere nach Darmtransplantation beiträgt. 2) Dies wird untermauert von der Beobachtung, dass eine Erholung der Transporterexpression mit einer Stabilisierung der Nierenfunktion einhergeht. 3) Tacrolimus scheint die Expression von NHE3 und DRA zu reduzieren und somit den Wasser-Elektrolythaushalt zu beeinträchtigen. Anwendung niedriger Tacrolimuswirkspiegel nach Darmtransplantation scheinen somit für die Nierenfunktion nicht nur wegen der geringeren direkten Nephrotoxizität, sondern auch durch indirekte Effekte günstig.

4.6 Möglichkeiten und Limitierungen dieser Studie

Quantitative Real-time-Polymerase Kettenreaktion (qRT-PCR) ist eine etablierte Methode, um Veränderungen der Transkription von einzelnen (evtl. auch mehreren) Genen zu bestimmen (Bustin et al., 2009; Bustin et al., 2005). Wichtig ist dabei die Auswahl der Kontrollparameter. Vor allem das Referenzgen und das Kontrollgewebe sind von größter Bedeutung. Deshalb wurde hier das bereits mehrfach im GI-Trakt als Referenz zur Bestimmung von epithelialen Ionentransportern verwendete Histon 3.3A als Vergleichs-gen bestimmt. Das Kontrollgewebe waren gleichermaßen gewonnene Ileum-Biopsien von gesunden Patienten, die zur Darmkrebsvorsorgekoloskopie endoskopiert worden waren. Trotz sorgfältiger Kontrolle dieser Parameter ist die Aussagekraft der qRT-PCR kritisch zu betrachten: Änderungen im mRNA-Gehalt der untersuchten Gene beziehen sich auf das Gesamtgewebe. Da die untersuchten Transportproteine hauptsächlich in der Bürstensaummembran der Enterozyten lokalisiert werden können, sind Änderungen der relativen Menge der mRNA wahrscheinlich auch auf Änderungen in den Enterozyten zurückzuführen. Mittels qRT-PCR bleibt die Frage ungeklärt, wie sich das Transportprotein auf Translationsebene verhält und ob sich durch Änderungen auf Ebene der Transkription auch Änderungen in der Menge des tatsächlich vorhandenen Transportproteins in der Zelle einerseits und des funktionell aktiven Anteils in der Bürstensaummembran andererseits ergeben. Um die tatsächliche Aktivität zu beurteilen, wären weitere Studien von Gewebe in Funktionsuntersuchungen wie Ussing-Kammer-Studien oder Widerstandsmessungen nötig.

Bezüglich der Zellkulturstudien sind die tatsächlichen Gewebekonzentrationen von Tacrolimus im Dünndarm bisher nicht untersucht und es ist unklar, ob die hier verwendeten Konzentrationen, die den Konzentrationen im Blut entsprechen, auch wirklich in Darmgewebe wirken.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Die Darmtransplantation ist eine Therapieoption in der Behandlung des Kurzdarmsyndroms/Darmversagens. Die Langzeitprognose nach Transplantation ist immer noch vergleichsweise schlecht. Eine häufige Komplikation stellt die chronische Niereninsuffizienz dar, die im Vergleich mit anderen Organtransplantationen bei der Darmtransplantation besonders häufig auftritt. Eine Ursache dafür sind hohe Serum-Spiegel an nephrotoxischen Calcineurin-Inhibitoren. Unklar ist immer noch, welche anderen Faktoren beitragen. Im Darm werden Wasser und Elektrolyte aufgenommen, aber es ist noch nicht untersucht, ob die Wasser- und NaCl-Aufnahmefähigkeit im Dünndarm nach Transplantation verändert ist. Um dies zu beurteilen, wurde hier die RNA-Expression der wichtigsten Transporter, welche die elektroneutrale Natriumchloridresorption vermitteln, untersucht. Die RNA-Expression von NHE3, DRA und CFTR im transplantierten Ileum war im hier vorliegenden Patientenkollektiv vermindert. Vor allem unmittelbar nach Transplantation schwankten die Expressionslevel stark und auf niedrigem Niveau. Mit der Zeit schien sich die Expression zu erholen und auf 56,8 % bis 67,3 % erniedrigte Werte im Vergleich zu gesunden Kontrollen zu stabilisieren. Dieser zeitliche Verlauf korrelierte mit dem Verlauf der Nierenfunktion: Direkt nach Transplantation fiel die glomeruläre Filtrationsrate stark ab und stabilisierte sich dann auf niedrige Werte. Ebenfalls parallel dazu wurden die Tacrolimus-Talspiegel nach klinischen Kriterien auf niedrigere Werte reduziert. Diese zeitlich parallel verlaufenden Veränderungen in der Nierenfunktion sind wahrscheinlich zum großen Teil der Tacrolimus-vermittelten Nephrotoxizität zuzuschreiben. Außerdem erscheint eine Beeinflussung der Nierenfunktion durch eine verminderte Wasser- und Elektrolytresorption des transplantierten Dünndarms im Sinne einer zusätzlichen prärenalen Komponente wahrscheinlich. Ungeklärt bleibt das Ausmaß funktioneller Transportveränderungen in der Mukosa des transplantierten Darmes und deren quantitativer Anteil an der eingeschränkten Nierenfunktion durch gestörten Wasser-Elektrolythaushalt.

6. LITERATURVERZEICHNIS

- Abu-Elmagd, K. (2015). The concept of gut rehabilitation and the future of visceral transplantation. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 12 (2), 108-120.
- Abu-Elmagd, K. M., Costa, G., Bond, G. J., Soltys, K., et al. (2012). A decade of experience with a single dose of rabbit antithymocyte globulin or alemtuzumab pretreatment for intestinal and multivisceral transplantation. *Clin Transpl*, 155-166.
- Abu-Elmagd, K. M., Costa, G., Bond, G. J., Soltys, K., et al. (2009). Five hundred intestinal and multivisceral transplantations at a single center: major advances with new challenges. *Ann Surg*, 250 (4), 567-581.
- Abu-Elmagd, K. M., Costa, G., Bond, G. J., Wu, T., et al. (2009). Evolution of the immunosuppressive strategies for the intestinal and multivisceral recipients with special reference to allograft immunity and achievement of partial tolerance. *Transpl Int*, 22 (1), 96-109.
- Abu-Elmagd, K. M., Kosmach-Park, B., Costa, G., Zenati, M., et al. (2012). Long-term survival, nutritional autonomy, and quality of life after intestinal and multivisceral transplantation. *Ann Surg*, 256 (3), 494-508.
- Alegre, M. L., Mannon, R. B., & Mannon, P. J. (2014). The microbiota, the immune system and the allograft. *Am J Transplant*, 14 (6), 1236-1248.
- Alper, S. L., Rossmann, H., Wilhelm, S., Stuart-Tilley, A. K., et al. (1999). Expression of AE2 anion exchanger in mouse intestine. *Am J Physiol*, 277 (2 Pt 1), G321-332.
- Barrett, K. E., & Keely, S. J. (2000). Chloride secretion by the intestinal epithelium: molecular basis and regulatory aspects. *Annu Rev Physiol*, 62, 535-572.
- Bell, G. H., & Parsons, D. S. (1976). Edward Waymouth Reid: a pioneer investigator of epithelial transport [proceedings]. *J Physiol*, 263 (1), 75P-78P.
- Boncompain-Gerard, M., Robert, D., Fouque, D., & Hadj-Aissa, A. (2000). Renal function and urinary excretion of electrolytes in patients receiving cyclic parenteral nutrition. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*, 24 (4), 234-239.
- Buchman, A. L., Moukarzel, A., Ament, M. E., Gornbein, J., et al. (1993). Serious renal impairment is associated with long-term parenteral nutrition. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*, 17 (5), 438-444.
- Buchman, A. L., Scolapio, J., & Fryer, J. (2003). AGA technical review on short bowel syndrome and intestinal transplantation. *Gastroenterology*, 124 (4), 1111-1134.
- Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellems, J., et al. (2009). The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem*, 55 (4), 611-622.
- Bustin, S. A., Benes, V., Nolan, T., & Pfaffl, M. W. (2005). Quantitative real-time RT-PCR--a perspective. *J Mol Endocrinol*, 34 (3), 597-601.

- Ceulemans, L. J., Monbaliu, D., De Roover, A., Detry, O., et al. (2015). Belgian multicenter experience with intestinal transplantation. *Transpl Int*, 28 (12), 1362-1370.
- Clayburgh, D. R., Musch, M. W., Leitges, M., Fu, Y. X., et al. (2006). Coordinated epithelial NHE3 inhibition and barrier dysfunction are required for TNF-mediated diarrhea in vivo. *J Clin Invest*, 116 (10), 2682-2694.
- DeLegge, M., Alsolaiman, M. M., Barbour, E., Bassas, S., et al. (2007). Short bowel syndrome: parenteral nutrition versus intestinal transplantation. Where are we today? *Dig Dis Sci*, 52 (4), 876-892.
- Deltz, E., Schroeder, P., Gebhardt, H., Gundlach, M., et al. (1989). [First successful clinical small intestine transplantation. Tactics and surgical technic]. *Chirurg*, 60 (4), 235-239.
- Favia, M., Fanelli, T., Bagorda, A., Di Sole, F., et al. (2006). NHE3 inhibits PKA-dependent functional expression of CFTR by NHERF2 PDZ interactions. *Biochem Biophys Res Commun*, 347 (2), 452-459.
- Fishbein, T. M. (2009). Intestinal transplantation. *N Engl J Med*, 361 (10), 998-1008.
- Fishbein, T. M., Florman, S., Gondolesi, G., Schiano, T., et al. (2002). Intestinal transplantation before and after the introduction of sirolimus. *Transplantation*, 73 (10), 1538-1542.
- Foster, E. S., Zimmerman, T. W., Hayslett, J. P., & Binder, H. J. (1983). Corticosteroid alteration of active electrolyte transport in rat distal colon. *Am J Physiol*, 245 (5 Pt 1), G668-675.
- Freel, R. W., Hatch, M., Green, M., & Soleimani, M. (2006). Ileal oxalate absorption and urinary oxalate excretion are enhanced in Slc26a6 null mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 290 (4), G719-728.
- Frizzell, R. A., & Hanrahan, J. W. (2012). Physiology of epithelial chloride and fluid secretion. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2 (6), a009563.
- Gawenis, L. R., Hut, H., Bot, A. G., Shull, G. E., et al. (2004). Electroneutral sodium absorption and electrogenic anion secretion across murine small intestine are regulated in parallel. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 287 (6), G1140-1149.
- Gawenis, L. R., Stien, X., Shull, G. E., Schultheis, P. J., et al. (2002). Intestinal NaCl transport in NHE2 and NHE3 knockout mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 282 (5), G776-784.
- Gonwa, T. A., Mai, M. L., Melton, L. B., Hays, S. R., et al. (2001). End-stage renal disease (ESRD) after orthotopic liver transplantation (OLT) using calcineurin-based immunotherapy: risk of development and treatment. *Transplantation*, 72 (12), 1934-1939.
- Goulet, O. (2012). [Intestinal transplantation: indications and strategy]. *Bull Acad Natl Med*, 196 (2), 375-380; discussion 380-371.
- Grant, D., Abu-Elmagd, K., Mazariegos, G., Vianna, R., et al. (2015). Intestinal transplant registry report: global activity and trends. *Am J Transplant*, 15 (1), 210-219.

- Grant, D., Abu-Elmagd, K., Reyes, J., Tzakis, A., et al. (2005). 2003 report of the intestine transplant registry: a new era has dawned. *Ann Surg*, 241 (4), 607-613.
- Group, T. U. S. M. F. L. S. (1994). A comparison of tacrolimus (FK 506) and cyclosporine for immunosuppression in liver transplantation. The U.S. Multicenter FK506 Liver Study Group. *N Engl J Med*, 331 (17), 1110-1115.
- Hanto, D. W., Fishbein, T. M., Pinson, C. W., Olthoff, K. M., et al. (2005). Liver and intestine transplantation: summary analysis, 1994-2003. *Am J Transplant*, 5 (4 Pt 2), 916-933.
- Hashimoto, K., Costa, G., Khanna, A., Fujiki, M., et al. (2015). Recent Advances in Intestinal and Multivisceral Transplantation. *Adv Surg*, 49, 31-63.
- Herlenius, G., Fagerlind, M., Krantz, M., Molne, J., et al. (2008). Chronic kidney disease--a common and serious complication after intestinal transplantation. *Transplantation*, 86 (1), 108-113.
- Hoogerwerf, W. A., Tsao, S. C., Devuyst, O., Levine, S. A., et al. (1996). NHE2 and NHE3 are human and rabbit intestinal brush-border proteins. *Am J Physiol*, 270 (1 Pt 1), G29-41.
- Horslen, S. P. (2006). Optimal management of the post-intestinal transplant patient. *Gastroenterology*, 130 (2 Suppl 1), S163-169.
- Hruz, T., Wyss, M., Docquier, M., Pfaffl, M. W., et al. (2011). RefGenes: identification of reliable and condition specific reference genes for RT-qPCR data normalization. *BMC Genomics*, 12, 156.
- Iwaki, Y., Starzl, T. E., Yagihashi, A., Taniwaki, S., et al. (1991). Replacement of donor lymphoid tissue in small-bowel transplants. *Lancet*, 337 (8745), 818-819.
- Jacob, P., Rossmann, H., Lamprecht, G., Kretz, A., et al. (2002). Down-regulated in adenoma mediates apical Cl-/HCO₃- exchange in rabbit, rat, and human duodenum. *Gastroenterology*, 122 (3), 709-724.
- Kaldas, F., Farmer, D., Gordon, S. A., McDiarmid, S. V., et al. (2007). Renal event outcomes in intestinal transplantation: results from a single-center experience. *Transplant Proc*, 39 (10), 3387-3388.
- Kato, A., & Romero, M. F. (2011). Regulation of electroneutral NaCl absorption by the small intestine. *Annu Rev Physiol*, 73, 261-281.
- Ko, S. B., Shcheynikov, N., Choi, J. Y., Luo, X., et al. (2002). A molecular mechanism for aberrant CFTR-dependent HCO₃⁻ transport in cystic fibrosis. *EMBO J*, 21 (21), 5662-5672.
- Kujala, M., Tienari, J., Lohi, H., Elomaa, O., et al. (2005). SLC26A6 and SLC26A7 anion exchangers have a distinct distribution in human kidney. *Nephron Exp Nephrol*, 101 (2), e50-58.
- Kunzelmann, K., & Mall, M. (2002). Electrolyte transport in the mammalian colon: mechanisms and implications for disease. *Physiol Rev*, 82 (1), 245-289.
- Lamprecht, G., Hsieh, C. J., Lissner, S., Nold, L., et al. (2009). Intestinal anion exchanger down-regulated in adenoma (DRA) is inhibited by intracellular calcium. *J Biol Chem*, 284 (29), 19744-19753.

- Lamprecht, G., Pape, U. F., Witte, M., & Pascher, A. (2014). S3-Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Ernährungsmedizin e.V. in Zusammenarbeit mit der AKE, der GESKES und der DGVS. [S3-Guideline of the German Society for Nutritional Medicine (DGEM) in Cooperation with the GESKES, the AKE and the DGVS]. *Aktuel Ernährungsmed*, 39 (02), e57-e71.
- Lauro, A., Zanfi, C., Dazzi, A., Cucchetti, A., et al. (2014). Effect of age on native kidney function after adult intestinal transplants on long-term follow-up. *Transplant Proc*, 46 (7), 2322-2324.
- Lauverjat, M., Hadj Aissa, A., Vanhems, P., Bouletreau, P., et al. (2006). Chronic dehydration may impair renal function in patients with chronic intestinal failure on long-term parenteral nutrition. *Clin Nutr*, 25 (1), 75-81.
- Lillehei, R. C., Idezuki, Y., Feemster, J. A., Dietzman, R. H., et al. (1967). Transplantation of stomach, intestine, and pancreas: experimental and clinical observations. *Surgery*, 62 (4), 721-741.
- Mahnensmith, R. L., & Aronson, P. S. (1985). The plasma membrane sodium-hydrogen exchanger and its role in physiological and pathophysiological processes. *Circ Res*, 56 (6), 773-788.
- Malakooti, J., Saksena, S., Gill, R. K., & Dudeja, P. K. (2011). Transcriptional regulation of the intestinal luminal Na(+) and Cl(-) transporters. *Biochem J*, 435 (2), 313-325.
- Maletzki, C., Stier, S., Gruenert, U., Gock, M., et al. (2012). Establishment, characterization and chemosensitivity of three mismatch repair deficient cell lines from sporadic and inherited colorectal carcinomas. *PLoS One*, 7 (12), e52485.
- Matsumoto, C. S., Kaufman, S. S., & Fishbein, T. M. (2011). Inclusion of the colon in intestinal transplantation. *Curr Opin Organ Transplant*, 16 (3), 312-315.
- Mazariegos, G. V., Steffick, D. E., Horslen, S., Farmer, D., et al. (2010). Intestine transplantation in the United States, 1999-2008. *Am J Transplant*, 10 (4 Pt 2), 1020-1034.
- Moseley, R. H., Hogle, P., Wu, G. D., Silberg, D. G., et al. (1999). Downregulated in adenoma gene encodes a chloride transporter defective in congenital chloride diarrhea. *Am J Physiol*, 276 (1 Pt 1), G185-192.
- Mount, D. B., & Romero, M. F. (2004). The SLC26 gene family of multifunctional anion exchangers. *Pflugers Arch*, 447 (5), 710-721.
- Nakamura, N., Suzuki, Y., Sakuta, H., Ookata, K., et al. (1999). Inwardly rectifying K⁺ channel Kir7.1 is highly expressed in thyroid follicular cells, intestinal epithelial cells and choroid plexus epithelial cells: implication for a functional coupling with Na⁺,K⁺-ATPase. *Biochem J*, 342 (Pt 2), 329-336.
- Nijhof, A. M., Balk, J. A., Postigo, M., & Jongejan, F. (2009). Selection of reference genes for quantitative RT-PCR studies in *Rhipicephalus* (Boophilus) microplus and *Rhipicephalus appendiculatus* ticks and determination of the expression profile of Bm86. *BMC Mol Biol*, 10, 112.
- O'Keefe, S. J. (2006). Candidacy for intestinal transplantation. *Am J Gastroenterol*, 101 (7), 1644-1646.

- O'Keefe, S. J., Emerling, M., Koritsky, D., Martin, D., et al. (2007). Nutrition and quality of life following small intestinal transplantation. *Am J Gastroenterol*, 102 (5), 1093-1100.
- Oh, P. L., Martinez, I., Sun, Y., Walter, J., et al. (2012). Characterization of the ileal microbiota in rejecting and nonrejecting recipients of small bowel transplants. *Am J Transplant*, 12 (3), 753-762.
- Ojo, A. O., Held, P. J., Port, F. K., Wolfe, R. A., et al. (2003). Chronic renal failure after transplantation of a nonrenal organ. *N Engl J Med*, 349 (10), 931-940.
- Partiseti, M., Collura, V., Agnel, M., Culouscou, J. M., et al. (1998). Cloning and characterization of a novel human inwardly rectifying potassium channel predominantly expressed in small intestine. *FEBS Lett*, 434 (1-2), 171-176.
- Petrovic, S., Wang, Z., Ma, L., Seidler, U., et al. (2002). Colocalization of the apical Cl-/HCO₃- exchanger PAT1 and gastric H-K-ATPase in stomach parietal cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 283 (5), G1207-1216.
- Pironi, L., Goulet, O., Buchman, A., Messing, B., et al. (2012). Outcome on home parenteral nutrition for benign intestinal failure: a review of the literature and benchmarking with the European prospective survey of ESPEN. *Clin Nutr*, 31 (6), 831-845.
- Pironi, L., Joly, F., Forbes, A., Colomb, V., et al. (2011). Long-term follow-up of patients on home parenteral nutrition in Europe: implications for intestinal transplantation. *Gut*, 60 (1), 17-25.
- Pironi, L., Lauro, A., Soverini, V., Zanfi, C., et al. (2014). Renal function in patients on long-term home parenteral nutrition and in intestinal transplant recipients. *Nutrition*, 30 (9), 1011-1014.
- Reiner, J., Hsieh, C. J., Straarup, C., Bodammer, P., et al. (2016). After Intestinal Transplantation Kidney Function Is Impaired by Downregulation of Epithelial Ion Transporters in the Ileum. *Transplant Proc*, 48 (2), 499-506.
- Reyes, J., Mazariegos, G. V., Abu-Elmagd, K., Macedo, C., et al. (2005). Intestinal transplantation under tacrolimus monotherapy after perioperative lymphoid depletion with rabbit anti-thymocyte globulin (thymoglobulin). *Am J Transplant*, 5 (6), 1430-1436.
- Riordan, J. R., Rommens, J. M., Kerem, B., Alon, N., et al. (1989). Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science*, 245 (4922), 1066-1073.
- Rocha, P. N., Rocha, A. T., Palmer, S. M., Davis, R. D., et al. (2005). Acute renal failure after lung transplantation: incidence, predictors and impact on perioperative morbidity and mortality. *Am J Transplant*, 5 (6), 1469-1476.
- Rossmann, H., Bachmann, O., Vieillard-Baron, D., Gregor, M., et al. (1999). Na⁺/HCO₃⁻ cotransport and expression of NBC1 and NBC2 in rabbit gastric parietal and mucous cells. *Gastroenterology*, 116 (6), 1389-1398.
- Rubel, J. R., Milford, E. L., McKay, D. B., & Jarcho, J. A. (2004). Renal insufficiency and end-stage renal disease in the heart transplant population. *J Heart Lung Transplant*, 23 (3), 289-300.

- Sasaki, T., Hasegawa, T., Nakai, H., Kimura, T., et al. (2002). Zoom endoscopic evaluation of rejection in living-related small bowel transplantation. *Transplantation*, 73 (4), 560-564.
- Schäffler, H., Schneider, N., Hsieh, C. J., Reiner, J., et al. (2013). NOD2 mutations are associated with the development of intestinal failure in the absence of Crohn's disease. *Clin Nutr*.
- Schultheis, P. J., Clarke, L. L., Meneton, P., Miller, M. L., et al. (1998). Renal and intestinal absorptive defects in mice lacking the NHE3 Na⁺/H⁺ exchanger. *Nat Genet*, 19 (3), 282-285.
- Schweinfest, C. W., Henderson, K. W., Suster, S., Kondoh, N., et al. (1993). Identification of a colon mucosa gene that is down-regulated in colon adenomas and adenocarcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90 (9), 4166-4170.
- Schweinfest, C. W., Spyropoulos, D. D., Henderson, K. W., Kim, J. H., et al. (2006). slc26a3 (dra)-deficient mice display chloride-losing diarrhea, enhanced colonic proliferation, and distinct up-regulation of ion transporters in the colon. *J Biol Chem*, 281 (49), 37962-37971.
- Seidler, U., Rottinghaus, I., Hillesheim, J., Chen, M., et al. (2008). Sodium and chloride absorptive defects in the small intestine in Slc26a6 null mice. *Pflugers Arch*, 455 (4), 757-766.
- Shcheynikov, N., Wang, Y., Park, M., Ko, S. B., et al. (2006). Coupling modes and stoichiometry of Cl⁻/HCO₃⁻ exchange by slc26a3 and slc26a6. *J Gen Physiol*, 127 (5), 511-524.
- Singh, V., Raheja, G., Borthakur, A., Kumar, A., et al. (2012). Lactobacillus acidophilus upregulates intestinal NHE3 expression and function. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 303 (12), G1393-1401.
- Song, P., Song, W., Liu, X., Jin, C., et al. (2013). Function and expression of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator after small intestinal transplantation in mice. *PLoS One*, 8 (4), e62536.
- Spencer, A. G., Labonte, E. D., Rosenbaum, D. P., Plato, C. F., et al. (2014). Intestinal inhibition of the Na⁺/H⁺ exchanger 3 prevents cardiorenal damage in rats and inhibits Na⁺ uptake in humans. *Sci Transl Med*, 6 (227), 227ra236.
- Sudan, D. (2006). Cost and quality of life after intestinal transplantation. *Gastroenterology*, 130 (2 Suppl 1), S158-162.
- Sudan, D. L., Chinnakotla, S., Horslen, S., Iyer, K., et al. (2002). Basiliximab decreases the incidence of acute rejection after intestinal transplantation. *Transplant Proc*, 34 (3), 940-941.
- Suzuki, M., Mujtaba, M. A., Sharfuddin, A. A., Yaqub, M. S., et al. (2012). Risk factors for native kidney dysfunction in patients with abdominal multivisceral/small bowel transplantation. *Clin Transplant*, 26 (4), E351-358.
- Turnamian, S. G., & Binder, H. J. (1989). Regulation of active sodium and potassium transport in the distal colon of the rat. Role of the aldosterone and glucocorticoid receptors. *J Clin Invest*, 84 (6), 1924-1929.

- Ueno, T., Kato, T., Gaynor, J., Velasco, M., et al. (2006). Renal dysfunction following adult intestinal transplant under tacrolimus-based immunosuppression. *Transplant Proc*, 38 (6), 1762-1764.
- Walker, N. M., Simpson, J. E., Brazill, J. M., Gill, R. K., et al. (2009). Role of down-regulated in adenoma anion exchanger in HCO₃⁻ secretion across murine duodenum. *Gastroenterology*, 136 (3), 893-901.
- Walker, N. M., Simpson, J. E., Yen, P. F., Gill, R. K., et al. (2008). Down-regulated in adenoma Cl/HCO₃ exchanger couples with Na/H exchanger 3 for NaCl absorption in murine small intestine. *Gastroenterology*, 135 (5), 1645-1653 e1643.
- Wallemacq, P., Armstrong, V. W., Brunet, M., Haufroid, V., et al. (2009). Opportunities to optimize tacrolimus therapy in solid organ transplantation: report of the European consensus conference. *Ther Drug Monit*, 31 (2), 139-152.
- Wang, Z., Petrovic, S., Mann, E., & Soleimani, M. (2002). Identification of an apical Cl(-)/HCO₃(-) exchanger in the small intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 282 (3), G573-579.
- Wang, Z., Wang, T., Petrovic, S., Tuo, B., et al. (2005). Renal and intestinal transport defects in Slc26a6-null mice. *Am J Physiol Cell Physiol*, 288 (4), C957-965.
- Watson, M. J., Venick, R. S., Kaldas, F., Rastogi, A., et al. (2008). Renal function impacts outcomes after intestinal transplantation. *Transplantation*, 86 (1), 117-122.
- Wormmeester, L., Sanchez de Medina, F., Kokke, F., Tse, C. M., et al. (1998). Quantitative contribution of NHE2 and NHE3 to rabbit ileal brush-border Na⁺/H⁺ exchange. *Am J Physiol*, 274 (5 Pt 1), C1261-1272.
- Xie, Q., Welch, R., Mercado, A., Romero, M. F., et al. (2002). Molecular characterization of the murine Slc26a6 anion exchanger: functional comparison with Slc26a1. *Am J Physiol Renal Physiol*, 283 (4), F826-838.
- Yang, J., Zhao, X., Patel, A., Potru, R., et al. (2015). Rapamycin Inhibition of mTOR Reduces Levels of the Na⁺/H⁺ Exchanger 3 in Intestines of Mice and Humans, Leading to Diarrhea. *Gastroenterology*, 149 (1), 151-162.
- Yun, C. H., Gurubhagavatula, S., Levine, S. A., Montgomery, J. L., et al. (1993). Glucocorticoid stimulation of ileal Na⁺ absorptive cell brush border Na⁺/H⁺ exchange and association with an increase in message for NHE-3, an epithelial Na⁺/H⁺ exchanger isoform. *J Biol Chem*, 268 (1), 206-211.
- Zhang, G. H., Zhu, J. X., Xue, H., Fan, J., et al. (2007). Dopamine stimulates Cl(-) absorption coupled with HCO₃(-) secretion in rat late distal colon. *Eur J Pharmacol*, 570 (1-3), 188-195.

7. ANHANG

7.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Indikationen zur Darmtransplantation.....	4
Abbildung 2: Drei Verschiedene Transplantationsmodi.....	5
Abbildung 3: Transzelluläre NaCl-Bewegungen intestinal.....	9
Abbildung 4: Fragestellung dieser Arbeit.....	12
Abbildung 5: RNA-Banden unter UV-Licht.	15
Abbildung 6: PCR-Einstellungen am Abi Prism 7000 SDS.....	19
Abbildung 7: Mittlere Tacrolimusspiegel nach Transplantation.....	24
Abbildung 8: Immunsuppression nach Transplantation im Zeitverlauf.	25
Abbildung 9: RNA-Expression der Ionentransporter im Gesamtbeobachtungszeitraum.....	28
Abbildung 10: Relative NHE3-Expression über den Beobachtungszeitraum.	29
Abbildung 11: Relative DRA-Expression über den Beobachtungszeitraum.	30
Abbildung 12: Relative CFTR-Expression über den Beobachtungszeitraum.	32
Abbildung 13: Regressionsanalyse der Ionentransporter untereinander.....	33
Abbildung 14: Verlauf von NHE3, DRA und CFTR-Expression bei Patient 1.	35
Abbildung 15: Verlauf von NHE3, DRA und CFTR-Expression bei Patient 2.	37
Abbildung 16: Nierenfunktion und Tacrolimus-Talspiegel nach Darmtransplantation.....	39
Abbildung 17: Tacrolimus-Wirkung auf HROC113-Zellen.	41

7.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Optimierte Primerkonzentrationen für die Reverse Transkription.	18
Tabelle 2: Tübinger Darmtransplantationskohorte 2006-2012.....	23
Tabelle 3: Δ Ct-Werte aus Kontroll-Ileum.	26

7.3 Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde in der Medizinischen Klinik I unter Betreuung von Prof. Dr. med. Hans-Georg Lamprecht durchgeführt. Teile der Arbeit wurden bereits veröffentlicht in (Reiner et al., 2016).

Prof. Dr. med. Hans-Georg Lamprecht hat die Studie initiiert, die Arbeit betreut und das veröffentlichte Manuskript korrigiert. Dr. Chih-Jen Hsieh hat die Primer und PCR-Bedingungen optimiert und einen Teil der PCR-Untersuchungen durchgeführt. PD Dr. rer. nat. Michael Linnebacher hat die HROC Zellen etabliert und bereitgestellt. Camilla Straarup und Dr. rer. nat. Peggy Bodammer haben die HROC Zellen im Hinblick auf Transporterexpression charakterisiert. PD Dr. med. Maria Witte, Prof. Dr. med. Silvio Nadalin und Prof. Dr. med. Alfred Königsrainer haben die Transplantation durchgeführt und an der Erstellung der Publikation mitgewirkt. Dr. med. Holger Schäffler, Dr. med. Florian Graepler, Dr. med. Dietmar Stüker und Dr. med. Thomas Kratt haben Probenmaterial gewonnen und an der Erstellung des Manuskripts mitgewirkt.

Die Erstellung der Datenbank, die Erhebung der klinischen Daten, ein Teil der PCR-Untersuchungen, die Literaturrecherche, die statistische Auswertung, die Erstellung der Dissertationsschrift, die Anfertigung der Abbildungen und Tabellen, Entwurf und Überarbeitung der finalen Publikation wurde von mir, Johannes Reiner, unter Supervision von Prof. Dr. med. Hans-Georg Lamprecht, durchgeführt.

Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Rostock, den 21.11.2016

7.4 Danksagungen

Mein größter Dank gilt Prof. Dr. med. Hans-Georg Lamprecht für die Überlassung der Arbeit, seine ansteckende wissenschaftliche Begeisterung und die seit Beginn der experimentellen Arbeiten fortwährende Unterstützung und Beratung in Labor, Klinik, USA-Aufenthalt und Beginn der ärztlichen Tätigkeit.

Prof. Jerrold R. Turner, jetzt Boston, möchte ich ganz herzlich danken für die Zeit in seinem gigantischen Forschungslabor an der University of Chicago und die damit verbundene wissenschaftliche Weiterentwicklung. Ein großer Dank geht außerdem an die Böhringer Ingelheim Stiftung für die finanzielle Förderung meiner experimentellen Arbeiten an der University of Chicago. Für die intensive und lehrreiche Zeit in Chicago möchte ich außerdem Le Shen, Matt Odenwald, Jonathan King, Chris Weber, Karen Edelblum, Mary Buschmann, Yitang Wang, Juanming Zha, Weiqi He, Guohua Liang und Peiyun Tsai danken.

Dem Tübinger Laborteam Holger Schäffler, Chih-Jen Hsieh, Simone Lissner und Lilia Nold möchte ich außerdem danken für die spannende Anfangszeit. Ebenso gilt mein Dank dem Laborteam Peggy Berlin, Julia Steinig und Karen Bannert für die gute Zusammenarbeit in Rostock.

Ein weiterer Dank geht an alle Kommilitonen und Freunde aus Tübingen für alle extra-, intra- und supracurriculären Aktivitäten.

Vielen lieben Dank auch meinen Eltern und Geschwistern für die immerwährende Unterstützung.

Zuletzt möchte ich mich ganz besonders bei meiner lieben Mia bedanken, ohne deren unermüdliche Unterstützung und liebevolle Begleitung diese Arbeit nicht entstanden wäre.