

Aus der Chirurgischen Klinik und Poliklinik
der Universität Würzburg
Chirurgische Klinik I
Direktor: Prof. Dr. med. Prof. h. c. A. Thiede

**Manipulation der humoralen Immunreaktivität gegen humanes
Xenoantigen im Modell *Ratte-anti-Mensch* durch eine
Antigen-Cyclophosphamid-Kombinationsbehandlung**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von
Alexander Scholz
aus Kiel

Würzburg, Februar 2006

Referentin: Professor Dr. rer. nat. K. Ulrichs
Korreferent: Professor Dr. med. A. Thiede
Dekan: Professor Dr. med. G. Ertl

Tag der mündlichen Prüfung: 13.06.06

Der Promovend ist Arzt

Liste der verwendeten Abkürzungen

Cy	Cyclophosphamid
Gal α 1,3Gal	Galactose- α -1,3-Galactose
hPBL	humane periphere Blutleukozyten
IgM	Immunglobulin(e) der Klasse M
IgG	Immunglobulin(e) der Klasse G
i. p.	intraperitoneal
i. v.	intravenös
LEW	Inzuchtratten vom Stamm <i>Lewis</i>
NXA	natürliche(r) xenoreaktive(r) Antikörper
NXA-IgG	natürliche(r) xenoreaktive(r) Antikörper der Klasse G
NXA-IgM	natürliche(r) xenoreaktive(r) Antikörper der Klasse M
XAg	xenogene(s) Antigen(e)
XA	xenogene(r) Antikörper
XA-IgG	xenogene(r) IgG Antikörper
XA-IgM	xenogen(r) IgM Antikörper

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
2.	Offene Fragen	7
3.	Material und Methoden	8
3.1.	Versuchstiere	8
3.2.	Xenoantigen	8
3.2.1.	Gewinnung humaner peripherer Blutleukozyten	8
3.2.2.	Einfrieren und Auftauen von Blutleukozyten	9
3.3.	Cyclophosphamid	9
3.4.	Versuchsablauf	10
3.4.1.	<i>In vivo</i> Behandlung	10
3.4.2.	Versuchsanordnung	10
3.5.	Serumgewinnung aus der Ratte	12
3.6.	Durchflusszytometrische Analyse der natürlichen und der induzierten xenoreaktiven Antikörper	12
3.7.	Dokumentation der Ergebnisse	13
4.	Ergebnisse	14
4.1.	Induktion xenoreaktiver Antikörper durch intravenös appliziertes Antigen	14
4.2.	Effekte einer Kombinationsbehandlung aus i. v. appliziertem Xenoantigen und Cyclophosphamid auf die Produktion der xenoreaktiven Antikörper	16
4.3.	„Booster“ mit Xenoantigen nach erfolgter Kombinationsbehandlung	18
4.4.	Wiederholung der Kombinationsbehandlung zu einem späteren Zeitpunkt	19
4.5.	Wiederholung der Kombinationsbehandlung nach „Booster“ mit Xenoantigen	20
4.6.	Langfristige Applikation von niedrig dosiertem Xenoantigen	21
4.7.	Einfluss einer langfristigen Applikation von niedrig dosiertem Xenoantigen auf die Kombinationsbehandlung	23
4.8.	Langfristige Applikation von hoch dosiertem Xenoantigen	24
4.9.	Einfluss einer langfristigen Applikation von hoch dosiertem Xenoantigen auf die Kombinationsbehandlung	25
5.	Diskussion	27
6.	Zusammenfassung	35
7.	Literaturverzeichnis	37
	Danksagung	
	Lebenslauf	

1. Einleitung

Die Organtransplantation stellt für Patienten mit terminalem Organversagen häufig die einzige lebensrettende Maßnahme dar. Sie gehört zu den großen Herausforderungen der modernen Medizin, da die Transplantationstechnik und besonders die Integration des Spenderorgans in den Wirt mit sehr komplexen Problemen verbunden sind. Hauptgrund für viele Misserfolge sind die immunologischen Prozesse, die Transplantat-Abstoßungen und mit ihnen auch den Verlust des neuen Organs verursachen können.

Die Allotransplantation, die Organübertragung innerhalb einer Spezies, z. B. von Mensch auf Mensch, bietet dabei heutzutage aufgrund der immunologischen Zuordnung durch die Gewebetypisierung, moderner, kompetenter Immunsuppressiva und der Weiterentwicklung chirurgischer Techniken eine heilende Therapie – vielfach sogar Routinetherapie. Der insgesamt ansteigende Organbedarf – mit zunehmenden Erfolgen verknüpfen Patienten, die der Organtransplantation bislang eher skeptisch gegenüber standen, ebenfalls große Hoffnungen – führt jedoch zu einem relativen Mangel an verfügbaren Organen. Hinzu kommt eine geringe gesellschaftliche Akzeptanz für die Organspende. Die Deutsche Stiftung Organtransplantation (DSO) registrierte 2005 ca. 11.500 Patienten auf der Warteliste, 10.000 von ihnen warteten auf eine Nierentransplantation. Diese Zahl steigt kontinuierlich an; die Folge ist, dass viele Patienten erst nach jahrelangen Wartezeiten transplantiert werden oder, besonders bei Herz- und Leberversagen, noch auf der Warteliste versterben.

Ein Ausweg aus diesem Dilemma ist die Xenotransplantation. Darunter versteht man die Übertragung von lebenden Zellen, Geweben und Organen zwischen zwei Individuen unterschiedlicher Spezies [1-3]. Sofern man unterschiedliche Spezieskombinationen für eine Xenotransplantation in Betracht zieht, existieren komplexe Unterschiede in der Pathohistologie und der Kinetik der immunologischen Abstoßungsreaktionen; deswegen werden neue Klassifikationen diskutiert. Bisher werden nach Calne [4] entsprechend der Heftigkeit der Abstossung zwei Modelle unterschieden:

Zum einen die *konkordante Xenotransplantation*, bei der es ähnlich wie bei der Allotransplantation zu zellvermittelten Abstoßungsreaktionen kommt, die innerhalb von Tagen bis Wochen das Spenderorgan schädigen. Dies ist bei der Kombination phylogenetisch

nahe verwandter Spezies der Fall, z. B. zwischen Menschen (Empfänger) und Menschenaffen (Spender). In dieser Konstellation sind in der Vergangenheit, d. h. in der Anfangszeit der klinischen Xenotransplantation, und durchaus mit einigem Erfolg, Organübertragungen durchgeführt worden [5-7]. In dieser Konstellation scheinen die Abstoßungsreaktionen durchaus beherrschbar zu sein. Hat man in der Anfangsphase der Xenotransplantation Menschenaffen als Organspender ernsthaft in Betracht gezogen, so wurde diese Intention schnell wieder verworfen: Es gibt große ethische Vorbehalte in der Bevölkerung gegen die Verwendung von Menschenaffen als Organspender: Das betrifft ihre Ähnlichkeit mit den Menschen; sie haben lange Generationszeiten; die in Betracht kommenden Arten sind überwiegend vom Aussterben bedroht; die Kosten für ihre Zucht und Haltung sind hoch, und besonders gefürchtet ist die Gefahr der Übertragung viraler Infektionen. Hatte man sie zunächst noch für die Transplantation in besonders komplizierten Fällen vorgesehen, so ist man heute ganz von Menschenaffen als Organspendern abgerückt.

Zum zweiten die *diskordante Xenotransplantation*; hierbei handelt es sich um Empfänger/Spender Kombinationen mit phylogenetisch größerer Distanz, z. B. vom Schwein auf den Menschen. Hier ist die erste Hürde die Hyperakute Abstoßung; sie erfolgt innerhalb von Minuten bis Stunden, ausgelöst durch die Bindung natürlicher xenoreaktiver Antikörper des Empfängers an die Endothelzellen der Blutgefäße im Spenderorgan (Herz, Niere oder Leber). Diese Bindung führt zur Komplementaktivierung, sodann zu pathophysiologischen Veränderungen in den Gefäßen des Spenderorgans und letztlich zum Verlust der Gefäßintegrität, mit dem Bild der Hämorrhagie, mikro- und makrovaskulärer Thrombose, Koagulation und Ischämie. Als wichtigster diskordanter Organspender wird weltweit zur Zeit das Schwein favorisiert; andere Arten, wie noch in der Anfangsphase der klinischen Xenotransplantation, werden hingegen kaum erwogen. Das Schwein ist ein Nutztier, die ethischen Bedenken sind bei dieser Spezies sehr viel geringer. Es kann in großen Zahlen zu vertretbaren Kosten gezüchtet und gehalten werden und die Organgrößen stimmen mit jenen des Menschen weitgehend überein. Sehr viele Faktoren sprechen also für das Schwein als Organspender.

Natürliche xenoreaktive Antikörper (NXA) gehören, wie auch ABO-Isohämagglutinine zu den natürlichen Antikörpern. Sie können ohne den Nachweis einer Sensibilisierung vorhanden sein. Ihr Ursprung ist weitgehend unklar; er kann einerseits genetisch be-

dingt/gesteuert sein (*germ line dependent*); er kann aber auch auf frühe mikrobielle Kontakte in der Darmschleimwand zurückgehen, weshalb ihre immunologische Funktion ein früher Abwehrmechanismus von Bakterien sein soll (*first line defense mechanism*), an deren Zelloberflächen-Saccharide sie binden [8]. Das Vorkommen der NXA ist in unterschiedlichen Individuen sehr variabel [9, 10]. Überwiegend bestehen die NXA aus Komplement-aktivierenden IgM, seltener aus IgG. Die NXA-Klone sind sich selbst erneuernde Populationen von T-Zellunabhängigen B-Zellen des Typs B-1 [11]. Hauptstimuli für die NXA Produktion scheinen Umgebungsantigene und Nahrungsmittel zu sein. Hauptsächlich ist die Zielstruktur der NXA das Kohlenhydrat-Epitop Galactose- α -1,3-Galactose (Gal α 1,3Gal) [12]. Dieses wird vor allem und kräftig auf den Endothelzellen der Gefäße, sehr viel schwächer bzw. gar nicht auf den somatischen Zellen exprimiert [13].

Verschiedene Methoden zur Eliminierung der NXA wurden untersucht. Durch Plasmapherese, spezifischer noch durch Immunoabsorption, kann man sie für einige Stunden aus der Zirkulation entfernen, danach kommt es allerdings zu einem so genannten *rebound* Effekt. Erst durch Einsatz einer Kombination hochpotenter Immunsuppressiva, wie Antilymphozytenglobulin (ALG), Azathioprin, Prednison und Cyclosporin A (CyA) konnte in Tierversuchen der NXA *rebound* verhindert werden; allerdings ist eine langfristige, nebenwirkungsreiche Gabe von Immunsuppressiva nicht die Lösung des Problems. Die noch genauere Charakterisierung der NXA Zielepitope könnte in Zukunft eine spezifische Eliminierung ermöglichen und die hyperakute Abstoßung verhindern. Ein weiterer vielversprechender Ansatz liegt im Einsatz gentechnisch modifizierter α 1,3-Galactosyltransferase *knock-out* Schweine als Spender; auf ihren Epithelzellen fehlt das Zielepitop, das Gal α 1,3Gal, an das die NXA binden [14].

Solange man nicht zumindest zeitweise die NXA aus der Blutzirkulation des Empfängers entfernt und so die Hyperakute Abstoßung abwehrt, ist die Xenotransplantation von vaskularisierten Organen nicht möglich [9].

Gelingt dies, müssen wir als zweite Hürde die Akute (oder Verzögerte) Abstoßung überwinden, die durch Xenotransplantat-induzierte xenoreaktive Antikörper (XA), vornehmlich IgG, verursacht wird, und die eine T-zellabhängige B-Zellaktivierung erfordert (*Abb. 1*).

Die XA gehören vorwiegend dem IgG, seltener dem IgM Isotyp an und erscheinen unmittelbar nach einer Transplantation im Empfängerserum. Auch sie sind – wie die NXA – gegen das Kohlenhydrat-Epitop Galactose- α -1,3-Galactose gerichtet.

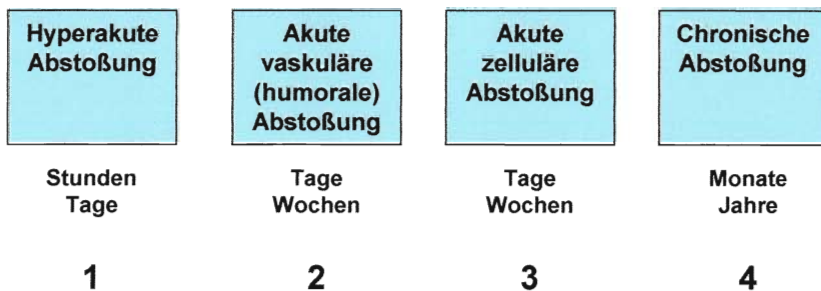


Abb. 1: Mindestens vier Hürden müssen auf dem Weg zur erfolgreichen Xenotransplantation vaskularisierter Organe (z. B. Niere, Herz, Leber) genommen werden. Die 1 und 2 verursachenden xenoreaktiven Antikörper sind Gegenstand der vorliegenden Arbeit. Bei der Transplantation nicht-vaskularisierter Organe (z. B. Langerhans-Inseln, Nebenschilddrüsengewebe) entfällt die Hyperakute Abstoßung, da diese in der Regel keine intakten Endothelzellen mehr enthalten.

Wesentliche Ansätze zur Überwindung der immunologischen Barrieren zur Xenotransplantation sind somit:

- (1) die Eliminierung der natürlich vorhandenen xenoreaktiven Antikörper,
- (2) die Prävention Xenotransplantat-induzierter xenoreaktiver Antikörper,
- (3) die Induktion von Toleranz gegen das Xenotransplantat und
- (4) die Prävention der zellvermittelten Xenoreaktivität.

In unserer Arbeitsgruppe hat in einer vorangegangenen Arbeit Breitzkreuz [15] im diskordanten Model *Ratte-anti-Mensch* mittels einer zeitlich korrelierten Kombinationsbehandlung, bestehend aus Cyclophosphamid (Cy) und Xenoantigen (XAg) ein effektives Konzept zur Manipulation von NXA und XA entwickelt. Das Prinzip dieser Behandlung stützte sich auf Arbeiten von Herrlinger und Müller-Ruchholtz in den 70er Jahren [16, 17]. Die Behandlung mit Cy alleine ergab bei Breitzkreuz bereits einen reversiblen suppressiven Effekt auf die NXA über ca. 20 Tage; ihn kann man mit der direkten cytotoxischen Wirkung von Cy erklären. Die Kombinationsbehandlung, bestehend aus einer einmaligen i. p. Gabe des XAg und der 6tägigen Cy Medikation, führte zu einer signifikanten Reduktion der NXA und vor

allem der XA. Nach dem „Booster“ mit XAg reagierte das spezifisch sensibilisierte humorale Immunsystem mit einer spezifisch verminderten Antwort.

Aufbauend auf diesen Ergebnissen galt es, (1) mit einer modifizierten Kombinationsbehandlung eine ausgeprägte und längerfristige Reduktion der NXA zu erzielen, womit die Hyperakute Abstoßung überwunden werden sollte. (2) Es galt, eine ausreichende *down-regulation* der XA zu erzielen, um so die Akute humorale Abstoßung zu verhindern.

Ein wesentlicher Ansatz zur Erlangung dieser Ziele lag in einer anderen Form der Präsentation des xenogenen Antigens. Im Gegensatz zu der von Breitzkreuz [15] favorisierten i. p. Applikation des Xenoantigens, wollten wir mit der i. v. Applikation eine effektivere Penetration und Präsenz in den lymphoiden Geweben und somit eine stärkere Stimulation reaktiver B-Zellklone induzieren. Diese proliferierenden Klone sind für die unmittelbar folgende, zeitlich begrenzte Cy Behandlung essentiell, weil besonders vulnerabel, was ihre effektive und schnelle Deletion unterstützen würde (*Abb. 2*). Anzustreben war dies für beide Arten von Klonen, die NXA und vor allem die XA produzierenden B-Zellklone.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, mittels persistierender Gaben eines Tolerogens im Rahmen der oben vorgestellten Kombinationsbehandlung spezifische Reaktionslosigkeit (Toleranz) der B-Zellen zu induzieren. Nach entsprechender Vorbehandlung sollte der Empfänger ein xenogenes Organ nicht mehr als „fremd“ erkennen und abstoßen, sondern als „selbst“ akzeptieren, ohne Abwehrreaktionen auszulösen. Als Mechanismus dieser Toleranzinduktion wurde die klonale Elimination aktivierter B-Zellklone mit Cy angestrebt, mit anschließender Prägung undeterminierter Vorläuferzellen durch die Anwesenheit humaner Leukozyten (XAg) als Tolerogen. Speziell Cy wird eine Toleranz-induzierende Wirksamkeit zugeschrieben. Als Immunsuppressivum aus der Gruppe der Alkylantien kann es sowohl Antikörper-produzierende B-Zellen eliminieren, als auch T-Zellen beeinflussen. T-Suppressorzellen bleiben dabei offenbar funktionell unbeschadet und können zumindest in allogenen Modellen eine Toleranz unterstützen [18, 19]. Im xenogenen Modell ist diese Toleranz-induzierende Wirkung allerdings noch nicht bestätigt worden.

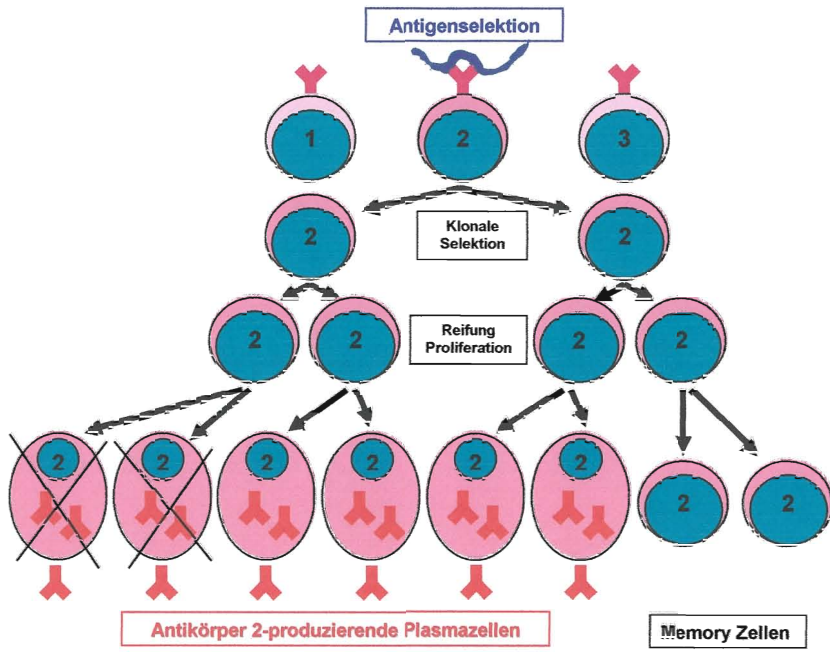


Abb. 2: Antigenselektion, klonale Selektion, Reifung und Proliferation von B-Lymphozyten. Die Antikörper-produzierenden Plasmazellen sind sensitiv (vulnerabel) für Cyclophosphamid und werden zerstört (angedeutet durch zwei sich überkreuzende Linien). Die B-Memory-Zellen ruhen und werden erst durch wiederholten Kontakt mit dem gleichen Antigen zur Proliferation angeregt (modifiziert nach Roitt et al. [20]).

Es darf inzwischen als gesichert gelten, dass Xenotransplantate nur dann im Menschen überleben, wenn der menschliche Organismus gegen die xenogenen Antigene tolerant ist. Die Kombinationsbehandlung, bestehend aus Antigen plus Pharmakon, soll die entsprechende humorale Reaktionslosigkeit hervorrufen, als optimale Voraussetzung für eine spätere Organtransplantation. B-Zelltoleranz gegenüber den Spenderantigenen wäre ein erster Schritt, damit das fremde Organ integriert wird und seine ihm eigene Funktion aufnimmt – all das ohne schwere immunologische Abwehrmechanismen bei maximaler Schonung des Patienten.

2. Offene Fragen

1. Birgt die intravenöse Sensibilisierung mit Xenoantigenen einen Vorteil gegenüber der intraperitonealen Sensibilisierung im Modell *Ratte-anti-Mensch*? Mit anderen Worten, sind höhere Antikörpertiter zu erreichen, wenn das Xenoantigen i. v. appliziert wird?
2. Kann man mit einer zeitlich korrelierten Kombinationsbehandlung, bestehend aus intravenös appliziertem Xenoantigen und Cyclophosphamid, die humorale Immunantwort, d. h. die Antikörpertiter, wirkungsvoll senken?
3. Falls eine Hemmung erreicht wird, ist diese reversibel oder kann mit Hilfe der Kombinationsbehandlung lange anhaltende humorale Reaktionslosigkeit, eventuell sogar Toleranz erzielt werden?
4. Würde eine zweite Kombinationsbehandlung die Hemmung, falls diese nach der ersten Kombinationsbehandlung unvollständig bleibt, verstärken?
5. Sollte auch die zweite Kombinationsbehandlung keine vollständige Hemmung hervorrufen, würde sich die Frage nach dem Effekt eines mehrmaligen „Boosters“ mit Xenoantigen und erneuter Kombinationsbehandlung (Prinzip: Stimulation/Deletion) stellen?
6. Sollten alle oben genannten Maßnahmen nicht zu der erhofften vollständigen Hemmung führen, wäre zu untersuchen, ob die längerfristige Applikation des Xenoantigens einen Zustand der Toleranz im Empfänger herbeiführt.
7. Falls der erhoffte Erfolg nicht eintritt, sollte die längerfristige Antigen-Applikation (siehe Punkt 6) nach vorheriger Kombinationsbehandlung durchgeführt werden.
8. Falls (6) und (7) nicht den erhofften Erfolg bringen, sollte die Antigenmenge deutlich erhöht und in kürzeren Zeitintervallen appliziert werden.
9. Hier stellte sich die Frage, ob der Ansatz in (8) nach vorheriger Kombinationsbehandlung den erhofften Hemmungserfolg im Sinne einer „klonalen Erschöpfung“ zeigt.

3. Material und Methoden

3.1. Versuchstiere

Versuchstiere waren 180-210g schwere, 2-3 Monate alte weibliche Lewis(LEW)-Inzuchtratten (Haupthistokompatibilitätskomplex RT1^l). Die Tiere stammten aus der spezifisch-pathogen-freien Tierhaltung des Instituts für Versuchstierzucht Hannover. Sie wurden in der Tierhaltung des Instituts für Immunologie in Kiel wie folgt gehalten: Maximal 3 Ratten befanden sich in einem Makrolon-Käfig auf Sägemehl und erhielten Altromin[®]-Pressfutter und Wasser *ad libitum*. Alle Versuche waren Bestandteil von genehmigten Tierversuchsvorhaben der Universität Kiel.

3.2. Xenoantigen

Als Xenoantigen (XAg) wurden humane periphere Blutleukozyten (hPBL) verwendet, sowohl für die intravenöse (i. v.) Applikation *in vivo* als auch als Ausgangszellen für die Bindung der Serumantikörper und ihren Nachweis mittels indirekter Immunfluoreszenz in der Durchflusszytometrie *in vitro*. Die Ergebnisse der i. p. Applikation des XAg stammen alle aus der Dissertation von Dr. A. Breitreuz [15] und dürfen hier mit seiner freundlichen Genehmigung zwecks Vergleich mit den eigenen Daten abgebildet werden.

3.2.1. Gewinnung humaner peripherer Blutleukozyten

hPBL wurden aus dem heparinisierten Vollblut eines gesunden Spenders (A. S., männlich, 26 Jahre alt) oder aus *buffycoats* mittels Ficoll-Dichtegradienten-Zentrifugation isoliert. Dazu wurden Blut und *phosphate-buffered saline* (PBS) im Verhältnis 1:2 gemischt, über Lymphoflot (Dichte 1,077 g/ml) geschichtet und bei 800 xg/20 min zentrifugiert. Der so entstandene Leukozytenring wurde abgehoben, in RPMI-komplett gewaschen (RPMI-1640, Gibco, Berlin, mit: 36,8 M Hepes, 10⁵ IU/L Penicillin, 10⁵ µg/l Streptomycin, 2 mM L-Glutamin, 10% FCS; 330 xg/10 min), das Pellet ein zweites mal gewaschen (nun 240 xg/7min) und die Zellzahl im Pellet sodann in der Thoma-Zählkammer bestimmt und wie folgt eingestellt: für die *in vivo* Behandlung auf 5x10⁶ bzw. auf 5x10⁵ Zellen/ml RPMI-1640 und für die *in vitro* Messung im Durchflußzytometer auf 10⁶ Zellen/ml RPMI-1640. Die LEW Ratten erhielten in einer kurzen Ätherrauschnarkose 5x10⁶ bzw. 5x10⁵ hPBL als XAg intravenös (i. v.) in die Schwanzvene injiziert, maximal in 1 ml RPMI-1640. Für die

Gruppe 7 und **Gruppe 8** (siehe 3.4.2.) wurden hPBL aus Vollblut des oben genannten Spenders isoliert und in Portionen zu 10^7 Zellen eingefroren. An den Injektionstagen wurde jeweils eine Portion aufgetaut, und verwendet. Für die **Gruppe 9** und **Gruppe 10** (siehe 3.4.2.) wurden hPBL aus frischen *bufficoats* (Transfusionsmedizinisches Institut der Universität Kiel) entsprechend dem Vollblut isoliert und in Portionen zu 2×10^7 Zellen eingefroren. An den Injektionstagen wurden jeweils 3 Portionen unterschiedlicher *bufficoats* aufgetaut, gepoolt und dann verwendet.

3.2.2. Einfrieren und Auftauen von Bluteukozyten

Die aus Frischblut und aus *bufficoats* isolierten hPBL wurden nach der Methode von Groth und Steinmann [21] eingefroren. In 1,8 ml Einfriermedium, bestehend aus 90% Gelifundol (Biotest, Dreieich) und 10% DMSO (Dimethylsulfoxide, Merck, Darmstadt) wurden je 2×10^7 Zellen in Nunc-Röhrchen portioniert, umgehend in -80°C eingefroren und bis zur Verwendung gelagert. An den Injektionstagen wurden die Proben 1 min im 37°C warmen Wasserbad aufgetaut, danach mit 10 ml komplettem RPMI-1640 verdünnt und bei $300 \times g/7$ min zentrifugiert. Dieser Waschvorgang wurde 1x wiederholt, anschließend wurden die hPBL mittels einer Thoma-Zählkammer gezählt und auf die benötigte Zellkonzentration eingestellt.

3.3. Cyclophosphamid

Das Zytostatikum Cyclophosphamid (Cy) gehört zu den Stickstoff-Lost-Derivaten. Als *Prodrug* wird es erst durch Hydroxilierung in der Leber zu aktiven Metaboliten umgewandelt. Von diesen geht der alkylierende Effekt aus, der durch eine Störung der Nukleinsäuren-Reduplikation die Zellteilung beeinträchtigt. In der Ratte wird der alkylierende Effekt bereits 30 min nach Injektion gemessen. Nach 4 h ist er nicht mehr nachweisbar [22]. Für die experimentellen Injektionen wurden jeweils 100 mg lyophilisiertes Cy (Endoxan, ASTA Pharma AG, Frankfurt) frisch in 5 ml Aqua dest. gelöst. Cy wurde in einer Dosis von 20 mg/kg Körpergewicht in 1 ml 0,9 %iger NaCl-Lösung innerhalb von 30 min nach Herstellung in einer kurzen Ätherrauschnarkose intraperitoneal (i. p.) injiziert. Die Injektionen erfolgten täglich über einen Zeitraum von 6 Tagen. Die Gesamtdosis von 120 mg/kg Körpergewicht entspricht ca. 65 % der LD_{50} für LEW Ratten [23].

3.4. Versuchsablauf

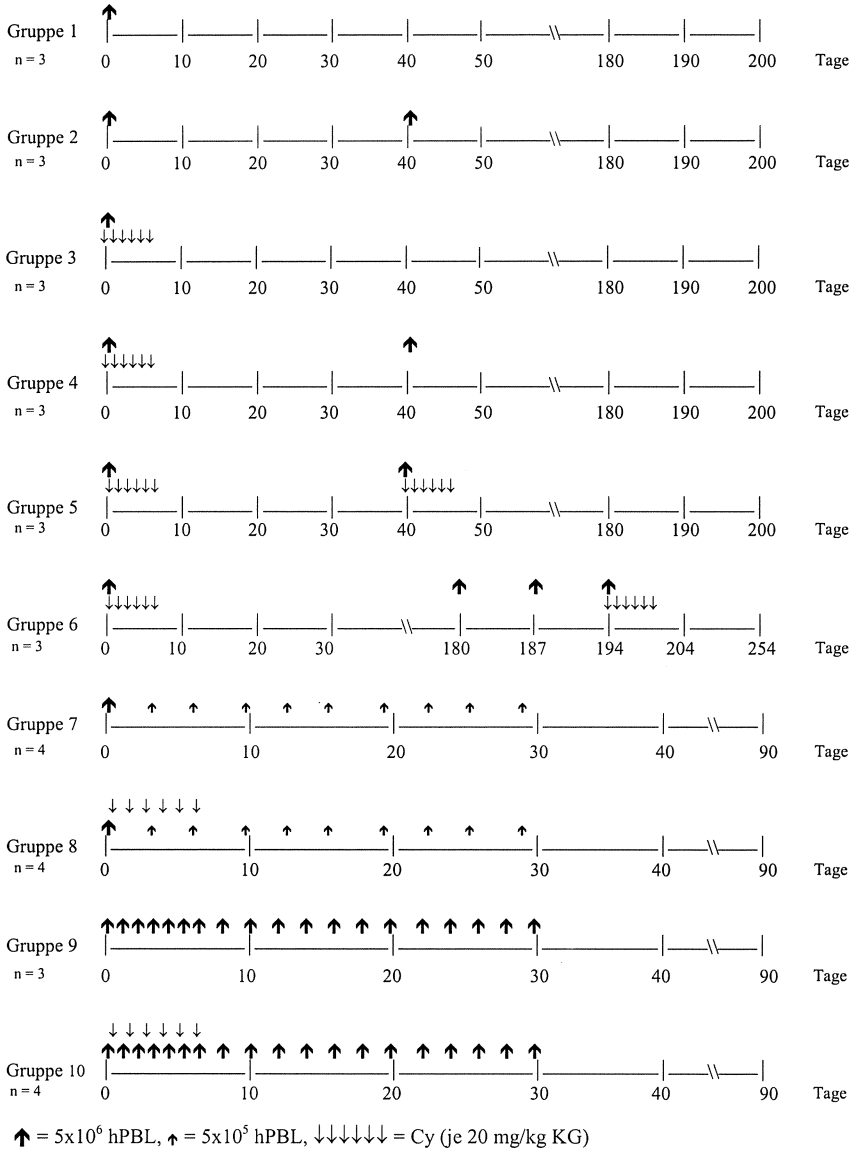
3.4.1. *In vivo* Behandlung

Für die *in vivo* Versuche wurde LEW Ratten an den jeweiligen Behandlungstagen Cy durch die Bauchhaut i. p. und/oder Xenoantigen durch i. v. Injektion in eine Schwanzvene verabreicht. Sämtliche Eingriffe wurden in kurzzeitiger Ätherrauschnarkose durchgeführt. Zur Dokumentation der Toxizität der Behandlung wurden die Tiere unmittelbar vor und nach den Eingriffen gewogen und täglich inspiziert.

3.4.2. Versuchsanordnung

Die Behandlungs-Protokolle sind in **Tabelle 1** noch einmal übersichtlich dargestellt. Zusammengefasst wurden die Tiere wie folgt behandelt: **Gruppe 1** wurde nur mit Ag (5×10^6 hPBL) am Tag 0 behandelt. Die Langzeitbeobachtung erfolgte bei dieser und den nachfolgenden Gruppen bis zum Tag +200. **Gruppe 2** bekam eine zusätzliche Gabe XAg am Tag +40. **Gruppe 3** wurde kombiniert mit XAg am Tag 0 und Cy von Tag 0 bis Tag+5 (je 20 mg/kg) behandelt. **Gruppe 4** erhielt zusätzlich zur Kombinationsbehandlung noch einen „Booster“ mit XAg am Tag +40. **Gruppe 5** wurde zweifach ab Tag 0 und ab Tag +40 kombiniert behandelt. **Gruppe 6** erhielt nach einer Kombinationsbehandlung einen zweimaligen „Booster“ mit XAg an den Tagen +180 und +187 und eine erneute Kombinationsbehandlung mit XAg (5×10^6 hPBL) am Tag +194, sowie Cy von Tag +194 bis +199. **Gruppe 7** wurde langfristig niedrig dosiert mit XAg behandelt. Injektionen erfolgten am Tag 0 mit 5×10^6 hPBL und an den Tagen +3, +6, +10, +13, +16, +20, +23, +26, +30 mit der niedrigeren Dosis von 5×10^5 hPBL. Die Beobachtung erfolgte bei dieser und den folgenden Gruppen über 90 Tage. **Gruppe 8** erhielt kombiniert Cy von Tag 0 bis Tag +5 (je 20 mg/kg) und die langfristig niedrig dosierte Behandlung mit XAg wie Gruppe 7. **Gruppe 9** erhielt eine langfristig hoch dosierte Behandlung mit XAg (je 5×10^6 hPBL) von Tag 0 bis Tag +6 täglich, anschließend von Tag +8 bis +30 in zweitägigen Abständen. **Gruppe 10** wurde kombiniert mit Cy von Tag 0 bis Tag +5 (mit je 20 mg/kg) und dem langfristig hoch dosierten XAg (wie in Gruppe 9) behandelt.

Tab. 1. Zusammenstellung aller Versuchsgruppen und Behandlungen mit Xenoantigen und Cyclophosphamid (siehe auch den zugehörigen Text).



3.5. Serumgewinnung aus der Ratte

Den Versuchstieren wurde in 10tägigen Intervallen 1,5 ml Schwanzvenenblut in einer kurzzeitigen Ätherrausnarkose entnommen. Nach der Gerinnung wurden die Blutproben bei 1.700 xg/10 min zentrifugiert, das Serum abgenommen und bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

3.6. Durchflußzytometrische Analyse der natürlichen und der induzierten xenoreaktiven Antikörper

Nach dem Auftauen der Seren wurden diese zur Zerstörung des Komplements bei 56°C für 30 min Hitze-inaktiviert und anschließend mit PBS verdünnt (1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32 etc.). 100 µl hPBL (10^6 Zellen/ml RPMI-1640) wurden für 45 min mit je 100 µl verdünntem Rattenserum (s. o.) bei Raumtemperatur inkubiert, alle 15 min geschüttelt, anschließend bei 500 xg/5 min zentrifugiert und sodann der Überstand abgesaugt. Die Zellen wurden 3x mit 750 µl PBS gewaschen und jeweils bei 500 xg/5 min zentrifugiert. In einem zweiten Inkubationsschritt wurden die Zellen mit 30 µl eines Sekundäntikörpers (1:40 mit PBS verdünnt) für 45 min inkubiert und alle 15 min geschüttelt. Als Sekundäntikörper wurden verwendet: (a) Fluorescein (DTAF)-gekoppelter AffinePure Ziege-anti-Ratte IgG, Fc-Fragment spezifisch (#12-015-071, Dianova, Hamburg), (b) Fluorescein (DTAF)-gekoppelter AffinePure F(ab)2 Fragment Ziege-anti-Ratte IgM, Mµ Kette spezifisch (#112-016-075, Dianova). Nach 3x Waschen mit 750 µl PBS bei 500 xg/5 min wurden die Zellen mit 250 µl Sheathfluid (#95-2003, FACS-Flow, Becton Dickinson, Heidelberg) resuspendiert. Die Bindung der IgM und IgG Antikörper wurde mit einem FACScan (Becton Dickinson) untersucht (*Abb. 3*). Von jeder Probe wurden die Daten (Größe, Granularität, Fluoreszenz) von jeweils 10.000 Zellen aufgenommen und auf einem Hewlett-Packard Computer (HP-310) unter Verwendung der FACScan-Software (Becton Dickinson) analysiert. Größe und Granularität dienten zur Abgrenzung der humanen Lymphozyten von mitosolerten Granulozyten und Monozyten. Die Auswertung der Antikörperbindung beschränkte sich auf die Zellpopulation der Lymphozyten. Um die Reproduzierbarkeit der Testergebnisse zu gewährleisten, wurde die Funktion des Photo-Multipliers des Fluoreszenz-1 Kanals mit Kalibrierungskörperchen (#95-0002, Becton Dickinson) regelmäßig kontrolliert. Ein LEW Rattenserum mit IgG und/oder IgM wurde als positiv gewertet, wenn >90% der

Fluoreszenzsignale über der Fluoreszenz der Negativkontrolle (nur Sekundäntikörper) gemessen wurden.

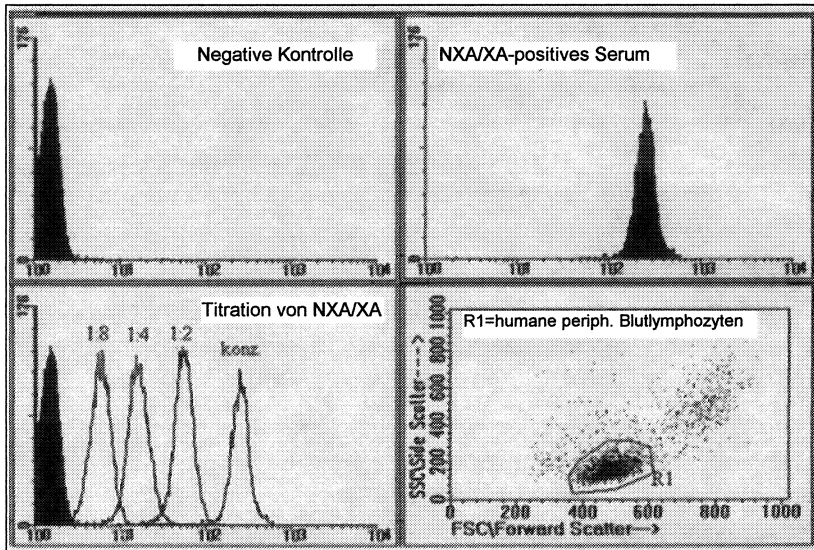


Abb. 3. Titerbestimmung natürlicher xenoreaktiver (NXA) und induzierter xenoreaktiver (XA) Antikörper im Serum kombiniert behandelter LEW Ratten in der Durchflußzytometrie (FACS-can). Links oben: Negativkontrolle (nur Sekundäntikörper); rechts oben: Beispiel eines NXA/XA-positiven Rattenserums; links unten: Titration eines NXA/XA-positiven Rattenserums (Verdünnungen 1:8, 1:4, 1:2 und konzentriert = unverdünnt); rechts unten: die Zielzellpopulation ist R1; dabei handelt es sich um humane periphere Blutlymphozyten, gewonnen aus humanen peripheren Blutleukozyten (hPBL).

3.7. Dokumentation der Ergebnisse

Die Ergebnisse sind als Säulendiagramme mit dem Mittelwert und den Standardabweichungen dargestellt. Pro Versuchsgruppe und Testzeitpunkt wird das Serum von mindestens drei gleichartig behandelten LEW Ratten getestet (siehe auch **Tab. 1** für die genaue Anzahl der Tiere pro Versuchsgruppe).

4. Ergebnisse

4.1. Induktion xenoreaktiver Antikörper durch intravenös appliziertes Antigen

Es stellte sich die Frage, ob die Stärke der humoralen Immunantwort in Ratten nach i. v. Applikation von humanem XAg jener nach i. p. Applikation gleicht. Zu Beginn der hiesigen Untersuchungen existierten bereits die Ergebnisse von Breitzkreuz [15] zur i. p. Applikation des XAg im Modell *Ratte-anti-Mensch* unter ansonsten identischen Versuchsbedingungen. Dazu erhielten LEW Ratten einmalig 5×10^6 hPBL i. v. am Tag 0 als XAg (**Gruppe 1**). Über einen Zeitraum von 200 Tagen wurde den Ratten Schwanzvenenblut entnommen und das Serum auf veränderte Antikörpertiter in der indirekten Immunfluoreszenz mit hPBL (hier nur die Lymphozytenfraktion) im Durchflußzytometer bestimmt. **Abbildung 4** stellt das Ergebnis für die xenoreaktiven IgG (XA-IgG) und IgM (XA-IgM) dar, im direkten Vergleich zu den von Breitzkreuz erarbeiteten Daten nach i. p. Applikation der hPBL. Die wichtigsten Befunde lauten zusammengefasst: (1) Die IgM am Tag 0 entsprechen den vor Sensibilisierung stets vorhandenen natürlichen xenoreaktiven Antikörpern (NXA, wobei $\text{IgM} \gg \text{IgG}$). (2) Der i. v. Sensibilisierung mit hPBL am Tag 0 folgt erwartungsgemäß ein kräftiger Anstieg neu gebildeter XA-IgG und XA-IgM; der Titer der XA-IgG ist nun sehr viel höher als jener der XA-IgM, es kommt zum Isotypenwechsel. (3) Die XA-IgG und XA-IgM Titer fallen bis zum Tag +200 nur geringfügig ab. (4) Insgesamt ist die Stärke der i. v. Sensibilisierung jener nach i. p. Sensibilisierung vergleichbar. Somit kann man auch mit der i. v. Sensibilisierung in Ratten eine lange anhaltende, kräftige humorale Immunantwort gegen humane Antigene erzeugen.

Fraglich war, ob die Sensibilisierungseffekte durch eine zweite Antigengabe („Booster“) am Tag +40 noch verstärkt werden können. Dazu erhielt eine zweite Gruppe LEW Ratten nach Sensibilisierung am Tag 0 eine weitere Sensibilisierung mit hPBL am Tag +40 (**Gruppe 2**). **Abbildung 5** stellt das Ergebnis für beide Sensibilisierungen dar: Der „Booster“ mit hPBL 40 Tage nach der ersten Sensibilisierung resultiert in deutlich erhöhten Titern: Über die folgenden 160 Tage sind es näherungsweise 3 Titerstufen für XA-IgG und näherungsweise 2 Titerstufen für XA-IgM.

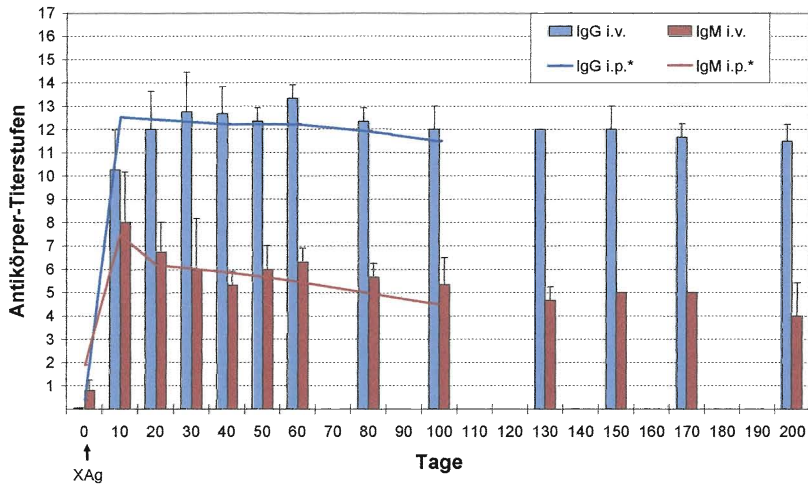


Abb. 4. Induktion xenoreaktiver Antikörper (XA-IgG, XA-IgM) in LEW Ratten durch einmalige i. v. Applikation von humanem XAg (5×10^6 hPBL) am Tag 0. Der Vergleichsgruppe wurde XAg i. p. appliziert; diese Daten wurden freundlicherweise von Dr. A. Breikreuz [15] zur Verfügung gestellt. Den Ratten wurde dann über 200 Tage Schwanzvenenblut entnommen; die Titer der gegen hPBL (hier die Lymphozytenfraktion) gerichteten IgG und IgM Antikörper wurden durchflußzytometrisch bestimmt (Minimum der Versuche $n=3$ pro Säule; bei Säulen ohne Standardabweichung sind die gemessenen Titer in allen 3 Tieren identisch).

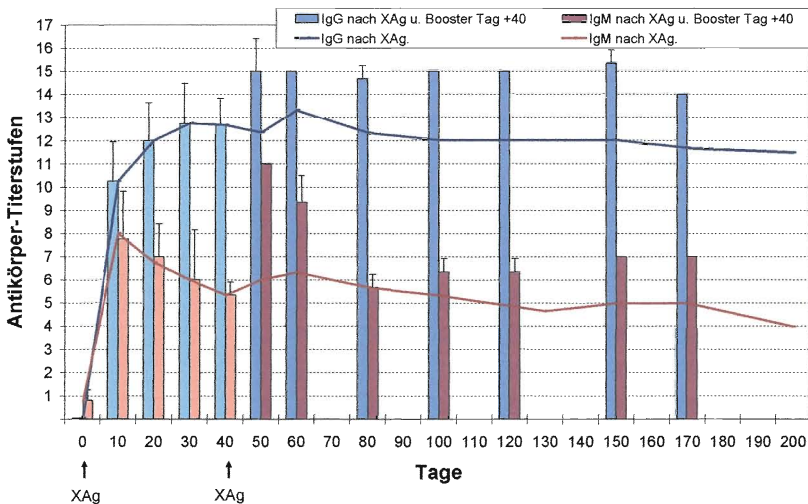


Abb. 5. Effekte einer zweiten Sensibilisierung mit XAg (hPBL, i. v.) am Tag +40 („Booster“). Die hellblauen und hellroten Säulen sind die relevanten Kontrollwerte bis Tag +40 und wurden aus **Abb. 4** übertragen.

Diese Versuche bildeten die Grundlage für die nachfolgenden Manipulationen der XA-IgG und XA-IgM mit der Kombinationsbehandlung, bestehend aus der zeitlich eng korrelierten Gabe von XAg (i. v.) und Cy (i. p.).

Fazit: Die einmalige i. v. Applikation von XAg (hPBL) in LEW Ratten bewirkt einen starken Titeranstieg der XA-IgG und XA-IgM mit Isotypenwechsel von NXA-IgM zu Xenotransplantat-induzierten XA-IgG/XA-IgM. Dieser Anstieg gleicht jenem nach i. p. Applikation. Ein „Booster“ mit XAg am Tag +40 erhöht die Titer von XA-IgG und XA-IgM um 3 bzw. 2 Stufen; diese bleiben bis Tag +160 nahezu konstant.

4.2. Effekte einer Kombinationsbehandlung aus i. v. appliziertem Xenoantigen und Cyclophosphamid auf die Produktion der xenoreaktiven Antikörper

Nach Etablierung der xenogen sensibilisierten Kontrollgruppe (**Gruppe 1**) stellte sich die Frage, ob die zeitlich korrelierte Kombinationsbehandlung aus der einmaligen i. v. Gabe des XAg und einer 6tägigen i. p. Applikation von Cy die Neubildung der XA im Sinne einer *down regulation* hemmt. Das XAg steht in unserem Modell stellvertretend für ein xenogenes Transplantat. Fraglich war zudem, ob die Kombinationsbehandlung auch die natürlichen NXA hemmen würde. Breitzkreuz [15] hatte eine 20tägige Suppression der XA nach alleiniger Cy Applikation und eine 60tägige Suppression nach kombinierter Behandlung erzielt. Für die i. v. Applikation des XAg in Kombination mit Cy gab es bislang keine Daten. Dazu erhielten LEW Ratten einmalig am Tag 0 XAg i. v. appliziert und Cy täglich von Tag 0 bis Tag +5 i. p. (**Gruppe 3**). Serumgewinnung und Antikörperbestimmungen erfolgten gemäß 4.1. **Abbildung 6** dokumentiert das Ergebnis: (1) Die kombinierte Behandlung mit XAg + Cy führt zu einer signifikanten *down regulation* der XA-IgG und XA-IgM über den gesamten Beobachtungszeitraum von 200 Tagen (**Abb. 6a**): Die XA-IgG werden über den gesamten Zeitraum vollständig gehemmt, für die XA-IgM werden zwischen 0 und 2 Titerstufen gemessen. (2) Die komplette Hemmung an den Tagen +10 und +20 (gemäß Definition: <90% Antikörper-bindende Zellen: siehe Material und Methoden) könnte auf die direkte Wirkung des Cy zurückzuführen sein. (3) Die komplette Hemmung von Tag +160 bis Tag +200 dürfte ein Späteffekt der Kombinationsbehandlung sein. (5) Die Kombinationsbehandlung mit XAg i. v. ist jener mit XAg i. p. (Breitzkreuz [15]) im Sinne einer Effektverstärkung (Hemmung) überlegen (**Abb. 6b**).

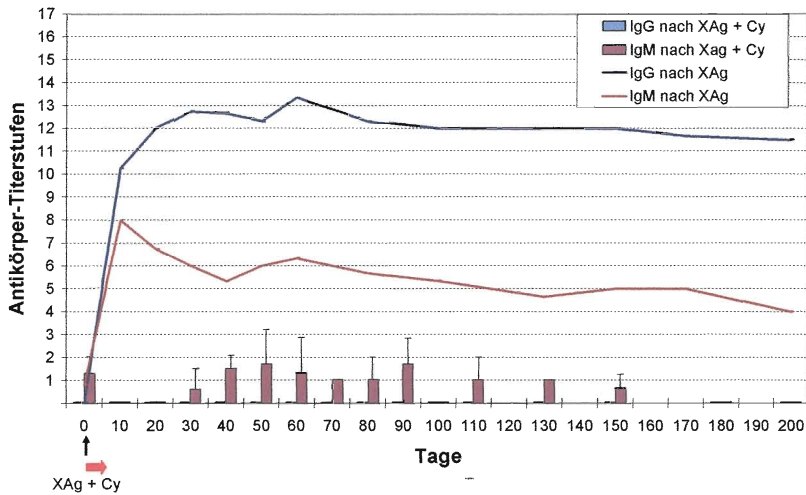


Abb. 6a. Manipulation (down regulation) der xenoreaktiven Antikörper mit einer Kombinationsbehandlung aus XAg + Cy in LEW Ratten: XAg am Tag 0 i. v. und Cy täglich von Tag 0 bis Tag +5 i. p.; als Vergleich dienten Ratten, die nur XAg i. v. am Tag 0 erhalten hatten (siehe Abb. 4).

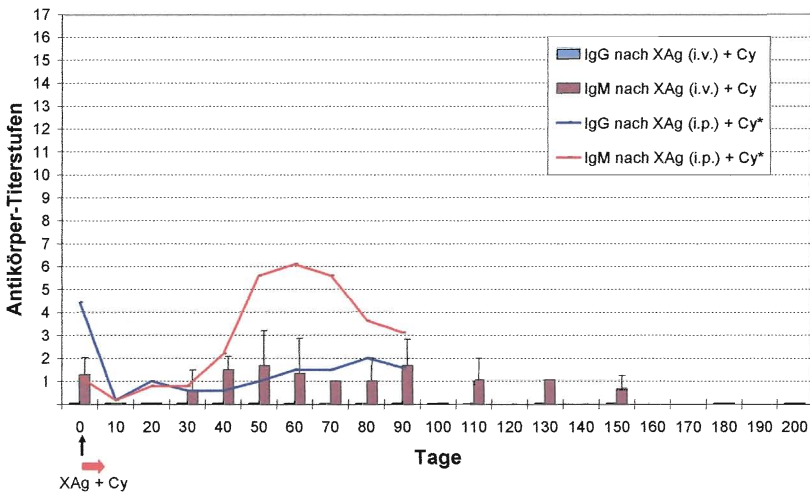


Abb. 6b. Vergleichende Manipulation (down regulation) der xenoreaktiven Antikörper nach i. v. und i. p. Applikation des XAg. Die Ergebnisse der i. p. Applikation wurden uns freundlicherweise von Dr. A. Breitzkreuz [15] zur Verfügung gestellt.

Fazit: Die Kombinationsbehandlung aus XAg i. v. und Cy i. p. hemmt die Neubildung der XA-IgG vollständig über 200 Tage, die der XA-IgM jedoch nur unvollständig. Die Neubildung der NXA wird nicht gehemmt. Die i. v. Sensibilisierung ist der i. p. Sensibilisierung im Sinne der Effektverstärkung (Hemmung) überlegen.

4.3. „Booster“ mit Xenoantigen nach erfolgter Kombinationsbehandlung

Nach den Ergebnissen in 4.2 stellte sich die Frage nach der verbleibenden humoralen Immunreaktivität in den kombiniert behandelten LEW Ratten. Würden die Ratten auf eine erneute XAg Gabe am Tag +40 mit einem Anstieg der humoralen Reaktivität oder Reaktionslosigkeit reagieren? Dazu wurden 3 von 6 Tieren der **Gruppe 3** am Tag +40 mit hPBL „geboostert“ und die Antikörpertiter wie zuvor gemessen (**Gruppe 4**). **Abbildung 7** dokumentiert das Ergebnis: (1) Im Vergleich zu **Gruppe 2** steigen die XA Titer nach dem „Booster“ kräftig an, eine Hemmung der XA/NXA findet nicht statt. (2) Die XA Titer in **Gruppe 4** erreichen jedoch nicht das Niveau der „geboosterten“ unbehandelten Kontrollgruppe: Der „Boostereffekt“ für XA-IgG währt für ca. 40 Tage (bis Tag +80) und beträgt 2-5 Titerstufen Unterschied zur unbehandelten Kontrolle, jener für XA-IgM währt für ca. 30 Tage (bis Tag +70) und beträgt 0-3 Titerstufen. Die erhoffte Reaktionslosigkeit wurde nach dem „Booster“ mit XAg jedoch nicht erzielt.

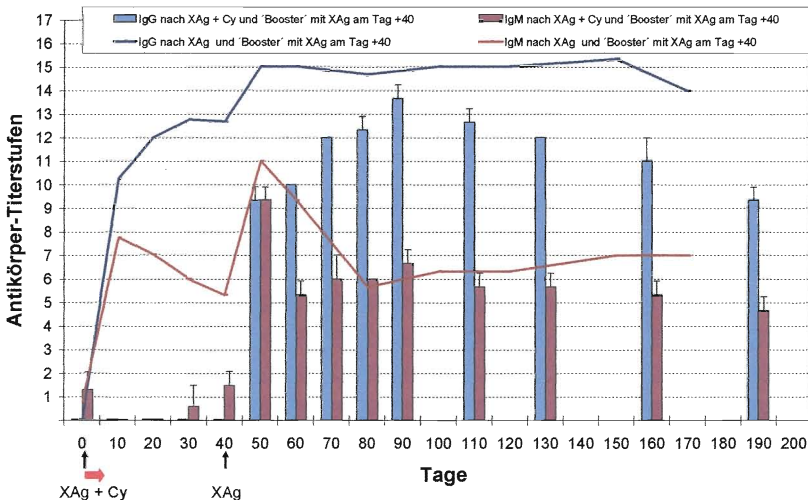


Abb. 7. Wiederkehr der humoralen Reaktivität durch erneute i. v. Applikation von XAg am Tag +40 („Booster“) nach Kombinationsbehandlung mit XAg (Tag 0) + Cy (6x von Tag 0 bis Tag +5).

Fazit: Mit einem „Booster“ von XAg am Tag +40 kann die Neubildung der XA/NXA nicht gehemmt werden. Die humorale Reaktivität (XA-IgG; XA-IgM) kehrt auf annähernd normale Werte zurück, nachdem sie zuvor mit der Kombinationsbehandlung erfolgreich gehemmt wurde.

4.4. Wiederholung der Kombinationsbehandlung zu einem späteren Zeitpunkt

Breitkreuz [15] erzielte eine Effektverstärkung im Sinne einer stärkeren *down regulation* der XA, wenn er die Kombinationsbehandlung zu gegebener Zeit wiederholte. So stellte sich auch hier die Frage, ob die in 4.2 beobachtete Restreaktivität durch Wiederholen der Kombinationsbehandlung – einziger Unterschied ist die Art der Antigen-Applikation – weiter gesenkt würde. Dazu erhielten die LEW Ratten am Tag +40 erneut XAg i. v. und 6x Cy von Tag +40 bis Tag +45 i. p. (**Gruppe 5**). Serumbewinnung und Antikörperbestimmungen erfolgten wie zuvor. Das Ergebnis dokumentiert **Abb. 8**: (1) Die Wiederholung der Kombinationsbehandlung am Tag +40 stabilisiert die vorherige starke Hemmung der humoralen Reaktivität durch die erste Kombinationsbehandlung. (2) Sie hemmt jedoch die Restreaktivität, vermutlich NXA-IgM, nicht komplett. Deren leichter Titerabfall von Tag +50 bis Tag +70 könnte noch die Folge der direkten Cy Cytotoxizität sein. (3) Der Titeranstieg durch den „Booster“ mit XAg am Tag +40 (vergleiche dazu **Abb. 7**) wird jedoch durch die anschließende 6tägige Gabe von Cy verhindert.

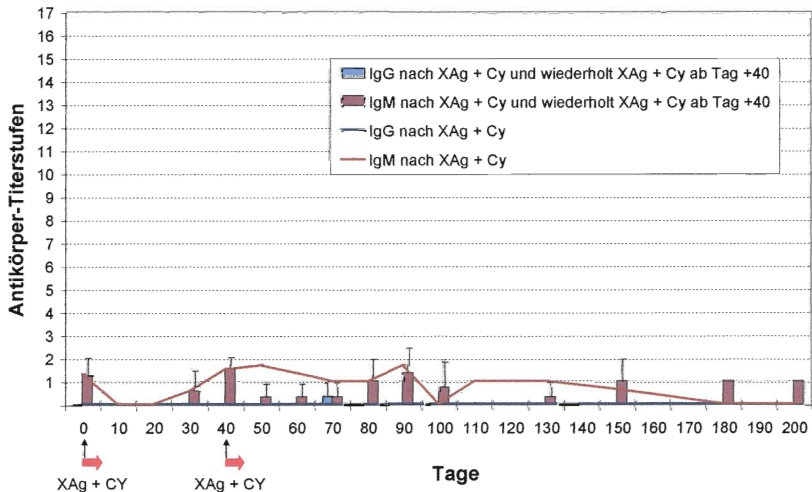


Abb. 8. Mit einer zweiten Kombinationsbehandlung, beginnend am Tag +40 wird der hemmende Effekt der ersten Kombinationsbehandlung stabilisiert.

Fazit: Eine zweite Kombinationsbehandlung, beginnend am Tag +40 stabilisiert die starke Hemmung nach der ersten Kombinationsbehandlung. Die Nachbildung der NXA kann jedoch nicht verhindert werden.

4.5. Wiederholung der Kombinationsbehandlung nach „Booster“ mit Xenoantigen

Die bisherigen Daten lassen erkennen, dass die XA-IgG mit der kombinierten Behandlung (XAg + Cy) wirkungsvoll *down reguliert* werden können, Non-Reaktivität der XA-IgM und NXA-IgM Klone wird jedoch nicht erreicht. Es stellte sich die Frage, ob eine starke Gabe von XAg vor einer zweiten Kombinationsbehandlung nun auch die XA-IgM/NXA-IgM Klone komplett eliminieren würde. Dazu wurden LEW Ratten zunächst am Tag 0 kombiniert behandelt, erhielten am Tag +180 und am Tag +187 jeweils XAg i. v., um dann ab Tag +194 erneut kombiniert behandelt zu werden (**Gruppe 6**). Serumgewinnung und die durchflußzytometrische Antikörperbestimmung erfolgten wie oben. **Abbildung 9** dokumentiert das Ergebnis: (1) Ähnlich den in **Abb. 7** beschriebenen Effekten, reagieren kombiniert behandelte LEW Ratten auf erneute Antigenreize am Tag +180 und am Tag +187 mit einem starken Titeranstieg von XA-IgG und XA-IgM. (2) Die 7 Tage später einsetzende zweite Kombinationsbehandlung hemmt die Produktion der XA-IgG und XA-IgM nur unwesentlich über den verbleibenden Messzeitraum von 60 Tagen (Tag +194 bis Tag +254).

Fazit: Die verbleibenden XA-IgM/NXA-IgM Titer lassen sich auch durch Wiederholen der Kombinationsbehandlung, der ein zweimaliges „Boostern“ mit XAg vorausgeht, nicht senken. Die doppelte Antigen-Applikation hebt die erfolgreiche Hemmung der wiederholten Kombinationsbehandlung auf.

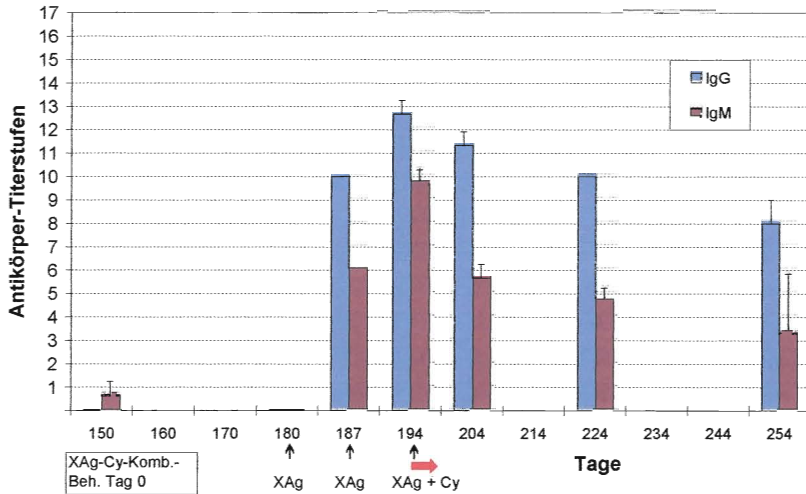


Abb. 9. Wiederholung der Kombinationsbehandlung nach zweimaligem „Booster“ mit XAg kann die kräftige Nachproduktion von XA-IgG und XA-IgM nicht verhindern. LEW Ratten wurden am Tag 0 kombiniert behandelt, erhielten am Tag +180 und am Tag +187 jeweils XAg i. v. und dann ab Tag +194 die zweite Kombinationsbehandlung.

4.6. Langfristige Applikation von niedrig dosiertem Xenoantigen

Die bisherigen Ergebnisse zeigen, dass Kombinationsbehandlungen mit einer einzelnen Xenoantigen-Applikation genügen, um die beabsichtigte verminderte Reaktionsfähigkeit des humoralen Immunsystems zu erzielen. Ungeklärt war die Frage, ob eine langfristige Gabe von niedrig dosiertem Xenoantigen als Bestandteil der Kombinationsbehandlung die vollständige Reaktionslosigkeit (der XA-IgM/NXA-IgM Klone) bewirken würde. Im Mittelpunkt der Überlegungen stand, ob das Xenoantigen in der etwas veränderten Versuchsanordnung auch ein tolerogenes Potential entwickeln würde, nachdem sein immunogenes Potential ja bereits nachgewiesen war.

Zunächst musste eine relevante Kontrollgruppe gebildet werden. Dazu erhielten LEW Ratten am Tag 0 XAg i. v. (5×10^6 hPBL) und dann reduziert auf 5×10^5 hPBL an den Tagen +3, +6, +10, +13, +16, +20, +23, +26 und +30 (**Gruppe 7**). Da hierzu keine experimentellen Daten verfügbar waren, orientierten wir uns bezüglich der Dosierung des XAg an einer für

LEW Ratten fiktiven Belastbarkeitsgrenze. **Abbildung 10** dokumentiert die durchflußzytometrisch gemessenen NXA und XA Titer, und das Ergebnis lässt sich wie folgt zusammenfassen: (1) Den Sensibilisierungen von Tag 0 bis Tag +9 folgt der erwartete sehr kräftige Anstieg neu gebildeter XA beider Isotypen, IgG und IgM. (2) Die dann bis Tag +30 folgenden Antigen-Applikationen bewirken keinen weiteren Titeranstieg (IgG), sondern sogar einen Titerabfall (IgM). Im Vergleich zur einmaligen Sensibilisierung (**Gruppe 1**) fallen die IgM um 1 Titerstufe und die IgG um 2 Titerstufen höher aus. (3) XA-IgM sinken insgesamt um 4 Titerstufen und bleiben dann auf konstantem Niveau, während die XA-IgG ihr anfänglich hohes Niveau bis zum Versuchsende am Tag +90 beibehalten.

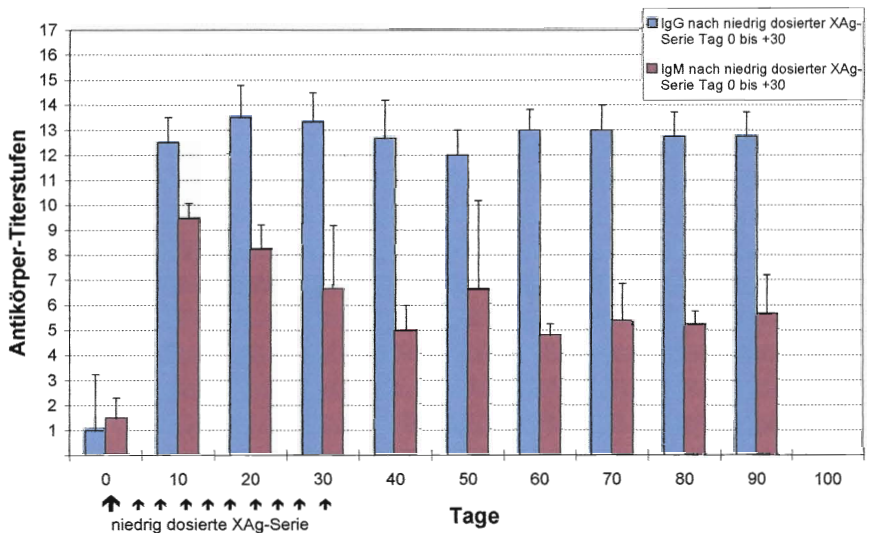


Abb. 10. Induktion xenoreaktiver Antikörper in LEW Ratten nach langfristiger, niedrig dosierter i. v. Applikation von XAg: 5×10^6 hPBL am Tag 0; danach folgen „Booster“ mit jeweils 5×10^3 hPBL an den Tagen +3, +6, +10, +13, +16, +20, +23, +26 und +30.

Fazit: Die langfristige Applikation von niedrig dosiertem XAg über einen Zeitraum von 30 Tagen induziert sehr hohe XA-Titer; IgM und IgG erreichen ihre höchsten Titer lange vor dem Behandlungsende am Tag +90.

4.7. Einfluss einer langfristigen Applikation von niedrig dosiertem Xenoantigen auf die Kombinationsbehandlung

Nach der Etablierung der Kontrollgruppe wurde der Effekt des Cy auf die Produktion der xenoreaktiven Antikörper – besonders natürlich der XA-IgM/NXA-IgM – untersucht. Hierzu erhielten LEW Ratten XAg (i. v.) wie in 4.6. beschrieben und zusätzlich 6x Cy (i. p.) von Tag 0 bis Tag +5 (**Gruppe 8**). **Abbildung 11** dokumentiert das Ergebnis und die Titerverläufe: (1) Am Tag 0 liegen nur sehr geringe IgM Titer vor; die Profile entsprechen den natürlichen xenoreaktiven Antikörpern. Am Tag +10 sinkt der IgM Titer vorübergehend gegen 0. (2) Am Tag +20 steigt er jedoch wieder an, erreicht am Tag +30 ein Maximum, fällt danach geringfügig ab und bleibt dann bis zum Tag +90 stabil. (3) Der IgG Titer sinkt zunächst gegen 0 (Tag +10), steigt bis zum Tag +30 wieder an und verharrt ab dann auf einem 4-6 Stufen höheren Niveau bis zum Tag +90.

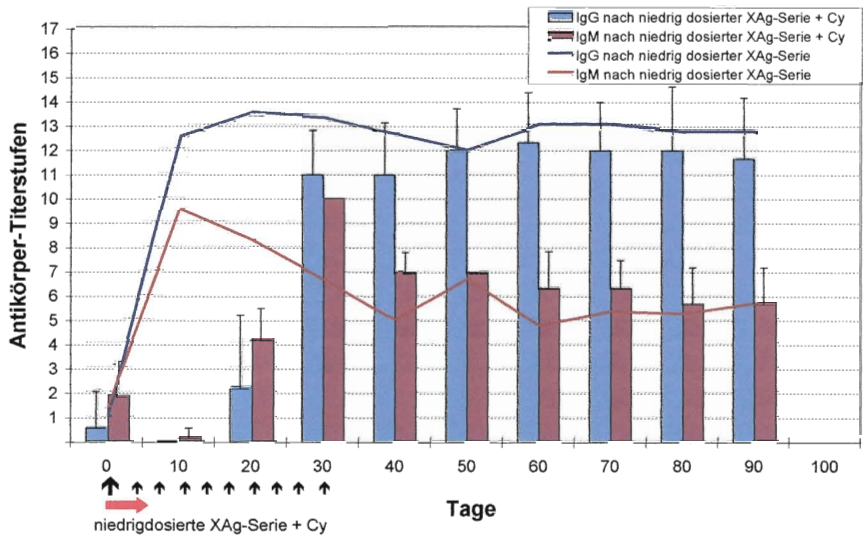


Abb. 11. Einfluss einer langfristigen Applikation von niedrig dosiertem XAg auf die Kombinationsbehandlung. Behandlung wie in Abb. 10, nun jedoch mit Cy i. p. von Tag 0 bis Tag +5.

Fazit: Die Kombinationsbehandlung, bestehend aus wiederholten niedrigen Antigengaben bis zum Tag +30 und einer 6tägigen Cy Behandlung (Tag 0 bis Tag +5) senkt die XA-IgM und XA-IgG vorübergehend auf 0. Die nachfolgenden Antigen-Applikationen induzieren keinen Antikörper-senkenden Effekt oder gar Reaktionslosigkeit, sondern die bekannten hohen und lange anhaltenden Titer.

4.8. Langfristige Applikation von hoch dosiertem Xenoantigen

Anhand der Ergebnisse der **Gruppe 7** (siehe **Abb. 10**) mit niedrig dosiertem XAg, stellte sich nun die Frage, ob humorale Reaktionslosigkeit mittels höher dosiertem Xenoantigen, erzielbar sein; vor allem dann, wenn es in noch kürzeren Intervallen appliziert würde. So sollte kontinuierliche Präsenz des Antigens erreicht werden und ggf. sogar eine „klonale Erschöpfung“. Voraussetzung war, dass die Ratten die höhere Dosierung gut vertrugen – verglichen mit der vorherigen 10x geringeren Antigenmenge. In dieser spezifischen Kontrollgruppe (**Gruppe 9**) erhielten die LEW Ratten zunächst täglich von Tag 0 bis Tag +6 und dann in 2tägigen Abständen von Tag +8 bis Tag +30 das 10x höher dosierte XAg (5×10^6 hPBL) i. v. in die Schwanzvene appliziert. Die Titerverläufe in **Abb. 12** zeigen eine überaus starke XA-IgG und XA-IgM Produktion am Tag +10 mit dem schon bekannten Isotypenwechsel von IgG zu IgM und Titern, die im Vergleich zur **Gruppe 7** für beide, IgG und IgM, 2 bis 3 Stufen höher ausfallen und bis zum Tag +90 unterschiedlich stark absinken (IgG um 2 Stufen, von Stufe 15 bis 13; IgM um 6 Stufen, von Stufe 12 bis 6).

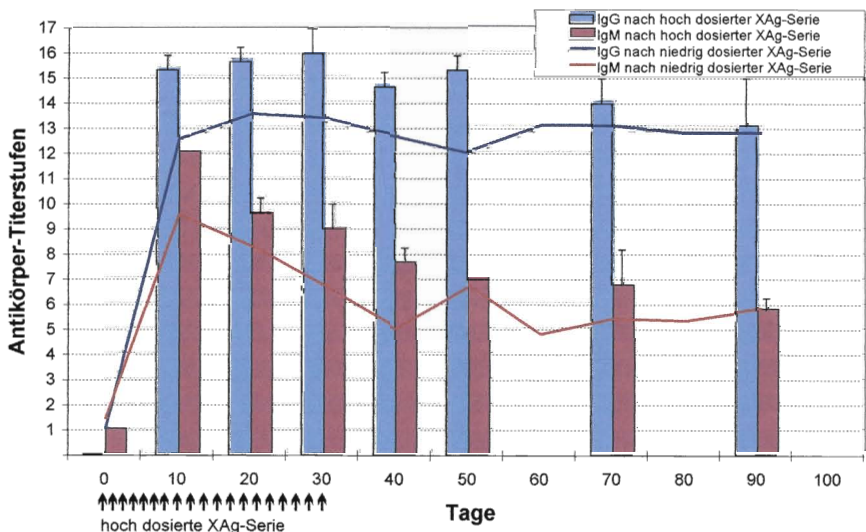


Abb. 12. Induktion xenoreaktiver Antikörper in LEW Ratten durch langfristige hoch dosierte i. v. Applikation von XAg: 5×10^6 hPBL täglich von Tag 0 bis Tag +5; dann in 2tägigem Abstand in gleicher Dosierung von Tag +6 bis Tag +30.

Fazit: Die langfristige Applikation von hoch dosiertem XAg über einen Zeitraum von 30 Tagen und in kürzeren Zeitintervallen verstärkt die humorale Immunantwort noch einmal gegenüber der Vergleichsgruppe mit der niedrigeren Dosierung.

4.9. Einfluss einer langfristigen Applikation von hoch dosiertem Xenoantigen auf die Kombinationsbehandlung

Nach Etablierung der relevanten Kontrollgruppe sollte dieses Behandlungsschema (siehe 4.8.) mit Cy kombiniert werden. Cyclophosphamid wurde von Tag 0 bis Tag +5 i. p. verabreicht (**Gruppe 10**). Das Ergebnis ist in **Abb. 13** dargestellt. Danach lassen sich folgende Feststellungen treffen: (1) Wie schon in **Gruppe 8** (siehe **Abb. 11**) werden die IgM kurzfristig (am Tag +10) *down reguliert*. (2) Am Tag +20 resultiert die Applikation von hohen XAg Dosen in einem kräftigen Anstieg der XA-IgM. (3) Am Tag +30 ist der bekannte Isotypenwechsel von IgG nach IgM vollzogen. (4) Ab Tag +30 verharren die XA-IgG auf gleich bleibendem Niveau (bis Tag +90); sie sind jedoch gegenüber der unbehandelten Kontrolle um mehrere Titerstufen reduziert: 3-5 Stufen zwischen Tag +30 und Tag +60, ab dann 1,5-3 Stufen bis Tag +90. (5) Die XA-IgM werden durch diese Art der Kombinationsbehandlung nicht beeinträchtigt, bzw. gesenkt; sie scheinen zwischen dem 30. und 50. Tag sogar leicht erhöht zu sein, um danach auf das Niveau der unbehandelten Kontrolle abzufallen.

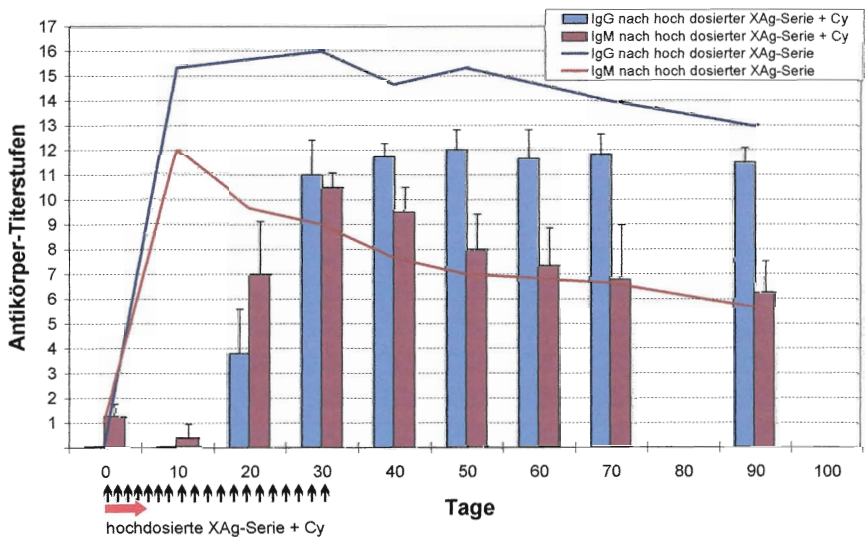


Abb. 13. Einfluss einer langfristigen Applikation von hoch dosiertem XAg auf die Kombinationsbehandlung. Behandlung wie in **Abb. 7** dokumentiert, plus Cy i. p. von Tag 0 bis Tag +5.

Fazit: Die Kombinationsbehandlung, bestehend aus wiederholten hohen Antigengaben bis zum Tag +30 und einer 6tägigen Cy-Behandlung (Tag 0 bis Tag +5) senkt zwar XA-IgM und XA-IgG vorübergehend auf 0, langfristig und sehr begrenzt jedoch nur die XA-IgG. Allerdings ist diese Hemmung etwas stärker als nach Kombinationsbehandlung und niedrig dosiertem XAg. Dauerhafte humorale Reaktionslosigkeit wird auch mit diesem Protokoll nicht erreicht.

5. Diskussion

Vorbetrachtung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, ein Behandlungsprotokoll im xenogenen Modell *Ratte-anti-Mensch* zu entwickeln, mit dessen Hilfe die durch das Xenotransplantat induzierten neuen Antikörper (XA-IgG, XA-IgM) – ggf. aber auch die natürlichen xenoreaktiven Antikörper (vorwiegend NXA-IgM) – im Empfänger wirkungsvoll gehemmt werden können. Die in anderen *in vivo* und *in vitro* Modellen erfolgreichen Kombinationsbehandlungen, aus einer zeitlich eng korrelierten Behandlung von Xenoantigen (hPBL) und Cyclophosphamid (Cy) [15-17] waren die konzeptionelle Grundlage für die hiesigen Untersuchungen. Sie beruht auf dem Prinzip der Stimulation/Deletion Cy-sensitiver B-Zellklone (**Abb. 2**). In dieser Arbeit – im Gegensatz zu der von Breitreuz [15] – sollte das Xenoantigen (XAg) nun nicht i. p. sondern i. v. appliziert werden, um seine schnellere und direktere Verfügbarkeit im Empfänger zu gewährleisten [24]. Das XAg war die Variable bei allen Manipulationsversuchen, Cy hingegen blieb stets konstant.

Die hierbei verwendeten Methoden, z. B. Gewinnung, Aufbereitung und Injektion des XAg (hPBL), Serumgewinnung aus Ratten, Antikörperbindungstests und die durchflußzytometrische Analyse waren etabliert; die Messung der Antikörperbindung im Durchflußzytometer war zwar sehr zeit- und kostenaufwendig, dafür aber sehr viel präziser als die Bestimmung der Fluoreszenzintensität im Mikroskop durch das menschliche Auge, wie es in Vorversuchen erprobt und dann wegen des größeren Ablesefehlers verworfen wurde.

Der hiesigen Arbeit liegt zwar eine immunbiologische Frage zu Grunde (die Manipulation von Xenoantikörpern), ihr Schwerpunkt sollte aber die Etablierung einer wirkungsvollen Therapie zur Hemmung der B-Zellklone auf dem Prinzip Stimulation/Deletion im Rattenmodell sein; die zell- und molekularbiologische Analytik der B-Zellklone mit modernen Labormethoden, wie sie heute zu fordern ist, stand damals nicht im Vordergrund. Das hätte auch den Rahmen dieser (stärker [mikro]chirurgisch geprägten) Arbeit gesprengt. Diese Ausgangslage gilt es zu berücksichtigen, wenn Fragen nach den spezifischen Charakteristika der Cy-sensitiven und -insensitiven B-Zellklone am Ende der Diskussion nicht beantwortet werden können. Als diese Arbeit entstand, wurden beide Strategien, die Etablierung von Therapiemodellen *in vivo* und die *in vitro* Analytik der humoralen Xenoreaktivität

weltweit intensiv und parallel verfolgt [1, 11, 25]. Erstaunlich ist, dass es auch nach vielen Jahren intensiver Forschung immer noch keine erfolgreichen immunsuppressiven Protokolle für die Transplantation vaskularisierter xenogener Organe (Herz, Niere) gibt; dieser Umstand ist u. a. verantwortlich für den gegenwärtigen Stillstand der xenogenen Transplantation im Großtiermodell und somit bleibt der hier entwickelte Ansatz der Kombinationsbehandlung unverändert ein sehr attraktives Konzept. Sehr viel schwieriger als die T-Zellreaktivität ist die B-Zellreaktivität auszuschalten, und das „altbekannte“ Cyclophosphamid ist unverändert das Pharmakon mit der grössten Wirkung auf die B-Lymphozyten [26, 27].

Im Modell *Ratte-anti-Mensch* gleicht die intravenöse Sensibilisierung mit Xenoantigen der intraperitonealen Sensibilisierung

Zentraler Punkt der Kombinationsbehandlung war die intravenöse Applikation des XAg (im Gegensatz zu der zuvor von Breitzkreuz [15] verwendeten intraperitonealen Applikation); so sollte später eine noch stärkerer B-Zellaktivierung und sicherere Zerstörung der aktivierten B-Zellklone mit Cy erzielt werden. Dies ist nicht der Fall wie *Abb. 5* dokumentiert; die Antikörpertiter sind in beiden Fällen identisch – denkbar ist auch, dass die B-Zellklone maximal aktiviert sind und maximale Titer produzieren. So gesehen ist die i. v. Applikation kein geeignetes Instrument, um noch höhere Titer herbeizuführen. Als Folge der direkteren Präsentation des XAg über das Gefäßsystem hätte man dies durchaus erwarten können. Erwartungsgemäß kommt es nach der ersten XAg Applikation zum Isotypenwechsel von XA-IgM zu XA-IgG, was beweist, dass es sich bei den hohen Titern um eine klassische Antikörper-Sekundärreaktion handelt. Breitzkreuz brach seine Versuche am Tag +100 ab, wir können zeigen, dass XA-IgG und XA-IgM unverändert bis zum Tag +200 auf ihrem ursprünglichen Niveau verharren. Ob dieses Niveau auch mit der i. p. Applikation hätte aufrechterhalten werden können, ist nicht bekannt und hier von untergeordneter Bedeutung. Ein „Booster“ mit XAg am Tag +40 (i. v.) verstärkt die Antikörpertiter wie erwartet um 2-3 Stufen. Diese Erhöhung signalisiert das Vorhandensein von B-Gedächtniszellen. Offenbar folgt die i. v. Sensibilisierung mit dem XAg, das ja aus einer Vielzahl unbekannter Antigene/Epitope besteht, (die mit den hPBL injiziert werden), den bekannten Regeln der B-Zellaktivierung, verglichen mit den bislang viel besser erforschten Alloantigenen. Weitere vergleichende Untersuchungen zur intravenösen versus intraperitonealen Antigen Applikation liegen in der Literatur nicht vor.

Eine zeitlich eng korrelierte Kombinationsbehandlung aus Xenoantigen und Cyclophosphamid senkt die humorale Immunantwort wirkungsvoll

Kombiniert man die Sensibilisierung mit dem XAg zeitlich eng mit einer Cyclophosphamid Behandlung, dann wird die resultierende starke humorale Reaktivität über 200 Tage wirkungsvoll auf nahezu 0 gesenkt; diese unerwartet starke Hemmung (*down regulation*) gilt besonders für die XA-IgG und den gesamten Beobachtungszeitraum; für die XA-IgM gilt sie sicher erst ab dem Tag +160. Fraglich ist ob die NXA-IgM Klone eliminiert wurden, die verbleibenden schwachen Antikörpertiter könnten NXA-IgM sein, wohingegen die XA-IgM Klone – wie schon die XA-IgG Klone – ebenfalls zerstört wurden. Hier müssten differenzierte zellbiologische Analysen das vorhandene B-Zellrepertoire charakterisieren – wie gesagt, das stand nicht im Vordergrund dieser Arbeit. Die vollständige Hemmung der XA-IgM zwischen dem 10. und 20. Tag könnte jedoch noch die Folge des direkten cytotoxischen/deletierenden Effektes von Cy sein, der dann allmählich abklingt. Cy schädigt als Alkylans die Funktion der B-Lymphozyten und es resultiert eine Reduktion der Antikörpertiter. [28]. Die Titer der verbleibenden IgM zwischen dem 30. und 150. Tag sprächen dafür, dass es sich bei ihnen um NXA handelt; sie entsprechen in etwa jenen für NXA in unbehandelten LEW Ratten am Tag 0. Wäre dies der Fall, dann hieße es, dass die NXA Klone nicht auf die Kombinationsbehandlung ansprechen – also Cy-insensitiv sind. Bestätigt wird dieses durch Ashton-Chess [29], welcher mit Hilfe von Cy wie auch mit Hilfe von Mitoxantron im Modell *Schwein-auf-Menschenaffe* keine Verminderung der zirkulierenden NXA beobachtete. Die fehlende Produktion von NXA/XA-IgM ab dem Tag +160 kann derzeit nicht erklärt werden – hier bedarf es weiterführender Untersuchungen.

Bereits dieses erste Ergebnis entspricht damit der hohen Erwartung, die wir in diese Kombinationsbehandlung gemäß dem Stimulations/Deletions-Prinzip gesetzt hatten. Die Überlegenheit der i. v. Applikation des XAg gegenüber seiner i. p. Applikation wird erst erkennbar, wenn das Cy in der Kombinationsbehandlung wirkt (**Abb. 6b**). Die i. p. Applikation induziert also einen weit geringeren „hemmenden Einfluss“ auf die Sensibilisierungsabhängige Antikörper Produktion; daraus darf man schließen, dass beide Sensibilisierungswege einen unterschiedlich starken *impact* auf die Neubildung der Antikörper ausüben. Aus **Abb. 4** war das nicht erkennbar gewesen. In wie weit beide Applikationswege auch unterschiedliche B-Zellklone aktivieren, ist nicht bekannt. Lediglich für die i. v. Applikation des Antigens liegen Untersuchungen an Mäusen vor, wonach die Antigene an verschiedene Subtypen von dendritischen Zellen in der Milz gebunden werden. Von den

Subtypen ist dann die Form und Effizienz der Präsentation an CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen abhängig [24]. Untersuchungen bezüglich der i. p. Injektion des Antigens liegen nicht vor.

Der hemmende Effekt wird durch erneute Applikation von Xenantigen aufgehoben

Die spannende Frage war, ob der hemmende Effekt der Kombinationsbehandlung in eine dauerhafte Reaktionslosigkeit mündet. Würden also LEW Ratten auf einen erneuten Antigenreiz mit unverminderter humoraler Reaktivität, Reaktionsminderung oder weiterhin mit Reaktionslosigkeit (siehe XA-IgG) reagieren? Betrachtet man *Abb. 8*, dann wird klar, dass nicht alle B-Zellklone durch die Kombinationsbehandlung eliminiert werden. Nach erneuter i. v. Applikation von XAg kommt es für beide, XA-IgG und XA-IgM, zu vergleichsweise hohen Titern. Das würde bedeuten, dass die hier praktizierte Art der Kombinationsbehandlung als Toleranz-induzierende Maßnahme vor einer späteren xenogenen Organ-Transplantation nicht geeignet ist.

Die Wiederholung der Kombinationsbehandlung stabilisiert die Hemmung

Die zweite Kombinationsbehandlung stabilisiert den Effekt der ersten und hebt ihn nicht gar auf – auch das könnte passieren, z. B. wenn nach der zweiten XAg Gabe Cy-insensitive Klone aktiviert werden. Damit ist gezeigt, dass die zweite XAg Gabe, der „Booster“ am Tag +40 (*Abb. 7*) Cy-sensitive B-Zellklone aktiviert hat. Da die Neubildung der XA-IgG nach der ersten Kombinationsbehandlung bereits wirkungsvoll gehemmt war und auch die 2. Behandlung diese hoch effizient unterdrückte, blieb die Frage offen, ob die NXA-produzierenden Klone durch die zweite Kombinationsbehandlung nun komplett eliminiert werden könnten – mit der ersten kombinierten Behandlung war dies ja nicht gelungen. *Abbildung 8* dokumentiert, dass dies nicht geschieht, der erhoffte Erfolg bleibt aus – die verbleibende humorale Reaktivität (wahrscheinlich wie schon zuvor NXA) gleicht in der Art und Titerhöhe unverändert jener in *Abb. 6a*. Eine Hemmung der NXA-Klone scheint also mit diesem Behandlungskonzept und hier besonders unter Verwendung von Cy nicht möglich zu sein – eigentlich hätte man dieses Ergebnis bereits nach der ersten Behandlung erwarten können, bzw. erwarten müssen; insofern war die zweite Behandlungsrunde einer Erkenntniserweiterung nicht unbedingt dienlich. Mit Spezies-spezifischen Zelloberflächenmarkern – die vor allem für die Ratten in den vergangenen Jahren vermehrt entwickelt wurden – könnte man heute die NXA-produzierenden B-Zellklone durchflußzytometrisch viel genauer charakterisieren. So scheinen die NXA von B-Zellen der CD5⁺ Untergruppe produziert zu werden [30], welche Darm-assoziiert bestehen und durch die Darmflora sti-

muliert werden [31, 32]. Der Aufbau der NXA-IgM resultiert vornehmlich aus schweren Ketten der VH3-Familie, während die weniger vorhandenen NXA-IgG und nach Sensibilisierung auch xenoreaktive anti-Gal α 1,3Gal IgM und -IgG schwere Ketten der Familie VH1, VH3 und VH4 aufweisen. Der *switch* im Aufbau der IgM legt nahe, dass nach Sensibilisierung andere B-Zell-Klone an der Produktion beteiligt sind [33, 34]. Mit einem so erweiterten Wissen wäre es möglich, aus den schon vorhandenen Pharmaka jene zu selektieren, bzw. Kombinationsstrategien zu entwickeln, auf die diese speziellen Klone empfindlich reagieren. Die NXA sind durch konventionelle Immunsuppressiva wie Cyclosporin A, Tacrolimus, Azathioprin, Mycophenolat Mofetil und Steroide nicht zu eliminieren [35]. Durch Plasmapherese gelingt zwar die Entfernung der NXA aus der Zirkulation, es resultiert jedoch ein *rebound*. Absorptionsstrategien, welche die NXA aus dem Blut entfernen, nicht aber die Klone eliminieren, sind kein ausreichendes Mittel, um hier Reaktionslosigkeit herbeizuführen. Sowohl Immunaffinitäts-Säulen wie auch Immunabsorptions-Techniken erreichen nur eine temporäre Elimination der zirkulierenden NXA [36]. Ebenso wird mit Cobravenomfaktor, kombiniert mit Cyclosporin A, eine NXA-Reduktion erreicht, durch zusätzliche Plasmapherese auch die Hyperakute Abstossung verhindert; dennoch traten die NXA-Titer erneut auf, und eine Verzögerte Abstossung konnte nicht verhindert werden [37]. Warum Breitkreuz [15] mit der zweiten Kombinationsbehandlung die IgM eliminieren kann – er hatte das Xenantigen i. p. appliziert – kann zum jetzigen Zeitpunkt nicht beantwortet werden. Da in beiden Fällen Cy auf die gleiche Art und Weise appliziert wurde und das sonstige methodische Procedere komplett identisch war, muss der Unterschied in der Applikation des XAg, i. v. versus i. p. zu suchen sein.

Macht ein „Booster“ vor der zweiten Kombinationsbehandlung die NXA-Klone für Cyclophosphamid sensitiver?

Die Antwort ist eindeutig „nein“ – auch die Applikation von XAg 14 und 7 Tage vor erneuter Kombinationsbehandlung resultiert in keinem „besseren“ Ergebnis – die Antikörper titer schießen erneut in die Höhe (*Abb. 9*). So jedenfalls ist keine Hemmungsverstärkung erzielbar; andererseits zeigt dieser Versuch, dass das „System“ zu diesem späten Zeitpunkt (Tag +180) unverändert reaktiv ist, d. h. auf den „Booster“ reagieren kann. Dieser Versuch ist zudem ein gutes Beispiel dafür, dass nur die enge zeitliche Kombination/Korrelation von XAg und Cy die erhoffte starke Hemmung erzielt; sowie die XAg Gabe das Zeitfenster verlässt, d. h. die Proliferation zeitlich vorgezogen wird, kann Cy sein cytotoxisches Potential nicht entwickeln..

Die längerfristige Applikation von niedrig dosiertem Xenoantigen hat keinen tolerogenen Effekt

Die Wiederkehr der humoralen Reaktivität nach der ersten Kombinationsbehandlung und erneuter Antigenapplikation am Tag +40 (*Abb. 7*), veranlasste uns, das XAg langfristig in niedrigen Dosen zu verabreichen. Es war beabsichtigt, mittels persistierenden Antigengaben nach der ersten Kombinationsbehandlung einen Zustand der Toleranz zu induzieren, der vor allem jene Klone betreffen sollte, die unverändert NXA produzierten. Der Empfänger sollte allmählich an die fremden Antigene gewöhnt werden. Dazu war jedoch in einem ersten Schritt die relevante Kontrollgruppe zu etablieren – sie existierte bisher noch nicht. Gewählt wurde die halbe Antigenmenge, um den Empfängerorganismus an das vermeintliche Tolerogen zu gewöhnen. *Abbildung 10* dokumentiert, dass die Ratten die insgesamt 10 Applikationen des XAg sehr gut vertrugen – kein Tier litt oder starb als Folge der wiederholten Injektionen, was zunächst befürchtet wurde; auch darum war die Antigendosis halbiert worden; die Antikörpertiter erreichen Werte, die jenen hohen in *Abb. 5* entsprechen – das System ist offenbar maximal aktiviert (vergleiche *Abb. 10* mit *Abb. 5*). Festzuhalten bleibt, dass die längerfristige Anwendung der halben Konzentration des XAg keinen tolerogenen Effekt auf die B-Zellreaktivität ausübt.

Kombinationsbehandlung und längerfristige Antigen-Applikation führen nicht zur klonalen Erschöpfung

Die Kombinationsbehandlung führt zunächst – wie erwartet – zur klonalen Reaktionslosigkeit, allerdings nur für eine sehr kurze Zeitspanne, von Tag +6 (Ende der Cy Gabe bis Tag +10 als Messpunkt); dies könnte wieder ein Späteffekt der Cy-bedingten Cytotoxizität sein. Spätestens aber ab Tag +40 ist jeglicher hemmende Effekt der Kombinationsbehandlung verschwunden, wie die Antikörpertiter der behandelten und unbehandelten LEW Ratten zeigen. Somit gelingt es nicht, durch eine längerfristige Applikation des „halben Antigens“ den Empfänger in einen wie auch immer gearteten Zustand der Toleranz zu überführen. Es gibt unverändert Cy-insensitive Klone, die diesem Behandlungsprotokoll funktionell widerstehen und die unverändert sehr hohe Antikörpermengen produzieren.

Führen höhere Antigen-Konzentrationen zur „klonalen Erschöpfung“ der B-Zell-Klone?

Diese Frage muss klar mit „nein“ beantwortet werden. Die Erhöhung der Antikörpermenge um den Faktor 10 einschliesslich der Verkürzung der Applikations-Intervalle über 30 Tage

– ohne und mit Kombinationsbehandlung – führen nicht zur „klonalen Erschöpfung“ residualer B-Zell-Klone. Mit diesem Konzept ist die B-Zellreaktivität nach xenogener Stimulation nicht zu inhibieren – wobei die längerfristige Gabe des Xenoantigens wiederum die Anwesenheit eines xenogenen Organs im Empfänger, z. B. die Leber, die kontinuierlich große Mengen löslicher Antigene in den Empfängerorganismus abgibt, widerspiegeln dürfte.

Zusammenfassend kann man feststellen, dass das hier angewandte Konzept der Kombinationsbehandlung nach dem Prinzip der Stimulation/Deletion sehr wohl geeignet ist, die gegen die xenogenen Antigene/Epitope gerichteten XA-IgG und XA-IgM auszulöschen, nicht aber die natürlichen xenoreaktiven NXA-IgM (die NXA-IgG spielen nur eine untergeordnete Rolle). Eine zweite Kombinationsbehandlung verstärkt den Hemmeffekt zwar nicht, stabilisiert ihn aber. Die erfolgreiche Hemmung hängt vor allem von der engen zeitlichen Beziehung zwischen dem XAg und Cy ab, die gewährleisten muss, dass das Cy die proliferierenden B-Zellklone in ihrer verwundbarsten Zellzyklusphase trifft. Toleranz gegen die xenoreaktiven Antikörper im Empfänger kann man mit den hier gewählten Ansätzen nicht induzieren, ebenso wenig erzielt man eine „klonale Erschöpfung“. Die unbefriedigenden Ergebnisse im Zusammenhang mit der Elimination der NXA-Klone – hierbei handelt es sich vorzugsweise um IgM – legen den Schluss nahe, dass zu ihrer Ausschaltung völlig andere Strategien entwickelt werden müssen. Die Reduktion der NXA durch Immunabsorption (α Gal-Säulen) reicht nicht aus, um die die Hyperakute Abstoßung zu überwinden, da nur 85-95% der NXA gegen das α Gal Epitop gerichtet sind; es gibt also noch andere, bisher nicht identifizierte NXA [38]. Erfolgversprechende Ansätze zur Überwindung der Hyperakuten Abstoßung liegen in der genetischen Modifikation der Spenderschweine. Bei den seit kurzem verfügbaren 1,3Galactosyl-Transferase *knockout* (Gal T-KO) Schweinen werden die Zielepitope für die NXA auf den Endothelzellen nicht mehr exprimiert [14]. Daher findet keine Antikörperbindung statt. Im Transplantationsmodell *Gal T-KO-Schwein-auf-Menschenaffe* gibt es erste Erfolge bezüglich der Verlängerung der Überlebenszeit; allerdings steigen die zirkulierenden xenoreaktiven Antikörper auch nach Überwindung der Hyperakuten Abstoßung an, woraus eine Verzögerte Abstoßung resultiert [39]. Bessere Ergebnisse erhält man, wenn die Empfänger durch Thymus-Transplantation zur Induktion einer T-Zelltoleranz und durch eine Co-Stimulator-Blockade mit CD154 spezifischen monoklonalen Antikörpern vorbehandelt wurden [40]. Des Weiteren werden seit Beginn der 90er Jahre transgene Spenderschweine generiert, welche das

human complement regulating protein (hCRP), das *human membrane cofactor protein (MCP)*, den *human decay accelerating factor (hDAF)* und das humane *hCD59* auf ihren Endothelzellen exprimieren. Wurden Herzen und Nieren dieser transgenen Schweine in nicht-humanen Primaten transplantiert, wurde die Komplement-Aktivierung (mit und ohne Antikörperbindung) unterbunden und die Hyperakute Abstoßung in Menschenaffen überwunden [41-44]. Das immunsuppressive Potential der „klassischen“ Immunsuppressiva, Cyclosporin A, Azathioprin, FK 506, Mykofenolat Mofetil, um nur einige zu nennen, genügt bislang nicht, um die Akuten Abstossungen nach der Transplantation einer xenogenen Schweineiere oder eines xenogenen Schweineherzens in nicht-humane Primaten zu verhindern. Die Kombinationsbehandlung, bestehend aus dem XAg und Cy würde – nach allem, was wir aus den hiesigen Experimenten gelernt haben – ebenfalls keine langfristige Transplantat-Akzeptanz herbeiführen. Sie bleibt aber, wie auch die o. g. Immunsuppressiva, eine interessante Option in Verbindung mit anderen Toleranz-induzierenden Strategien.

6. Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, ein Behandlungsprotokoll im xenogenen Modell *Ratte-anti-Mensch* zu entwickeln, mit dessen Hilfe die durch das Xenotransplantat induzierten Antikörper (XA-IgG, XA-IgM) – ggf. auch die natürlichen xenoreaktiven Antikörper (vorwiegend NXA-IgM) – im Empfänger wirkungsvoll gehemmt werden. Die in anderen *in vivo* Modellen erfolgreiche Kombinationsbehandlung, aus einer zeitlich korrelierten Injektion von Xenoantigen (XAg; hPBL) und Cyclophosphamid (Cy), bildete die Grundlage der hiesigen Untersuchungen. Sie beruht auf dem Prinzip der Stimulation/Deletion Cy-sensitiver B-Zellklone. Allerdings wurde das XAg nicht i. p. sondern i. v. appliziert, um seine schnellere und direktere Verfügbarkeit im Empfänger zu gewährleisten. Dazu erhielten LEW Ratten im Grundversuch 5×10^6 hPBL i. v. am Tag 0 und Cy 6x von Tag 0 bis Tag +5 i. p. Zu unterschiedlichen Zeiten vor und nach Behandlung wurde den Ratten Blut zur Serumgewinnung entnommen. Die Antikörpertiter wurden durch Bindung an ihre Zielzellen (hPBL; Lymphozytenfraktion), getrennt nach IgG und IgM, durchflußzytometrisch bestimmt. Folgende Ergebnisse wurden erzielt:

1. Die einmalige i. v. Applikation von XAg in LEW Ratten bewirkt einen starken Titer-Anstieg der XA-IgG und XA-IgM mit Isotypenwechsel von NXA-IgM zu Xenotransplantat-induzierten XA-IgG/XA-IgM. Dieser Anstieg gleicht jenem nach i. p. Applikation. Ein „Booster“ mit XAg am Tag +40 erhöht die Titer von XA-IgG und XA-IgM um 3 bzw. 2 Stufen; diese bleiben bis Tag +160 nahezu konstant.
2. Die Kombinationsbehandlung aus XAg i. v. und Cy i. p. hemmt die Neubildung der XA-IgG vollständig über 200 Tage, die der XA-IgM jedoch nur unvollständig. Die Neubildung der NXA wird nicht gehemmt. Die i. v. Sensibilisierung ist der i. p. Sensibilisierung im Sinne der Effektverstärkung (Hemmung) überlegen.
3. Ein „Booster“ mit XAg am Tag +40 kann die Neubildung der XA/NXA nicht hemmen. Insgesamt kehrt die humorale Reaktivität (XA-IgG; XA-IgM) auf normale Werte zurück, nachdem sie zuvor mit der Kombinationsbehandlung erfolgreich unterdrückt wurde.
4. Die Wiederholung der Kombinationsbehandlung am Tag +40 stabilisiert die starke Hemmung nach der ersten Kombinationsbehandlung. Die Nachbildung der NXA kann aber nicht verhindert werden.

5. Die verbleibenden XA-IgM/NXA-IgM Titer lassen sich auch durch Wiederholen der Kombinationsbehandlung, wenn ihr ein zweimaliger „Booster“ mit XAg vorausgeht, nicht senken. Die doppelte Antigen-Applikation hebt die erfolgreiche Hemmung in (4) wieder auf.
6. Die langfristige Applikation von niedrig dosiertem XAg über 30 Tage induziert sehr hohe XA-Titer und zeigt keine tolerogenen Eigenschaften. IgM und IgG erreichen ihre höchsten Titer lange vor dem Behandlungsende.
7. Die Kombinationsbehandlung, bestehend aus wiederholten niedrigen Antigengaben bis zum Tag +30 und einer 6tägigen Cy Behandlung (Tag 0 bis Tag +5) senkt die XA-IgM und XA-IgG vorübergehend auf 0. Die vielfachen Antigen-Applikationen haben jedoch keinen Antikörper-senkenden Effekt oder Reaktionslosigkeit zur Folge sondern induzieren die bekannten hohen und lange anhaltenden Titer.
8. Die langfristige Applikation von hoch dosiertem XAg über 30 Tage und in kürzeren Zeitintervallen verstärkt die humorale Immunantwort noch einmal gegenüber der Vergleichsgruppe mit der niedrigeren Dosierung (6).
9. Die Kombinationsbehandlung, bestehend aus wiederholten hohen Antigengaben bis zum Tag +30 und einer 6tägigen Cy Behandlung (Tag 0 bis Tag +5) senkt zwar XA-IgM und XA-IgG vorübergehend auf 0, langfristig und begrenzt jedoch nur die XA-IgG. Allerdings ist die Hemmung etwas stärker als nach Kombinationsbehandlung mit dem niedrig dosierten XAg. Dauerhafte humorale Reaktionslosigkeit wird auch mit diesem Protokoll nicht erreicht.

Das hier etablierte Behandlungspotokoll zur Hemmung der humoralen Immunantwort nach xenogener Organtransplantation ist in Teilansätzen sehr attraktiv. Allerdings hat sich inzwischen gezeigt, dass auch Cy, in Kombination mit anderen modernen Immunsuppressiva, offenbar nicht in der Lage ist, die akute Humorale Abstossung eines xenogenen (z.B. vom Schwein) stammenden vaskularisierten Organs in nicht-humanen Primaten langfristig zu verhindern. Um die xenogene Organtransplantation in die Klinik zu überführen, sind völlig neue B- (und T-)Zelltoleranz-induzierende Konzepte erforderlich.

7. Literaturverzeichnis

1. Auchincloss Jr., H., Sachs, D. H. (1988): Xenogeneic Transplantation. *Transplantation* 46: 1-20
2. Reemtsma, K. (1989): Xenografts. *Transplant. Proc.* 21: 517-518
3. Hammer, C. (1990): Xenografts: Do they have a future? *Contrib. Nephrol.* 86:165-179
4. Calne, R. Y. (1970): Organ transplantation between widely disparate species. *Transplant. Proc.* 2: 550-556
5. Reemtsma, K., Mc Cracken, B. H., Schlegel, J. U., Pearl, M. A., Pearce, C. W., De Witt, C. W., Smith, P. E., Hewitt, R. L., Flinner, R. L., Creech, O. (1964): Renal heterotransplantation in man. *Ann. Surg.* 160: 384-393
6. Starzl, T. E., Marchioro, T. L., Peters, G. N., Kirkpatrick, C. H., Wilson, W. E., Porter, K. A., Rifkind, D., Ogden, D. A., Hitchcock, C. R., Waddell, W. R. (1964): Renal heterotransplantation from baboon to man: experience with 6 cases. *Transplantation* 2: 752-776
7. Starzl, T. E. (1989): Baboon renal and chimpanzee liver heterotransplantation. In: M. A. Hardy (ed.) *Xenograft* 25. Excerpta Medica, Elsevier Science Publishers; Amsterdam, New York; p. 17-28
8. Samuelsson, B. E., Rydberg, L., Breimer, M. E., Backer, A., Gustavsson, M., Holgersson, J., Karlsson, E., Uyterwaal, A. C., Cairns, T., Welsh, K. (1994): Natural Antibodies and Human Xenotransplantation. *Immunol. Rev.* 141: 151-168
9. Bach, F. H. (1992): Discordant xenografting: A summary and look to the future. *Transplant. Proc.* 24: 739-742, review

10. Eckstein, V. (1994): Natürliche xenoreaktive Antikörper aus dem menschlichen Serum: Ihre immunbiologische Bedeutung hinsichtlich der klinischen Xenotransplantation von Langerhans-Inseln aus dem Schweinepankreas. Dissertationsschrift; Agrarwissenschaftliche Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

11. Samstein, B. and Platt, J. (2001): Physiologic and immunologic hurdles to xenotransplantation. *J. Am. Soc. Nephrol.* 12: 182-193

12. Vaughan, H. A., Dabkowski, P. L., McKenzie, I. F. C., Sandrin, M. S. (1993): Biochemical analysis of pig xenoantigens detected by human antibodies. *Transplant. Proc.* 25: 2919-2920

13. Igaz, P. (2001): Recent strategies to overcome the hyperacute rejection in pig to human xenotransplantation. *Yale J. Biol. Med.* 74: 329-340

14. Phelbs, C. J., Koike, C., Vaught, T. D., Boone, J., Wells, K. D., Chen, S. H., Ball, S., Specht, S. M., Polejaeva, I. A., Monahan, J. A., Jobst, P. M., Sharma, S. B., Lamborn, A. E., Garst, A. S., Moore, M., Demetris, A. J., Rudert, W. A., Bottino, R., Bertera, S., Trucco, M., Starzl, T. E., Dai, Y., Ayares, D. L. (2003): Production of alpha 1,3-galactosyltransferase-deficient pigs. *Science* 299: 411-414

15. Breitreutz, A. (1995): Beeinflussung der humoralen Reaktivität gegen Xenoantigen im diskordanten Modell Ratte-anti-Mensch durch Antigen-Cyclophosphamid-Kombinationsbehandlung. Dissertationsschrift; Medizinische Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

16. Herrlinger, J. D., Müller-Ruchholtz, W. (1973): Hemmung der Antikörperbildung sensibilisierter Tiere. I. Vergleich von Cyclophosphamid und Cyclophosphamid/Antigen-Behandlung. *Z. Immun. Forsch.* 146: 195-206

17. Herrlinger, J. D., Müller-Ruchholtz, W. (1978): Different suppressive effects of combined cyclophosphamide-antigen treatment compared with exclusive cyclo-

phosphamide treatment on primary and secondary humoral immune reactivity. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 57: 82-89

18. Tomita, Y., Mayumi, H., Eto, M., Nomoto, K. (1990): Importance of suppressor T cells in cyclophosphamide-induced tolerance to the non-H-2-encoded alloantigens. Is mixed chimerism really required in maintaining a skin allograft tolerance? *J. Immunol.* 144: 463-470
19. Eto, M., Mayumi, H., Tomita, Y., Yoshikai, Y., Nishimura, Y., Nomoto, K. (1990): Sequential mechanisms of cyclophosphamide-induced skin allograft tolerance including the intrathymic clonal deletion followed by late breakdown of the clonal deletion. *J. Immunol.* 145: 1303-1310
20. Roitt, I., Brostoff, J., Male, D. (1998): *Immunology*. 5th Edition, Mosby International, London
21. Groth, J., Steinmann, J., Eckstein, V., Müller-Ruchholtz, W. (1991): Freezing of cells – replacement of serum by oxypolygelatine. *J. Immunol. Meth.* 141:105-109
22. Brock, N., Gross, R., Hohorst, H. J., Klein, H. O., Schneider, B. (1971): Activation of cyclophosphamide in man and animals. *Cancer* 27: 1512-1529
23. Herrlinger, J. D. (1976): Antigen-spezifische Unterdrückung der Antikörperbildung sensibilisierter Tiere. Untersuchung zur selektiven Reaktionsverminderung mit Hilfe einer kombinierten Antigen-Cytostatikum-Behandlung an sensibilisierten Ratten. Habilitationsschrift; Medizinische Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
24. Pooley, J. L., Heath, W. R., Shortman, K. (2001): Cutting edge: intravenous soluble antigen is presented to CD4 T cells by dendritic cells, but cross-presented to CD8 T cells by CD8⁺ dendritic cells. *J. Immunol.* 166: 5327-5330
25. Platt, J. L., Bach, F. H. (1991): The barrier to xenotransplantation. *Transplantation* 52: 937-947

26. Stockman, G. D., Heim, L. R., South, M. A., Trentin, J. J. (1973): Differential effects of cyclophosphamide on the B and T cell compartments of adult mice. *J. Immunol.* 110: 277-282
27. Murase, N., Starzl, T. E., Demetris, A. J., Valdivia, L., Tanabe, M., Cramer, D., Makowka, L. (1993): Hamster-to-rat heart and liver xenotransplantation with FK506 plus antiproliferative drugs. *Transplantation* 55: 701-707
28. Cupps, T. R., Edgar, L. C., Fauci, A. S. (1982): Suppression of human B lymphocyte function by cyclophosphamide. *J. Immunol.* 128: 2453-2457
29. Ashton-Chess, J., Meurette, G., Karam, G., Petzold, T., Minault, D., Naulet, J., Tesson, L., Plat, M., Anegon, I., Soulillou, J. P., Blanche, G. (2004): The study of mitoxantrone as a potential immunosuppressor in transgenic pig renal xenotransplantation in baboons: comparison with cyclophosphamide. *Xenotransplantation* 11: 112-122
30. White, S. A., Nicholson, M. I. (1999): Xenotransplantation. *Br. J. Surg.* 86: 1499-1514
31. Springer, G. F., Horton, R. E., Forbes, M. (1959): Origin of anti-human blood group B agglutinins in white leghorn chicks. *J. Exp. Med.* 110: 221-224
32. Galili, U. (1993): Interaction of the natural anti-Gal antibody with alpha galactosyl epitopes: a major obstacle for xenotransplantation in humans. *Immunol. Today* 14: 480-482
33. Wang, L., Radic, M. Z., Galili, U. (1995): Human anti-gal heavy chain genes. Preferential use of VH3 and the presence of somatic mutations. *J. Immunol.* 155: 1276-1285
34. Kearns-Jonker, M., Swensson, J., Ghiuzeli, C., Chu, W., Osame, Y., Starnes, V., Cramer, D. V. (1999): The human antibody response to porcine xenoantigens is en-

- coded by IGHV3-11 and IGHV3-74 IgVH germline progenitors. *J. Immunol.* 163: 4399-4412
35. Gojo, S., Bartholomew, A., Xu, Y., Neethling, F. A., Awwad, M., Saidman, S., Cosimi, A. B., Cooper, D. K. C. (2000): Anti-Gal α 1-3Gal antibody levels in organ transplantant recipients receiving immunosuppressive therapy. *Transplantation* 69: 914-917
 36. Brenner, P., Reichenspurner, H., Schmoeckel, M., Wimmer, C., Rucker, A., Eder, V., Meiser, B., Hinz, M., Felbinger, T., Müller-Hocker, J., Hammer, C., Reichart, B. (2000): IG-therasorb immunoapheresis in orthotopic xenotransplantation of baboon with landrace pig hearts. *Transplantation* 69: 208-214
 37. Lin, Y., Soares, M. P., Sato, K., Csizmadia, E., Robson, S. C., Smith, N., Bach, F. H. (2000): Long-term survival of hamster hearts in presensitized rats. *J. Immunol.* 164: 4883-4892
 38. Sablinski, T., Gianello, P. R., Bailin, M., Bergen K. S., Emery, D. W., Fishman, J. A., Foley, A., Hatch, R. J., Hawley, R. J., Kozlowski, T., Lorf, T., Meehan, S., Monroy, R., Powelson, J. A., Colvin, R. B., Cosimi, A. B., Sachs, D. H. (1997): Pig to monkey bone marrow and kidney xenotransplantation. *Surgery* 121: 381-391
 39. Chen, G., Qian, H., Starzl, T., Sun, H., Garcia, B., Wang, X., Wise, Y., Liu, Y., Xiang, Y., Copeman, L., Liu, W., Jevnikar, A., Wall, W., Cooper, D. K. C., Murase, N., Dai, Y., Wang, W., Xiong, Y., White, D. J., Zhong, R. (2005): Acute rejection is associated with antibodies to non-Gal antigens in baboons using Gal-knockout pig kidneys. *Nat. Med.* 11: 1295-1298
 40. Yamada, K., Yazawa, K., Shimizu, A., Iwanaga, T., Hisashi, Y., Nuhn, M., O'Malley, P., Nobori, S., Vagefi, P. A., Patience, C., Fishman, J., Cooper, D. K., Hawley, R. J., Greenstein, J., Schuurman, H. J., Awwad, M., Sykes, M., Sachs, D. H. (2005): Marked prolongation of porcine renal xenograft survival in baboons through the use of alpha1,3-galactosyltransferase gene-knockout donors and the co-transplantation of vascularized thymic tissue. *Nat. Med.* 11: 32-34

41. Cozzi, E., Yannoutsos, N., Langford, G. A., Pinot-Chavet, G., Wallwork, J., White, D. J. G. (1997): Effect of transgenic expression of human decay-accelerating factor on the inhibition of hyperacute rejection of pig organs. In: Cooper, D. K. C., Kemp, E., Platt, J. L., White, D. J. G. (eds.). *Xenotransplantation: The Transplantation of Organs and Tissues Between Species*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York; p. 665-682
42. Byrne, G. W., McCurry, K. R., Martin, M. J., McClellan, S. M., Platt, J. L., Logan, J. S. (1997): Transgenic pigs expressing human CD59 and decay accelerating factor produce an intrinsic barrier to complement-mediated damage. *Transplantation* 63: 149-155
43. Carrington, C. A., Richards, A. C., van den Bogaerde J., Trucker, A. W., White, D. J. G. (1997): Complement activation, its consequences, and blockade by gene transfer. *World J. Surg.* 21: 907-912
44. Cozzi, E., Bhatti, F., Schmoeckel, M., Chavez, G., Smith, K. G. C., Zaidi, A., Bradley, J. R., Thiru, S., Goddard, M., Vial, C., Ostlie, D., Wallwork, J., White, D. J. G., Friend, P. J. (2000): Long-term survival of non-human primates receiving life-supporting transgenic porcine kidney xenografts. *Transplantation* 70: 15-21

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Professor Dr. rer. nat. K. Ulrichs, Experimentelle Transplantations-Immunologie, Chirurgische Klinik I, Universität Würzburg, für die Betreuung meiner Arbeit – besonders auch nach ihrem Wechsel von Kiel nach Würzburg. Für die Überlassung des interessanten Themas, für motivierende und kritische Diskussionen und Anregungen bedanke ich mich sehr herzlich bei ihr.

Sehr danken möchte ich Herrn Professor Dr. med. Prof. h. c. A. Thiede, Direktor der Chirurgischen Klinik I am Zentrum für Operative Medizin der Universität Würzburg, für die Übernahme des Korreferates.

Herrn Professor Dr. Dr. Dr. h.c. W. Müller-Ruchholtz, ehemals Direktor des Instituts für Immunologie an der Universität Kiel, danke ich sehr für die Überlassung des Arbeitsplatzes, seine finanzielle Unterstützung und freundlichen, sachkritischen Anmerkungen in den „Mittwoch-Morgen-Runden“. In seinem Institut entstanden die experimentellen Arbeiten.

Dankbar bin ich Herrn Dr. agr. V. Eckstein, der mich in die Arbeit mit dem FACScan eingeführt hat, und der mir bei der Lösung von Problemen stets hilfreich und freundlich zur Seite stand.

Frau I. Chodnevskaja, Abteilung für Experimentelle Transplantations-Immunologie, Chirurgie I, Klinikum Würzburg, danke ich sehr für ihre technische Unterstützung und Hilfe bei den Korrekturen während der Anfertigung meiner Arbeit.

Allen Kolleginnen und Kollegen im Institut für Immunologie in Kiel danke ich für ihre freundschaftliche Hilfe und exzellente technische Assistenz, wann immer diese erforderlich war.

Lebenslauf

Personalien

Name	Alexander Scholz
Geburtsdatum	03. November 1967
Geburtsort	Mannheim
Familienstand	verheiratet, 2 Kinder
Staatsangehörigkeit	deutsch

Schule

1973-1977	Grundschule Viernheim, Grundschule Moorrege
1977-1984	Ludwig-Meyn-Gymnasium, Uetersen
1984-1987	Heinrich-Heine-Gymnasium, Kreis Plön, Heikendorf
05/1987	Abitur

Bundeswehr

07/1987 – 08/1989	Zeitsoldat, zwei Jahre Sanitätsdienst bei der Bundesmarine im Schiffahrtmedizinischen Institut Kronshagen, Abteilung Tauchermedizin
-------------------	---

Hochschulstudium

10/1989	Medizinstudium an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
08/1991	Physikum
08/1992	Erstes Staatsexamen
03/1995	Zweites Staatsexamen
12/1996	Drittes Staatsexamen

Promotionsarbeit

seit 01/1992	Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, Institut für Immunologie, (damaliger Direktor: Prof. Dr. Dr. W. Müller-Ruchholtz, Betreuung der Arbeit durch Frau Prof. K. Ulrichs; Thema: „Manipulation der humoralen Immunreaktivität gegen humanes Xenoaantigen im Modell <i>Ratte-anti-Mensch</i> durch eine Antigen-Cyclophosphamid-Kombinationsbehandlung“
01/1992 – 09/1994	Praktische Durchführung der experimentellen Arbeiten an Ratten

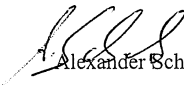
Ärztliche Tätigkeit

- 01/1997 – 06/1998 Arzt im Praktikum an der Lubinus-Klinik, Kiel, Klinik für Chirurgie, Traumatologie, Handchirurgie, Endoprothetik, Wirbelsäulenchirurgie, Kinderorthopädie, Gefäßchirurgie, Rheumatologie und Anästhesiologie
01. 07. 1998 Approbation als Arzt
- seit 07/1998 Assistenzarzt in Weiterbildung zum Facharzt für Orthopädie an der Lubinus-Klinik, Kiel (Ärztlicher Direktor: Dr. P. Lubinus)
27. 09. 2003 Facharzt für Orthopädie an der Lubinus-Klinik, Kiel, Abteilung für Unfallchirurgie, Arthroskopische und Rekonstruktive Chirurgie, (Chefarzt: Dr. H. Laprell, Ärztlicher Direktor: Dr. P. Lubinus)

Fachkunden

- seit 03/2001 Fachkunde Strahlenschutz
- seit 01/2002 Fachkunde Rettungsdienst
- seit 06/2005 Zusatzbezeichnung Chirotherapie
- seit 07/2005 Fortbildungszertifikat

Kiel, im Februar 2006


Alexander Scholz

