



Nach Zellen angeln

Die Zelltherapie ist eine große Hoffnung im Kampf gegen Krankheiten. Doch die Gewinnung von Spenderzellen ist eine Herausforderung. Mit einer neuen sanften Methode lassen sich gezielt Zellen aus Spendermaterial fischen, ohne dass sie Schaden nehmen

Link
www.mikrobio.med.tu-muenchen.de

Wären Dirk Busch und Christian Stemberger Sportfischer, dann würden ihnen die Angler dieser Welt vermutlich zu Füßen liegen, denn die beiden Forscher vom Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene der Technischen Universität München haben so etwas wie den sanften Angelhaken erdacht. Wer Fischen nachstellt, der muss den richtigen Haken wählen, die richtige Form, Farbe und den richtigen Schwimmer. Immerhin soll am Ende nur die gewünschte Spezies an der Angel zappeln – Dorsch oder Hering. Doch hat der Fisch endlich zugebissen, beginnt das Malheur. Wie den Haken entfernen, ohne das arme Tier zu quälen oder ihm das Maul zu zerreißen? Freilich fangen die Münchner Forscher keine Fische. Dennoch ähnelt ihre Arbeit durchaus der eines Anglers: Ihre Beute sind die Zellen des menschlichen

Körpers, vor allem Immunzellen, sogenannte T-Zellen, und weil die so empfindlich sind, kommt der wunderbare Angelhaken zum Einsatz – einer, der genau die gewünschten Zellen packt, sich aber quasi mit einem Fingerschnipp vom Fang lösen lässt, ohne dass der Blessuren davonträgt.

Körpereigene Raumpatrouille

Immunzellen sind die Polizei im Organismus. Sie fahnden permanent nach Krankheitserregern – zum Beispiel nach Bakterien oder Viren. Zu dieser körpereigenen Raumpatrouille gehören auch die T-Zellen, denen Busch und Stemberger mit ihrer molekularen Angel besonders intensiv nachstellen. T-Zellen erkennen Fremdkörper sehr genau. Von ihnen gibt es verschiedene Varianten. „Zytotoxische T-Zellen“ etwa können sogar Erreger auf-

spüren und beseitigen, die sich im Innern körpereigener Zellen versteckt halten. Ein gesunder Organismus kann sich auf seine T-Zellen verlassen. Doch ist der Körper geschwächt, können die Angreifer die Oberhand gewinnen. Dann werden mitunter sogar simple Herpesviren lebensgefährlich, mit denen die T-Zellen normalerweise spielend fertigwerden. Besonders bedroht sind Menschen, deren Immunsystem während einer Therapie bewusst zerstört wurde, was zum Beispiel bei der Behandlung von Tumorerkrankungen häufig nötig ist. Ein Extremfall sind Patienten mit Leukämie-Erkrankungen, dem Blutkrebs. Hier haben sich die Zellen des Immunsystems selbst in Tumorzellen verwandelt. Die Behandlung nimmt daher zwangsläufig das körpereigene Abwehrsystem unter Beschuss. In einigen Fällen kann man die Betroffenen durch eine Knochenmarkspende retten.

Zunächst werden durch Medikamente oder Bestrahlung die Krebszellen im Patienten zerstört. Das betrifft auch die Immunfabrik im Knochenmark. So wird das gesamte Immunsystem vernichtet. Anschließend muss es neu aufgebaut werden. Zu diesem Zweck gibt man dem Betroffenen Knochenmark von einem gesunden Spender. Da die Knochenmarkszellen ausgesprochen teilungsfreudig sind, entwickelt sich daraus schnell ein neues Immunsystem.

T-Zellen an der Angel

Doch bis der Patient eine neue Immunität aufgebaut hat, kann mitunter ein ganzes Jahr vergehen. In dieser Zeit ist er anfällig für Krankheitserreger, auch solche, die eigentlich harmlos sind. Der Grund: Im geschwächten Patienten fehlen genau jene erregerspezifischen ▶

T-Zellen, die auch der Gesunde ständig benötigt, um eindringende Keime zu bekämpfen und nicht zu erkranken. Doch gerade diese T-Zellen werden nur sehr langsam neu gebildet. Genau hier setzt das Angelprinzip von Busch und Stemberger an. Die Forscher haben eine Methode entwickelt, mit der sie im Blut von Spendern zielsicher nach T-Zellen gegen bestimmte Krankheitserreger fischen können. Das Besondere: Die Angelmethode ist so sanft, dass die T-Zellen den Fang völlig unbeschadet überstehen und dem Patienten quasi im frischen Zustand direkt gespritzt werden können. Innerhalb kürzester Zeit bekämpfen die T-Zellen dann die Erreger – wie ein mobiles Sondereinsatzkommando, das im Notfall eingeflogen wird.

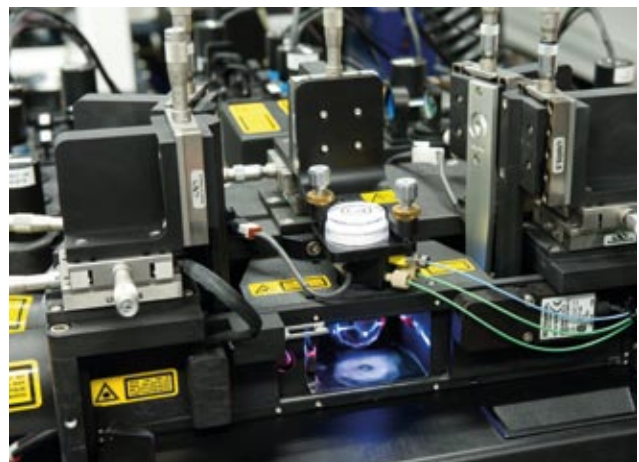
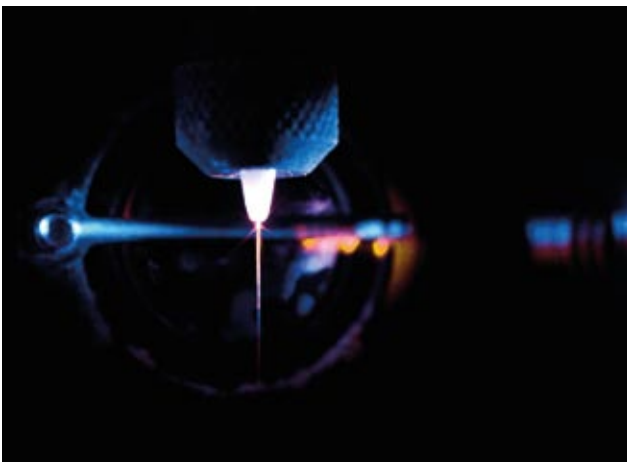
Angriffe aus dem eigenen Körper

Nach einer Knochenmarkstransplantation werden die Patienten dazu angehalten, in keimarmen Umgebung zu leben. Sie müssen sich von ihren Zimmerpflanzen verabschieden, denn in den Blumentöpfen tummeln sich etliche Bakterien und Pilze. Und bei der Begrüßung sollten sie auf den Händedruck verzichten. Doch manche Erreger schlummern permanent im Körper des Menschen. Das Epstein-Barr-Virus etwa, ein Erreger aus der Gruppe der Herpesviren, lebt in fast jedem Menschen, ohne dass man es merkt oder erkrankt. Gleiches gilt für

Rechts: In kleinen Laborgefäßen, den Eppendorf-Caps, fügen die Forscher vom Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene die verschiedenen molekularen Komponenten zur T-Zell-Angel, dem MHC-Streptamer, zusammen

Unten: Mit Laserlicht erfasst das Durchflusszytometer Zellen, die in einem dünnen Flüssigkeitsstrahl aus einer Düse austreten. Das Gerät registriert pro Sekunde bis zu 100.000 Zellen

das Cytomegalo-Virus (CMV), das in etwa 60 Prozent aller Menschen wohnt. Solche Viren verstecken sich über lange Zeit in Körperzellen. Dort bleiben sie für das Immunsystem und die T-Zellen unsichtbar. Wenn aber die Körperabwehr schwächelt oder durch eine Krebstherapie ganz ausgeschaltet ist, dann erwachen die Viren zu neuem Leben. Für die meisten Menschen bleibt das ohne große Folgen. Nach einer Knochenmarkspende aber kann das lebensbedrohlich sein. Vor allem das CMV führt immer wieder zu gefährlichen Infektionen. Zwar züchtet man schon seit vielen Jahren T-Zellen in Laborgefäßen. Doch diese Arbeit ist mühsam. Einem Spender müssen Blutproben entnommen, daraus die T-Zellen extrahiert und anschließend vermehrt werden. Erst nach Wochen ist genug Zellmasse da, um sie dem Patienten zu verabreichen. Ein weiteres Problem besteht darin, dass die T-Zellen aus der Laborkultur einen regelrechten Schock bekommen, wenn sie schließlich im Körper des Patienten landen. Diesen umständlichen Weg wollen die Münchener mit ihrer Methode deutlich abkürzen. Sie setzen auf den Direktimport von T-Zellen aus dem Spender in den Patienten. Der Vorteil wäre enorm: Patienten könnte man künftig schnell und individuell auf ihre Situation zugeschnitten T-Zellen spritzen. Die Methode funktioniert, so viel scheint sicher. In einer kürzlich begonnenen klinischen Studie wurden erste >



Fotos: Werner Bachmeier



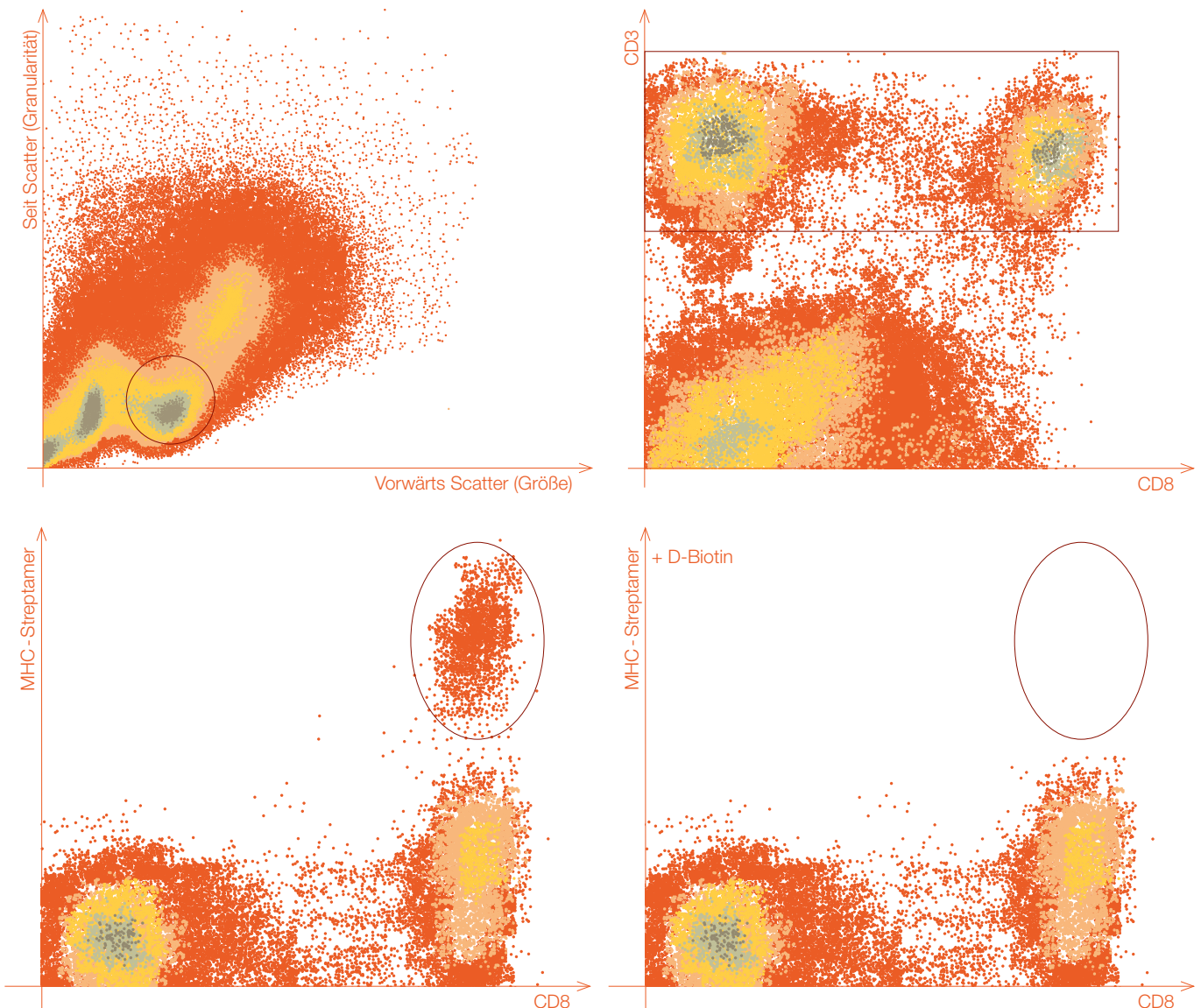
Die Suche nach der Nadel im Heuhaufen

Wie das Streptamer-Verfahren Zellgemische auftrennt, lässt sich gut anhand dieser nachgestellten Punktwolken-Darstellung erläutern, die die Ergebnisse einer Durchflusszytometer-Analyse schematisch darstellt. Die Methode verrät den Forschern, wie viele Zellen verschiedener Zelltypen in der Probe vorhanden sind. Zu diesem Zweck wurden die Zellen aus einer Blutprobe mit zwei fluoreszenzmarkierten Antikörpern und einem Streptamer behandelt. Der eine Antikörper bindet an das weitverbreitete CD3-Oberflächenprotein von Zellen, der andere an das CD8-Protein.

Das MHC-Streptamer wiederum markiert selektiv jene CD8-T-Zellen, die spezifisch CMV-infizierte Zellen erkennen. Aufgrund der unterschiedlichen Fluoreszenzmarker erkennt das Durchflusszytometer die verschiedenen Zellen sehr genau. Das Ergebnis ist eine Grafik, in der die Häufigkeitsverteilung der verschiedenen Zelltypen dargestellt ist. Die Abbildung links oben zeigt zunächst nur eine Auftrennung nach Größe (x-Achse) und Feinkörnigkeit (Granularität; y-Achse) der Zellen. Antikörper und Streptamer wurden hier noch nicht berücksichtigt. Die relevanten Immunzel-

len (Lymphozyten) befinden sich im Kreis. Das Bild rechts oben stellt diese Zellgruppe im Detail dar, die weiter aufgetrennt wurde. Dazu wurde analysiert, welche Zellen CD3-Oberflächenproteine (Rechteck) und welche CD8-Oberflächenproteine (kleine Wolke rechts oben innerhalb der CD3-Zellen) aufweisen.

In der kleinen CD8-Zellpopulation befinden sich auch die gesuchten T-Zellen, die für CMV spezifisch sind. Markiert man diese mit Streptameren, lassen sie sich exakt von den übrigen CD8-Zellen abtrennen (Bild links unten, kleine Wolke im Oval). Das Ziel der Forscher ist nun, diese virusspezifischen Zellen sehr genau von den übrigen (unspezifischen) T-Zellen z. B. mittels magnetischer- oder durchflusszytometrischer Zellsortierung zu isolieren. Nach erfolgter Isolation kann dann das Streptamer durch Zugabe von D-Biotin vollständig von den Zielzellen entfernt werden (das Prinzip ist rechts unten dargestellt). Nun ist man bestrebt, durch den Einsatz verschiedener Marker Zellgemische künftig immer weiter aufzutrennen und so genau die gewünschten Zelltypen ohne verbleibende Marker zu gewinnen.



Patienten erfolgreich behandelt. Nach einer Knochenmarkspende waren sie an CMV-Infektionen erkrankt. Damit zeichnet sich ab, dass die Forscher mit ihren gefischten T-Zellen dem CMV tatsächlich den Garaus machen können.

Doch der Weg bis dahin war lang. Rund zehn Jahre hat die Entwicklung der sanften Angelmethode gedauert. Mitte der 1990er-Jahre hörte Dirk Busch, der damals an der Yale University in den USA arbeitete, davon, dass es Forschern von der Stanford University erstmals gelungen war, erregerspezifische T-Zellen in komplexen Zellgemischen wie etwa Blutproben sichtbar zu machen – mithilfe von Nachweissubstanzen, Markern, die sich an die T-Zellen heften. Dirk Busch konnte diese neue Methodik schnell zur genauen Untersuchung von Immunreaktionen bei Infektionen weiterentwickeln. Mit seinem Wechsel an die TUM im Jahr 1999 widmete sich Busch dann erstmals der Frage, ob man die neue Technologie nicht auch zur Gewinnung und Aufreinigung erregerspezifischer T-Zellen und möglicherweise zur Therapie von Infektionserkrankungen einsetzen könnte. Doch kopelte sich der Marker zunächst so fest an die T-Zellen, dass er kaum noch zu lösen war.

TUM-Kollege inspiriert zu neuer Forschung

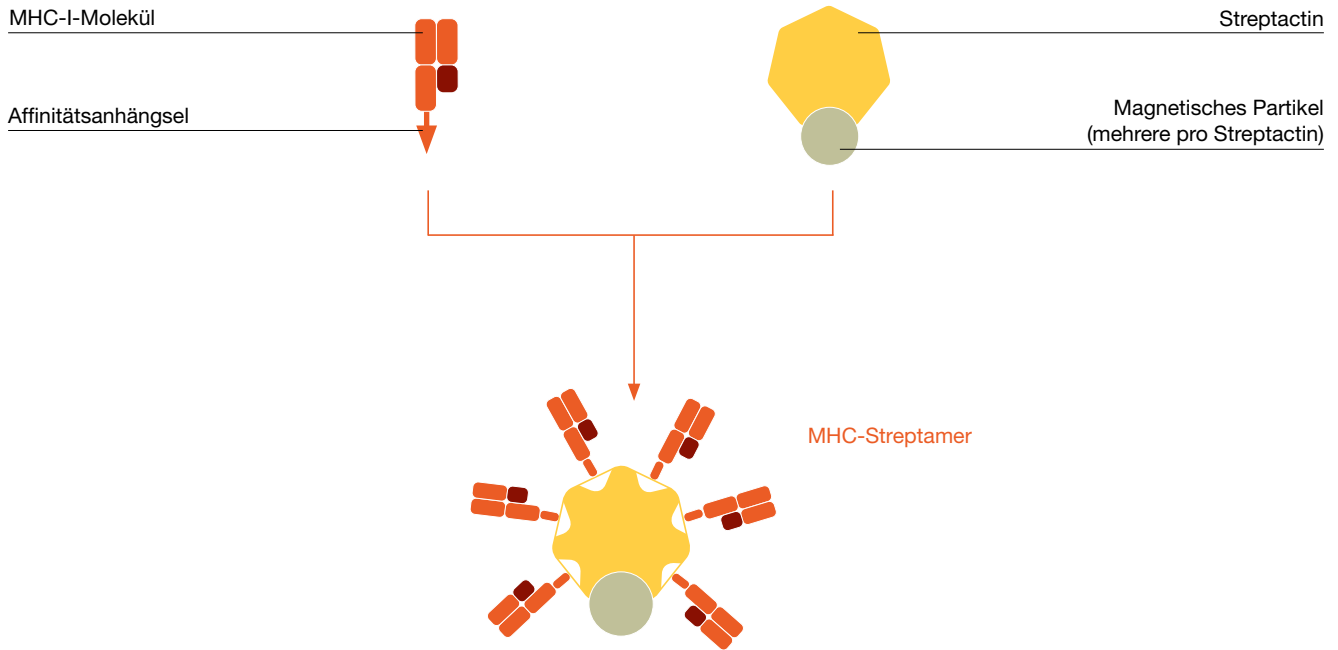
„Etwa zur gleichen Zeit wurde mir bewusst, dass ein Kollege hier an der TUM, Professor Arne Skerra, einen Weg gefunden hatte, Eiweiße aus einer Lösung zu fischen, um diese aufzureinigen“, erzählt Busch. Der Clou: Die Eiweiße ließen sich leicht wieder vom Fängermolekül lösen. Beide Arbeiten hatten nichts miteinander zu tun. Busch aber dämmerte es, dass beide Bausteine zusammen zum Erfolg führen könnten. Gemeinsam mit anderen Forschern machte er sich an die Arbeit und entwickelte seine ganz eigene, sanfte T-Zell-Angel. Auf der Oberflä-

che von T-Zellen sitzen kleine molekulare Anhängsel, T-Zell-Rezeptoren (TCR, T-Cell-Receptor), die zielsicher an bestimmte körpereigene Strukturen binden. Sie werden dann aktiv, wenn sich von Viren befallene Körperzellen melden. Die Körperzellen transportieren Fragmente des eingedrungenen Virus, beispielsweise der Virenhülle, an ihre Zelloberfläche und binden sie dort wie eine Art Signalfolge fest. MHC, Major Histocompatibility Complex, nennt man etwas kryptisch diese großen Moleküle auf der Oberfläche einer befallenen Zelle. Genau diese Moleküle nehmen die T-Zell-Rezeptoren wahr.

Für gewöhnlich kommt der Mensch in seinem Leben mehrfach mit ähnlichen Krankheitserregern in Berührung, beispielsweise Schnupfenviren. Beim ersten Kontakt lernt das Immunsystem den Erreger kennen. Es bildet T-Zellen aus, deren TCR den Erreger identifizieren kön- ▷



Prof. Dr. Dirk Busch (links) und Dr. Christian Stemberger bei der Besprechung von Laborergebnissen



Das Streptamer-Verfahren im Detail: Ein spezifisches MHC-Streptamer besteht aus verschiedenen molekularen Komponenten (links), dem gewünschten spezifischen MHC-Komplex und einem magnetisch markierten Streptactinmolekül. Letztlich funktioniert das MHC-Streptamer, indem es sehr gezielt an die Oberflächenstrukturen der Zielzellen, den T-Zell-Rezeptor (TCR), bindet (rechts, Zelle mit roten Stäbchen). Durch Gabe von Biotin wird der Streptamer-Komplex demontiert und der molekulare Angelhaken gelöst

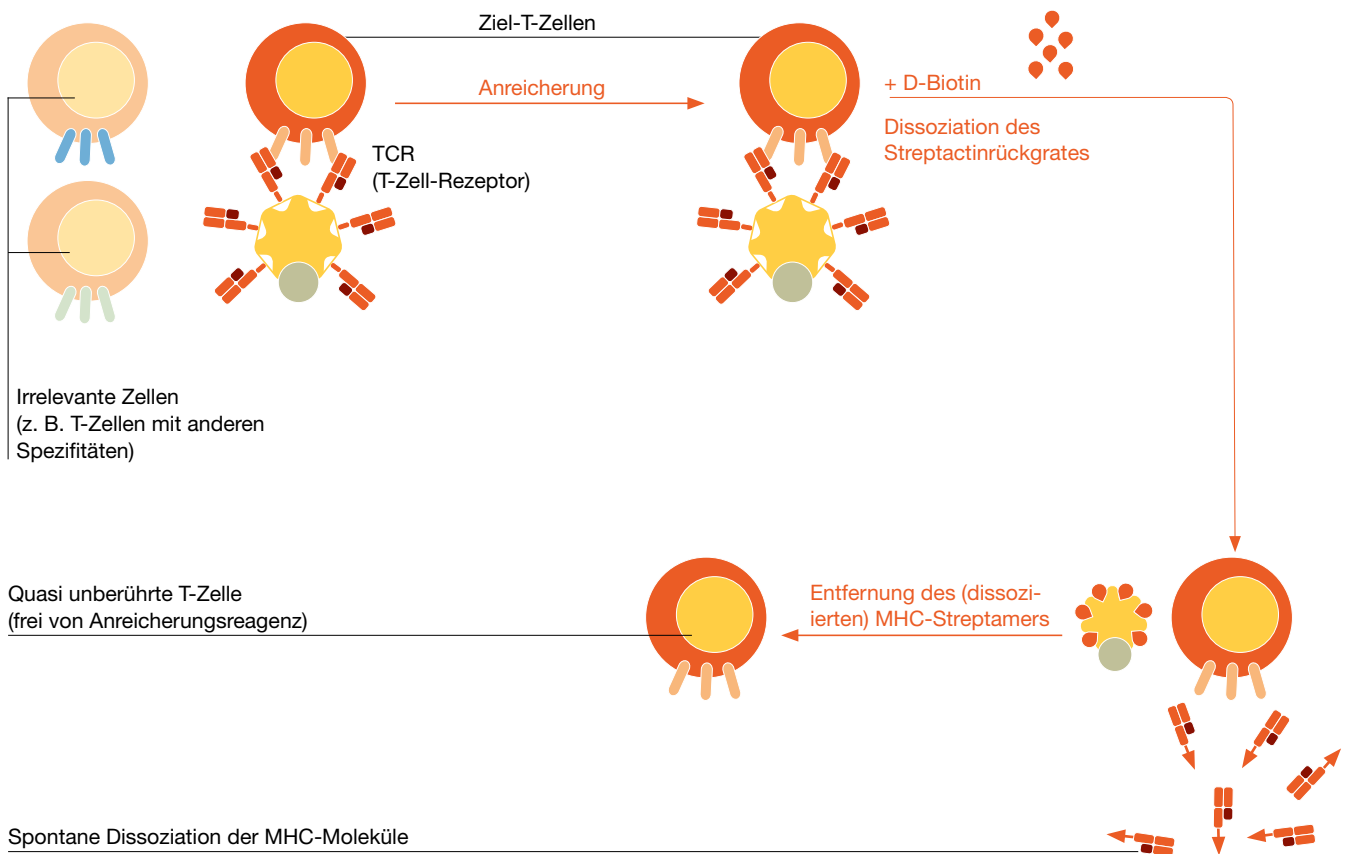
Grafik: edlundsepp

nen. So entsteht das Gedächtnis des Immunsystems. Bei der nächsten Infektion sind sofort T-Zellen zur Stelle, die den bekannten Verdächtigen dingfest machen. Die T-Zellen werden dann vom MHC auf der infizierten Zelle angezogen. Sie docken mit ihrem T-Zell-Rezeptor an das MHC an – und zerstören die infizierte Zelle und damit die in ihr versteckten Viren. Tatsächlich kann man im Labor mithilfe gentechnischer Methoden MHC-Moleküle synthetisieren und damit künstliche T-Zell-Angelhaken herstellen. Die Bindungsstärke eines MHC aber reicht nicht aus, um eine ganze T-Zelle zu schnappen. Man benötigt mehrere MHC-Haken. Das hatten schon die Forscher um Mark Davis von der Stanford University erkannt. Sie entwickelten deshalb ein Molekül mit mehreren MHC-Haken, das MHC-Tetramer. Das bindet an mehrere T-Zell-Rezeptoren und hält die T-Zelle ausreichend fest.

Allerdings war die Bindung so fest, dass sich das Tetramer nicht mehr von der T-Zelle abtrennen ließ, ohne sie in Mitleidenschaft zu ziehen.

Starke Verbindung, sanfte Trennung

Busch ging deshalb für seine eigene Angelmaschine den entscheidenden Schritt weiter. Angeregt durch die Entwicklungen von Skerra, baute er in das MHC-Tetramer eine Art Sollbruchstelle ein. Das neue Molekül taufte er MHC-Streptamer. Gibt man jetzt das Provitamin Biotin in winzigen Mengen hinzu, so löst sich das MHC in Sekundenschnelle und gibt die T-Zelle wieder frei. Damit hatte Busch seinen perfekten Angelhaken entwickelt, der zielsicher greift und leicht ablösbar ist. Seine Arbeit bescherte ihm eine Veröffentlichung im angesehenen Forschungsmagazin Nature Medicine.



Die Erfindung des biotinsteuerten MHC-Streptamer-Hakens liegt einige Jahre zurück. Inzwischen hat Busch das T-Zell-Fischen mit den MHC-Streptameren perfektioniert. Wenn es ans Angeln geht, synthetisieren er und seine Mitarbeiter zunächst passende MHC-Moleküle, damit schnappen sie die gewünschten T-Zellen aus der Blutprobe, etwa solche zur Bekämpfung von Cytomegalovirus-Infektionen. Derzeit hängen die Forscher magnetisierte Streptamer-Moleküle an die T-Zellen an. So lassen sich diese im magnetischen Feld sauber aus der Blutprobe ziehen. Unmittelbar danach wird Biotin zugegeben, um die MHC-Streptamere zu zerstören und von den T-Zellen abzuspalten. Dann werden die T-Zellen in einer Zentrifuge von MHC und Streptamer getrennt. Doch Busch will mehr. Er ist der Kopf der Focus Group „Clinical Cell Processing and Purification“ am Institute

for Advanced Study der TUM. Und die hat sich, wie der Name sagt, ganz allgemein der Aufbereitung und Reinigung von klinisch bedeutsamen Zellen verschrieben. „Die Gabe von T-Zellen ist nur eine Variante der Zelltherapie“, sagt Busch. „Es gibt viele andere Immunzellen, die sich für die Behandlung von Krankheiten einsetzen lassen. Wir konzentrieren uns daher nicht allein auf T-Zellen.“ Ein Beispiel sind Immunzellen, die allergische Reaktionen oder Autoimmunerkrankungen eindämmen. Denn bei manchen Allergien wird das Immunsystem durch Stoffe aus der Umwelt so weit gereizt, dass es Entzündungsreaktionen auslöst, die den eigenen Körper angreifen. Hier wäre eine Behandlung mit Immunzellen denkbar, welche die überschießende Immunreaktion gezielt zurückfahren. ▶



Oben: Zur besseren Unterscheidung verschiedener Zelltypen heften die Münchener unterschiedlich gefärbte Fluoreszenzmarker an die Streptamer-Komplexe

Unten: Für ihre Laborexperimente müssen die Forscher Spenderblut in seine Bestandteile auftrennen und die roten Blutkörperchen oder das Blutplasma entfernen. Von Interesse ist vor allem jene kleine Fraktion, die die Immunzellen enthält

Die gesuchten Zellen sichtbar machen

Der Biologe Christian Stemberger arbeitet in Buschs Forschungsgruppe daran, die Angelmethode zu verfeinern und zu diversifizieren. So versucht er, Streptamere zu entwickeln, die nach anderen Zellen schnappen. Ein erster Schritt ist es, die Zellen sichtbar zu machen, wofür statt der MHC-Moleküle andere Bindungspartner nötig sind. Eine Alternative sind Teile von Antikörpern – sogenannte Fab-Fragmente. Ihr Vorteil besteht darin, dass man im Grunde für jedes beliebige Oberflächenmolekül passende Fab-Fragmente synthetisieren kann. Damit wird die Markierung von vielen verschiedenen Zelltypen möglich. Zusätzlich heftet man sogenannte Fluoreszenzmarker an die Fab-Moleküle, Farbstoffe, die mit Laserlicht zum Leuchten angeregt werden. Auch die Fab-Fragmente lassen sich zum Mehrfach-Haken-Streptamer umbauen. Docken diese farbigen Fab-Streptamere an, wird die Zelle sichtbar. Stembergers Ziel ist es, verschiedene Fab-Streptamere mit unterschiedlichen Farbstoffen einzusetzen, um in einem Gemisch von Zellen, wie man es zum Beispiel in einer Blutprobe findet, die verschiedenen Zellen zu erkennen. Seit einiger Zeit gibt es die dafür erforderliche Technik – die Durchflusszytometrie. Diese Apparate sind in der Lage, farbmarkierte Partikel oder eben Zellen zu erkennen, die in rasendem Tempo durch die Maschine sausen – bis zu 100.000 Stück pro Sekunde. „Man kann damit sogar Zellen voneinander trennen. Diese Aufreinigung ist deutlich sauberer als bei der magnetischen Methode“, sagt Stemberger. Für den klinischen Einsatz ist genau diese saubere Aufreinigung wichtig. Denn es gibt durchaus T-Zell-Typen, die dem Patienten auch Schaden zufügen können. Die Forscher müssen daher genau darauf achten, die richtigen Zellen zu fischen.

Eine sanfte Angel für verschiedene Zelltypen wäre eine attraktive Lösung für die Zelltherapie, meinen die Forscher. Denn von den Vorteilen ihrer Streptamer-Methode sind sie überzeugt. „Bei anderen Verfahren werden Zellen durch das Andocken von Substanzen so stark verändert, dass man sie kaum noch verwenden kann“, sagt Busch. Besonders günstig an der neuen Methode

ist, dass das An- und Abkoppeln der Streptamere bei sehr niedrigen Temperaturen zwischen vier und zehn Grad Celsius abläuft – in einem Temperatur-Bereich, in dem die T-Zelle quasi inaktiv ist. Wie bei einer Vollnarkose spürt die Zelle die Behandlung kaum.

Anders als bei der Vermehrung in der Laborkultur sind die Immunzellen also topfit, wenn sie per Angelmethode für den Patienten gewonnen werden. Stemberger hat das Verfahren lange an Mäusen getestet, ehe die erste klinische Studie mit Leukämiepatienten begann. „Es ist verblüffend, wie wenige T-Zellen man benötigt, um eine Erkrankung erfolgreich zu bekämpfen“, sagt er. „In manchen Fällen konnten Infektionen mit einer einzigen übertragenen T-Zelle bekämpft werden, die sich dann im Körper der Maus vervielfältigt hat.“ Auch beim Menschen benötigt man wahrscheinlich vergleichsweise wenige Zellen, um eine klinische Wirkung zu erzielen – nur etwa einige Tausend T-Zellen. Verwendet man hingegen T-Zellen aus der Retorte, sind pro Dosis mehrere Milliarden T-Zellen nötig, um die Infektion in Schach zu halten. Busch und Stemberger hoffen, dass es ihnen gelingt, ihre sanfte Methode auf eine Vielzahl von Zellen auszuweiten.

Medizintechnik par excellence

Die Focus Group am Institute for Advanced Study hat es sich zum Ziel gesetzt, die Entwicklung von Medizintechnologie voranzutreiben. „Was wir hier machen, die Kombination von Durchflusszytometrie und molekularbiologischen Methoden, ist medizintechnische Arbeit par excellence“, sagt Busch. Seine Arbeit verblüfft viele seiner Fachkollegen. Während Busch nämlich daran arbeitet, Streptamere zu finden, die nur leicht an ihrem Zielobjekt haften, suchen die meisten anderen Forscher nach Molekülen mit starker Haftkraft – beispielsweise Antikörper, die fest an Tumorgewebe andocken, damit es im mikroskopischen Bild sichtbar wird.

„Wir haben es vergleichsweise leicht“, sagt Busch mit einem Lachen. „Nicht zuletzt weil wir durchaus das gebrauchen können, was die anderen wegwerfen.“

Tim Schröder