

Gesellschaft zur Förderung Kynologischer Forschung



Abschlussbericht

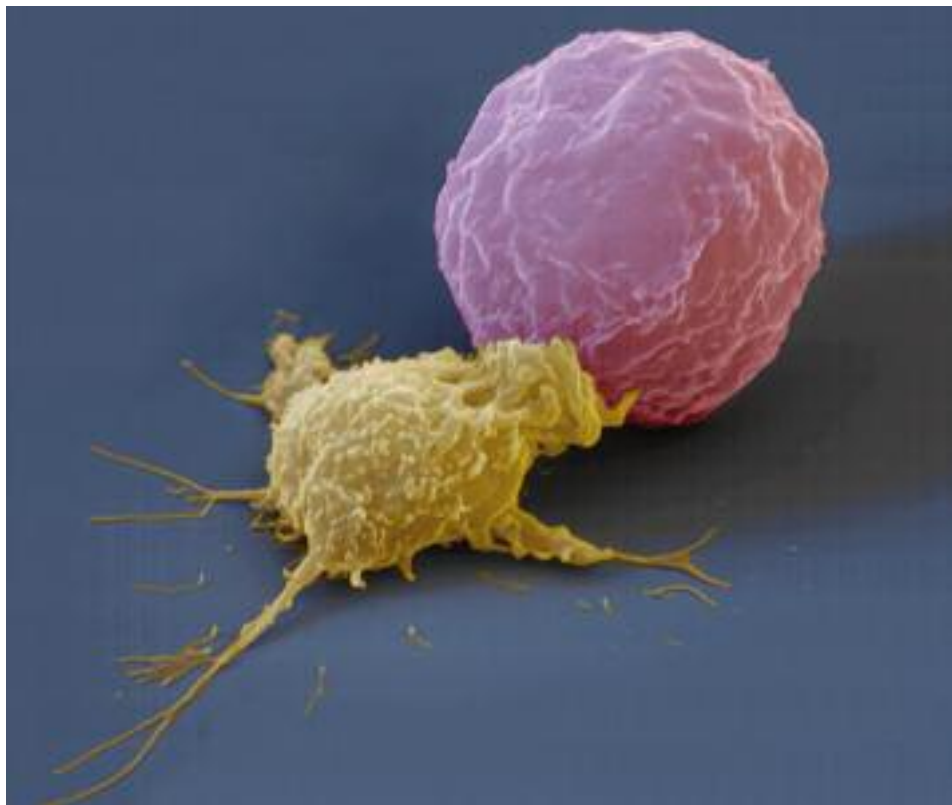
# Trainingslager für Tumorkiller

aus der gkf-Info 35 | Juni 2012



Abschlussbericht

# Trainingslager für Tumorkiller



*Eine Natürliche Killerzelle greift eine Krebszelle an | ©eyes of science*

*Eine Forschungsgruppe um Axel Wehrend von der Tierärztlichen Fakultät der Justus-Liebig Universität Gießen arbeitet daran, bestimmte körpereigene Abwehrzellen von krebserkrankten Hunden so zu „trainieren“, dass sie gezielt die Tumorzellen zerstören, ohne dabei gesunde Zellen zu schädigen. Mit Unterstützung der GKF konnte Michele C. Klymiuk*

*erste entscheidende Schritte in der Entwicklung dieser vielversprechenden Behandlungsmethode machen.*

Trotz großer Fortschritte in der Therapie und Diagnostik von Tumoren stoßen die klassischen Methoden der Krebsbehandlung immer wieder an ihre Grenzen: So können



*In diesen Kulturplatten wurden die Natürlichen Killerzellen gezüchtet.*

im Zuge einer Operation oder der herkömmlichen Strahlentherapie nur Tumoren ab einer gewissen Größe behandelt werden - versprengte Tumorzellen, kleine Tochtergeschwülste oder Krebserkrankungen des Blut- oder Lymphsystems können mit diesen Methoden nicht erfasst werden.

Die klassische Chemotherapie hingegen, die in diesen Fällen eingesetzt wird, beruht auf der Zerstörung sich schnell teilender Zellen. Dabei machen die Medikamente jedoch keinen Unterschied zwischen Tumorzellen und gesunden Körperzellen. Aufgrund der starken Giftwirkung der Chemotherapeutika auf gesunde Zellen können sie nur in niedrigen Dosen eingesetzt werden, die oftmals nicht ausreichen, um den Krebs zu besiegen.

Daher sucht die Wissenschaft schon lange nach Methoden, mit deren Hilfe die Krebszellen treffsicher aufgesucht, angegriffen und im Idealfall vernichtet werden können, ohne die gesunden Zellen zu schädigen. Im körpereigenen Abwehrsystem haben die Forscher einen möglichen Verbündeten für die gezielte Zerstörung von Krebszellen ausgemacht.

Denn das Abwehrsystem greift nicht nur Krankheitserreger an, die von außen in den Organismus gelangen, sondern auch Tumorzellen. Tatsächlich kann das Abwehrsystem sogar verschiedene Zellarten und Abwehrmechanismen gegen Tumorzellen in Stellung bringen. Die Idee vieler Krebsforscher ist es daher, die verschiedenen natürlichen Abwehrmaßnahmen gegen Krebs wie zum Beispiel spezielle Antikörper als Medikamente zu nutzen und/oder bestimmte Zellen effektiver und stärker im Kampf gegen die Tumorzellen zu machen.

## Zellen mit Lizenz zum Töten

Wehrend und seine Arbeitsgruppe haben sich dafür entschieden, besondere Abwehrzellen, die sogenannten Natürlichen Killerzellen (NK) in die Krebstherapie einzubinden. Die Entscheidung für die Natürlichen Killerzellen fiel, weil diese als einzige Abwehrzellen Tumorzellen von sich aus erkennen und zerstören können. Sie sind quasi die winzigen James Bonds unter den körpereigenen Abwehrspezialisten und haben anders als der fiktive Spionageheld eine ganz reale Lizenz zum Töten.

Um die Natürlichen Killerzellen effizienter gegen Tumorzellen zu machen, werden sie außerhalb des Körpers mit einem speziellen Molekül, dem Interleukin-2 (IL-2), stimuliert. Interleukin-2 ist ein Botenstoff (Zytokin), der Natürliche Killerzellen dazu veranlasst, sich zu vermehren und aktiv zu werden. Nach der Stimulation und der Vermehrung sollen die Natürlichen Killerzellen in den Organismus des Patienten zurück geschleust werden, damit sie dort gezielt die Tumorzellen angreifen und möglichst vernichten.

So einfach und plausibel diese Idee erscheinen mag, so kompliziert ist ihre Umsetzung. Denn bevor man überhaupt daran denken kann, Natürliche Killerzellen gegen eine Tumorerkrankung einzusetzen, musste die Arbeitsgruppe und insbesondere Michele C. Klymiuk erst die Voraussetzungen schaffen, in dem er die jeweils beste Methode für die folgenden vier Arbeitsschritte erprobte:

- Gewinnung und Reinigung der NK aus dem Blut
- Kultivierung der NK in Gefäßen
- Stimulierung der NK mit dem Anti-Tumor-Faktor Interleukin-2
- Kryokonservierung der stimulierten NK
- In einem fünften Arbeitsschritt wird demnächst auch die beste Methode für den Rücktransport der stimulierten NK in den Organismus getestet.

## Seltene Spezialisten

Natürliche Killerzellen sind im Vergleich zu anderen Zellarten nur zu einem geringen Anteil im Blut vorhanden. Im ersten Arbeitsschritt musste ermittelt werden, wie man eine ausreichende Anzahl von Natürlichen Killerzellen gewinnt und sie von den anderen Blutzellen trennt.

Klymiuk fand in diesem Arbeitsgang heraus, dass einem krebserkrankten Hund mindestens 20 Milliliter Blut entnommen werden müssen, um eine ausreichende Anzahl an Natürlichen Killerzellen zu erhalten. Zuvor hatte man angenommen, dass zehn Milliliter reichen würden.

Damit man im weiteren Verlauf der Tests tatsächlich nur mit Natürlichen Killerzellen zu tun hatte, mussten diese darüber hinaus

von den anderen Zellen im Blut getrennt werden. Dies geschah mithilfe der Dichtegradientenzentrifugation. Dabei handelt es sich um ein physikalisches Trennverfahren, bei dem die Blutzellen in einem speziellen Röhrchen mit einem Trennmittel mit hoher Geschwindigkeit im Kreis geschleudert (zentrifugiert) und dadurch sortiert werden.

Vereinfacht kann man sich das so vorstellen: Die Zentrifugalkräfte schleudern die Zellen im Röhrchen nach außen. Das Trennmittel verhindert jedoch wie eine Art Sieb-



*Die Blutbestandteile und Zellen können mithilfe einer Zentrifuge getrennt werden. Sie bilden dann im Röhrchen sogenannte Banden. Der Pfeil zeigt auf eine Bande, die von Lymphozyten gebildet wurde. (Abbildungen: Wehrend)*

system mit unterschiedlicher Maschengröße, dass alle Zellarten im Schleudergang gleich weit nach außen fliegen. Je nach ihren typischen Eigenschaften sammeln sich die Zellen einer Zellart während der Zentrifugation in bestimmten Bereichen des Röhrchens an und bilden dort sogenannte Banden.

Unter welchen Bedingungen sich die Natürlichen Killerzellen von Hunden am besten von den anderen Blutzellen trennen lassen, musste Klymiuk erst austesten. Er ermittelte, dass bei 800facher Erdbeschleunigung (800 g), einer Zentrifugationsdauer von zehn Minuten und der Trennlösung Percoll (einer Art Kieselgel) die besten Ergebnisse erzielt wurden.

## Tote Killer bringen's nicht

So martialisch ihr Name auch ist: Natürliche Killerzellen sind ebenso zarte und verletzbare Geschöpfe wie alle anderen Körperzellen. Außerhalb ihres angestammten Lebensraums, dem Organismus, sind sie unter normalen Umständen zum Tod verurteilt. Dies galt es zu verhindern, denn tote Killer sind im Kampf gegen Krebs unbrauchbar. Daher bestand der zweite Arbeitsschritt darin, zu erproben, wie man die Natürlichen Killerzellen außerhalb ihres Körpers in sogenannten Zellkulturen nicht nur am Leben erhält, sondern sie sogar dazu bringt sich zu vermehren. Darüber hinaus sollte die Methode zur Kultivierung von Natürlichen Killerzellen möglichst einfach und kostengünstig sein, sodass sie später auch in anderen Laboren problemlos angewendet und letztlich in der Therapie krebserkrankter Hunde eingesetzt werden kann.

Dafür prüfte Klymiuk verschiedene im Spezialhandel erhältliche Kulturgefäße und unterschiedliche Kultivierungsmethoden in Tests, bis er die beste Methode und die passenden Gefäße herausgefunden hatte. Auch die Nährstofflösung, die die Zellen einerseits ernähren und andererseits vor Infektionen schützen sollte wurde getestet. Darüber hinaus erprobte Klymiuk auch verschiedenen Methoden zur Zucht (Kultivierung) von besonderen Zellen (BHK-Zellen), die die beim dritten Schritt nämlich der Stimulierung der Natürlichen Killerzellen eine herausragende Rolle als Produzenten des Interleukin-2 spielen sollten.

## Angeregt auf Eis

Im dritten Arbeitsschritt ging es darum herauszufinden, auf welche Weise Interleukin-2 die Natürlichen Killerzellen am besten zur Vermehrung anregt. Hierzu wurde das Gedeihen von drei Gruppen mit Kulturen mit Natürlichen Killerzellen beobachtet. Die erste Gruppe, die Kontrollgruppe, wurden die Zellen nicht stimuliert. Bei Gruppe Nummer 2 gab Klymiuk das Interleukin-2 am ersten und am 4. Tag in die Kultur. Die dritte Gruppe von den oben genannten BHK-Zellen kontinuierlich mit Interleukin-2 stimuliert.

Dazu wurden alle Gruppen in speziellen Gefäßen kultiviert. Diese Gefäße bestanden aus zwei Abteilungen, die durch eine halbdurchlässige Membran voneinander getrennt waren. Diese Membran ließ die Nährflüssigkeit und falls vorhanden das Interleukin-2 frei passieren, stellte aber für die Natürlichen Killerzellen und die BHK-Zellen eine unüberwindbare Grenze dar, sodass die

verschiedenen Zellarten sauber voneinander getrennt in ihren Abteilungen blieben. In ihrem Abteil bildeten die BHK-Zellen das Interleukin-2, dass dann durch die Membran kontinuierlich in das Abteil der Natürlichen Killerzellen strömte und diese dort stimulierte. Tatsächlich erwies sich die dritte Methode als die erfolgreichste und wird nun in den weiteren Versuchen eingesetzt.

Schließlich fand Klymiuk in einem vierten Arbeitsschritt noch heraus wie man die stimulierten Zellen am besten konserviert. Als optimal erwies sich eine computergesteuerte Temperaturabsenkung mit einem programmierbaren Zelleinfriergerät. Der Kälteschlaf durch die sogenannte Kryokonservierung soll die Natürlichen Killerzellen frisch und am Leben erhalten, bis sie schließlich am Patienten zum Einsatz kommen. In einem nächsten Arbeitsschritt wird man erproben, wie man die Natürlichen Killerzellen auf ihren Rücktransport zu ihrem Einsatzort im Körper vorbereitet.

Dann erst kann man austesten, ob die Methode so gut ist, wie sie zu sein verspricht.

*(Barbara Welsch)*

### Wissenschaftlicher Arbeitstitel des Projektes:

**Untersuchung zur Proliferation und Steigerung der zytotoxischen Aktivität Natürlicher Killerzellen in vitro als Basis einer immunvermittelten Tumorthherapie.**

#### Kontakt

Prof. Dr. Axel Wehrend  
 JUSTUS-LIEBIG-UNIVERSITÄT  
 Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie  
 und Andrologie der Groß- und Kleintiere  
 Frankfurter Straße 106  
 35392 Gießen  
[geburtshilfe@vetmed.uni-giessen.de](mailto:geburtshilfe@vetmed.uni-giessen.de)

Gesellschaft zur Förderung Kynologischer Forschung e. V.



**Forschung für den Hund**

Postfach 14 03 53  
 53058 Bonn  
 Service-Telefon (0180) 334 74 94  
[www.gkf-bonn.de](http://www.gkf-bonn.de)

Volksbank Bonn - BLZ 380 601 86 - KTO 100 10 10 014




UNTERSTÜTZEN  
SIE DIE GKF!