



Leistungsbericht LIFE-Zentrum

2009

Leistungsbericht LIFE-Zentrum 2009

Geschäftsführung:

Professor Dr. med. Stefan Endres

Professor Dr. med. Christian Stief

Professor Dr. rer. nat. Wolfgang Zimmermann (leitender Geschäftsführer)

Telefon: 7095-4895

Telefax: 7095-4864

E-Mail: wolfgang.zimmermann@med.uni-muenchen.de

Das LIFE-Zentrum besteht seit Mai 2008 aus den drei Forschungseinheiten Laserforschungslabor, Labor für Tumorummunologie und der Experimentellen Urologie. Hervorgegangen ist die Forschungseinrichtung aus einer 1995 etablierten Forschungseinrichtung der Urologischen Klinik.

1. Personal

Laser-Forschungslabor (LFL)

Wissenschaftliche Mitarbeiter

Planstellen: 5

Drittmittel: 1 + 6x 1/2

Gesamt: 6 + 6x 1/2

Nichtwissenschaftliche Mitarbeiter

Planstellen: 1/2

Drittmittel: 1 + 1/2

Gesamt: 2 + 2x 1/2

Labor für Tumorummunologie (LTI)

Wissenschaftliche Mitarbeiter

Planstellen: 3

Drittmittel: 1

Gesamt: 4

Nichtwissenschaftliche Mitarbeiter

Planstellen: 1

Drittmittel: 1

Gesamt: 2

Experimentelle Urologie

Wissenschaftliche Mitarbeiter

Planstellen: 2

Drittmittel: 0

Gesamt: 2

Nichtwissenschaftliche Mitarbeiter

Planstellen: 0

Drittmittel: 2

Gesamt: 2

2. Lehre

2.1 Pflichtveranstaltungen

MeCuM Modul III (Urologie: Tutorials, Seminare, Vorlesungen, Bedside-Teaching),
MeCuM Longitudinalkurs

2.2 Wahlveranstaltungen

Tumorimmunologiepraktikum für Mediziner und Biologen; Beteiligung an Vorlesung und Praktikum „Grundlagen der Immunologie“ des Immunologischen Instituts; 7 Medizindoktoranden in Ausbildung (LTI); Laser in der Urologie; Physik an medizinischen Beispielen, Anwendungen physikalischer Methoden in der Medizin; Laser in der Medizin: Grundlagen und klinische Anwendungen in HNO, Urologie und Gynäkologie; 6 Medizindoktoranden in Ausbildung (LFL); LIFE-Seminar mit eingeladenen Rednern; LIFE-Forschungsbesprechung mit Ärzten der Urologischen Klinik.

3. Forschungsschwerpunkte

Die Forschungsschwerpunkte der Forschungseinrichtung sind ausgerichtet auf die Entwicklung und Verbesserung von Immuntherapien solider Tumoren sowie auf die Etablierung neuer prognostischer Marker bei urologischen Tumoren, Entwicklung und klinische Validierung innovativer optischer Verfahren zur Diagnose und Therapie humaner Neoplasien mit einem Schwerpunkt Lasermedizin sowie die Identifikation von neuen therapeutischen Ansätzen bei urologischen Tumoren und die Entwicklung neuer Strategien zur therapeutischen Beeinflussung urologischer Funktionsstörungen (erektile Dysfunktion, Blasenentleerungsstörungen).

3.1 Laser-Forschungslabor (LFL)

Das LFL ist eine interdisziplinäre Forschungseinrichtung mit dem Ziel, innovative optische Methoden zur Detektion und Therapie humaner Neoplasien zu entwickeln, klinisch umzusetzen und zu evaluieren. Um diesen Prozess zu optimieren, werden enge Kontakte mit der Fachhochschule München (*University of Applied Sciences*) und dem Fachbereich Physik der naturwissenschaftlichen Fakultät der LMU München gepflegt. Sie ermöglichen in optimaler Weise auf der Basis von Praktikanten- und Diplomarbeiten Labormuster zu entwickeln und diese in Kooperation mit Industriepartnern bis hin zur klinischen Anwendung umzusetzen. Die anschließende Evaluierungsphase in der Klinik wird ebenso begleitet. Dies eröffnet die Möglichkeit, in enger Kooperation mit den Ärzten Systemschwächen schnell zu

erkennen und an die Kooperationspartner zur Optimierung weiterzuleiten. Bei Erfolg versprechenden Verfahren werden Kontakte zu Mitarbeitern aus unterschiedlichen Fachbereichen des Klinikums geknüpft, um diese Methoden rasch interdisziplinär umzusetzen. Im Laser-Forschungslabor werden drei Forschungsgebiete schwerpunktmäßig bearbeitet:

3.1.1 Optische In-vivo-Pathologie

Bei diesem Forschungsschwerpunkt, der auch unter dem Namen *Optical Biopsy* bekannt ist, werden derzeit international endoskopgestützte Methoden entwickelt, die es erlauben, eine histopathologische Befundung ohne Gewebeprobeentnahme vorzunehmen. Dazu ist notwendig, prä-maligne und maligne Areale mit hoher Sensitivität und Spezifität vorwiegend in Hohlorganen zu lokalisieren. Als besonders geeignet erweisen sich dabei das multilokuläre Harnblasenkarzinom und Karzinome in der Lunge sowie Tumoren im Gehirn. Auch Präkanzerosen, speziell in den Fachbereichen HNO und Gynäkologie sind eine wichtige Indikation. Durch spezielle Sonden, die über die Arbeitskanäle der Endoskope eingebracht werden, ist es möglich, sowohl die Invasion des Tumors (*staging*) als auch die zelluläre Struktur der Oberfläche (*grading*) optisch auf einem Monitor darzustellen. Im Laser-Forschungslabor werden dazu aktuelle neue Fluoreszenzmarker eingesetzt sowie an einer Optimierung der Mikroendoskopie gearbeitet. Ziel ist, alle für die In-vivo-Pathologie notwendigen erforderlichen Techniken in ein einziges Endoskop zu integrieren. Folgende Projekte wurden in 2009 in diesem Forschungsschwerpunkt bearbeitet:

Klinische Untersuchungen mit endoskopisch eingesetzter optischer Kohärenztomographie (OCT)

Herbert Stepp (LFL); Klinik: Christian Betz (HNO), Alexander Karl (Urologie), Christian Dannecker (Gynäkologie), Carola Berking (Dermatologie); Förderung: Industrie.

Dieses Vorhaben wird in Kooperation mit dem US Unternehmen *Imalux* sowie der britischen Firma *Michelson Diagnostics* (MD) durchgeführt. Es ist Bestandteil des Verbundes T.E.A.M. am Klinikum. Beim Blasenkarzinom, Frühmalignomen der Mundhöhle und der Zervix werden derzeit systematische Untersuchungen durchgeführt mit dem Ziel, die Eignung des Verfahrens zur pathologischen Beurteilung des Stagings zu prüfen. Die zentrale Frage ist dabei, ob die OCT geeignet ist, die relevantesten Stellen für eine Biopsieentnahme zu finden sowie die Resektionsgrenzen präziser festzulegen. Beim Blasenkarzinom wird die Fluoreszenzzystoskopie eingesetzt, um suspekte Areale einzugrenzen. Die OCT könnte sich hier insbesondere auch zur Reduktion falsch-positiver Fluoreszenzbefunde qualifizieren. Die bisherigen Ergebnisse zeigen in der Tat eine bessere Spezifität. Allerdings ist noch nicht abschließend geklärt, ob sich durch OCT Bilder ein *Carcinoma in situ* zuverlässig als maligne einstufen lässt.

Eine erste Machbarkeitsuntersuchung wurde zusammen mit Pulmologen in Gauting durchgeführt, wobei die Notwendigkeit und Art von Gerätemodifikationen identifiziert wurden, woran die Firmen *Imalux* und *Karl Storz* derzeit gemeinsam arbeiten. Die Firma MD vertreibt ein Mikroskop-OCT, das technisch einen höheren Entwicklungsstand aufweist als das endoskopische *Imalux*-Gerät, und entwickelt dieses in Richtung Endoskopie weiter. Derzeit wird ein Handheld-Gerät in der Dermatologischen Klinik getestet und auch für Resektionspräparate nach Konisationen durch eine Doktorandin der Frauenklinik genutzt. Durch die höhere Aufnahmegeschwindigkeit

lassen sich 3D-Scans durchführen, die in Verbindung mit einer höheren Auflösung auch eine verbesserte Gewebediagnostik versprechen.

„Femtoscope“, ein Projekt im Münchner Exzellenzcluster MAP (Munich Advanced Photonics)

Richard Meier, Ronald Sroka

Dieses Projekt hat sich zum Ziel gesetzt, durch mikroskopische Auflösung der Gewebeoberfläche durch ein Endoskop pathologisch gesicherte Aussagen über den Malignitätsgrad (*grading*) von humanen Neoplasien treffen zu können. Die Technik basiert auf einem flexiblen Endoskop in das kurze Laserpulse in Femtosekundenbereich eingekoppelt werden. In Kombination mit in vivo verwendbaren Kontrastmitteln wird angestrebt, zelluläre Strukturen aufzulösen. Derzeit werden Untersuchungen zur optischen Auflösung an histologischen Schnitten durchgeführt. Mit Hilfe des 2-Photoneneffekts erhalten wir dabei einen konfokalen Effekt, mit dessen Hilfe wir vergleichbar zum konfokalen 2-Photonen-Mikroskop auch hoch aufgelöste optische Schnitte durch das Gewebe durchführen können.

Die Probleme beim Transport kurzer Pulse durch dünne Glasfasern konnten im Rahmen einer Bachelorarbeit und einer Physik-Diplomarbeit weitgehend behoben werden und somit neuere Messungen zur optischen Auflösung des Systems durchgeführt werden.

Eine Publikation über die Ergebnisse dieser Untersuchungen wird in 2010 veröffentlicht. Ein Abstract dieser Arbeitsgruppe wurde auf dem Kongress Medical Laser Applications 2009 mit dem Best-Abstract-Award (500 Euro) ausgezeichnet.

Verbundprojekt „3D-Tissue Screen“

Katharina Thomsen, Richard Meier, Herbert Stepp; Förderung: BMBF in Biophotonik III.

Dieses im Unterauftrag eines Laser- sowie eines Mikroskopherstellers bearbeitete Projekt hatte zum Ziel, die Komponenten der Auftraggeber hinsichtlich ihrer Eignung für den Aufbau eines Zwei-Photonen-Endomikroskops zu prüfen. Die Eignung konnte weitgehend bestätigt werden, lediglich die Ausgangsleistung des kompakten Femtosekunden (fs)-Lasers eines Verbundpartners erwies sich zu Projektende als noch zu gering. Mithilfe eines anderweitig verfügbaren Lasers konnte aber ein Labormuster erstellt werden, mit dem die Funktionstüchtigkeit der anderen Komponenten getestet werden konnte. Als wesentliche Eigenleistung wurde ein Gitterkompressor aufgebaut, der durch einen so genannten „*pre-chirp*“ die Pulsverzerrungen des Laserstrahls bei Durchtritt durch das bildgebende Lichtleiterbündel eines flexiblen Endoskops zu kompensieren imstande ist. Außerdem wurde eine Vorrichtung zur variablen Einstellung der Scantiefe auf Basis von Nitinoldrähnen aufgebaut und untersucht. Im Ergebnis konnten mit einem Labormuster Fluoreszenzaufnahmen von Testobjekten angefertigt werden. Mit Hilfe des Gitterkompressors konnte ohne Verwendung exogener Farbstoffe SHG-Signale von Harnkristallen bei einer mittleren Leistung von 3 mW und einer Pulsbreite von um die 100 fs detektiert werden. Auf Grund der schwachen Fluoreszenzsignale liegt die bisher erreichte Bildwiederholrate unter einem Hz. Es konnte gezeigt werden, dass die Vorteile von schnellen Scannern in Kombination mit Faserbündeln bisher nicht ausgenutzt werden kann.

Verbundprojekt „Neurotax“

*Ann Johansson, Herbert Stepp; Klinik: Friedrich-Wilhelm Kreth (Neurochirurgie);
Förderung: BMBF in MoBiTech.*

Ziel des Verbundprojekts ist die Erarbeitung von Grundlagen für sichere stereotaktische Eingriffe unter fluoreszenzoptischer und endoskopischer Kontrolle. Diese Technologie erlaubt die Risiken einer stereotaktischen Probenentnahme aus dem Gehirn durch die Verursachung einer intrakraniellen Blutung zu minimieren. Hierzu sollen fluoreszenz-gestützte faseroptische Führungssysteme aufgebaut und mit den Methoden der minimal invasiven Stereotaxie verbunden werden. Aufgabe des LFL ist es, eine interstitielle Fluoreszenzsonde zu entwickeln, mit der eine optische Feinnadelbiopsie durchgeführt werden kann. Damit soll gezeigt werden, wie die herkömmliche invasive Entnahme von Gewebeproben bei stereotaktischen neurochirurgischen Eingriffen durch Einsatz optischer Signale (Fluoreszenz- und Remissionspektroskopie) gesteuert werden kann. Es besteht die Anforderung, die Fluorchromkonzentrationen quantitativ angeben zu können. Untersuchungen zu optischen Eigenschaften und Konzentration von Protoporphyrin IX (PPIX) nach oraler Gabe von 5-Aminolävulin-Säure (ALA) werden in vivo durchgeführt, um den Schwankungsbereich dieser Parameter festzulegen. Zusätzlich werden unterschiedliche methodische Ansätze zu fasergestützten Fluoreszenzsonden für die quantitative PPIX-Bestimmung untersucht und verglichen.

Verbundprojekt „Tumorvision“

Tobias Beck, Gesa Palte, Sabine Sandner, Herbert Stepp; Klinik: Christian Betz (HNO); Förderung: BMBF in Biophotonik III.

Aufgabe des LFL in Tumorvision (Projektende Oktober 2009) war der Aufbau eines Funktionsmusters zur Fluoreszenzdetektion neuartiger molekularer Tumormarker („smart probes“) für die tumorspezifischen Enzyme Transketolase-like 1 (TKTL1) und DNaseX. Die Fluoreszenz soll dabei a) hochsensitiv, b) spektral aufgelöst, c) quantitativ aus streuender Matrix, d) mit einer endoskopietauglichen Sonde und e) unter Verwendung kostengünstiger Halbleiterlichtquellen angeregt, erfasst und nachgewiesen werden. Dies konnte in allen Punkten ganz oder näherungsweise erfüllt werden. Die größten Schwierigkeiten bereitete die Quantifizierung der Fluoreszenzsignale in streuenden Medien, die für die Wellenlängenbereiche der molekularen Fluoreszenzmarker der Verbundpartner noch nicht zufrieden stellend funktioniert. Dieser Aspekt wird mit neuen Konzepten und unterstützt durch *Ray-tracing*-Simulationen jetzt im Projekt Neurotax weitergeführt. Der Aspekt LED-Faserkopplung wurde intensiv bearbeitet, ebenso die Theorie, Simulation und Fluoreszenzquantifizierung faserbasierter Sonden. Auf Basis dieser Grundlagenkenntnisse wurde am LFL eine Arbeitsgruppe „interstitielle Photodynamik“ konstituiert (Leitung: Dr. Ann Johansson), aus der heraus Diagnostik und Photodynamische Therapie großvolumiger Tumoren (Glioblastom, Prostatakarzinom, Mammakarzinom, Kindertumoren etc.) in allen Aspekten bearbeitet werden. Neben „Neurotax“ werden weitere Projektskizzen und Publikationen erstellt (Erst- bzw. Koautor Ann Johansson).

Fluoreszenznachweis von Indocyaningrün (ICG)

Hilmar Schachenmayr, Herbert Stepp; Klinik: Christian Betz (HNO); Förderung: Industrie

Mit den zum letzten Leistungsbericht erstellten Endoskopen konnten bereits klinische Untersuchungen zur Hautlappenperfusion in der Mundhöhle durchgeführt werden. Dabei wurde die im Infrarot liegende ICG-Fluoreszenz im Blaukanal einer modifizierten Endokamera dargestellt. Nun ist es gelungen, im Labormuster eine gleichzeitige Weißlichtdarstellung zu realisieren, indem aus den Bildern des Grün- und Rotkanals ein künstliches Blaukanal-Bild errechnet wird und das Fluoreszenzbild, das tatsächlich vom Blaukanal aufgezeichnet wird dem künstlichen Weißlichtbild überlagert wird. Die dafür nötige Technik der Beschichtung optischer Filter und das Verfahren wurden zum Patent angemeldet und anschließend auf der *Photonics West* vorgetragen und publiziert. Ein entsprechendes klinisch einsetzbares Funktionsmuster steht für die kommenden Patientenuntersuchungen zur Verfügung. Die weitere Entwicklung wird sich auf die Umsetzung von quantitativen Bildauswertekonzepten (Perfusion) konzentrieren.

3.1.2 Klinische Laserbehandlungen

Allgemeine Einführung

Als einziges Labor für Lasermedizin in Bayern hat sich die Arbeitsgruppe „Lasermedizin“ im LFL zum Ziel gesetzt, die neuesten Lasersysteme und -Verfahren ausgehend von In-vitro-Laborversuchen bis hin zu klinischen Studien auf ihre Effizienz hin zu untersuchen. Abhängig von den Laserparametern werden dabei Effekte der Gewebekoagulation und Vaporisation bis hin zur Steinertrümmerung untersucht. Die Forschungsarbeiten wurden schwerpunktmäßig in Kooperation mit den klinischen Fächern Urologie und HNO durchgeführt. Folgende Projekte wurden in 2009 in diesem Forschungsschwerpunkt bearbeitet:

Laserinduzierte Steinertrümmerung

Ronald Sroka; Klinik: Markus Bader (Urologie); Förderung: Industrie.

Ziel dieses Projekts ist es, unterschiedliche Lasersysteme im Hinblick auf ihre destruktive Wirkung auf humane Nieren- und Speichelsteine im Vergleich zu Kunststeinen zu untersuchen. Im Mittelpunkt stand dabei die Bestimmung der Fragmentierungs- und Abtragate. Um die Prozesse der Steinertrümmerung besser physikalisch verstehen zu können, wurden die Stoßwellen, die die unterschiedlichen Lasersysteme induzierten, detailliert untersucht. Es zeigten sich signifikante Unterschiede für verschiedene Wellenlängen im IR- und auch im sichtbaren Bereich. Demnach konnten alle klinischen Steinproben bei IR emittierenden Lasern fragmentiert werden, wobei sichtbares Licht keine überzeugenden Ergebnisse lieferte. Zusätzlich bietet der IR-Laser den Vorteil, im geringen Leistungsbereich auch Gewebe koagulieren zu können. Ein und dasselbe Lasersystem ist damit für verschiedene Krankheitsformen einsetzbar.

Weiterhin wurde die Fragmentierungseffizienz von Lasersystemen an klinischen Urolithen untersucht. Eine dazu angefertigte Facharbeit wurde mit 15 Punkten bewertet und für eine Ehrung als eine der besten bayerischen Facharbeiten des Jahrgangs vorgeschlagen. Publikationen zur Fragmentierung von artifiziellen Steinen, und der Induzierung kollateraler Schäden sind zur Veröffentlichung eingereicht.

Erstmalig wurden Untersuchungen zum Mechanismus der Kavitationsblasenbildung klinischer Lasersysteme in Kooperation mit dem Institut für Lasertechnologien in der

Medizin in Ulm durchgeführt. Im Rahmen einer Bachelorarbeit werden sie derzeit ausgewertet. Zudem wurde ein neues innovatives Verfahren zur Untersuchung der Repulsion von Kongrementen entwickelt. Mit diesem Experiment (Pendelversuch) werden nun die Effekte unterschiedlicher Lasersysteme und neuester Lithotripsie Systeme experimentell verglichen.

Untersuchungen zur Indikation des 1470-nm-Diodenlasers in der HNO

Ronald Sroka; Förderung: Industrie.

Ziel des Projektes war es, den Einsatz eines Diodenlasers mit der Wellenlänge 1470 nm und einer Leistung bis 20 W für klinische Indikationen im Fachbereich HNO zu untersuchen. In experimentellen Untersuchungen konnte in vitro festgestellt werden, dass dieses Lasersystem ähnliche Gewebefeffekte hervorruft wie die üblicherweise verwendeten Diodenlaser bei 940nm und der CO₂-Laser. Allerdings war für einen vergleichbaren Gewebeabtrag erheblich weniger Energieeintrag notwendig. Nach den In-vitro-Untersuchungen wurden diese Ergebnisse an Ex-vivo-Präparaten der HNO (Nasenmuschel, Uvulum, Tonsille) verifiziert. Auf der Basis dieser Voruntersuchungen wurden 2 prospektiv randomisierte klinische Studien mit Genehmigung der Ethikkommission mit jeweils 20 Patienten initiiert:

- Studie 1: Vergleich des DL980 vs DL1470 zur Reduktion der Nasenmuschel
- Studie 2: Vergleich des CO₂-Lasers vs DL1470 bei der Tonsillotomie

Untersuchungen zur Indikation des 1320nm-Diodenlasers zur partiellen Nephrektomie

Ronald Sroka; Förderung: Industrie.

Ziel des Projektes war es, den Einsatz des 1320-nm-Diodenlaser (max. 100 W) für die partielle Nephrektomie zu untersuchen. In einer experimentellen In-vitro-Phase wurde zunächst das Präparationspotential ermittelt, ferner die Handhabung und Führung des Lichtwellenleiters und die Geweberversiegelungsstärke. Nach erfolgter Genehmigung durch die Ethikkommission wurden zunächst offene Operationen (OPs) durchgeführt und das neue Verfahren unter klinischen Bedingungen getestet. Es zeigte sich, dass OPs ohne Einsatz von Ischämie durchgeführt werden konnten. In einem erweiterten Ansatz wurde der laparoskopische Einsatz getestet. Auch hier ist es möglich die OP der partiellen Nephrektomie ohne Ischämie durchzuführen. Neben weiteren klinischen Einsätzen steht nun die Entwicklung von optimierten OP-Bestecken im Vordergrund. Ebenso sollen weitere Lasersysteme für diesen operativen Ansatz geprüft werden. Dieser Einsatz steht in unmittelbarem Zusammenhang mit der Arbeitsgruppe NOTES im Kompetenznetzwerk T.E.A.M. Eine Publikation der klinischen Resultate steht vor der Einreichung.

„BetaMod“ – Wundheilungsmodulation durch lokal platzierte Betastrahler

Kathrin Weick, Ronald Sroka; Förderung: Bayerische Forschungsförderung.

Wundheilung ist ein komplexer Prozess, der auf der Proliferation von Fibroblasten beruht. Im klinisch ungünstigsten Fall führt dieser Prozess zu Strikturen und Stenosen. Treten sie in röhrenförmigen Organen wie Harnröhre, Gallengang oder Tränen-gang auf, ist eine klinische Intervention unabwendbar. Ziel des BetaMod-Projekts ist, radioaktive Implantate aus Betastrahlern zu entwickeln und ihre Auswirkungen auf den Wundheilungsprozess zu untersuchen. Dazu werden in einem ersten Schritt an

Tiermodellen mit Hilfe von Laserstrahlung Strikturen künstlich erzeugt. Die sich anschließende Gewebeproliferation wird mit Hilfe der OCT-Methode kontrolliert und aufgezeichnet und mit der Histologie verglichen. Ebenso können OCT-Bilder Aussagen über das Inkrustierungsverhalten unterschiedlicher Katheter liefern. Mit Hilfe marktverfügbarer Mikroendoskopiesysteme kann zusätzlich die Vernarbung der Gewebeoberfläche ohne Probenentnahme histologisch bewertet werden.

Die Ergebnisse der Untersuchungen wurden zur Publikation eingereicht. Eine klinische Untersuchung zum Inkrustierungsverhalten Kohlenstoffbeschichteter DJ-Katheter steht vor der Entblindung.

Urologisches Teilprojekt: Während des Berichtszeitraumes wurde zunächst ein Stenose-Modell in der Urethra von Kaninchen etabliert. Mittels definierter Applikation von Laserenergie konnte eine reproduzierbare Schädigung des Urothels induziert werden, was bei einer entsprechenden Wartedauer zu einer hochgradigen Stenose führte. Diese Verengung wurden dann mittels kalter Schlitzung behandelt und ein mit ³²P-haltigen Verbindungen beschichteter Katheter zur Behandlung der Wunde durch Wundmodulation mittels Beta-Strahlung im Niedrigdosis-Bereich platziert. Nach einem im Protokoll festgelegten Follow-up wurden die Urethrae explantiert und stehen nun zur histologischen Begutachtung an.

Gastroenterologisches Teilprojekt: Zunächst wurde hier das Stenose-Modell am Gallengang des Schweins etabliert. Aufgrund des komplexen Zugangs erwies sich die laserinduzierte Schädigung als nicht reproduzierbar. So wurde hier auf ein zirkumferentielles RF-Verfahren zurückgegriffen. Das weitere experimentelle Prozedere entsprach dem der Urologie. Zusätzlich wurden jedoch die Präparate mittels innovativer Konfokal-Sonde unmittelbar während der Explantation untersucht.

Sowohl die therapeutischen als auch die diagnostischen Entwicklungen bei BetaMod haben direkten Einfluss auf die Aktivitäten im Kompetenznetzwerk T.E.A.M. Nach Beendigung der tierexperimentellen Studien, werden nun klinische Studien für die Bereiche Urologie und Gastroenterologie initiiert.

3.1.3 Photodynamische Therapie (PDT)

Interstitielle PDT in der Neurochirurgie

Tobias Beck, Wolfgang Beyer, Herbert Stepp, Ann Johansson; Klinik: Friedrich-Wilhelm Kreth (Neurochirurgie)

Es wurde eine Phase-I/II-Studie zur stereotaktischen PDT mit 5-ALA-induziertem PPIX von inoperablen Gliomrezidiven an 12 Patienten durchgeführt. Zur Bestrahlung wurden 3-6 Lichtleitfasern verwendet, deren Positionierung auf der Basis gemessener optischer Eigenschaften von Gehirngewebe in Kombination mit Computersimulationen der zu erwartenden Lichtverteilung im Gewebe optimiert wurde. Die klinischen Ergebnisse liegen inzwischen vor. Danach bestätigen sich die ermutigenden Beobachtungen der vorausgegangenen Pilotstudie. So erreichten 4 Patienten ein Überleben von mehr als 3 Jahren. Eine Phase-II-Studie mit der Brachytherapie als Referenztherapie ist in Vorbereitung. Die Bestrahlungen werden in der Zwischenzeit in Form von Heilversuchen unter lichtdosimetrischer Betreuung durch das LFL fortgesetzt, in deren Rahmen die fluoreszenztechnischen Untersuchungen des oben erwähnten Projekts „Neurotax“ durchgeführt werden.

5-ALA-PDT frühkindlicher Tumoren

*Michael Heide, Herbert Stepp; Klinik: Florian Bergmann (Kinderchirurgie);
Förderung: DFG*

Das Projekt wurde im Juni 2009 abgeschlossen. Der Abschlussbericht an die DFG konnte die präklinischen Untersuchungen als viel versprechend darstellen. Insbesondere die pharmakokinetischen und Therapieversuche am intraperitonealen Rattentumormodell des Hepatoblastoms erbrachten klare Ergebnisse, die eine sehr selektive und effiziente Photosensibilisierung der Tumoren mit 5-Aminolävulin-Säure (5-ALA) zeigten. Als Nebenergebnis ergab sich eine recht eindrucksvolle Intravital-Färbemethode durch 5-ALA: 48 h nach initialer Photosensibilisierung mit 5-ALA und nachfolgender Photodynamischer Therapie wurde erneut 5-ALA verabreicht, das sich dann nur noch in den Tumorumlumina zu fluoreszierendem PPIX umbaute, die nicht durch die PDT vorher erfolgreich phototherapiert worden waren. So konnte direkt am längs geschnittenen Tumor bzw. am Gefrierschnitt unter dem Fluoreszenzmikroskop die erzielte Nekrosentiefe ausgemessen werden. Eine Antwort der DFG auf Nachfolgeförderung steht aus.

Optimierung der PDT von Akne

Wolfgang Beyer, Jianan Li, Michael Heide; Förderung: Bayerische Forschungsförderung

Eine Therapieoption für *Akne vulgaris* ist die Bestrahlung der befallenen Hautflächen mit blauem Licht. Die dabei herbeigeführte Zerstörung der *Akne-propionicus*-Bakterien durch einen photodynamischen Effekt hat sich als sehr effizient erwiesen. Zur Steigerung der Lichtdosis im Gewebe und damit der Effizienz sollen Substanzen aufgetragen werden, die die Transparenz von Gewebe für das Licht temporär erhöhen. Für eine Optimierung der verwendeten Substanzgemische ist eine Quantifizierung dieses Effekts erforderlich. Unter den verschiedenen Messverfahren, die dazu vorgesehen waren, hat sich die spektrale Messung der Licht-Transmission an Ex-vivo-Hautproben am aussagekräftigsten erwiesen. Dazu wurde eine spezielle Lichtquellenanordnung entwickelt. In ersten Experimenten an unbehandelter Schweinehaut wurde keine Steigerung der Transparenz beobachtet. An humanen Ex-vivo-Hautproben ist der Effekt dagegen deutlich ausgeprägt. Die Reproduzierbarkeit des Effekts ist jedoch als Folge der Variationsbreite der Eigenschaften der zur Verfügung stehenden Hautproben gering. Für aussagekräftige Mittelwerte an möglichst vielen Substanzkandidaten sind damit größere Probenmengen erforderlich, deren Beschaffung einen limitierenden Faktor darstellt. Die Messungen werden begleitet von theoretischen Modellen der Lichtverteilung in Gewebe mit kontinuierlich variierenden optischen Eigenschaften wie sie bei Diffusion der Substanzen in das Gewebe hinein zu erwarten sind. Die bisherigen Ergebnisse deuten darauf hin, dass bei einer Einwirkzeit von einer Stunde nur Effizienzsteigerungen deutlich unter einem Faktor 2 zu erwarten sind. Bei längeren Einwirkzeiten kann die Steigerung der Transparenz jedoch erheblich darüber liegen.

3.1.4 Das Kompetenznetzwerk Endoskopie (T.E.A.M)

Sprecher: Reinhold Baumgartner

Das im November 2008 gegründete Kompetenznetzwerk T.E.A.M. hat in 2009 seine Aktivitäten kontinuierlich fortgesetzt. Eine gemeinsam mit der Öffentlichkeitsarbeit des Klinikums verfasste Pressemitteilung wurde von mehreren externen Zeitschriften

aufgenommen und publiziert. Eine längere Darstellung der Aktivitäten von T.E.A.M. erfolgte in der klinikumseigenen Broschüre „Klinikum aktuell“ (Ausgabe 2/09).

Im Folgenden eine kurze Zusammenfassung der Tätigkeiten in den T.E.A.M.-Arbeitsgruppen. In der Arbeitsgruppe „Optische endoskopische Diagnostik“ wurden Kontakte zu den Firmen *Michelson Diagnostics* (England) und *Maua Kea* (Frankreich) intensiviert. Ziel ist es, langfristige Kooperationsverträge mit beiden Firmen, die Systeme zur OCT bzw. Mikroendoskopie herstellen, abzuschließen.

In der Arbeitsgruppe „NOTES“ wurde der Kontakt zur Firma Karl Storz ausgebaut. Auf der Basis eines interdisziplinären klinischen Forschungsplans soll mittelfristig der Zugriff auf eines der modernsten NOTES Endoskopiesysteme gesichert werden. Im Forschungsverbund „Betamod“ wurden tierexperimentelle Studien begonnen, die Erkenntnisse über den durch *Low-dose*-Betastrahlung induzierten Einfluss auf die Stenoseausbildung in Gallengang und Urethra liefern sollen. Die Ergebnisse sind ein wichtiger Bestandteil der Arbeitsgruppe: „Funktionelle Implantate“.

Website: <http://www.klinikum.uni-muenchen.de/Kompetenznetzwerk-Endoskopie>

3.2 Labor für Tumormunologie

Einführung

In der Tumormunologie wird versucht, die körpereigenen Abwehrmechanismen gegen Tumoren zu erforschen und neue Wege zu finden, die Zellen des Immunsystems oder Tumorzellen gezielt therapeutisch zu beeinflussen, um Krebserkrankungen zu bekämpfen. In den letzten Jahren wurde eine Reihe von neuen Immuntherapien erarbeitet und in der Klinik getestet. Hierzu gehören Therapien mit Peptid-, dendritische Zell- und Tumorzellvakzinen, adoptive Zelltherapien, sowie Antikörpertherapien. Einen neuen Aspekt der Tumormunologie stellt die immuntherapeutische Wirkung von photodynamischer Therapie (PDT) dar. Sie erlaubt die Tötung von Tumorzellen mit Hilfe von Photosensibilisatoren nach Lichtbestrahlung bei gleichzeitiger Stimulation einer Tumormunantwort. In den letzten Jahren wurden so genannte Tumor-initiiierende Zellen oder Tumorstammzellen, ursprünglich in Leukämien entdeckt, auch für eine Reihe von soliden Tumoren nachgewiesen. Sie machen nur einen sehr geringen Bruchteil der Tumormasse aus und zeigen in vielen Fällen eine ausgeprägte Unempfindlichkeit gegenüber Chemo- und Strahlentherapie. Sie werden daher für das Wiederauftreten des Tumors nach zunächst erfolgreich erscheinender Therapie verantwortlich gemacht und stellen aus diesem Grund interessante Zielzellen für immunologische und andere Therapien dar. Allerdings ist gegenwärtig noch völlig offen, ob sich, wegen ihrer großen Ähnlichkeit zu normalen Gewebestammzellen, antigene Unterschiede finden lassen, die einen selektiven immuntherapeutischen Angriff erlauben.

Die Erfahrungen mit auftretenden Resistenzen bei neuen Wirkstoffen (niedermolekulare Kinaseinhibitoren, sog. *small molecule drugs*), die gezielt aufgrund der Kenntnis molekularer Vorgänge bei der Krebsentstehung entwickelt wurden, zeigen, dass Krebs wahrscheinlich nur erfolgreich mit Kombinationstherapien bekämpft werden kann. Daher wird auch der Immuntherapie ein wichtiger Stellenwert zukommen, da die Resistenzmechanismen für immuntherapeutische und *Small-molecule-drug*-Therapieansätze sehr verschieden sein dürften und so eine Kreuzresistenz von Tumoren vermieden werden kann.

Die Forschungsaktivitäten im Labor für Tumorummunologie betreffen hauptsächlich urologische Tumoren, insbesondere Nieren- und Prostata Tumoren, aber seit kurzem auch Lungen- und Magenkarzinome. Für die Entwicklung und Verbesserung der Immuntherapie solider Tumoren forschen wir mit Schwerpunkt auf folgenden Gebieten mit einzeln aufgeführten Projekten:

3.2.1 Identifizierung und Validierung von antigenen Zielstrukturen und Prognosemarkern

Identifizierung von Zielstrukturen in Tumorstammzellen des Magenkarzinoms

Mariana Tölge, Elena Vetter, Wolfgang Zimmermann; Förderung: DAAD, Graduiertenförderung der Medizinischen Fakultät

In diesem Projekt möchten wir Zielstrukturen auf selektionierten Tumorzellen mit Stammzeleigenschaften identifizieren, die idealerweise nicht in normalen Stammzellen exprimiert werden und sich zur Entwicklung einer Immuntherapie eignen. Zur Isolierung solcher Zellen verfolgen wir zwei Strategien: (1) Einmal wollen wir bekannte Tumorstammzellmarker zur Anreicherung von potentiellen Stammzellen des Magenkarzinoms verwenden und diese Zellen funktionell verifizieren. (2) Unser zweiter Ansatz zeichnet sich dadurch aus, dass nicht einzelne Oberflächenmarker, sondern vielmehr Chemo- bzw. Immuntherapien *in vitro* und in einem von uns etablierten autochthonen murinen Magenkarzinommodell (CEA424-SV40-T-Antigen-Mäuse, TAG) zur Selektion der Zellen eingesetzt werden. Somit werden wir unvoreingenommen diejenigen Zellen untersuchen können, die einer konventionellen Therapie nicht zugänglich sind. Bisher konnten wir auf humanen und von unserem transgenen Magentumormodell abgeleiteten Magenkarzinomzellen eine Reihe von potentiellen Tumorstammzellmarkern nachweisen (CD44, CD133, ABCG2, Hoechstfarbstoff ausschleusende *side populations*) und erste vergleichende Expressionsprofile der angereicherten potentiellen Stammzellen erstellen. Als viel versprechend zeigte sich der funktionelle Nachweis des Stammzellmarkers Aldehyddehydrogenase 1A1 (ALDH1A1) durch den ALDEFLUOR-Assay. Mittels dieses Nachweissystems gelang es anderen Gruppen, Tumorstammzellen für bereits eine Reihe von Karzinomen anzureichern. Für einen Teil der von uns untersuchten Magenkarzinomzelllinien konnten wir ALDEFLUOR⁺-Subpopulationen nachweisen. Gegenwärtig erfolgt die funktionelle Überprüfung der Marker-positiven Zellen durch Kultivierung unter sog. Stammzellbedingungen, die selektives Wachstum von Stammzellen als so genannte *spheres* ermöglichen. Für eine Linie mit einem hohen Gehalt an CD44⁺-Zellen (CD44 wurde bereits als ein Stammzellmarker für das Magenkarzinom beschrieben) beobachteten wir besonders ausgeprägtes Wachstum, was für einen großen Anteil an Tumorstammzellen spricht.

Zur Identifizierung von Tumorstammzellen in unserem transgenen Magenkarzinommodell, das pylorusnah mit 100%iger Penetranz neuroendokrine Tumoren entwickelt, verwendeten wir einen genetischen Ansatz. Nach Verpaarung mit Lgr5-EGFP-Ires-CreERT2 (Lgr5-EGFP)-Mäusen (Barker et al. Nature, 449, 1003 [2007]), in deren Stammzellen der Magenschleimhaut der Pylorusregion EGFP exprimiert wird, konnten in Tumoren doppelt transgener Mäuse (Lgr5-RGFP x TAG) allerdings keine der adulten Stammzelle ähnelnden Tumorstammzellen (mit EGFP-Expression) beobachtet werden, was deren Isolierung mittels Durchflusszytometrie ermöglicht hätte. Um zu beweisen, dass die Tumorzellen in der Tat nicht von den normalen

Gewebestammzellen abstammen (entgegen der weit verbreiteten Annahme), werden gegenwärtig so genannte Tracing-Experimente nach Einkreuzung eines Reporterstamms (ROSA-tdRFP) durchgeführt. Mit Hilfe dieser dreifach transgenen Mäuse sollte geklärt werden können, ob die Zielzelle für das initiale Transformationsereignis durch T-Antigen, eine Lgr5-exprimierende adulte Stammzelle ist.

Identifizierung von Zielantigenen in Tumorstammzellen des Nierenzellkarzinoms

Heike Pohla, Alexander Buchner, Rainer Riesenberg, Heidi Herbig, Birgit Stadlbauer, Wolfgang Zimmermann

Kürzlich wurde ein mesenchymaler Marker (CD105) für die Anreicherung von Tumorstammzellen aus Nierenzellkarzinomen (RCC) beschrieben. Wir wollen diesen und andere Marker untersuchen, ob sich in Kombination die Tumorstammzellen weiter eingrenzen lassen. Zunächst werden RCC-Zelllinien (RCC-26, RCC-53) untersucht, die sich erheblich in ihren In-vivo-Tumorbildungspotential unterscheiden (RCC-53 >> RCC-26). Erste Untersuchungen zeigten, dass die stark tumorbildende Zelllinie (RCC-53) einen großen Anteil an ALDEFLUOR+-Zellen und somit wahrscheinlich vermehrt Tumorstammzellen besitzt. Funktionelle Tests (Sphere-formation-Assays und Wachstum in immundefizienten Mäusen) sowie Nachweis solcher Zellen in RCC-Primärtumoren werden sich anschließen.

Identifizierung von Zielantigenen und Prognosemarker im klarzelligen Nierenzellkarzinom durch genomweite Expressionsanalysen

Alexander Buchner, Rainer Riesenberg; Förderung: Krebshilfe

Ziel dieses Projekts ist es, mögliche *targets* für Antikörper- und Zell-vermittelte Tumorimmuntherapie aber auch andere Therapieansätze (z. B. *small molecule drugs*) sowie Prognosefaktoren zur Abschätzung des therapiewichtigen Rezidivrisikos von Patienten mit klarzelligen Nierenzellkarzinom (RCC) zu finden. Dazu wurden Tumorareale aus mehr als 50 kryopräservierten RCC-Primärtumor- und Metastasengeweben mittels *laser capture microdissection* isoliert und ihre genomweiten Expressionsprofile erstellt. Derzeit werden Analysen der Expressionsdaten durchgeführt, die gemeinsame Veränderungen in Signaltransduktions- und Stoffwechselwegen der Tumorzellen in Metastasen aufzeigen. Mit Hilfe der *Follow-up*-Daten von 28 Patienten mit RCC-Metastasen konnte eine 3-Gensignatur identifiziert werden, die eine von bekannten Parametern unabhängige prognostische Stratifizierung erlaubt. HNF1- β /TCF2, eines dieser Gene, ist in Primärtumoren und Metastasen herunterreguliert, was mittels quantitativer RT-PCR validiert werden konnte. Die Expression dieses Transkriptionsfaktors ist im Tumorgewebe strikt auf Tumorzellen begrenzt. Die Identifikation neuer, deregulierter Signal- und Stoffwechselwege im Nierentumorgewebe wurde ausgehend von den Expressionsprofilen mit Hilfe der neuen Analysemethode GSEA (*gene set enrichment analysis*) begonnen. Dabei zeigen sich auch kleinere, aber statistisch signifikante und biologisch relevante Veränderungen funktionell zusammenhängender Gene. RCC-Primärtumoren zeigen gegenüber normalem Nierengewebe u. a. signifikante Verluste bestimmter Adhäsionsmoleküle und Hochregulation von Zellmotilitäts-, Proliferations- und Angiogenese-assoziierten Genen. RCC-Metastasen wiederum zeigen gegenüber Primärtumoren signifikante Veränderungen im Energiestoffwechsel. Diese Daten sind Gegenstand weiterer Evaluation und Validierung und können die Grundlage zukünftiger spezifischer Therapieformen darstellen.

Analysen zur prognostischen Bedeutung und dem möglichen Wirkmechanismus der als immunsuppressiv angesehenen Indolamin-3,2-Dioxygenase (IDO) in Tumor-endothelzellen des primären RCC konnten durch Publikation in der Fachzeitschrift *Clinical Cancer Research* abgeschlossen werden (Riesenberg et al., 2007). Die bei diesen Untersuchungen an wenigen Proben beobachtete Expression von IDO in Tumorzellen von RCC-Lymphknotenmetastasen deutet auf eine Interaktion mit Immunzellen hin. Interferon- γ -Ausschüttung durch möglicherweise im Rahmen einer Antitumorimmunantwort stimulierte Lymphozyten könnte verantwortlich für die IDO-Expression sein. Analyse von über 30 RCC-Lymphknotenmetastasen und der Vergleich von korrespondierenden Primärtumoren bestätigt die metastasenspezifische IDO-Expression in Tumorzellen in rund 50% der Patienten. Gegenwärtig werden diese Ergebnisse auf ihr prognostisches Potential hin untersucht.

Artifizielle neuronale Netzwerke zur individuellen Prognosebestimmung bei Patienten mit Nieren- und Blasen-tumor

Alexander Buchner

Eine möglichst präzise individuelle Prognosebeurteilung von onkologischen Patienten ist Voraussetzung für eine individuell angepasste Therapie und für die Stratifizierung von Patienten für Therapiestudien. Artifizielle neuronale Netzwerke (ANN) sind analog zu biologischen Netzwerken aus untereinander vernetzten (Software-)Neuronen aufgebaut und können nach einer Trainingsphase komplexe, nichtlineare Zusammenhänge in Datensätzen erkennen. In der onkologischen Forschung kommen ANN in letzter Zeit zunehmend zum Einsatz. An zwei unizentrischen Follow-up-Datenbanken von Nierentumor-Patienten (gemischtes Kollektiv nach Tumor-nephrektomie bzw. Patienten mit fortgeschrittenem RCC und systemischer Therapie) und einer multizentrischen Follow-up-Datenbank mit Blasen-tumor-Patienten nach Zystektomie wurden neuronale Netzwerke entwickelt, die Tumorrezidiv- und Tumorspezifisches Überleben bei den meisten Patienten mit hoher Genauigkeit vorher-sagen können. Insbesondere die Spezifität, also das Erkennen von Patienten mit geringem Tumorrisiko im Follow-up liegt in allen Szenarien bei >90%. Neuronale Netzwerke sind ein viel versprechender Ansatz für die gezielte Identifikation von High-risk- und Low-risk-Patienten und somit für die Optimierung der Beratung und Therapiewahl. Durch Einbeziehung neuer molekularer Marker in die Tumordaten-sätze wird sich die Leistung der neuronalen Netzwerke zukünftig mit Sicherheit noch weiter erhöhen lassen.

Funktionelle Charakterisierung von CEACAM20, ein potentiell-les Zielantigen für das Magen- und Prostatakarzinom

Carina Hoffmann, Michaela Paptistella, Andreas Eisenried, Birgit Stadlbauer, Wolfgang Zimmermann; Förderung: Graduiertenförderung der Medizinischen Fakultät

CEACAM20, ein Mitglied der karzinoembryonalen Antigenfamilie (CEA), wird in Prostatakarzinomen und in gastrointestinalen Tumoren des Menschen exprimiert. CEACAM20 trägt ein so *genanntes immunoreceptor tyrosine-based activation motif* (ITAM). Überexpression von Proteinen mit ITAM-Motiven führt in Epithelzellen zu Transformation. Daher könnte CEACAM20 an der Tumorprogression in Tumoren epithelialen Ursprungs beteiligt sein. Um dies zu überprüfen, haben wir stabile indizierbare Transfektanten (Tet-on-System) hergestellt. Induktion von CEACAM20 in HEK293T-Zellen führte zur Ablösung der Zellen von der Kulturschale verbunden mit

einer Hemmung der Zellvitalität (durch Anoikis = programmierter Zelltod nach Kontaktverlust). Durch Verwendung von Deletions- und Punktmutationsmutanten von CEACAM20 konnten wir zeigen, dass diese Vorgänge unabhängig von Signaltransduktion durch ITAM und andere Signalmotive im zytoplasmatischen Bereich stattfinden. Wenn Überexpression von CEACAM20 im Tumor ebenfalls zu Zellablösung führt, könnte CEACAM20 Metastasierung fördern. Geplant ist ein Panel von in Zusammenarbeit mit GENOVAC erstellten monoklonalen Antikörpern zu testen, ob diese Funktion von CEACAM20 in therapeutischer Hinsicht günstig beeinflusst werden kann.

3.2.2 Neue immunologische Ansätze für die Tumorthherapie

Adoptiver Transfer von T-Zellrezeptorgen-modifizierten T-Lymphozyten, Herstellung und Charakterisierung hochaffiner, gegen Tumorantigene gerichtete T-Zellen

Heike Pohla, Heidi Herbig, Birgit Stadlbauer; Förderung: Transregio 36

Eines der größten Hemmnisse für eine erfolgreiche Tumorummuntherapie ist die Toleranz gegenüber Selbstantigenen, zu denen auch die meisten in Tumoren vorhandenen, nicht individualspezifischen Antigene zählen. Ein neuer Weg, dieses Problem zu umgehen, stellt die Klonierung von T-Zellrezeptoren (TCR) aus seltenen Tumorantigen-spezifischen zytotoxischen T-Zellen und ihre funktionelle Expression mittels retroviralem TCR-Gentransfer in die T-Zellen von Tumorpatienten dar (Geiger et al. 2009). Im Rahmen des Z1-Projekts des SFB-Transregio 36/1 (Leitung: H. Pohla und B. Gänsbacher für München und W. Uckert für Berlin) werden TCR- α - und TCR- β -Ketten von Tumor-erkennenden zytotoxischen T-Zellen kloniert, rekombinant exprimiert und funktionell getestet. Bisher wurden in Kooperation TCR-Analysen von über 20 T-Zellklonen mittels PCR klassifiziert und sequenziert. In einem Teil der Fälle wurden die dazugehörigen T-Zellrezeptor-cDNAs für die α - und β -Ketten kloniert und für die retrovirale Expression an die Gruppe Uckert weitergegeben. Aus über 40 Nierenzell- und Prostatakarzinomen konnten Tumor-infiltrierende Lymphozyten (TIL) isoliert werden, deren TCR-Repertoire gegenwärtig analysiert wird. Für die Analyse Prostatakarzinom-spezifischer TCR wurde ein weiteres Drittmittelprojekt eingereicht (Leitung: H. Pohla gemeinsam mit B. Gänsbacher, TU und D. J. Schendel, Helmholtz Zentrum München; *Prostate Cancer Research Program des US Department of Defense*).

Antitumorimmunpotential von photodynamischer Therapie beim Prostatakarzinom und Glioblastom

Robert Kammerer, Wolfgang Zimmermann, Michael Heide, Patrick Palluch, Konstantin Oboukhovskij, Thomas Pongratz; Förderung: Krebshilfe.

Die photodynamische Therapie (PDT) ist eine neuartige Modalität zur Behandlung von Krebs. Dabei werden Photosensibilisatoren oder metabolische Vorstufen, wie 5-ALA, verabreicht, die bevorzugt in Tumorzellen akkumulieren oder metabolisiert werden. Bestrahlung des Tumors mit Licht zerstört den Tumor hauptsächlich durch die Photosensibilisator-vermittelte Bildung von hochreaktivem Singulett-Sauerstoff. Es konnte gezeigt werden, dass PDT in Mäusen systemische Immunreaktionen auslösen kann, die vermutlich für das vollständige Verschwinden von Tumoren verantwortlich sind. Gelegentlich bei Gliompatienten nach PDT beobachtete vollständige Tumorregressionen legen nahe, dass auch beim Menschen durch PDT systemische

Anti-Tumorimmunreaktionen ausgelöst werden. Wir haben uns zum Ziel gesetzt, die 5-ALA-basierte PDT im Sinne einer maximal wirksamen Anti-Tumorimmunantwort zu optimieren. Als Modell verwenden wir humane und murine Prostatakarzinom- sowie humane Glioblastomzelllinien. Genomweite Transkriptionsanalysen zeigten, dass Tumorzellen nach sublethaler PDT, wie erwartet, sehr effizient so genannte *Early-response*-Transkriptionsfaktor- (c-fos, Jun), Hitzeschockprotein- (u.a. HSP70) und andere Stress-Gene aber auch Zytokin- und Chemokin-Gene hochregulierten. Letztere Gene zählen sogar zu den am stärksten in subkutan wachsenden Mausprostatatumoren nach PDT induzierten Genen. Aldoketoreduktase-Gene (z. B. AKR1C1) zählen ebenfalls zu den stark nach PDT transkriptionell aktivierten Genen. Aldoketoreduktasen stehen im Verdacht, an Entgiftungsprozessen nach oxidativer Schädigung (wie bei PDT erfolgt) beteiligt zu sein. Gegenwärtig versuchen wir daher, durch Hemmung dieser Enzyme durch selektiv wirkende Inhibitoren (Methyl-Jasmonat, Jasmonsäure) das Reparaturvermögen von Tumorzellen zu stören, um so, so hoffen wir, uns ein zeitlich größeres Fenster für immuntherapeutische Interventionen nach PDT zu eröffnen.

Evolution der CEA-Familie

Robert Kammerer, Wolfgang Zimmermann

CEA wird von vielen Arbeitsgruppen für die Etablierung unterschiedlicher immuntherapeutischer Ansätze als Zielantigen verwendet, da es weit verbreitet in Tumoren exprimiert wird. Untersuchungen von Stanners und Mitarbeitern zeigten, dass CEA kausal an der Tumorentstehung von kolorektalen Karzinomen beteiligt ist. Daher besteht ein Selektionsdruck auf den Tumor, die Expression dieses möglichen Zielantigens aufrechtzuerhalten, was vorteilhaft für CEA-gerichtete Immuntherapien ist. Erstaunlicherweise ist das Vorkommen des CEA-Gen auf Primaten begrenzt, was bisher unverstanden ist. CEA gehört zu einer großen, evolutionär sehr divergenten Proteinfamilie. Ein Teil ihrer Mitglieder, insbesondere CEACAM1, das eine bedeutende Rolle als negativer Regulator des Immunsystems und der Gewebemöostase spielt, können u. a. als Rezeptor für virale und bakterielle Pathogene dienen. Durch phylogenetische Studien konnten wir mehrere, zum Teil speziesspezifische Strategien aufdecken, mit denen es den Wirten im Wettlauf mit den Pathogenen gelang, den durch die Pathogene erzeugten Schaden auf ein für den Fortbestand der Art akzeptables Niveau zu halten (Kammerer and Zimmermann, BMC Biol 8:12 [2010]).

3.2.3 Entwicklung, Optimierung und klinische Testung von Tumorzellen

Allogene genetisch modifizierte Tumorzellen zur Therapie von Patienten mit metastasiertem Nierenzellkarzinom (RCC) und von Patienten mit hormonrefraktärem Prostatakarzinom

Heike Pohla, Alexander Buchner, Birgit Stadlbauer, Heidi Herbig; Förderung: DFG, BMBF

Beide Studien wurden erfolgreich abgeschlossen. Es wurden weder Vakzine-induzierte Autoimmunität noch systemische Nebenwirkungen beobachtet.

a) *Klinische Phase-I-Studie mit RCC-26/CD80/IL-2 zur Behandlung von 15 Nierenzellkarzinompatienten: Delayed type hypersensitivity (DTH) Hautreaktionen wurden in 11 von 14 der evaluierten Patienten beobachtet, und hier insbesondere in den*

Patienten mit längerem Überleben. In 7 von 12 immunologisch evaluierbaren Patienten konnten parallel spezifische Vakzine-induzierte Immunreaktionen nachgewiesen werden. Die Zeit bis zur Progression betrug im Median 5,3 Monate und die Überlebenszeit 15,6 Monate. Damit ist das mediane Überleben vergleichbar mit anderen derzeit eingesetzten Therapien, aufgrund der geringeren Toxizität aber mit einer deutlich besseren Lebensqualität für die Patienten verbunden (Buchner, Pohla et al. Hum Gene Ther 2010 Jan 27 [Epub ahead of print]).

b) Klinische Phase-I/II-Studie mit LNCaP/IL-2/IFN- γ zur Behandlung von 30 Prostatakarzinompatienten: Es konnte eine signifikante Verlängerung der PSA-Verdopplungszeit und eine Stabilisierung des PSA-Wertes von mind. 12 Wochen in 50% der Patienten erreicht werden, wobei 10% sogar eine 50%ige Verringerung des PSA-Wertes aufwiesen. 75% der Patienten zeigten ferner eine mehr als 2-fache Zunahme der Anti-Tumor-T-Zellreaktivität vor und nach der Vakzinierung. Neuronale Netzwerkanalysen konnten des Weiteren Antigene identifizieren, die signifikant PSA-Responder von Non-Respondern unterscheiden konnten (Brill et al. 2009).

Somit zeigten sich beide Vakzinierungen als sicher und ambulant gut durchführbar in diesen Patienten mit fortgeschrittener Erkrankung. Bei fast allen Patienten waren Vakzine-induzierbare T-Zellantworten gegen mindestens eines oder mehrere Tumor-assoziierte Antigene nachweisbar. Damit sind zelluläre Tumorigenimpfstoffe durchaus als sinnvolle Option für zukünftige Kombinationstherapien zu bewerten. Weiterführende umfangreiche Immunmonitoring-Analysen werden derzeit durchgeführt und ebenfalls für Publikationen vorbereitet.

Einsatz einer Multipeptidvakzine zur Behandlung des metastasierten Nierenzellkarzinoms (Klinische Phase-I- und Phase-II-Studie)

Heike Pohla, Heidi Herbig, Birgit Stadlbauer; Industrie: immatics biotechnologies GmbH

IMA901 ist eine auf mehreren Tumor-assoziierten Peptiden basierende therapeutische Tumorigenimpfstoffe. Die Peptide wurden aufgrund ihrer Überexpression in primärem RCC-Gewebe ausgewählt. Sie besteht aus neun HLA-Klasse-I-bindenden Peptiden und einem HLA-Klasse-II-bindenden Peptid und ist in der Lage, CD8⁺ zytotoxische T-Zellen (CTL) und CD4⁺ T-Helferzellen zu aktivieren. Entwickelt wurde diese Vakzine von der Firma immatics biotechnologies GmbH in Tübingen. Es handelte sich um eine multizentrische klinische Phase-I-Studie zur Behandlung von Patienten mit fortgeschrittenem RCC (IMA901-101). Hauptziel dieser offenen, nicht-kontrollierten, einarmigen Studie war die Untersuchung der Verträglichkeit und Sicherheit dieser Vakzine zusammen mit intradermal injiziertem rekombinanten humanen GM-CSF als Adjuvanz. Wir hatten für diese erste Studie 76 Patienten HLA-typisiert und 15 Patienten konnten alleine in München eingeschlossen werden (Kooperation: M. Staehler, Urologische Klinik). IMA901 stellte sich als eine sehr sichere, gut verträgliche und immunogene Multipeptidvakzine heraus. Mittlerweile ist auch eine multizentrische klinische Phase-II-Studie (IMA901-202 bzw. IMA901-203; Kooperation: R. Oberneder, Urologische Klinik München-Planegg) abgeschlossen und die Studien befinden sich derzeit in der Auswertung durch die Tübinger Firma.

Immunmonitoring zur Pilotstudie: Therapie von Patienten mit nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom

Heike Pohla, Birgit Stadlbauer

Unter Leitung der Chirurgischen Klinik (Klinikum der Universität München) wurde eine klinische Pilot-Phase-I-Studie begonnen, in der Patienten mit nicht-kleinzelligem Bronchiakarzinom (NSCLC) nach chirurgischer Resektion mit bestrahlten, autologen Tumorzellen vakziniert werden. Am Ort der Vakzinierung wurde über eine Minipumpe kontinuierlich GM-CSF appliziert. Zusätzlich erhielten die Patienten vor Vakzinierung und nach Lymphopenieinduktion durch Gabe von Cyclophosphamid/Fludarabine eine Reinfusion autologer Leukozyten (Leukaphereseprodukt). Ziel war die Induktion einer systemischen Tumor-spezifischen Immunantwort und damit die generalisierte Bekämpfung einer vorliegenden Mikrometastasierung (*minimal residual disease*). Präklinische und klinische Studien belegen, dass durch Erzeugung von Lymphopenie die Frequenz zirkulierender Tumor-spezifischer T-Lymphozyten grundsätzlich gesteigert werden kann. Die Analysen zum Immunmonitoring befinden sich derzeit in der Auswertung. Außerdem ist eine weitere Pilotstudie geplant, bei der vor Rekonstitution eine Depletierung Tumor-induzierter regulatorischer T-Zellen (Treg) vorgenommen wird, um die Effizienz dieses therapeutischen Ansatzes zu erhöhen.

Modulation der Funktion regulatorischer T-Zellen

Heike Pohla, Birgit Stadlbauer, Heidi Herbig

Regulatorische T-Zellen (Treg) spielen in der Immunologie eine zentrale Rolle und gehören derzeit zu den am intensivsten erforschten Zellen des Immunsystems. Sie besitzen suppressive Eigenschaften, die es ihnen ermöglichen, Immunreaktionen zu kontrollieren. So kann eine Depletierung der Zellen oder die Dysfunktion sowohl zur Entstehung oder Aufrechterhaltung von Autoimmunerkrankungen führen, als auch die Reaktivität Tumor-spezifischer T-Zellen fördern. Bei ca. 2/3 unserer Nierenzellkarzinompatienten konnten wir während der Vakzinierung eine zahlenmäßige Reduktion der Treg und gleichzeitig eine erhöhte Frequenz Tumorantigen-spezifischer T-Zellen beobachten. Die zugrunde liegenden Mechanismen möchten wir zukünftig aufklären. Tregs, in der Tumorummunologie eher unerwünscht, sind beispielsweise in der Transplantationsimmunologie zur Blockade der Gewebeabstoßung durchaus erwünscht. Für die Thematik „Modulation of xenogeneic responses via regulatory T cells“ wurde im Rahmen der DFG Transregio-Forscherguppe FOR 535 ein neues Projekt beantragt und positiv begutachtet.

3.2.4 Weiterentwicklung des Immunmonitorings

Heike Pohla, Birgit Stadlbauer, Heidi Herbig

Professionelles Immunmonitoring umfasst die parallele Anwendung der unterschiedlichsten Technologien, die nur zusammen die Bestimmung der Frequenz, des Phänotyps, die Funktion und die Homing-Kapazität Vakzine-induzierter Lymphozyten in der Zirkulation oder im Zielgewebe ermöglichen. Nur eine Kombination der Methoden wird auch zu einem validen Set von Surrogatmarkern für erfolgreiche immuntherapeutische Strategien in der Zukunft führen. Folgende Technologien wurden für das Immunmonitoring am LTI etabliert: der ELISPOT zur Quantifizierung Antigen-spezifischer T-Zell-Antworten anhand von Zytokin- bzw. Granzym- oder Perforinproduktion, *cytometric bead arrays* für die gleichzeitige Quantifizierung von bis zu 30 verschiedenen Zytokinen und Chemokinen aus Serum und Zellkulturüberständen, der Zytokin-Sezernierungsassay bzw. *Cytokine-capture-Assay*, der eine Anreicherung z. B. CD4+ und CD8+ Tumor-spezifischer T-Zellen auch ohne Kenntnis des Antigens erlaubt, Multiparameter-Immunfluoreszenz am LSRII-FACS-Gerät, für eine kombinierte phänotypische und funktionelle Analyse verschiedener T-Zell-

Subpopulationen, MHC/Peptid-Multimer-Bindungsanalysen sowie die quantitative TCR-Analyse mittels Real-time-RT-PCR. Die AG H. Pohla ist hier in die Immunmonitoring-Plattform des Helmholtz Zentrums München eingebunden (<http://www.helmholtz-muenchen.de/immunmonitoring/startseite/index.html>) und hat an mehreren internationalen Ringversuchen des Cancer Vaccine Consortiums (CVC) des Cancer Research Institutes, New York (Janetzki et al., 2008) und der Monitoring Working Group der Association for Cancer Immunotherapy (Mander et al. 2009 Epub, Britten et al. 2009) zur Standardisierung der Immunmonitoring-Technologien erfolgreich teilgenommen.

3.3 Experimentelle Urologie

3.3.1 Projektgruppe Cannabinoid-Rezeptoren

Christian Gratzke

Die Rationale der vorliegenden Arbeit gründete auf klinischen Beobachtungen, wonach die Einnahme von Cannabinoid-Extrakten bei Patienten mit Multipler Sklerose zu einer Besserung von Symptomen des unteren Harntraktes führt. In einer grundlegenden Arbeit hatte unsere Arbeitsgruppe die Expression sowie die Funktion von Cannabinoid-Rezeptoren 1 und 2 (CB1 & CB2) in der Harnblase von Ratte, Affe und Mensch untersucht (Gratzke et al, *The Journal of Urology* 181, 1939-1948, 2009). Dabei zeigte sich der CB2-Rezeptor in der Mukosa signifikant stärker exprimiert als im *M. detrusor vesicae* in allen Spezies, während CB1-Rezeptoren nur vereinzelt in der gesamten Harnblase exprimiert wurden. Im Suburothel fanden sich CB2-Rezeptoren auf sensiblen Nervenfasern, die gleichzeitig immunopositiv für den Transient Rezeptor Potential V1 (TRPV1)-Ionenkanal sowie das Calcitonin Gene-Related Peptide (CGRP) als Marker für afferente Nervenfasern waren. Nervenfasern, die sowohl CB2 als auch den vesikulären Acetylcholin-Transporter (VACht) als Marker für efferente Nerven aufwiesen, wurden im *M. detrusor vesicae* gefunden. Weder Anandamid, ein endogener Cannabinoid-Rezeptor-Agonist, der auch TRPV1-Ionenkanäle aktiviert, noch CP 55,940, ein hochpotenter synthetischer CB1/CB2-Agonist, kontrahierten oder relaxierten isolierte Gewebestreifen *in vitro*. Dagegen verstärkte Anandamid neural induzierte Kontraktionen signifikant, während CP 55,940 diese signifikant abschwächte. In den In-vivo-Versuchen an wachen weiblichen Ratten verursachte CP 55,940 eine Verlängerung des Miktionsintervalls und Erniedrigung des Schwellendruckes, während Anandamid den Schwellendruck erhöhte und das Miktionsintervall senkte.

Zusammenfassend zeigten die durchgeführten Untersuchungen, dass das Endocannabinoid-System periphere, direkte Effekte auf die Harnblase ausübt. Nachdem angenommen wird, dass sowohl Miktionsintervall als auch Schwellendruck typischerweise durch „afferente“ Stimuli reguliert werden, scheint den CB2-Rezeptoren eine Bedeutung im afferenten Schenkel der Regulation des Miktionszyklus zuzukommen. Die Ko-Lokalisation von VACht und CB2 sowie die Effekte von CP 55,940 auf neuronal induzierte Kontraktionen glatter Muskelstreifen zeigt weiterhin einen modulatorischen Effekt von CB2-Rezeptoren bei cholinergem Nervenstimulation. Dies könnte zu den am Menschen beobachteten urodynamischen Effekten nach der Einnahme von Cannabis-Extrakten beigetragen haben. Die divergierenden Effekte von Anandamid und CP 55,940 könnten auf die Aktivierung von z. B. TRPV1-Ionenkanälen durch Anandamid zurückzuführen sein, was deren physiologische Relevanz für die Anandamid-Effekte unterstreicht.

Aufbauend auf dieser Arbeit war die Entwicklung eines selektiv peripher wirksamen (d.h. nicht die Blut-Hirn-Schranke überschreitenden) CB2-Agonisten der nächste logische und konsequente Schritt, um die Bedeutung peripherer Cannabinoid-Rezeptoren zu untersuchen. Mit dem zur Zeit für noch keine Indikation zugelassenen Cannabis-Extrakt "*Cannabinor*" (Pharmos Limited, Rehovot, Israel) wurde eine Substanz gefunden, die allen geforderten Kriterien entsprach. *Cannabinor* ist ein voller CB2-Rezeptor-Agonist mit schwacher Wirkung an CB1-Rezeptoren (Affinität 10 nM am CB2-Rezeptor, $K_i = 9.7 \times 10^{-9}$ M, und 330 nM am CB1 Rezeptor, $K_i = 3.3 \times 10^{-7}$ M). In unserem Labor wurde erstmalig in einem Tiermodell (Ratte) der Effekt von *Cannabinor* in einem urologischen Zusammenhang untersucht. Die intravenöse Verabreichung von *Cannabinor* in verschiedenen Dosierungen führte zu ähnlichen Effekten wie nach Verabreichung von CP 55,940. So zeigte sich eine Erhöhung des Miktionsintervalls, des Blasenschwelledruckes sowie der Blasenkapazität und des Blasenvolumens. Somit scheint sich die Hypothese zu bestätigen, wonach durch Stimulation peripherer CB2-Rezeptoren auf sensiblen Nervenfasern und auf cholinergen Nerven im Detrusor sowohl afferente als auch efferente Impulse eine Verlängerung des Miktionsintervalls bewirken.

Im Zweiten Schritt testeten wir entsprechend unserem Antrag den Effekt von *Cannabinor* auf die Blasenfunktion in einem Modell mit partieller Harnröhren-Obstruktion. Dieses Modell ist etabliert bei der Simulation einer Detrusor-Überaktivität und wird als Tiermodell zur Testung der Effekte von Substanzen auf Symptome der überaktiven Blase (OAB) verwendet. Dabei zeigte sich nach chronischer Verabreichung (intraperitoneal) von *Cannabinor* mit 3 mg/kg über 14 Tage bei zehn Ratten im Vergleich zu zehn Ratten, die ebenfalls harnröhrenligiert wurden, aber kein *Cannabinor* erhielten, eine signifikante Verkürzung des Miktionsintervalls sowie eine signifikante Erhöhung des Blasenschwelledruckes (*threshold pressure*) und Flussdruckes (*flow pressure*). Die Ratten, die mit *Cannabinor* behandelt wurden, zeigten eine signifikant geringere Inzidenz von unwillkürlichen Blasenkontraktionen (*non-voiding contractions*, NVC).

3.3.2 Neue Regulations- und Funktions-Prinzipien prostatischer α_1 -Adrenozeptoren

Martin Hennenberg, Christian Gratzke

Alpha1-Adrenozeptoren vermitteln die Kontraktion der glatten Prostata-Muskulatur und sind daher einer der Hauptansatzpunkte für die pharmakologische Therapie von Symptomen des unteren Harntraktes (*lower urinary tract symptoms*, LUTS) bei Patienten mit benigner Prostata-Hyperplasie (BPH). Durch die Behandlung mit α_1 -Blockern kommt es zu einer Erschlaffung der glatten Prostata-Muskulatur, was zur Verbesserung des Harnflusses bei LUTS-Patienten beiträgt. Daher ist die Funktion und Regulation prostatischer α_1 -Adrenozeptoren von größtem Interesse.

Während die Expression prostatischer α_1 -Adrenozeptoren und die Verteilung der verschiedenen Subtypen bereits eingehend charakterisiert wurden, ist die posttranslationale Regulation sowie die intrazelluläre Signalgebung der prostatischen α_1 -Adrenozeptoren nur unzureichend verstanden. Verschiedene Anhaltspunkte legen nahe, dass die Regulation und Funktion prostatischer α_1 -Adrenozeptoren über das zur Zeit bekannte Maß hinausgehen dürfte. Daher sollten in verschiedenen Teilprojekten neue Regulations- und Funktions-Prinzipien prostatischer α_1 -Adrenozeptoren identifiziert werden.

Teilprojekt 1

Eines der Teilprojekte befasste sich mit der möglichen Kopplung prostatischer α 1-Adrenozeptoren an MAP-Kinasesignalwege. Hierbei zeigten Untersuchungen an intaktem Prostatagewebe aus radikalen Prostatektomien, dass die drei bekannten MAP-Kinasen (ERK1/2, p38, JNK) in der Prostata durch α 1-Adrenozeptoren reguliert werden. MAP-Kinasen sind durch Regulation von Proliferation, Zelltod und Differenzierung an der Steuerung von Wachstums-Vorgängen beteiligt.

Die In-vitro-Stimulation von isoliertem Prostatagewebe mit dem α 1-Adrenozeptor Agonisten Phenylephrin führte zu einer Aktivierung der ERK1/2 und der JNK, bei gleichzeitiger Deaktivierung der p38. Dieses Muster der MAP-Kinase-Regulation legt eine Begünstigung des Prostata-Wachstums durch α 1-Adrenozeptoren nahe. In myographischen Organbad-Untersuchungen blieben die Hemmung von ERK1/2 durch den MEK-Inhibitor U0126, bzw. der p38 durch SB202190 ohne Effekt auf die Phenylephrin-induzierte Kontraktion. Dies führte zu der Vermutung, dass die Aktivierung bzw. Deaktivierung dieser Signalwege nicht an der α 1-adrenergen Kontraktion beteiligt sind, sondern im Zusammenhang mit nicht-kontraktilen Funktionen prostatischer α 1-Adrenozeptoren stehen dürften, die noch zu identifizieren sind. Erste Versuche ergaben, dass die α 1-adrenerge ERK-Aktivierung zu einer Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors Elk-1 in der humanen Prostata führt. Über immunhistochemische Untersuchungen von Prostataschnitten konnte gezeigt werden, dass ERK1/2, p38, JNK, und Elk-1 in glatten Muskelzellen exprimiert werden, so dass die geschilderten Prozesse dort stattfinden dürften. Weiterführende Untersuchungen werden zurzeit durchgeführt.

Myographische Organbad-Untersuchungen zeigten, dass der JNK-Inhibitor SP600125 die Phenylephrin-induzierte Prostataktraktion hemmt. Dies lässt sich ausschließlich durch die Beteiligung einer JNK-Aktivierung an der α 1-adrenergen Prostataktraktion erklären. Die JNK-vermittelte Kontraktion der glatten Prostata-Muskulatur stellt neben den bislang beschriebenen Calcium- und Rho-Kinase-abhängigen Mechanismen einen neuen, dritten Kontraktionsmechanismus dar. Die Untersuchungen zur JNK-vermittelten Kontraktion werden zurzeit fortgesetzt. Es wird vermutet, dass die JNK-vermittelte Kontraktion über eine Phosphorylierung von Caldesmon und hieraus resultierende Verstärkung der Aktin-Myosin-Interaktion erfolgt.

Ein Manuskript zur ERK-Aktivierung befindet sich *in review* (BJUI). Ein Manuskript, welches die Rolle der JNK für die α 1-adrenerge Kontraktion sowie die Deaktivierung der p38 beschreibt, wurde verfasst und wird eingereicht. Weitere Untersuchungen zur JNK-vermittelten Kontraktion werden Anfang 2010 zu einem weiteren Manuskript zusammengefasst.

Teilprojekt 2

In einem weiteren Teilprojekt wurde die mögliche Interaktion prostatischer α 1-Adrenozeptoren mit b-Arrestinen untersucht. Beta-Arrestine können an aktivierte G-Protein-gekoppelte Rezeptoren binden, und dabei durch eine Verdrängung der Rezeptor-gekoppelten G-Proteine die Rezeptor-Signalgebung erheblich beeinflussen. Dies umfasst eine Verminderung der G-Protein-vermittelten Signaltransduktion, bei gleichzeitig erfolgreicher Arrestin-abhängiger Signalgebung.

Über quantitative RT-PCR, Western-blot-Analysen und immunhistochemische Färbungen konnte nun erstmalig die Expression von b-Arrestin-2 (mRNA, Protein) in

der humanen Prostata gezeigt werden. Koimmunpräzipitationsstudien zeigten, dass es zu einer Bindung von b-Arrestin-2 an $\alpha 1A$ -Adrenozeptoren kommt, jedoch nicht zur Interaktion zwischen b-Arrestin-2 und $\alpha 1D$ -Adrenozeptoren. Sowohl die Expression von b-Arrestin-2 als auch die des $\alpha 1A$ -Adrenozeptors ist in der Prostata auf glatte Muskelzellen beschränkt. Daher ist zu vermuten, dass die beobachtete Interaktion dort stattfindet. Da der $\alpha 1A$ -Subtyp verantwortlich für die $\alpha 1$ -adrenerge Kontraktion ist, dürfte die b-Arrestin-2-vermittelte Regulation des Rezeptors einen wichtigen Faktor bei der Therapie von BPH Patienten mit $\alpha 1$ -Blockern darstellen.

Aktuell wird die Expression und $\alpha 1$ -Adrenozeptor-Interaktion von b-Arrestin-1 in der humanen Prostata untersucht. Darüber hinaus sind Untersuchungen zur Interaktion prostatistischer $\alpha 1$ -Adrenozeptoren mit weiteren akzessorischen Proteinen vorgesehen. Ein Manuskript, das die oben geschilderten Ergebnisse beschreibt, wurde verfasst und wird eingereicht.

Teilprojekt 3

Ein weiteres Teilprojekt untersucht die Kommunikation prostatistischer $\alpha 1$ -Adrenozeptoren mit anderen Rezeptoren. Durch Verwendung eines phosphospezifischen Antikörpers konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung prostatistischer $\alpha 1$ -Adrenozeptoren durch Phenylephrin zu einer Transphosphorylierung von $\beta 2$ -Adrenozeptoren am Serin345/Serin346 führt. Die Phosphorylierung des $\beta 2$ -Adrenozeptors an diesen Positionen führt zu einer Desensibilisierung des Rezeptors, was wiederum eine Kontraktion begünstigen würde. Dies könnte über die JNK-vermittelte Kontraktion hinaus (s.o.) einen weiteren, neuen Mechanismus darstellen, den prostatistische $\alpha 1$ -Adrenozeptoren für die Kontraktion verwenden. Es wird vermutet, dass diese Phosphorylierung des $\beta 2$ -Adrenozeptors über eine Aktivierung der G-Protein-gekoppelten Rezeptor-Kinase 2 (GRK2) erfolgt. Western-blot-Analysen und immunhistochemische Färbungen zeigten, dass GRK2 in glatten Muskelzellen der humanen Prostata exprimiert wird. Um eine Beteiligung der *Second-messenger*-Kinasen PKC und PKA auszuschließen, wird z. Z. der Effekt einer pharmakologischen Hemmung dieser Kinasen auf die $\alpha 1$ -adrenerge $\beta 2$ -Adrenozeptor-Phosphorylierung geprüft.

Weiterhin wird aktuell die mögliche Regulation von Rezeptor-Tyrosinkinasen durch $\alpha 1$ -Adrenozeptoren in der humanen Prostata untersucht. Diese Studien werden durch das FöFoLe-Programm der LMU (Reg.-Nr. 654) gefördert.

Zusammenfassung

Insgesamt führen die Ergebnisse aus den einzelnen Teilprojekten zu einem neuen Modell prostatistischer $\alpha 1$ -Adrenozeptors. Hierbei wird das klassische Modell eines statischen, Kontraktions-vermittelnden $\alpha 1$ -Adrenozeptors durch das Modell eines dynamischen Rezeptors ersetzt, bei dem die Kontraktion nur eine von mehreren Funktionen ist und die Kopplung an G-Proteine lediglich einen von mehreren möglichen Zuständen darstellt.

In den beschriebenen Teilprojekten wurden zwei neue Mechanismen identifiziert, die über die bereits bekannten Mechanismen (Calcium, Rho-Kinase) an der $\alpha 1$ -Adrenozeptor-induzierten Kontraktion der glatten Prostata-Muskulatur beteiligt sind. Nichtkontraktile Funktionen prostatistischer $\alpha 1$ -Adrenozeptoren umfassen mindestens die Regulation von MAP-Kinasen und Transkriptionsfaktoren.

3.3.3 TRPA1-Ionen-Kanäle

Philipp Weinhold, Christian Gratzke

Die Rationale des vorliegenden Projektes gründete auf experimentellen Beobachtungen, in denen TRPA1-Ionen-Kanäle in der humanen Harnröhre nachgewiesen wurden, sowie TRPA1-Agonisten eine Relaxation der glatten Muskulatur der Harnröhre in vitro verursacht haben. Außerdem scheinen TRPA1-Ionen-Kanäle eine Rolle bei der afferenten und efferenten Signalweiterleitung im unteren Harntrakt zu spielen (Gratzke et al., 2009). In der grundlegenden Arbeit hatte unsere Arbeitsgruppe die genauen Mechanismen der zustande kommenden Relaxation durch TRPA1-Agonisten auf eine mögliche Interaktion mit sensorischen oder inflammatorischen Prozessen untersucht (Weinhold et al. J Urol, 2010). Dabei wurden die Effekte von TRPA1-Agonisten allein und in Kombination mit dem TRPV1-Agonisten Capsaicin, mit dem TRPV1 Antagonisten Capsazepin, dem Cyclooxygenase-Inhibitor (COX-Inhibitor) Indomethacin, dem Cannabinoid-Rezeptor-Agonisten CP55910 und dem NOS-Inhibitor L-NNA mittels Organbadversuchen untersucht. Zusätzlich führten wir noch Versuche an der Harnröhre ohne Urothel durch.

Dabei zeigte sich einmal, dass alle TRPA1-Agonisten zu einer Relaxation des vorkontrahierten Gewebes führten, jedoch die Relaxation in Anwesenheit von dem TRPV1-Antagonisten Capsazepin, dem Cyclooxygenase-Inhibitor Indomethacin und dem Cannabinoid-Rezeptor-Agonisten CP55940 vermindert wurde. Die durch TRPA1-Agonisten induzierte Relaxation wird in Kombination mit dem TRPV1-Agonisten Capsaicin verstärkt. Es konnte kein Unterschied der TRPA1-induzierten Relaxation in Anwesenheit und Abwesenheit von L-NNA, sowohl bei vorhandenen Urothel, als auch in Abwesenheit des Urothels festgestellt werden.

Zusammenfassend zeigten die durchgeführten Versuche eine Zusammenarbeit von TRPA1 und TRPV1 in der mechansosensorischen Funktion. Die durch TRPA1-Agonisten verursachte Relaxation am humanen Ureter wurde in Anwesenheit von Capsaicin verstärkt und durch Capsazepin vermindert. Daraus lässt sich schließen, dass TRPA1-Ionen-Kanäle in Entzündungsreaktionen im unteren Harntrakt involviert sind. Das heißt durch TRPA1-Ionen-Kanäle stimulierte nachgeschaltete Mediatoren beinhalten Indomthacin-sensitive COX-Produkte. TRPA1, CB1- und CB2-Rezeptoren zeigten eine Koexpression in Nerven der humanen Urethra. Der CB1- und CB2-Rezeptorantagonist CP55940 zeigte im Versuch ebenfalls eine Verminderung der TRPA1-induzierten Relaxation. Was CB1- und CB2-Rezeptoren zu interessanten Zielen der pharmakologischen Therapie der LUTS macht. Keine unterschiedlichen Effekte konnte man bei den Versuchen mit und ohne Urothel feststellen, was bedeutet, dass durch TRPA1 verursachte urotheliale Signale nicht wichtig für die Regulation der glatten Muskulatur an der humanen Urethra zu sein scheinen.

3.3.4 Thromboxan-induzierte Kontraktion in der humanen Prostata

Frank Strittmatter, Christian Gratzke

Die Kontraktion der glatten Muskulatur in der Prostata erfolgt über die Aktivierung der Rho-Kinase und Ca^{2+} /Calmodulin-abhängiger Mechanismen. Diese Aktivierung erfolgt durch $\alpha 1$ -Adrenozeptoren. Daher werden Patienten mit obstruktiver Miktions-symptomatik (*lower urinary tract symptoms*, LUTS), bei denen ein erhöhter Tonus von prostatistischen Muskelzellen in der Prostata eine entscheidende Rolle spielt, im klinischen Alltag routinemäßig mit $\alpha 1$ -Adrenozeptor-Blockern behandelt. Da solche Eingriffe in den Tonus der glatten Prostata-Muskulatur die Basis für medikamentöse

Therapien darstellen, sind die Mediatoren und Mechanismen der Prostata-Kontraktion von großem Interesse. Die Identifizierung neuer Mediatoren der Prostata-Kontraktion war daher Gegenstand der unten dargestellten wissenschaftlichen Arbeiten.

Teilprojekt 1

Thromboxan A₂ (TXA₂), ein Prostaglandinderivat, führt neben der Thrombozyten-Aggregation und der Modulation von Entzündungsprozessen in verschiedenen Typen von glatter Muskulatur zur Kontraktion. Untersuchungen zur TXA₂-induzierten Kontraktion von glatten Muskelzellen der Prostata gibt es bisher jedoch nicht. Ziel dieses Projektes war es, eine eventuelle Kontraktion durch TXA₂ im Prostatagewebe zu untersuchen und seine intrazellulären Abläufe zu verstehen. Für die unten genannten Untersuchungen wurde periurethrales, gesundes Prostatagewebe von Patienten verwendet, die aufgrund eines Prostatakarzinoms radikal prostatektomiert werden mussten. Der Nachweis der Thromboxan-Synthase (TXA₂-S) und des Thromboxan-Rezeptors (TXA₂-R) erfolgte mit Hilfe von Western-blot-Analyse. Weiterhin wurde die Expression von TXA₂-S und TXA₂-R durch immunhistochemische Färbungen untersucht. Zum Nachweis des stabilen TXA₂-Metaboliten TXB₂ im Prostatagewebe wurde ein Enzymimmunoassay angewandt. Zur Untersuchung der TXA₂-induzierten Kontraktion von Prostatagewebe wurden in Organbadversuchen myographische Messungen zum Effekt des stabilen TXA₂-Analogons U46619 durchgeführt.

In der Western-blot-Analyse von humanem Prostatagewebe wurde sowohl für den TXA₂-R in unglykosylierter und glykosylierter Form als auch für die TXA₂-S-Banden in den zu erwartenden Größen beobachtet. Über immunhistochemische Färbungen konnte der TXA₂-R sowohl in glatten Muskelzellen wie auch in Drüsenzellen nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu fand sich die TXA₂-S nur in Drüsenzellen des Prostatagewebes. Durch den Nachweis von TXB₂ mit Hilfe des Enzymimmunoassays konnte das Vorkommen von TXA₂ in der Prostata gezeigt werden. In myographischen Organbadversuchen wurde eine Dosis-abhängige Kontraktion durch U46619, einem stabilen Derivat von TXA₂, beobachtet. Diese U46619-induzierten Kontraktionen traten in einem Konzentrations-Bereich von 0,1-3 mM auf. Um den intrazellulären Mechanismus der TXA₂-induzierten Kontraktion zu ermitteln, wurde in weiteren Versuchsreihen der Effekt von Y27632, einem Rho-Kinase-Inhibitor, und von W7, einem Calmodulin-Inhibitor, auf die U46619-induzierte Kontraktion untersucht. Durch die Zugabe beider Inhibitoren in unabhängigen Versuchsreihen wurde die Kontraktion durch U46619 signifikant gehemmt. Durch diese Versuchsabläufe konnte der intrazelluläre Kontraktionsablauf von TXA₂ in der glatten Muskelzelle der Prostata aufgezeigt werden.

Diese Arbeit stellt den ersten Nachweis einer TXA₂-vermittelten Kontraktion der glatten Prostata-Muskulatur dar. Die Mechanismen der TXA₂-induzierten Kontraktion gleichen denen der α 1-Adrenozeptoren. Eine parakrine Interaktion zwischen glatten Muskelzellen und Epithelzellen könnte von Bedeutung für die Regulation des Prostata-Tonus sein. Ein Manuskript dazu wurde erstellt und wird in Kürze eingereicht. Weitere Untersuchungen sind geplant, in denen Thromboxan-basierte LUTS-Therapien in Tiermodellen geprüft werden sollen. Darüber hinaus soll die Bedeutung von Thromboxan in pathophysiologischen Zusammenhängen der Prostata (benigne Prostata-Hyperplasie, Prostatitis) geklärt werden soll.

Teilprojekt 2

Über Thromboxan hinaus wurden andere potentielle Mediatoren der Prostata-Kontraktion untersucht. Dies sind Urotensin II, Leukotrien C₄ und Sphingosin-1-Phosphat (S1P). Alle Mediatoren führen in verschiedenen Typen glatter Muskulatur zu einer Kontraktion oder Relaxation. Hier wurde erstmalig eine mögliche Motorik der glatten Prostata-Muskulatur durch diese Mediatoren untersucht. In myographischen Organbadversuchen führte jedoch keiner dieser Mediatoren zu einer Kontraktion oder Relaxation von humanem Prostatagewebe.

3.3.5 Bedeutung des suburothelialen Myofibroblastennetzwerkes für die Pathogenese der überaktiven Blase

Alexander Roosen; Förderung: DFG

Im menschlichen Gewebe konnte die Bedeutung des suburothelialen Myofibroblasten-Netzwerks (MF-Netzwerks) für Blasenfunktion und -dysfunktion nachgewiesen werden. MF bilden ein funktionales Synzytium durch elektrische Kopplung über das *Gap-junction*-Protein Connexin 43 (Cx43) und mechanische Kopplung über *Zonulae adhaerentes* (Cadherin-11/ β -Catenin). Wegen ihrer engen Lagebeziehung zu afferenten Nervenfasern in der *Lamina propria* wird den MF eine Relaisfunktion in der Weiterleitung der sensorischen Information aus dem Urothel zugeschrieben. Tatsächlich sollen die MF mithilfe ihrer langen Fortsätze, mit denen sie afferente C-Fasern umgreifen, und ihres kontraktile Apparates diese Fasern mechanisch beeinflussen können. Sie könnten gleichfalls einen direkten Effekt auf den Detrusor haben. Patienten mit therapierefraktärem instabilen Detrusor werden mit Botulinumtoxin-Injektion (BoNT/A-Injektion) in die Blasenwand behandelt, kalte Biopsien wurden mittels flexibler Zystoskopie vier und 16 Wochen nach Behandlung entnommen. Die Biopsate wurden immunhistochemisch auf Cx43, Vimentin, c-Kit, Cadherin-11 und β -Catenin untersucht und mit Kontrollbiopsien von Patienten ohne Drangsymptomatik verglichen. Sowohl idiopathische als auch neurogene Detrusorüberaktivität sind mit einer größeren Dichte an *gap junctions* (elektrische Kopplung) und mit einer gesteigerten Expression der extrazellulären Komponente (Cadherin-11) der *Zonulae adhaerentes* (mechanische Kopplung) korreliert. Somit könnte eine intensivere elektrische und ggf. mechanische Kopplung im Myofibroblastennetzwerk Anteil an der Pathogenese der Detrusorüberaktivität haben. Obwohl BoNT/A-Injektionen den pathologischen Harndrang und die Detrusorautonomie wirkungsvoll therapieren, wird die suburotheliale Dichte von *gap junctions* offenbar dadurch nicht beeinflusst. Dies würde gut zur bekannten Wirkdauer der BoNT/A-Injektionen von nicht mehr als zehn Monaten passen. Es ist bereits gezeigt worden, dass BoNT/A die Anzahl der sensorischen P2X₃- und TRPV1-Rezeptoren auf suburothelialen Nervenendigungen senkt; diese Rezeptoren scheinen somit das strukturelle Surrogat für Veränderungen durch BoNT/A im Suburothel zu sein.

3.3.6 Adreno-muskarinerges Synergismus und Spontanaktivität des Trigonums

Alexander Roosen; Förderung: DFG

Zum ersten Mal wurde eine prominente Wechselwirkung zwischen adrenerger und cholinerges Aktivierung des Trigonums beschrieben. Dieses Phänomen wird adreno-muskarinerges Synergie genannt. Dass dieser Effekt postsynaptisch, also an der

Myozytenmembran, lokalisiert ist, konnte dadurch bewiesen werden, dass adrenerge Stimulation nicht nur elektrisch evozierte Kontraktionen, sondern auch Spannung, die durch muskarinerge Aktivierung hervorgerufen wird, potenziert. Z. B. verstärkten 10 μM Phenylephrin die Kontraktion, die durch 1 μM Carbachol induziert wird, um das $3,9 \pm 1,2$ -fache. Dieser ausgeprägte synergistische Effekt, der im Organbad beobachtet wurde, war nicht begleitet von entsprechenden Anstiegen der intrazellulären Kalziumionenkonzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) in der isolierten einzelnen Zelle. Wenn $[\text{Ca}^{2+}]_i$ konstant ist, können Agonisten durch Aktivierung von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren eine Linksverschiebung auf der Ca^{2+} /Spannungs-Kurve verursachen: Dieses Phänomen wird Kalzium-Sensitivierung genannt. Die zwei vorrangigen G-Protein-gekoppelten Signaltransduktionswege führen über die DAG-aktivierte Proteinkinase C (PKC) und die G_q -aktivierte Rho-Kinase (ROK). Beide inhibieren die Myosin-Phosphatase und unterstützen dadurch die Phosphorylierung der leichten Ketten des Myosins und damit die Kraftentwicklung. Die durch Phenylephrin vermittelte Kontraktion wurde drastisch durch den PKC-Inhibitor GF 109203X und in geringerem Maße durch den ROK-Inhibitor Y-27632 gehemmt, wohingegen die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ unverändert blieb. Der Effekt der PKC-Inhibierung auf die kombinierte Intervention ergab eine drastische Reduktion der Potenzierung um 73 %. Der ausgeprägte Effekt der Kinasen-Inhibierung auf die potenzierte muskarinerge Komponente der kombinierten Intervention zeigt deutlich, dass die adreno-muskarinerge Synergie im Trigonum hauptsächlich PKC- und zu einem geringeren Maße ROK-vermittelt ist. Die Daten weisen ferner darauf hin, dass die adrenerge Signalkaskade im wesentlichen über die Kalziumionen-Sensitivierung des kontraktiven Apparats arbeitet und damit zu einer mehr als vierfachen Potenzierung der muskarinergen Kraftentwicklung in der Lage ist, die ihrerseits ein vornehmlich $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -abhängiges Ereignis zu sein scheint. Diese Synergie könnte einen deutlich erhöhten Verschußdruck im Falle unwillkürlicher Detrusorkontraktionen zur Folge haben und dadurch Inkontinenz vermeiden helfen.

Durch die vorgelegten Arbeiten konnte die Blasenbasis als Ort ausgeprägter spontaner Aktivität beschrieben werden. Deutliche spontane $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Transienten und Kontraktionen wurden in trigonalen isolierten Zellen und Streifenpräparaten beobachtet. Die Spontanaktivität war signifikant höher als im Detrusor. Kalziumionenfreie Nährlösung und Verapamil beendeten die Spontanaktivität sowohl der isolierten Zelle als auch der intakten Präparation. Der Cl-Kanal-Blocker Niflumsäure konnte sowohl $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Transienten der isolierten Zelle als auch die spontanen Kontraktionen der Muskelpräparation mindern. Im Trigonum fand sich eine fünfmal höhere Cx43-Immunreaktivität als im Detrusor. Folgerichtig hatte der *Gap-junction*-Blocker 18- β -glycyrrhetinische Säure einen inhibierenden Effekt auf spontane Kontraktionen im Trigonum, nicht jedoch im Blasendach.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass sich trigonale Myozyten – ähnlich den interstitiellen Detrusorzellen – membranöser L-Kalzium- und Chlorid-Kanäle bedienen, um eine ausgeprägte Spontanaktivität zu entwickeln. Intensive elektrische Kopplung gewährleistet die Ausbreitung der spontanen Impulse und dadurch eine nachhaltige Kontraktion des gesamten Trigonums während der Blasenfüllung.

3.3.7 Untersuchungen des suburothelialen Myofibroblastennetzwerkes und der glattemuskulären Funktion und Steuerung im menschlichen Harnausflußtrakt bei Kontinenz und Inkontinenz

Alexander Roosen; Förderung: DFG

Harninkontinenz mindert die Lebensqualität des einzelnen und hat gleichzeitig erhebliche sozioökonomische Auswirkungen. Die komplizierten Kontinenzmechanismen des Harnausflußtrakts sind letztlich nur unvollständig verstanden. Der Großteil der experimentellen Daten stammt aus dem Tierexperiment; Studien an Humanewebe sind rar. Obwohl oftmals eine zugrunde liegende Ursache für die Harninkontinenz benannt werden kann (radikale Prostatektomie, überaktiver Detrusor, Insuffizienz des bindegewebigen Halteapparates), ist die Pathophysiologie der "essentiellen" Inkontinenz unbekannt: Handelt es sich um strukturelle oder funktionelle Schäden auf muskulärer Ebene oder um Veränderungen bei der neuromuskulären Übertragung (relative Denervierung oder Minderung der Rezeptorendichte)? Oder ist die neuromuskuläre Einheit intakt und der Defekt auf einer höheren – spinalen – Ebene zu suchen? Wir haben als erste bedeutende synergistische Effekte in der neuromuskulären Aktivierung und eine starke Spontanaktivität der Blasenaußflußregion im Tiermodell beschrieben. Diese Mechanismen könnten relevant für die Kontinenz auch beim Menschen sein.

Unsere Untersuchungen haben weiterhin zum besseren Verständnis der Funktion von suburothelialen Myofibroblasten beigetragen, die ein elektrisch kontraktiles Netzwerk unter dem Urothel bilden und sensorische Informationen aus der Blase modulieren und weiterleiten und an der Pathogenese des hyperaktiven Detrusors beteiligt zu sein scheinen. Im Detail sollen in diesem Projekt vier Hypothesen verifiziert bzw. falsifiziert werden:

- 1) Ein ausgeprägter adreno-muskariner Synergismus existiert auch im menschlichen Harnausflußtrakt. Es könnten sich Unterschiede bei Patienten mit Harninkontinenz zeigen.
- 2) Eine prominente Spontanaktivität und elektrische Kopplung kennzeichnet auch die menschliche Ausflussregion. Beeinträchtigungen könnten ebenfalls ursächlich für Harninkontinenz sein.
- 3) Bei Patienten mit primärer Stressinkontinenz liegen Funktionseinschränkungen auf muskulärer Ebene in der Harnröhre vor, so z. B. Änderungen der neuromuskulären Kopplung durch relative Denervierung oder verminderte Rezeptorendichte.
- 4) Das suburotheliale Myofibroblastennetzwerk kontrahiert aktiv und unabhängig vom darunter liegenden Detrusor entweder spontan oder nach Aktivierung durch Agonisten (ADP, UTP). Kontraktile Eigenschaften dieses Netzwerkes könnten bei Patienten mit Speicher- oder Entleerungssymptomen beeinträchtigt sein.

3.3.7 Bedeutung von CEACAM1 bei der Diagnostik des nicht-invasiven Harnblasenkarzinoms

Derya Tilki; Förderung: Else-Kröner-Fresenius-Stiftung

Oberflächliche nicht-invasive Tumore bekommen in der Regel erst dann einen enormen Wachstumsschub, wenn sie in der Lage sind, eine Neubildung von Blutgefäßen aus bereits bestehenden Gefäßen, nämlich die Angiogenese, zu initiieren. Unsere Arbeitsgruppe konnte kürzlich zeigen, dass das Zelladhäsionsmolekül CEACAM1, welches bei der gesunden Harnblase an der luminalen Oberfläche des Harnblasenepithels nachzuweisen ist, schon bei nicht-invasiven Tumoren der Harnblase in Epithelzellen herunterreguliert ist, während es in Endothelzellen benachbarter Blutgefäße hochreguliert wird. Weiterhin konnten wir zeigen, dass dieses Umschalten der CEACAM1-Expression mit der Aktivierung der Angiogenese einhergeht. Ziel dieser Arbeit war es, den Nachweis von CEACAM1 im Urin und im Gewebe

kombinierend zu untersuchen, um feststellen zu können, inwieweit CEACAM1 in der Frühdiagnostik sowie in der Nachsorge der oberflächlichen Harnblasenkarzinome, wie pTa und Cis, einsetzbar ist.

Unsere Untersuchungen an Urinproben von Personen mit Harnblasenkarzinomen ohne operative Vorbehandlung und von Personen nach Operation des Harnblasenkarzinoms mittels *Western-blot*- und den ELISA-Analysen ergaben, dass die quantitative Spiegelbestimmung der löslichen Formen von CEACAM1 in Urinproben viel versprechend zu sein scheint sowohl für die nicht-invasive Diagnostik des Harnblasenkarzinoms als auch für die Beurteilung der Tumorpotenz hinsichtlich des Übergangs von einem oberflächlichen zu einem invasiven Phänotyp.

Diese Ergebnisse geben Anlass zu weiteren biochemisch und zellbiologisch komplizierteren und komplexen Analysen, um zu klären, wie die in Urinproben nachgewiesenen CEACAM1-Formen generiert werden, welche Zell-Zell-Interaktionen hierbei notwendig sind und welche Enzyme in diese Prozesse involviert sind. Ziel hierbei ist, zu untersuchen, welche Interaktionen zwischen Tumorzellen selbst, oder den Tumorzellen und den Blutgefäßwandzellen, stattfinden, um diese Formen zu generieren. Dies ist deshalb von besonderer klinischer Relevanz, weil erst dann die biologische Bedeutung dieser CEACAM1-Formen sowohl für Tumorwachstum und Metastasierung als auch für die klinische Tumordiagnostik besser beurteilt werden kann.

3.3.8 Gefäßwand-residente hämatopoietische Vorläuferzellen und ihre Rolle in der Tumorvaskularisierung durch postnatale Vaskulogenese

Derya Tilki; Förderung: DFG

Die Voraussetzung für Tumorwachstum und Metastasierung ist die Vaskularisierung durch Angiogenese und postnatale Vaskulogenese. Neben Endothelzellen und endothelialen Vorläuferzellen (EPC), spielen auch akzessorische hematopoietische Vorläuferzellen (HPCs) eine wichtige Rolle bei diesen Prozessen. Es konnte gezeigt werden, dass VEGFR-1(+) HPCs durch die Formierung einer so genannten prämetastatischen Nische noch vor Ankunft von Tumorzellen bedeutend in die Tumormetastasierung involviert sind. Bis vor wenigen Jahren glaubte man, dass EPCs und HPCs nur aus dem Knochenmark stammen. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass sich CD34(+)Tie-2(+)VEGFR-2(+) Zellen in einer Zone der Gefäßwand zwischen *Tunica media* und *Adventitia* befinden, die kapillarähnliche Aussprossungen bilden können. Auch CD45(+)CD34(-)-Zellen, wahrscheinlich HPCs, wurden in dieser Zone der Gefäßwand gefunden. Das Ziel dieses Projektes ist die Identifizierung und Charakterisierung der potentiell in der Gefäßwand existierenden hematopoietischen Vorläuferzellen und ihrer Rolle in Tumorvaskularisierung und Metastasierung. Hierzu kommen In-vitro-, Ex-vivo- und In-vivo-Angiogenesemodelle zur Anwendung.

4. Drittmittel

#	Drittmittelgeber (Aktenzeichen)	Empfänger	Laufzeit	k€
Laser- Forschungslabor				
1	Krebshilfe (107320)	Baumgartner, Zimmermann	06-09	s. u.
2	BMBF (13N9105)	Stepp	07-09	199

3	BMBF (13N10172)	Stepp, Johansson	09-11	255
4	DFG (TI/609/1-1)	Till, Stepp	06-09	100
5	BMBF (Unterauftrag von Fa. Toptika)	Stepp	08-09	180
6	DFG Exzellenzcluster (MAP D.1.6)	Sroka	07-09	160
7	Bayer. Forschungsstiftung (AZ-712-06)	Sroka	09-10	180
8	HoKa – Thüringen	Sroka	09-12	50
9	Firma Karl Storz	Baumgartner, Stepp	09	30
10	Firma Medac	Baumgartner	09-10	33
11	BMBF (Unterauftrag von Fa. Biolitec)	Beyer	06-09	100
12	Bayer. Forschungsstiftung (AZ-785-07)	Beyer, Baumgartner	12-10	132
13	Firma CeramOptec	Beyer	09	9
Summe				1.425
Labor für Tumorummunologie				
1	BioChancePLUS BMBF (0313822A)	Zimmermann	06-09	35
2	SFB-TransRegio (TR 36 Z1)	Pohla	06-09	228
3	Krebshilfe (107320)	Baumgartner, Zimmermann	06-09	193
4	Programm Molekulare Medizin (16/2007)	Kammerer, Zimmermann	08-09	15
5	Programm Molekulare Medizin (17/2007)	Kammerer, Zimmermann	08-09	15
6	Programm Molekulare Medizin (18/2007)	Kammerer, Zimmermann	08-09	15
7	DAAD-Postdoc-Stipendium (A/07/73021/Ref. 414)	Tölge-Corrales Urrutia	08-10	24
8	Weigand'sche Stiftung (15.12.2009)	Tölge-Corrales Urrutia	09	10
9	DFG Transregio FOR 535, Projekt X	Pohla	10-12	201
Summe				736
Experimentelle Urologie				
1	MSD Forschungsstipendium	Gratzke, Stief, Andersson, Hedlund	08-09	10
2	Deutsche Gesellschaft für Andrologie, Forschungsstipendium	Gratzke, Stief, Andersson, Bivalacqua, Hedlund	08-09	10
3	European Society for Sexual Medicine (ESSM)	Gratzke, Stief, Bivalacqua, Hedlund	08-09	50
4	FöFoLe, Med. Fakultät der LMU München (Reg.-Nr. 654)	Gratzke	08-09	36
5	Münchener Medizinische Wochenschrift	Schlenker	08-09	13
6	Else-Kröner-Fresenius-Stiftung	Tilki	08-10	151
7	Friedrich-Baur-Stiftung	Tilki	09	10
8	DFG	Tilki	08-09	34
9	DFG (DFG RO 3589/2-1)	Roosen	09-10	55
27	Münchener Medizinische Wochenschrift	Hennenberg	09	10
Summe				379
Gesamt				2.540

5. Ernennungen, Preise und Diplom- und Promotionsarbeiten

5.1 Laser-Forschungslabor

5.1.1 Ernennungen und Preise

Dr. hum. biol. Ronald Sroka:

- Wahl zum Generalsekretär der Deutschen Gesellschaft für Lasermedizin

Arbeitsgruppe Femtoskop:

- Best-Abstract-Award auf dem Kongress „Medical Laser Applications“ in München

5.1.2 Abgeschlossene Habilitationen, Promotionen und Diplomarbeiten

Dr. med. Christine Burgmeier

Dipl.-Phys. Sabine Scheibe

Bachelor Jonathan Brons

Bachelor Malte Hemmerich

Bachelor Judith Mittag

Bachelor Kristina Nehls

5.2 Labor für Tumorimmunologie

5.2.1 Ernennungen und Preise

Dr. med. Alexander Buchner:

- 3. Vortragspreis: Kongress der Deutschen Gesellschaft für Urologie 2009 „Neuronale Netzwerke zur individuellen Prognose-Vorhersage bei Patienten mit Nierenzellkarzinom“

cand. med. Rosemarie Krupar:

- Semesterstipendium (USA) des DAAD (Sept. 2009-Feb. 2010)

5.2.2 Abgeschlossene Habilitationen, Promotionen und Diplomarbeiten

Dr. med. Michaela Paptistella (magna cum laude)

Dr. med. Andreas Eisenried (magna cum laude)

5.3 Experimentelle Urologie

5.3.1 Ernennungen und Preise

PD Dr. med. Alexander Roosen:

- Maximilian-Nitze-Preis 2009 (Deutsche Gesellschaft für Urologie)

PD Dr. med. Derya Tilki:

- Wolfgang-Hepp-Preis 2009 (Deutsche Gesellschaft für Urologie)

PD Dr. med. Christian Gratzke:

- C.E. Alken-Preis 2009

5.3.2 Abgeschlossene Habilitationen, Promotionen und Diplomarbeiten

PD Dr. med. Alexander Roosen

PD Dr. med. Derya Tilki

Im Berichtszeitraum wurden keine experimentellen Doktorarbeiten abgeschlossen.

6. Publikationen (Originalarbeiten)

6.1 Laser-Forschungslabor

1. Adam C, Salomon G, Walther S, Zaak D, Khoder W, Becker A, Reich O, Blana A, Ganzer R, Denzinger S, Popken G, **Sroka R**, Knüchel-Clarke R, Kollermann J, Sauter G, Hartmann A, Bertz S, Graefen M, Huland H, Wieland W, Stief CG. Photodynamic diagnosis using 5-aminolevulinic acid for the detection of positive surgical margins during radical prostatectomy in patients with carcinoma of the prostate: a multicentre, prospective, phase 2 trial of a diagnostic procedure. *Eur Urol* 55(6), 1281-1288 (2009). **IF 6.512**
2. Bader MJ, **Sroka R**, Gratzke C, Seitz M, Weidlich P, Staehler M, Becker A, Stief CG, Reich O. Laser Therapy for Upper Urinary Tract Transitional Cell Carcinoma: Indications and Management. *Eur Urol* 56(1), 65-71 (2009). **IF 6.512**
3. Betz CS, Zhorzel S, **Schachenmayr H**, **Stepp H**, Havel M, Siedek V, Leunig A, Matthias C, Hopper C, Harreus U: Endoscopic measurements of free-flap perfusion in the head and neck region using red-excited Indocyanine Green: preliminary results. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 62(12), 1602-1608 (2009).
4. **Püls M**, Weick K, Bader M, Weidlich P, Assmann W, Wexel G, **Sroka R**. OCT-assisted control of catheter positioning in the urethra of the rabbit - A feasibility study. *Med Laser Appl* 24(3), 175-181 (2009). **IF not listed**
5. Seitz M, Bayer T, Ruszat R, Tilki D, Bachmann A, Gratzke C, Schlenker B, Stief C, **Sroka R**, Reich O. Preliminary evaluation of a novel side-fire diode laser emitting light at 940 nm, for the potential treatment of benign prostatic hyperplasia: ex-vivo and in-vivo investigations. *BJU International* 103(6), 770-775 (2009). **IF not listed**
6. Seitz M, Reich O, Gratzke C, Schlenker B, Karl A, Bader M, Khoder W, Fischer F, Stief C, **Sroka R**. High-power diode laser at 980 nm for the treatment of benign prostatic hyperplasia: ex vivo investigations on porcine kidneys and human cadaver prostates. *Laser Med Sci* 24(2), 172-178 (2009). **IF 1.675**
7. Seitz M, Ruszat R, Bayer T, Tilki D, Bachmann A, Stief C, **Sroka R**, Reich O. Ex vivo and in vivo investigations of the novel 1,470 nm diode laser for potential treatment of benign prostatic enlargement. *Laser Med Sci* 24(3), 419-424 (2009). **IF 1.675**

8. Upile T, Jerjes W, Sterenborg HJ, El Naggar AK, Sandison A, Witjes MJ, Biel MA, Bigio I, Wong BJ, Gillenwater A, Macrobert AJ, Robinson DJ, Betz CS, **Stepp H**, Bolotine L, McKenzie G, Mosse CA, Barr H, Chen Z, Berg K, D'Cruz AK, Stone N, Kendall C, Fisher S, Leunig A, Olivo M, Richards-Kortum R, Soo KC, Bagnato V, Choo-Smith LP, Svanberg K, Tan IB, Wilson BC, Wolfsen H, Yodh AG, Hopper C. Head & neck optical diagnostics: vision of the future of surgery. *Head Neck Oncol* 1(1), 25 (2009). **IF not listed**
9. Kammerer R, Palluch P, Oboukhovskij K, Toelge M, **Pongratz T, Beyer W, Buchner A, Baumgartner R, Zimmermann W** (2009). The molecular basis of prostate cancer cell escape from protoporphyrin IX-based photodynamic therapy. *Med Laser Appl* 24, 237-246. **IF not listed**

6.2 Labor für Tumorummunologie

1. Loisel-Meyer S, Foley JE, **Kammerer R**, Mizue N, Keefe R, McCart JA, **Zimmermann W**, Dropulic B, Fowler DH, Medin JA.. Potent induction of B- and T-cell immunity against human carcinoembryonic antigen-expressing tumors in human carcinoembryonic antigen transgenic mice mediated by direct lentivector injection. *Mol Cancer Ther* 8, 692-702 (2009). **IF 4.8**
2. Herbst A, Bommer GT, Kriegl L, Jung A, Behrens A, Csanardi E, Gerhard M, Bolz C, **Riesenberg R, Zimmermann W**, Dietmaier W, Schäl S, Wolf I, Brabletz T, Göke B and Kolligs FT. ITF-2 is a target of allelic loss of chromosome 18q21 and its expression is lost at the adenoma to carcinoma transition. *Gastroenterology* 137, 639-648 (2009). **IF 11.7**
3. Adler H, El-Gogo S, Freimüller K, Guggemoos S, **Zimmermann W**, Beauchemin N, **Kammerer R**. Perturbation of lytic latent gammaherpesvirus infection in the absence of the inhibitory receptor CEACAM1. *PLoS ONE* 4(7): e6317 (2009). **IF not listed**
4. **Kammerer R, Palluch P, Oboukhovskij K, Toelge M**, Pongratz T, Beyer W, **Buchner A**, Baumgartner R, **Zimmermann W**. The molecular basis of prostate cancer cell escape from protoporphyrin IX-based photodynamic therapy. *Med Laser Appl* 24, 237-246 (2009). **IF not listed**
5. Buchner A, Pohla H, Willimsky G, Frankenberger B, Frank R, Baur-Melnyk A, Siebels M, Stief CG, Hofstetter A, Kopp J, Pezzutto A, Blankenstein T, Oberneder R, Schendel DJ. Phase I Trial of an Allogeneic Gene-modified Tumor Cell Vaccine (RCC-26/CD80/IL-2) in Patients with Metastatic Renal Cell Carcinoma. *Hum Gene Ther* 2009; Epub ahead of print
6. *Brill TH, *Kübler HR, ***Pohla H, Buchner A**, Fend F, Schuster T, von Randenborgh H, Paul R, Kummer T, Plank C, Eisele B, Breul J, Hartung R, Schendel DJ, Gänsbacher B. Therapeutic vaccination with an IL-2-IFN γ -secreting allogeneic tumor vaccine in patients with progressive castration-resistant prostate cancer - a phase I/II trial. *Hum Gene Ther* 20,1641-1651 (2009). (* These authors contributed equally). **IF 4.104**
7. Wilde S, Sommermeyer D, Frankenberger B, Schiemann M, Milosevic S, Spranger S, **Pohla H**, Uckert W, Busch DH, Schendel DJ. Dendritic cells pulsed with RNA encoding allogeneic MHC and antigen induce T cells with superior

- antitumor activity and higher TCR functional avidity. *Blood* 114(10), 2131-2139 (2009). **IF 10.432**
8. Geiger C, Nössner E, Frankenberger B, Falk CS, **Pohla H**, Schendel DJ. Harnessing innate and adaptive immunity for adoptive cell therapy of renal cell carcinoma. *J Mol Med* 87(6), 595-612 (2009). **IF 4.370**
 9. Britten CM, Janetzki S, Ben-Porat L, Clay TM, Kalos M, Maecker H, Odunsi K, Pride M, Old L, Hoos A, Romero P; HLA-peptide Multimer Proficiency Panel of the CVC-CRI Immune Assay Working Group. Collaborators: Ahmed RK, Bain C, Barnby-Porritt H, Baumgartner P, Bercovici N, Brockstedt D, Cerundolo V, Channon JY, Chikoti P, Cox J, Currier JR, Curtsinger J, Desmaretz C, Gagnon D, Gearhart J, Gillanders V, Hampl J, Harrop R, Hobeika A, Kaempgen E, Kaufman J, Labroquere K, Landry C, Maeurer M, Matijevic M, Mueller S, Mohanakumar T, Olson W, **Pohla H**, Ramesh R, Rooke R, Samorski R, Sékaly RP, Schullery D, Slingluff C, Scheibenbogen C, Schmitt-Händle M, Smith K, Speiser D, Tarlton A, Trautmann L, Van Der Aa A, Walter S, Wolchok J, Yuan J. Harmonization guidelines for HLA-peptide multimer assays derived from results of a large scale international proficiency panel of the Cancer Vaccine Consortium. *Cancer Immunol Immunother* 58(10). 1701-1713 (2009). **IF 3.804**

6.3 Experimentelle Urologie

1. Becker AJ, Stief CG, Stadler TC. Erectile dysfunction after radical prostatectomy. *Aktuelle Urol* 2009;40(5): 289-93
2. Tilki D, Seitz M, Singer BB, Irmak S, Stief CG, Reich O, Ergün S. Molecular imaging of tumor blood vessels in prostate cancer. *Anticancer Res* 2009;29(5): 1823-9
3. Bolenz C, Fernández MI, Tilki D, Herrmann E, Heinzlbecker J, Ergün S, Ströbel P, Reich O, Michel MS, Trojan L. The role of lymphangiogenesis in lymphatic tumour spread of urological cancers. *BJU Int* 2009;104(5): 592-7
4. Ellinger J, Albers P, Müller SC, von Ruecker A, Bastian PJ. Circulating mitochondrial DNA in the serum of patients with testicular germ cell cancer as a novel noninvasive diagnostic biomarker. *BJU Int* 2009;104(1): 48-52
5. Gratzke C, Seitz M, Bayrle F, Schlenker B, Bastian PJ, Haseke N, Bader M, Tilki D, Roosen A, Karl A, Reich O, Khoder WY, Wyler S, Stief CG, Staehler M, Bachmann A. Quality of life and perioperative outcomes after retroperitoneoscopic radical nephrectomy (RN), open RN and nephron-sparing surgery in patients with renal cell carcinoma. *BJU Int* 2009;104(4): 470-5
6. Karl A, Tritschler S, Stanislaus P, Gratzke C, Tilki D, Strittmatter F, Knüchel R, Stief CG, Zaak D. Positive urine cytology but negative white-light cystoscopy: an indication for fluorescence cystoscopy? *BJU Int* 2009;103(4): 484-7
7. Ruszat R, Seitz M, Wyler SF, Müller G, Rieken M, Bonkat G, Gasser TC, Reich O, Bachmann A. Prospective single-centre comparison of 120-W diode-pumped solid-state high-intensity system laser vaporization of the prostate and 200-W high-intensive diode-laser ablation of the prostate for treating benign prostatic hyperplasia. *BJU Int* 2009;104(6): 820-5

8. Seitz M, Bayer T, Ruszat R, Tilki D, Bachmann A, Gratzke C, Schlenker B, Stief C, Sroka R, Reich O. Preliminary evaluation of a novel side-fire diode laser emitting light at 940 nm, for the potential treatment of benign prostatic hyperplasia: ex-vivo and in-vivo investigations. **BJU Int** 2009;103(6): 770-5
9. Shariat SF, Bolenz C, Karakiewicz PI, Fradet Y, Ashfaq R, Bastian PJ, Nielsen ME, Capitanio U, Jeldres C, Rigaud J, Müller SC, Lerner SP, Montorsi F, Sagalowsky AI, Cote RJ, Lotan Y. p53 expression in patients with advanced urothelial cancer of the urinary bladder. **BJU Int** 2009; Epub ahead of print
10. Staehler M, Schöppler G, Haseke N, Stadler T, Karl A, Siebels M, Ihrler S, Stief CG. Carcinoma of the collecting ducts of Bellini of the kidney: adjuvant chemotherapy followed by multikinase inhibition with sunitinib. **Clin Genitourin Cancer** 2009;7(1): 58-61
11. Ebelt K, Babaryka G, Frankenberger B, Stief CG, Eisenmenger W, Kirchner T, Schendel DJ, Noessner E. Prostate cancer lesions are surrounded by FOXP3+, PD-1+ and B7-H1+ lymphocyte clusters. **Eur J Cancer** 2009;45(9): 1664-72
12. Karl A, Buchner A, Becker H, Staehler M, Seitz M, Stief C. Perioperative blood loss in open retropubic radical prostatectomy - Is it safe to get operated at an educational hospital? **Eur J Med Res.** 2009;14(7): 292-6
13. Khoder WY, Becker AJ, Schlenker B, Tritschler S, Bastian PJ, Stief CG. Conservative management of rectal perforation after nerve sparing endoscopic extraperitoneal radical prostatectomy (nsEERPE) in a patient with a past history of polypectomy. **Eur J Med Res** 2009;14(7): 320-2
14. Adam C, Salomon G, Walther S, Zaak D, Khoder W, Becker A, Reich O, Blana A, Ganzer R, Denzinger S, Popken G, Sroka R, Knüchel-Clarke R, Köllermann J, Sauter G, Hartmann A, Bertz S, Graefen M, Huland H, Wieland W, Stief CG. Photodynamic diagnosis using 5-aminolevulinic acid for the detection of positive surgical margins during radical prostatectomy in patients with carcinoma of the prostate: a multicentre, prospective, phase 2 trial of a diagnostic procedure. **Eur Urol** 2009;55(6): 1281-8
15. Bader MJ, Seitz M, Reich O, Stief CG, Gratzke C. Reply to Lina Matera's Letter to the Editor re: Markus J. Bader, Ronald Sroka, Christian Gratzke, et al. Laser Therapy for Upper Urinary Tract Transitional Cell Carcinoma: Indications and Management. **Eur Urol** 2009; 56: 65-71. *Eur Urol.* 2009; Epub ahead of print
16. Bastian PJ, Carter BH, Bjartell A, Seitz M, Stanislaus P, Montorsi F, Stief CG, Schröder F. Insignificant prostate cancer and active surveillance: from definition to clinical implications. **Eur Urol** 2009;55(6): 1321-30
17. Bauer RM, Bastian PJ, Gozzi C, Stief CG. Postprostatectomy incontinence: all about diagnosis and management. **Eur Urol** 2009;55(2): 322-33
18. Bauer RM, Mayer ME, Gratzke C, Soljanik I, Buchner A, Bastian PJ, Stief CG, Gozzi C. Prospective Evaluation of the Functional Sling Suspension for Male Postprostatectomy Stress Urinary Incontinence: Results after 1 Year. **Eur Urol** 2009; Epub ahead of print
19. Becker F, Van Poppel H, Hakenberg OW, Stief C, Gill I, Guazzoni G, Montorsi F, Russo P, Stöckle M. Assessing the Impact of Ischaemia Time During Partial Nephrectomy. **Eur Urol** 2009; Epub ahead of print

20. Gratzke C, Christ GJ, Stief CG, Andersson KE, Hedlund P. Localization and Function of Cannabinoid Receptors in the Corpus Caverosum: Basis for Modulation of Nitric Oxide Synthase Nerve Activity. *Eur Urol* 2009; Epub ahead of print
21. Gratzke C, Weinhold P, Reich O, Seitz M, Schlenker B, Stief CG, Andersson KE, Hedlund P. Transient Receptor Potential A1 and Cannabinoid Receptor Activity in Human Normal and Hyperplastic Prostate: Relation to Nerves and Interstitial Cells. *Eur Urol* 2009; Epub ahead of print
22. Karl A, Carroll PR, Gschwend JE, Knüchel R, Montorsi F, Stief CG, Studer UE. The impact of lymphadenectomy and lymph node metastasis on the outcomes of radical cystectomy for bladder cancer. *Eur Urol* 2009;55(4): 826-35
23. Moch H, Artibani W, Delahunt B, Ficarra V, Knuechel R, Montorsi F, Patard JJ, Stief CG, Sulser T, Wild PJ. Reassessing the Current UICC/AJCC TNM Staging for Renal Cell Carcinoma. *Eur Urol* 2009; Epub ahead of print
24. Naspro R, Bachmann A, Gilling P, Kuntz R, Madersbacher S, Montorsi F, Reich O, Stief C, Vavassori I. A review of the recent evidence (2006-2008) for 532-nm photoselective laser vaporisation and holmium laser enucleation of the prostate. *Eur Urol* 2009;55(6): 1345-57
25. Reich O, Schlenker B, Gratzke C, Tilki D, Riecken M, Stief C, Seitz M, Bachmann A. Plasma Vaporisation of the Prostate: Initial Clinical Results. *Eur Urol* 2009; Epub ahead of print
26. Roosen A, Chapple CR, Dmochowski RR, Fowler CJ, Gratzke C, Roehrborn CG, Stief CG, Andersson KE. A Refocus on the Bladder as the Originator of Storage Lower Urinary Tract Symptoms: A Systematic Review of the Latest Literature. *Eur Urol* 2009; Epub ahead of print
27. Seitz M, Shukla-Dave A, Bjartell A, Touijer K, Sciarra A, Bastian P, Stief C, Hricak H, Graser A. Functional Magnetic Resonance Imaging in Prostate Cancer. *Eur Urol* 2009; Epub ahead of print
28. Tilki D, Singer BB, Shariat SF, Behrend A, Fernando M, Irmak S, Buchner A, Hooper AT, Stief CG, Reich O, Ergün S. CEACAM1: A Novel Urinary Marker for Bladder Cancer Detection. *Eur Urol* 2009; Epub ahead of print
29. van Rhijn BW, Burger M, Lotan Y, Solsona E, Stief CG, Sylvester RJ, Witjes JA, Zlotta AR. Recurrence and Progression of Disease in Non-Muscle-Invasive Bladder Cancer: From Epidemiology to Treatment Strategy. *Eur Urol* 2009; Epub ahead of print.
30. Irmak S, Oliveira-Ferrer L, Singer BB, Ergün S, Tilki D. Pro-angiogenic properties of orosomucoid (ORM). *Exp Cell Res* 2009; Epub ahead of print
31. Buchner A, Pohla H, Willimsky G, Frankenberger B, Frank R, Baur-Melnyk A, Siebels M, Stief CG, Hofstetter A, Kopp J, Pezzutto A, Blankenstein T, Oberneder R, Schendel DJ. Phase I Trial of an Allogeneic Gene-modified Tumor Cell Vaccine (RCC-26/CD80/IL-2) in Patients with Metastatic Renal Cell Carcinoma. *Hum Gene Ther* 2009; Epub ahead of print
32. Brill TH, Kübler HR, Pohla H, Buchner A, Fend F, Schuster T, von Randenborgh H, Paul R, Kummer T, Plank C, Eisele B, Breul J, Hartung R, Schendel DJ, Gänsbacher B. Therapeutic Vaccination with an IL-2-IFN γ -secreting

- Allogeneic Tumor Vaccine in Patients with Progressive Castration-Resistant Prostate Cancer - a Phase I/II Trial. *Hum Gene Ther* 2009; Epub ahead of print
33. Escudier B, Szczylik C, Hutson TE, Demkow T, Staehler M, Rolland F, Negrier S, Laferriere N, Scheuring UJ, Cella D, Shah S, Bukowski RM. Randomized phase II trial of first-line treatment with sorafenib versus interferon Alfa-2a in patients with metastatic renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 2009;27(8): 1280-9
 34. Gratzke C, Streng T, Park A, Christ G, Stief CG, Hedlund P, Andersson KE. Distribution and function of cannabinoid receptors 1 and 2 in the rat, monkey and human bladder. *J Urol* 2009;181(4): 1939-48
 35. Füllhase C, Soler R, Gratzke C, Brodsky M, Christ GJ, Andersson KE. Urodynamic evaluation of fesoterodine metabolite, doxazosin and their combination in a rat model of partial urethral obstruction. *BJU Int* 2009; Epub ahead of print
 36. Shariat SF, Karakiewicz PI, Godoy G, Karam JA, Ashfaq R, Fradet Y, Isbarn H, Montorsi F, Jeldres C, Bastian PJ, Nielsen ME, Müller SC, Sagalowsky AI, Lotan Y. Survivin as a prognostic marker for urothelial carcinoma of the bladder: a multicenter external validation study. *Clin Cancer Res* 2009;15(22): 7012-9
 37. Stadler TC. Erectile dysfunction. *MMW Fortschr Med* 2009;151(48): 37
 38. Waidelich R. Epididymitis. *MMW Fortschr Med* 2009;151(38): 40
 39. Staehler M. Kidney cancer: Developing objective criteria to characterize renal masses. *Nat Rev Urol* 2009;6(12): 638-9
 40. Bauer RM, Siegert S, Nordhaus C, Staehler M. Epidermoid cyst of the kidney: A rare cause of recurrent renal colic. *Urologe A* 2009
 41. Ganzer R, Neuhaus J, Gratzke C, Blana A, Wieland WF, Stolzenburg JU. Anatomical description of the periprostatic nerves in the male rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *World J Urol* 2009