



# Tätigkeitsbericht LIFE-Zentrum

2012



## Inhaltsverzeichnis

<b>Tätigkeitsbericht LIFE-Zentrum 2012</b> .....	<b>5</b>
<b>1. Personal</b> .....	<b>5</b>
Laser-Forschungslabor (LFL).....	5
Labor für Tumormunologie (LTI) .....	5
Experimentelle Urologie .....	5
<b>2. Lehre</b> .....	<b>6</b>
2.1 Pflichtveranstaltungen.....	6
2.2 Wahlveranstaltungen .....	6
2.3 Veranstaltungen .....	6
<b>3. Forschungsschwerpunkte</b> .....	<b>7</b>
3.1 Laser-Forschungslabor .....	7
3.1.1 Optische <i>In-vivo</i> -Pathologie.....	7
3.1.2 Klinische Laserbehandlungen .....	16
3.1.3 Photodynamische Therapie (PDT) .....	19
3.1.4 Das Kompetenznetzwerk Endoskopie (T.E.A.M.).....	22
3.1.5 Kooperationsverbände .....	24
3.2 Labor für Tumormunologie .....	26
3.2.1 Identifizierung und Validierung von antigenen Zielstrukturen und Prognosemarkern .....	26
3.2.2 Entwicklung, Optimierung und klinische Testung von Tumorstakzinen .....	32
3.2.3 Weiterentwicklung des Immunmonitorings .....	38
3.2.4 Rolle von Mitgliedern der CEA-Familie in Gesunden und bei malignen Prozessen .....	39
3.3 Experimentelle Urologie .....	42
3.3.1 Projektgruppe Endocannabinoide.....	42
3.3.2 Projektgruppe „glattmuskuläre Kontraktion und $\alpha$ 1-adrenerge Funktion im unteren Harntrakt“ .....	48
<b>4. Drittmittel</b> .....	<b>56</b>
<b>5. Ernennungen, Preise und Diplom- und Promotionsarbeiten</b> .....	<b>57</b>
5.1 Laser-Forschungslabor .....	57
5.1.1 Ernennungen und Preise.....	57
5.1.2 Abgeschlossene Habilitationen, Promotionen und Diplomarbeiten .....	57
5.2 Labor für Tumormunologie .....	57
5.2.1 Ernennungen und Preise.....	57
5.2.2 Abgeschlossene Habilitationen, Promotionen und Diplomarbeiten .....	57

5.3 Experimentelle Urologie .....	58
5.3.1 Ernennungen und Preise .....	58
5.3.2 Abgeschlossene Habilitationen, Promotionen und Diplomarbeiten .....	58
<b>6. Publikationen (Originalarbeiten) .....</b>	<b>58</b>
6.1 Laser-Forschungslabor .....	58
6.2 Labor für Tumorummunologie .....	60
6.3 Experimentelle Urologie .....	61

# Tätigkeitsbericht LIFE-Zentrum 2012

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: 3

Drittmittel: 1 + 3x 0,5

Gesamt: 5,5

Nichtwissenschaftliche Mitarbeiter

Planstellen: 1 + 0,5

Drittmittel: 1 x 0,5

Gesamt: 2

### Labor für Tumorummunologie (LTI)

Wissenschaftliche Mitarbeiter

Planstellen: 3

Nichtwissenschaftliche Mitarbeiter

Planstellen: 1

Drittmittel: 1

Gesamt: 2

### Experimentelle Urologie

Wissenschaftliche Mitarbeiter

Planstellen: 2,5

Drittmittel: 0,5

Gesamt: 3

Nichtwissenschaftliche Mitarbeiter	
Planstellen:	0
Drittmittel:	0
Gesamt:	0

## 2. Lehre

### 2.1 Pflichtveranstaltungen

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

### 2.2 Wahlveranstaltungen

#### LIFE-Zentrum

LIFE-Seminar mit eingeladenen Rednern

LIFE-Forschungsbesprechung mit Ärzten der Urologischen Klinik

#### LTI

Beteiligung an Vorlesung und Praktikum „Grundlagen der Immunologie“ des Immunologischen Instituts; Ringvorlesung Promotionsstudium „Systembiologische und Molekulare Medizin; MeCuM Immunologieseminar „Allergie“

8 Medizindoktoranden (einer davon Dr. biol. hum.)

#### LFL

Medizin-Seminare mit Übungen: Laser in der Urologie; Physik an medizinischen Beispielen;

Physik-Hauptseminar: Anwendungen physikalischer Methoden in der Medizin;

Physik-Vorlesung mit Übungen: BioPhotonik

Medizin-Vorlesung: Laser in der Medizin: Grundlagen und klinische Anwendungen in HNO, Urologie und Gynäkologie

Schulveranstaltungen: Lehrer entdecken Laser in der Medizin (n = 1)

Schulexkursionen: Schüler entdecken Laser in der Medizin (n = 4)

12 Doktoranden in Ausbildung, davon 5 Dr. biol. hum., 4 Dr. med., 2 Dr. med. dent., 1 Dr. rer. nat., sowie Diplomanden, Masteranden, Bacheloranden, und Praktikanten

#### Experimentelle Urologie

7 Medizindoktoranden

### 2.3 Veranstaltungen

Mitglieder des Laser-Forschungslabors waren bei folgenden Veranstaltungen als leitende Organisatoren verantwortlich:

*Deutsche Gesellschaft für Endoskopie und Bildgebende Verfahren (DGEbV) und Deutsche Gesellschaft für Lasermedizin (DGLM) Jahrestagung 21.-24. März 2012*

### **3. Forschungsschwerpunkte**

Die Forschungsschwerpunkte der Forschungseinrichtung sind ausgerichtet auf die Charakterisierung von therapieresistenten Tumorstammpopulationen als *targets* für die Immuntherapie und anderer Therapien 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 Identifizierung von neuen therapeutischen Ansätzen bei urologischen Tumoren und die Entwicklung neuer Strategien zur therapeutischen Beeinflussung urologischer Funktionsstörungen (erektile Dysfunktion, Blasenentleerungsstörungen). Das LIFE-Zentrum versteht sich als interdisziplinäre und fachübergreifende Forschungs- und Entwicklungseinheit. Auf der Basis fundierter Kenntnisse aus Medizin, Biologie und Physik werden die biologischen und physikalischen Aspekte medizinischer Fragestellungen erarbeitet, und in Kooperation mit dem medizinischen Partnern u. a. aus dem Netzwerk TEAM in klinikrelevante Techniken, Diagnose- und Behandlungsstrategien überführt.

#### **3.1 Laser-Forschungslabor**

Das LFL ist eine interdisziplinäre Forschungseinrichtung mit dem Ziel, innovative optische Methoden für klinische Anwendungen, insbesondere zur Detektion und Therapie humaner Neoplasien zu entwickeln, klinisch umzusetzen und zu evaluieren. Um diesen Prozess zu optimieren, werden enge Kontakte mit der Hochschule 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-, Bachelor-, Master-, Diplom- und Promotionsarbeiten Labormuster und Anwendungsstrategien zu entwickeln und diese in Kooperation mit Industriepartnern bis hin zur klinischen Anwendung umzusetzen, sowie die anschließende Evaluierungsphase in der Klinik zu begleiten. Dies eröffnet die Möglichkeit, in enger Kooperation mit den Ärzten weitere Optimierungsmöglichkeiten zu erkennen, Entwicklungspotential zu identifizieren und die Forschungs- und Entwicklungsarbeiten mit den Kooperationspartnern fortzuführen. Da die Verfahren prinzipiell für viele medizinische Fachbereiche attraktiv sein können, werden Kontakte zu Medizinern aus den unterschiedlichen Fachbereichen des Klinikums geknüpft, um diese Methoden rasch interdisziplinär umzusetzen. Dies spiegelt sich in dem Zusammenwirken mit TEAM wieder. 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 sollen, eine histopathologische Befundung ohne Gewebeprobeentnahme vorzunehmen. Dazu ist es notwendig, prä-maligne und maligne Areale mit hoher Sensitivität und Spezifität vorwiegend in Hohlorganen zu lokalisieren. Als besonders wichtige klinische Indikationen erweisen sich dabei das multilokuläre Harnblasenkarzinom und Karzinome in der Lunge sowie Tumoren im Gehirn. Auch Präkanzerosen, speziell in den Fachbereichen HNO und Gynäkologie werden in diesem

Zusammenhang untersucht. 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 oberflächlichen Gewebeschichten (*grading*) optisch auf einem Monitor darzustellen. Im Laser-Forschungslabor werden dazu aktuelle neue Fluoreszenzmarker eingesetzt sowie an einer Optimierung der Endomikroskopie gearbeitet. Ziel ist, alle für die *In-vivo*-Pathologie notwendigen erforderlichen Techniken in ein einziges Endoskop zu integrieren. Folgende Projekte wurden in 2012 in diesem Forschungsschwerpunkt bearbeitet:

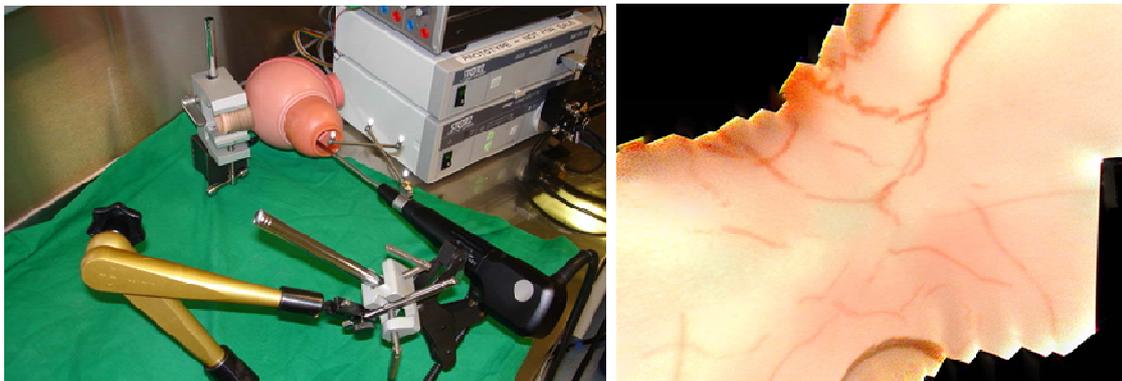
### ***EU-Projekt „BladderMap“***

*Herbert Stepp*

*Kooperation: Alexander Karl (Urologie)*

*Förderung: EU in Photonics4Life*

Bei diesem Projekt handelte es sich um eine Machbarkeitsuntersuchung, die Ende April 2012 abgeschlossen wurde. Weitere Institute aus Deutschland und Belgien, sowie ein Industriepartner (Karl Storz) waren beteiligt. Es konnte gezeigt werden, dass die Erstellung eines vollflächigen hochaufgelösten Bildes der gesamten Harnblase in Weißlicht und Fluoreszenz technisch prinzipiell möglich ist. Aus endoskopischen Videoaufzeichnungen wurden Panoramaaufnahmen erzeugt. Zusätzlich konnte ein 3D-Modell des Organs errechnet werden. Die Ergebnisse wurden Ende 2011 anlässlich eines Treffens aller an dieser Ausschreibung beteiligten gut 20 Projekte vorgestellt und mit dem ersten Preis prämiert. Im Januar 2012 wurde ein vollwertiger EU-Antrag gleichen Namens eingereicht, der leider nicht bewilligt wurde. Derzeit ist wieder ein Call der EU offen, auf den das Projekt passt. Die Projektpartner werden kontaktiert, es wird geprüft ob der überarbeitete Antrag erneut eingereicht werden soll.



**Versuch am Blasendummy.** Rechts ist das Fusionsbild eines Teilscans über die Blasenwand gezeigt.

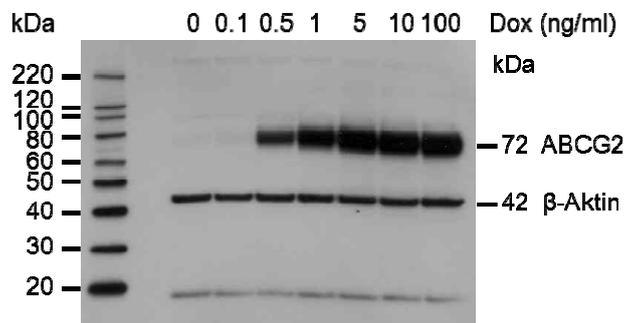
## **Einfluss des Tumorstammzellmarkers ABCG2 auf die PPIX-Photosensibilisierung bei Glioblastomzellen**

Herbert Stepp, Wolfgang Zimmermann, Michael Heide

Kooperation: Rainer Wittig, Institut für Lasermedizin, Ulm; Neurochirurgie und Urologie (geplant)

Förderung: geplant DFG

ABCG2 ist ein Membrantransportprotein, das *Multidrug*-Resistenz vermittelt und vermehrt in Tumorstammzellen gefunden wird. Der am KUM vielfach in Forschung und Klinik eingesetzte *Photosensitizer* Protoporphyrin IX (PPIX) soll laut Literatur ein Substrat dieses Proteins sein. Damit wären Tumorstammzellen bei Anwendung von photodynamischer Therapie (PDT) möglicherweise weniger gut photosensibilisiert als der Rest des Tumors. ABCG2 kann allerdings gut und spezifisch mit bereits klinisch eingesetzten Substanzen geblockt werden. Unsere Bemühungen, die Bedeutung dieser Befunde zu untersuchen, wurden 2012 fortgesetzt. Zelllinien mit unterschiedlicher ABCG2-Expression, induziert durch das Chemotherapeutikum und ABCG2-Substrat Mitoxantron, wurden dazu verwendet. In Untersuchungen zur PPIX-Akkumulation zeigte sich jedoch, dass die vermehrt ABCG2-exprimierenden Zellen entgegen jeder Erwartung mehr PPIX akkumulierten als die ABCG2-freie Elternzelllinie. ABCG2 scheint aber aktiv zu sein, weil wir zeigen konnten, dass andere Substrate transportiert werden und dies durch ABCG2-Blocker verhindert werden kann. Der Grund für das unerwartete Verhalten gegenüber der 5-ALA-induzierten PPIX-Akkumulation lässt sich möglicherweise dadurch erklären, dass durch die Mitoxantron-Gaben nicht nur die intrazelluläre ABCG2-Expression angestoßen wurde, sondern auch noch weitere Veränderungen, die u. a. auch verstärkenden Einfluss auf die PPIX-Akkumulation haben. Wir suchten deshalb nach anderen Zelllinien, die sich möglichst nur durch die Expression von ABCG2 voneinander unterscheiden. Dies erreichten wir in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Dr. Wittig am ILM in Ulm. Dr. Wittig konnte eine transfizierte Glioblastomzelllinie etablieren, deren ABCG2-Expression sich durch Gabe von Doxycyclin anschalten lässt (siehe Abbildung). Untersuchungen zur PPIX-Akkumulation und Photosensibilisierung dieser Zelllinien werden in Kürze erfolgen. Bei ausreichender Datenlage wird ein Förderantrag bei der DFG gestellt.



**Herstellung einer konditional ABCG2-exprimierenden Glioblastomzelllinie.** U-251-Zellen (früher U-373 genannt) wurden stabil mit einem Doxycyclin-induzierbaren ABCG2-Expressionsvektor transfiziert und mit steigenden Doxycyclinkonzentrationen inkubiert. Western-Blot-Analyse mit ABCG2-Antikörpern zeigt die Induktion der ABCG2-Expression. Der gleichzeitige Nachweis von  $\beta$ -Aktin dient als Ladungskontrolle.

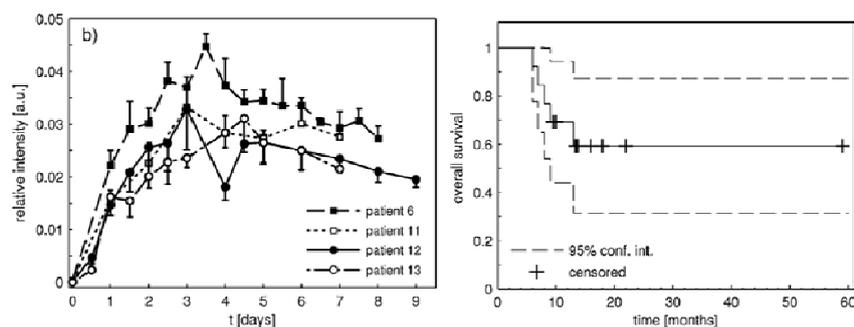
## „FOSCAN-Kinetik“

Herbert Stepp, Gesa Kniebühler, Thomas Pongratz

Kooperation: Jörg Schirra (Medizinische Klinik II)

Förderung: Industrie

FOSCAN ist der potenteste klinisch zugelassene Photosensitizer. Er zeigt leider eine langdauernde Hautphotosensibilisierung. Mit dem Ziel, diese Nebenwirkung zu reduzieren, wurde die Applikation einer niedrigeren Substanzdosis untersucht. In Kooperation mit der Medizinischen Klinik II wurde bei Patienten mit inoperablen Cholangiokarzinomen eine FOSCAN-PDT mit reduzierter Substanzdosis durchgeführt. Durch Fluoreszenzmessungen an der Mundschleimhaut wurde der optimale Bestrahlungszeitpunkt nach Substanzapplikation ermittelt. Als Normaldosis-Referenz wurden Patienten mit Mundhöhlenkarzinomen untersucht. Die bisherigen Ergebnisse an 13 Patienten wurden kürzlich publiziert<sup>1</sup>. Entgegen des bisherigen Standes der Literatur zeigte sich, dass mit der Reduzierung der Substanzdosis keine signifikante Reduzierung des Zeitpunktes der maximalen Gewebekonzentration einhergeht. Es ergeben sich aber niedrigere Konzentrationen und damit ist der Zeitpunkt einer unschädlichen Hautsensibilisierung früher erreicht. Bezüglich der therapeutischen Wirkung war keine Verminderung im Vergleich zu den bisherigen Behandlungserfolgen zu verzeichnen.



**Zeitverlauf der Intensität der FOSCAN-Fluoreszenz und Gesamtüberlebens der Cholangiokarzinompatienten.** Über 9 Tage nach Injektion einer reduzierten Dosis wurde die FOSCAN-Fluoreszenz an verschiedenen Stellen der Mundschleimhaut verfolgt. Rechts die Kaplan-Meier-Kurve des Gesamtüberlebens. 5 von 13 Patienten verstarben 6,7,8,9 und 13 Monate nach Diagnosestellung.

## Verbundprojekt „Neurotax“

Adrian Rühm, Herbert Stepp, Christoph Polzer, Gesa Kniebühler, Wolfgang Beyer, Ann Johansson, Bettina Günther

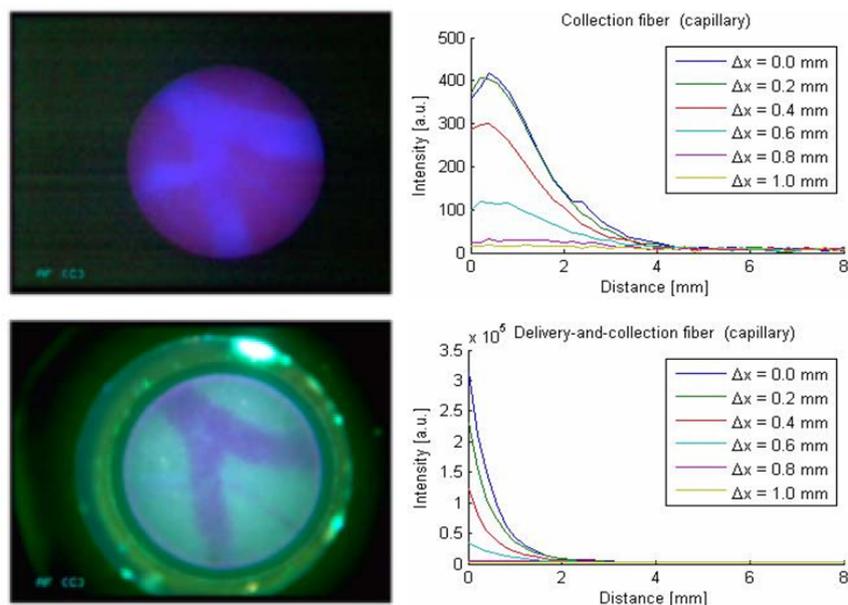
Kooperation: Friedrich-Wilhelm Kreth (Neurochirurgie)

Förderung: BMBF in MoBiTech

Dieses Verbundprojekt fand von Januar 2009 bis April 2012 statt. Zielsetzung war die Verbesserung stereotaktischer Eingriffe, v.a. beim malignen Gliom. Dabei sollten erstens die Treffsicherheit der Biopsieentnahme und zweitens die Sicherheit des

<sup>1</sup> Kniebühler G, Pongratz T, Betz CS, Göke B, Sroka R, Stepp H, Schirra J: Photodynamic therapy for cholangiocarcinoma using low dose mTHPC (Foscan®). *Photodiagn Photodyn*, im Druck (2013). IF 2.522

Eingriffs optimiert werden. Es konnte untermauert werden, dass die Treffsicherheit (also die intraoperative Abgrenzung von vitalem Tumorgewebe gegenüber Normalgewebe oder Nekrose) durch Detektion von 5-ALA-induzierter PPIX-Fluoreszenz verbessert werden kann. Dieses Verfahren beruht darauf, dass nur in stoffwechselaktiven Tumorzellen PPIX synthetisiert wird. Das Fluoreszenz-Signal ist prinzipiell proportional zur PPIX-Konzentration, wird jedoch bei fasergestützter Messung von den optischen Gewebeeigenschaften mit beeinflusst. Mehrere Kompensationskonzepte wurden an Gewebephantomen mit physiologisch realistischen optischen Eigenschaften sowie am Tiermodell getestet. Die besten Ergebnisse wurden mit einem Verfahren erzielt, welches zwei Fasern verwendet und Fluoreszenz- und Remissionsmessung kombiniert. Vorbereitend konnten die physiologischen Variationsbereiche der optischen Eigenschaften von humanem Gehirngewebe mittels eines potentiell *in-vivo*-tauglichen Messverfahrens ausreichend genau eingegrenzt werden. Teilergebnisse zu dieser Thematik wurden bereits 2011 auf der Konferenz *Biomedical Optics* in San Francisco (*Photonics West*) präsentiert.



**Validierung der Gefäßwarnungsmethode im Mausmodell.** Im linken Teil der Abbildung sind Schnappschüsse der Fluoreszenzkamera gezeigt, die mit einer bildgebenden Sonde (Durchmesser des Sichtfeldes: 700  $\mu\text{m}$ ) bei Annäherung an Blutgefäße in einem Mäusegehirn aufgenommen wurden. Im oberen Bild bei Anregungswellenlänge 785 nm stechen die Gefäße durch starke ICG-Fluoreszenz im Infrarot-Bereich hervor, welche aufgrund spezieller Eigenschaften des CCD-Sensors zu einer ICG-proportionalen Intensität im Blau-Kanal führt. Dieses Signal kann mit Hilfe eines Schwellwerts zur Gefäßwarnung genutzt werden. Im unteren Bild bei Anregungswellenlänge 405 nm erscheinen die Gefäße dunkel, da Blut im sichtbaren Bereich deutlich stärker als das umgebende Gewebe absorbiert. Im rechten Teil der Abbildung sind die Intensitäten des ICG-Fluoreszenz-Signals für den Fall einer Zweifaser-Sonde dargestellt, aufgetragen als Funktion des Abstands zwischen distalem Faserende und Blutgefäß-Phantom.

2012 lag der Fokus der Arbeiten am LFL auf dem Aspekt Patientensicherheit, welcher mit Hilfe einer Gefäßwarnung auf Basis von ICG-Fluoreszenz gewährleistet werden sollte. ICG ist ein häufig zur Gefäßmarkierung eingesetzter endoluminaler Infrarot-Fluoreszenz-Marker. An entsprechenden Phantomen mit physiologisch realistischen optischen Eigenschaften konnte nachgewiesen werden, dass eine

Vorwarnung 1-2 mm vor Gefäßkontakt realisierbar ist. Der zu erwartende Kontrast wurde dabei während Aneurysmen-chirurgischer Eingriffe ermittelt. Die Funktionalität der Gefäßwarnung konnte auch *in-vivo* am Mausmodell verifiziert werden. Teilergebnisse wurden 2012 in Optics Express publiziert<sup>2</sup>. Die technische Umsetzung wurde als Patent und Gebrauchsmuster angemeldet (Erfinder: Stepp, Kniebühler, Rühm, Hennig, Polzer)<sup>3</sup>.

Ein weiterer im Hinblick auf die Patientensicherheit zu berücksichtigender Aspekt ist die durch die Lichtapplikation potentiell hervorgerufene thermische Gewebeschädigung. Hierzu wurden Simulationsrechnungen durchgeführt und aus der zeitlichen Entwicklung der Temperaturverteilung im Gewebe anschließend Grenzwerte für die am Faserende maximal applizierbare Lichtleistung abgeleitet. Dabei zeigte sich, dass existierende lasertechnische Vorgaben zur Gewährleistung der Patientensicherheit nicht ausreichend sind. Diese Ergebnisse wurden in 2012 auf Tagungen präsentiert, entsprechende Publikationen sind in Vorbereitung.

Dieses Projekt hat seine Ziele uneingeschränkt erreicht. Nach erfolgreichen Tierversuchen konnte die bildgebende Sonde (Fa. Storz) Ende 2011 auch bereits am Patienten getestet werden. Der Einsatz war so erfolgreich, dass er als Fallstudie zur Veröffentlichung eingereicht wird. Die industriellen Verbundpartner und der beteiligte Neurochirurg sind an einer späteren Produktumsetzung weiterhin sehr interessiert. Die Fa. MRC-Systems würde dann ihre Stereotaxierahmen mit optischen Biopsiezangen ausrüsten.

### **Verbundprojekt „FLENDOS“**

*Katharina Thomsen, Herbert Stepp, Adrian Rühm, Peter Sterflinger, Judith Mittag, Georg Hennig*

*Kooperation: Christian Betz (HNO)*

*Förderung: BMBF in Biophotonik IV*

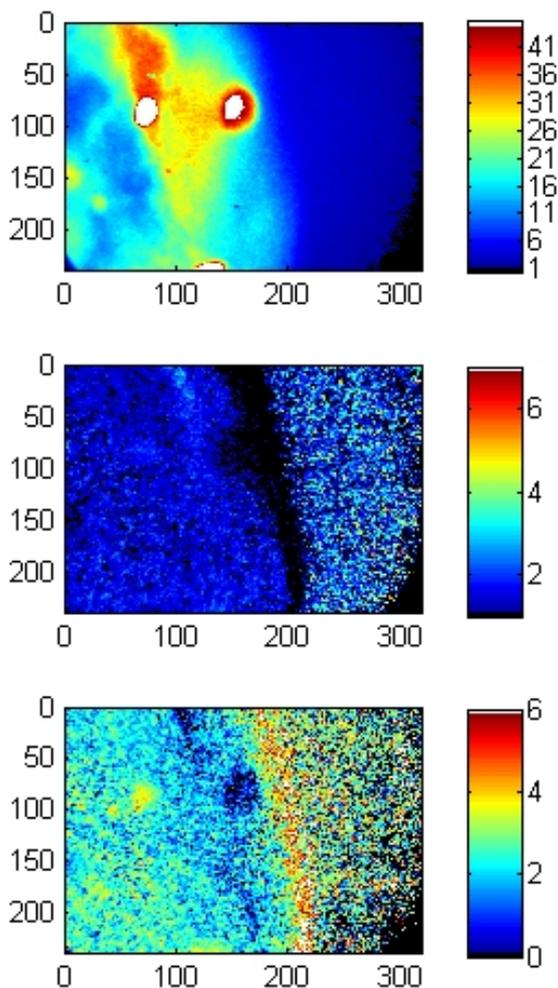
Das Verbundprojekt FLENDOS startete im Oktober 2010 und endet nach Verlängerung im März 2013. Ziel des Verbundprojekts ist es, Grundlagen für ein Fluoreszenzlebensdauer-Endoskopie-System für die Gewebedifferenzierung im oberen Luft-Speiseweg bereitzustellen. Die Aufgabe des LFL besteht darin, die Übertragbarkeit der im Verbund gewonnenen Grundlagenerkenntnisse in der Fluoreszenzlebensdauer-Messung auf spätere klinische Anwendungen zu untersuchen. Hierzu wurden humane Gewebeproben nach Tumor-Resektionen im sichtbaren Spektralbereich mit verschiedenen Fluoreszenzlebensdauer-Messsystemen untersucht. Hierbei ergaben sich statistisch signifikante Unterschiede in den Fluoreszenzlebensdauern von Tumor und Normalgewebe, sowohl intra- wie interindividuell. Dabei wurden sowohl Messergebnisse an einem geeigneten Lebendgewebemodell als auch an Gefrierschnitten berücksichtigt. Basierend auf diesen Messergebnissen wurde die Auswirkung der Gewebeschichtung untersucht und daraus geeignete Messbedingungen abgeleitet, unter denen sich selbst der am

---

<sup>2</sup> Göbel W, Brucker D, Kienast Y, Johansson A, **Kniebühler G, Rühm A**, Eigenbrod S, Fischer S, Goetz M, Kreth F-W, Ehrhardt A, Stepp H, Irion K-M, Herms J: Optical needle endoscope for safe and precise stereotactically guided biopsy sampling in neurosurgery. *Opt Express* 20(24):26117-26 (2012). **IF 3.587**

<sup>3</sup> Neurotax-Patent: LFL-Erfinder: **Stepp H, Kniebühler G, Rühm A, Hennig G, Polzer.**

schwierigsten von Normalgewebe abzugrenzende Fall des *Carcinoma in situ* noch nachweisen lassen sollte. In diesem Fall ist das Karzinom noch auf die ca. 0,1 mm dünne Epithelschicht begrenzt. Die Fähigkeit zur Kontrastierung klinisch relevanter Gewebeveränderungen sowie die Eignung zur Tumorfrühdagnostik wird mit Hilfe eines Funktionsmusters (Endo-FLI-Cam) präklinisch evaluiert. Die Bearbeitung der klinisch relevanten Fragestellungen wird durch den Unterauftrag an die HNO-Klinik am Klinikum Großhadern gewährleistet. Die bisherigen Ergebnisse des Projekts werden im Mai 2013 auf der HNODS-Tagung im Rahmen der ECBO präsentiert.



**Fluoreszenzlebensdauer-Messungen an HNO-Tumorgewebe.** In dem Bild oben ist eine bei 405 nm angeregte Autofluoreszenzaufnahme der Randregion einer Tumorprobe im Lebendgewebemodell gezeigt. Die Probe befindet sich in der linken Bildhälfte. Die Größe des Bildausschnitts ist 3 mm x 2 mm. In den beiden unteren Bildern ist die räumliche Verteilung zweier zugehöriger Fluoreszenz-Lebensdauern dargestellt (Farbskala in Nanosekunden). Die Diskrepanz der beiden Bilder deutet auf das Vorhandensein fluoreszierender Stoffe mit unterschiedlichen Fluoreszenzlebensdauern hin.

### **Resektionsrandbeurteilung beim Mammakarzinom durch 5-ALA-induzierte PPIX-Fluoreszenz**

*Herbert Stepp, Thomas Pongratz*

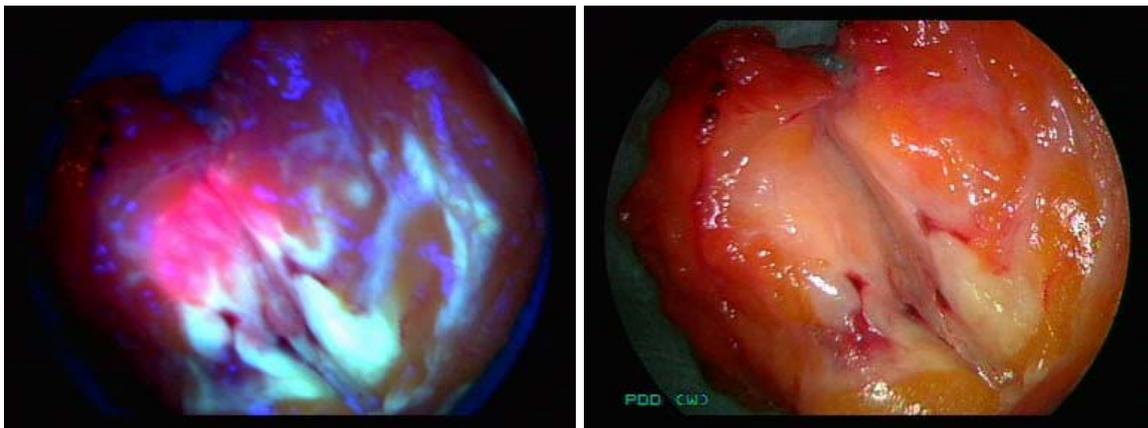
*Kooperation: Stephan Has Müller (Gynäkologie), Susanna Müller (Pathologie)*

*Förderung: Industrie*

Dieses Vorhaben wurde unter der Regie der Frauenklinik (IIT-Studie) und in Kooperation mit dem Pharma-Unternehmen *photonamic* durchgeführt. Es sollte untersucht werden, ob nach oraler Gabe von 30 oder 20 mg/kg 5-ALA 3-5 h vor chirurgischer Resektion Mammakarzinomgewebe nachweisbar und selektiv PPIX anreichert. Ziel wäre die intraoperative Erkennung positiver Resektionsränder. Das

Projekt wurde mit Ablauf des Jahres 2012 beendet und wird derzeit zum Abschlussbericht an die Zulassungsbehörden vorbereitet.

Insgesamt wurden 7 Patientinnen eingebracht. In den meisten Fällen konnte nur eine geringe Akkumulation von PPIX festgestellt werden. In einem Falle eines nicht-palpablen Tumors zeigte sich eine starke und selektive PPIX-Fluoreszenz im Tumorbereich (siehe Abbildung). Insgesamt ist aber zu konstatieren, dass zumindest palpable Tumoren eine zu geringe PPIX-Akkumulation zeigen, um mit der aktuell verfügbaren bildgebenden Technik intraoperativ ausreichend gut kontrastierend dargestellt zu werden. Dies liegt einerseits an der starken Eigenfluoreszenz des Tumorgewebes aber auch von Mastopathiegewebe, andererseits an dem manchmal nur geringen Tumorzellanteil im Bereich des maligne infiltrierten Brustgewebes. Die Auswertung der Ergebnisse der spektroskopischen Untersuchungen und der PPIX-Gewebeextraktionsmessungen steht noch aus, scheint aber nach vorläufigen Erhebungen durchaus eine statistisch signifikante Mehranreicherung von PPIX im Tumorbereich zu ergeben. Dies würde bedeuten, dass mit einem spezifischer PPIX nachweisenden Equipment auch ein bildgebender Nachweis malignen Mamma-Karzinomgewebes möglich sein könnte.



**Resektionsrandbeurteilung beim Mammakarzinom durch 5-ALA-induzierte PPIX-Fluoreszenz.** Das Bild zeigt das endoskopische Videobild (links im Fluoreszenzmodus mit roter PPIX-Fluoreszenz) eines durch den Tumor aufgeschnittenen Tumorpräparates unmittelbar nach Resektion.

### ***Fiberoptisches Hämatofluorometer: Fluoreszenznachweis von Zink-PPIX als Indikator von Eisenmangel***

*Herbert Stepp, Georg Hennig, Stephan Dittmar; Christoph Polzer, Christian Gruber, Klinik: Michael Vogeser (Klinische Chemie)*

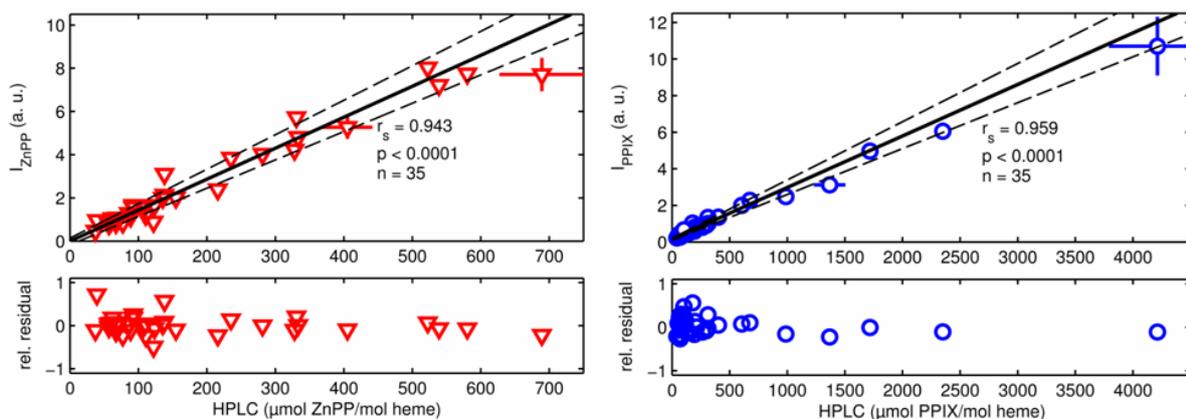
*Kooperation: Gary Brittenham (Columbia University, NY)*

*Förderung: Industrie*

Studien zur Prävention von Folgen von Mangelernährung zeigen, dass eine Eisen-substitution signifikant das Immunsystem (z. B. zum Schutz vor Malariainfektion) bei genau den Personen stärkt, die unter Eisenmangel leiden. Eine pauschale Substitution „auf Verdacht“ hingegen schwächt das Immunsystem der nicht unter Eisenmangel Leidenden. Die Detektion der Fluoreszenz von Zink-PPIX aus Erythrozyten ist ein wichtiger Indikator zur Identifizierung der richtigen Zielgruppe. Mit den verfüg-

baren Methoden ist diese allerdings zu invasiv (Blutentnahme). In Kooperation mit Prof. Brittenham und Prof. Vogeser wurden die 2009 begonnenen Untersuchungen zur Erfassung der Zink-PPIX Fluoreszenz aus Gewebe fortgesetzt und die Fa. Nestlé als Sponsor gewonnen. Die Firmenunterstützung ist sehr substanziell und konnte zum Jahresende 2012 sogar um die Bewilligung einer Postdoktorandenstelle erweitert werden. Es wurde ein Gerätefunktionsmuster für den klinischen Einsatz entwickelt. Für eine klinische Studie ist das Ethikvotum erteilt, der Beginn für Mitte 2013 geplant.

Bisher wurden Blutproben von Patienten mit niedrigem Hämoglobingehalt (und Kontrollen) untersucht, wobei das Vollblut verdünnt und mit Streumittel versehen wurde, um in den Bereich der Erythrozytenkonzentration zu gelangen, der in gut durchblutetem Gewebe erwartet werden kann (1 bis 4%). In Übereinstimmung mit der zwar nicht unbedingt intuitiven, aber nach theoretischen Überlegungen naheliegenden, Erwartung zeigt sich, dass die Signalintensität auch bei diesen hohen Verdünnungen nicht geringer ist als bei unverdünntem Vollblut. Erst unterhalb von 1-2% Verdünnung nimmt das Fluoreszenzsignal aus geometrischen Gründen ab. Das schon 2011 zum Patent angemeldete Nachweisverfahren erlaubt eine vollständige Eliminierung von Autofluoreszenzuntergrund und die gleichzeitige Erfassung von Zink-PPIX und PPIX. Für beide Fluorochrome ergab sich eine ausgezeichnete Korrelation der mit dem eigenen Messgerät ermittelten Werte mit dem quantitativen Vergleichsstandard HPLC (siehe Abbildung). Das Gerät ist jetzt für klinische Untersuchungen einsatzbereit. Als Messsonde dient eine CE-zertifizierte Quarzfaser mit 1 mm Durchmesser.



**Quantifizierung von Zink-PPIX durch Fluoreszenzmessung.** Korrelation der Zink-PPIX (links) bzw. der PPIX (rechts) Konzentration in verdünntem Vollblut zwischen dem Goldstandard HPLC (Abszisse) und dem eigenen Messgerät (Ordinate).

Ein Gerätedetail („Optische Filtereinheit mit verstellbarer spektraler Transmission“) wurde als Gebrauchsmuster angemeldet, die ersten Ergebnisse dieses Projektes wurden publiziert<sup>4, 5</sup>.

<sup>4</sup> Hennig G, Gruber C, Vogeser M, Stepp H, Dittmar S, Sroka R, Brittenham GM. Dual-wavelength excitation for fluorescence-based quantification of zinc protoporphyrin IX and protoporphyrin IX in whole blood. *J Biophotonics*, im Druck (2013). IF 4.343

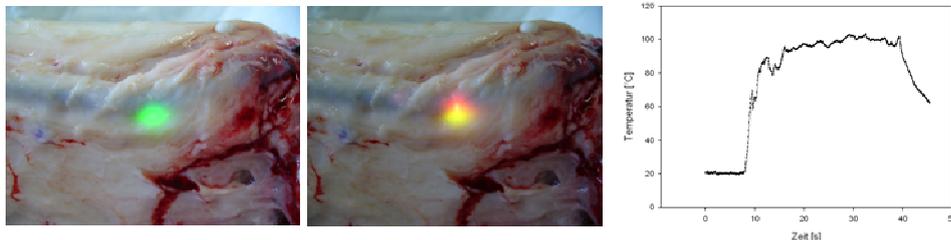
<sup>5</sup> Hennig G, Stepp H, Sroka R, Beyer W. Comparison of an accelerated weighted fluorescence Monte Carlo simulation method with reference methods in multi-layered turbid media. *Appl Optics* 52:1066-1075 (2013). IF 1.748

## **Fiberoptisches Messsystem zur On-line-Ermittlung der Temperatur bei Laser-assistierter endoluminaler Venenbehandlung**

Ronald Sroka, Florian Lugauer

Kooperation: Claus-Georg Schmedt (Krankenhaus Schwäbisch-Hall)  
Prof. Roths (University of Applied Science, Munich)

Ex-vivo-Untersuchungen zur endoluminalen Behandlung der Stammvenenvarikosis belegen einen optimalen Therapieerfolg bei Temperaturen von max. 100°C in der Venenwand, da sowohl Proteindenaturierung als auch Kollagenschrumpfung bis zu diesem Temperaturbereich erfolgen. Infolge der bereits abgeschlossenen Entwicklungen zur erfolgreichen Optimierung der genutzten Wellenlänge (optimale Wellenlänge 1470 nm) als auch des Lichtapplikationssystems (radial zylindrisch Abstrahlungsprofil) wurden Grundlagenuntersuchungen für ein Feedback-System durchgeführt. Es wurde ein faserbasiertes Temperaturmesssystem entwickelt, mit welchem auch im Strahlungsfeld des Therapielasers Umgebungstemperaturen mit einer Verlässlichkeit von  $\pm 2^\circ\text{C}$  im Bereich von 30-200°C ermittelt werden können. Dieses System wurde auf der Basis der temperaturabhängigen Fluoreszenz von Rubin-kristallen entwickelt und im Rinder-Fuß-Modell getestet. Ferner wurde ein Temperaturmesssystem auf der Basis von Faser-Bragg-Sensoren entwickelt und im Rinder-Fuß-Modell erfolgreich getestet. Ein Gebrauchsmuster für die Implementierung dieses Temperatur-Feedback-System wurde beim Deutschen Patent und Markenamt München hinterlegt, Publikationen zur Feedback-Implementierung in derartige Lichtapplikationssysteme wurden eingereicht, Kooperationsgespräche für eine industrielle Umsetzung dauern an.



**Fiberoptisches Messsystem zur On-line-Ermittlung der Temperatur bei Laser-assistierter endoluminaler Venenbehandlung.** Das linke Bild zeigt die endoluminale Position des fiberoptischen Temperatursensors erkennbar am Spot des grünen Lichtes, welches zur Fluoreszenzanregung genutzt wird. Das mittlere Bild zeigt die Überlagerung mit dem Pilotlicht (rot) der Therapielasersonde. Die Therapie erfolgte mit bei 6 W und kontinuierlichen Rückzug von Therapiesonde und Temperatursonde und belegt eine gleichmäßige Temperaturerhöhung im Strahlungsfeld auf  $100^\circ\pm 10^\circ\text{C}$  (rechtes Bild).

### **3.1.2 Klinische Laserbehandlungen**

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 2012 in diesem Forschungsschwerpunkt bearbeitet:

## ***Lithotripsie***

*Ronald Sroka, Praktikanten*

*Kooperation: Markus Bader (Urologie), Nicolas Haseke (Urologie)*

*Förderung: Industrie*

Ziel dieser Projektgruppe ist es, unterschiedlichste Lasersysteme im Hinblick auf ihre destruktive Wirkung auf humane Steine im Vergleich zu standardisierten Kunststeinen zu untersuchen. Im Mittelpunkt stehen dabei die Bestimmung der Fragmentierungs- und Abtragraten, sowie Rückstoßuntersuchungen, und allgemeine Handhabungen der Systeme. Als kostengünstige Variante der Laser-Lithotripsie stehen neue mechanische Lithotripsieverfahren zur Verfügung und wurden mit dem im Laser-Forschungslabor zur Verfügung stehenden experimentellen Portfolio untersucht.

Es konnte gezeigt werden, dass durch elektromechanische und pneumatische Systeme Steine sehr effektiv mit einer geringen Anzahl Stößen zerstört werden können. Die Fragmentierungsrate hängt von dem Einsatz systemimmanenter Dämpfungsmaterialien ab. Die Systeme ähneln sich in der Erzeugung der Repulsion. Derartige starre Lithotripsie-Geräte erscheinen als eine kostengünstige Alternative zu Lasergeräten. Klinische Untersuchungen müssen folgen. Die Ergebnisse der Untersuchungen wurden auf der *Photonics West 2013* präsentiert, eine Publikation ist eingereicht.

## ***Untersuchungen zur Indikation des 1940-nm-Tm-Faser-Lasers in der HNO***

*Ronald Sroka*

*Kooperation: Andreas Leunig (HNO)*

*Förderung: Industrie*

Der chirurgische Einsatz des Thulium (Tm)-Faser-Lasers wurde in einer klinischen Machbarkeits-Studie zur Behandlung der Nasenmuschelreduktion und kleinerer chirurgischer Interventionen im Nasenbereich untersucht.

Aufgrund der hohen Absorption durch das Gewebewasser wurde die obstruktive nasale Kavität lediglich mit einer Leistung von kleiner als 5 W behandelt. Sämtliche Behandlungen erfolgten im Nicht-Kontaktverfahren. Bei der Nasenmuschelbehandlung konnte die Leistung sogar auf im Mittel auf 3 W reduziert werden, so dass eine geringe Energieapplikation von im Mittel 100 J ausreichte, um eine suffiziente Reduktion des obstruierten Gewebes zu erhalten. Es wurden keinerlei Nebenwirkungen beobachtet. Die Patienten berichteten über eine signifikante Verbesserung der nasalen Atmung. Diese Studie wurde publiziert<sup>6</sup> und auf der *Photonics West 2013* vorgestellt.

---

<sup>6</sup> **Sroka R**, Havel M, Betz C, Kremser T, Leunig A. Clinical feasibility trial on 1940 nm Tm: fiber laser intervention of hyperplastic inferior nasal turbinates. *Photonics & Lasers in Medicine* 1:215–222 (2012).



**Tm-Faser-Lasereinsatz bei der Behandlung der Synechie.** Im linken und mittleren Bild ist die laser-induzierte Koagulation des Zielgewebes zu erkennen, was eine blutungsfreie laser-gestützte Trennung der Synechie zur Folge hatte. Im rechten Bild ist deutlich die Abheilung ohne Narbenbildung 28 Tage nach Behandlung zu erkennen.

### ***Untersuchungen zur Indikation von Lasern im 2- $\mu$ m-Bereich zur partiellen Nephrektomie***

*Ronald Sroka*

*Kooperation: Wael Khoder (Urologie)*

*Förderung: Industrie*

Nach der erfolgreichen Einführung des 1320-nm-Diodenlasers für die partielle Nephrektomie bei laparoskopischem Zugang und deren erfolgreiche Publikation in 2012 standen weitere klinische Einsätze bevor. Die Optimierung des OP-Bestecks zur laparoskopischen Behandlung wurde mit einer Gebrauchsmusteranmeldung beim Deutschen Patent- und Markenamt gesichert (Erfinder: Khoder, Sroka) und publiziert. Auf der Basis von *Ex-vivo*-Grundlagenuntersuchungen mit weiteren Laserenergiequellen im IR-Bereich wurden erste klinische Anwendungen mit Lasergeräten im 2  $\mu$ m-Bereich durchgeführt und eine weitere Studie initiiert.

### ***„BetaMod“ – Wundheilungsmodulation durch lokal platzierte Betastrahler***

*Ronald Sroka, Kathrin Siegrist*

*Kooperation: Walter Assmann (Physik), Jörg Schirra (Medizinische Klinik II), Markus Bader (Urologie)*

*Förderung: Bayerische Forschungsförderung*

Wundheilung ist ein komplexer Prozess, der hauptsächlich 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 Tränenangang 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. Zusätzlich wurden die Präparate mittels innovativer Konfokal-Sonden unmittelbar während der Explantation untersucht.

Dieses Projekt wurde in verschiedenen Teilprojekten weitergeführt und die zugehörigen Doktorarbeiten angefertigt. Nun ist es das weitere Ziel, die klinische Einführung stringent einzuleiten. Hierfür wurde im Oktober 2011 ein Konsensustreffen unter Mitwirkung von namhaften deutschen Medizinern und

Wissenschaftlern auf dem Gebiet der *Low-dose*-Strahlentherapie benigner Erkrankungen einberufen. In diesem Forum wurde vereinbart, dass dieses Verfahren zunächst in der Urologie bei der Behandlung der Anastomosenstriktur nach radikaler Prostatektomie erfolgen soll. Hierfür wurden folgende Schritte festgelegt: Erstellung und Einreichung eines Ethikprotokolls und die Entwicklung klinisch nutzbarer Applikatoren.

2012 wurden beide Ansätze von den fortführenden Wissenschaftlern und Klinikern weiter verfolgt. Zudem sind Publikationen zum BetaMod-Teilprojekt Urologie und Gastroenterologie in Vorbereitung, sowie die Aufarbeitung des Teilprojektes HNO des BetaMod-Vorläufers BioMatRad initiiert worden.

### **3.1.3 Photodynamische Therapie (PDT)**

#### ***Interstitielle PDT in der Neurochirurgie***

*Wolfgang Beyer, Herbert Stepp, Adrian Rühm*

*Kooperation: Friedrich-Wilhelm Kreth (Neurochirurgie)*

Es wurden Heilversuche zur stereotaktischen PDT mit 5-ALA-induziertem PPIX von inoperablen Gliomrezidiven an 20 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. Dabei wurden im Rahmen des oben erwähnten Projekts „Neurotax“ erstmalig *in vivo* fluoreszenztechnische Untersuchungen durchgeführt u. a. mit dem Ziel, Korrelationen zwischen zugänglichen Messgrößen und dem Therapieerfolg zu finden. So wurde mit einzelnen Fasern kurzzeitig Licht eingestrahlt und jeweils alle anderen Fasern nacheinander als Detektor für Fluoreszenzlicht eingesetzt. Die Intensität der Fluoreszenz stellt dabei ein Maß für die Anreicherung des Photosensibilisators dar, und der Vergleich der Intensitäten vor und nach PDT ein Maß für das Ausbleichen und damit für den lichtdosimetrischen Erfolg der Therapie. Parallel dazu wurden an Biopsieproben über eine Extraktionsmethode fluorometrisch die Konzentrationen des Sensibilisators bestimmt. Die Ergebnisse zu den ersten 5 Patienten wurden in 2012 zur Publikation eingereicht und befinden sich im Druck. Bei 3 Patienten ergab sich eine deutliche *In-vivo*-Fluoreszenz und eine hohe PPIX-Konzentration in der Biopsie. Diese Patienten sind bisher seit 29 bis 36 Monaten rezidivfrei. Bei den beiden anderen Patienten fanden sich fast keine Fluoreszenz, eine nur geringe PPIX-Konzentration und ein Überleben von nur 3 bzw. 9 Monaten. Eine Korrelation mit der Ki67-Expression und dem MGMT-Promotormethylierungsstatus des Tumorgewebes war dagegen nicht zu erkennen. Eine intraoperative Fluoreszenzkontrolle scheint damit eine deutlich bessere Vorhersage des Therapieerfolges zu erlauben. Vorbereitungen für die Planung einer klinischen Studie sind im Gange.

#### ***PDT mit Chlorin e6***

*Herbert Stepp, Michael Heide, Sara Abdel Hamid*

*Kooperation mit der German University of Cairo (GUC)*

*Förderung: DAAD*

Seit September 2012 ist die ägyptische Pharmaziestudentin Frau Abdel Hamid als DAAD-Stipendiatin am LFL. Sie bearbeitet hier den ersten Teil Ihrer Dissertation.

Betreuer ist Prof. Abdel Kader, Direktor der GUC. Es besteht seit einiger Zeit ein informeller Austausch zwischen der GUC und dem LFL, die Kontakte, die Herr Dr. Baumgartner eingeleitet hatte, werden nun von Herrn Dr. Stepp fortgeführt. Frau Abdel Hamid untersucht auf *In-vitro*-Ebene die Eignung pflanzlich basierter Photosensitizer für die PDT. Wir konnten eine Kooperation mit der Firma Apocare etablieren, die den Photosensitizer Chlorin e6 (Fotolon) in klinischen Zulassungsstudien untersucht. Die Untersuchungen finden im Vergleich zu 5-ALA basierter PDT statt. Es sollen neben den üblichen Phototoxizitätsparametern auch die Kopplung an Carriersystemen (Albumin, Nanopartikel) und die Abhängigkeit der Expression von Transportproteinen in der Zellmembran (ABCG2) untersucht werden. Es bestehen dazu Kontakte zu den LMU-Fakultäten für Pharmazie und Chemie.

### ***Dünne zylindrische Lichtapplikatoren für die interstitielle PDT***

*Daniel Haffa, Sebastian Fiedler, Thomas Pongratz, Wolfgang Beyer, Ronald Sroka*

*Förderung: Industrie*

Für die Lichtapplikation bei der interstitiellen PDT, z. B. bei Glioblastomen und in der Prostata, werden fasergestützte Zylinderstrahler mit einer Länge von 10 bis 40 mm und einem Durchmesser von maximal 2 mm benötigt. Es wurde ein entsprechendes Herstellungsverfahren auf der Basis von transparenten mit Streumedium gefüllten Kunststoffschläuchen mit Außendurchmesser 1mm entwickelt. Hierfür wurden die optischen Eigenschaften des in Silikon eingebetteten Streumediums ermittelt. Mit Hilfe von Simulationsprogrammen wurden die Konzentrationen für spezifische Applikatorgeometrien ermittelt, sodass eine homogene Abstrahlung des Lichtes auf der gesamten Länge erzeugt wird. Es konnte in reproduzierbarer Weise zylindrische Lichtapplikatoren erstellt und ein einfaches Herstellungsverfahren erarbeitet werden.

### ***Photonics4 LIFE-Endomikroskopie***

*Katharina Thomsen, Herbert Stepp, Ronald Sroka*

*Förderung: Photonics4 LIFE, EU*

Die konfokale Endomikroskopie mit kommerziellen Geräten hat als Limitierung den Einsatz spezifischer Sonden für die Erreichung einer definierten Gewebetiefe während der Untersuchung. Deshalb müssen unterschiedliche Sonden für die entsprechende Gewebetiefe genutzt werden. Mittels 2-Photonenanregungen könnte die optische Penetration gesteigert und somit auch scanbare Gewebetiefen erreicht werden. Für die 2-Photonenanregung sind hohe Laserleistung und ultrakurze Laserpulse (Femtosekunden-Bereich) notwendig. Nachdem im FemtoScope-Projekt im Rahmen des MAP-Cluster das Prinzip der 2-Photonenendoskopie erfolgreich gezeigt werden konnte, ist es nun die Aufgabe dies auf flexible, fasergeführte Sonden zu übertragen. Hierfür müssen zunächst endoskopisch nutzbare Fasern und Bildleiter gefunden werden. In Kooperation mit dem ICFO (Barcelona, Spanien) und der Firma High-Q (Feldkirch, Österreich) wird in diesem Projekt die Spezifizierung von entsprechenden Lichtwellenleitern verfolgt. Am ICFO stehen dazu die notwendigen experimentellen Bedingungen zur Verfügung. High-Q stellt die notwendige Laserlichtquelle für die Untersuchungen bereit. Nach Beendigung der Komponentenuntersuchungen wird der gesamte Aufbau ins LFL transferiert, um dann erste Untersuchungen an Gewebeproben vorzunehmen.

Die experimentellen Arbeiten stellen sich komplexer als geplant dar, so dass der zeitliche Rahmen gestreckt wurde. Es wurde am ICFO eine Masterarbeit betreut. Nach deren Begutachtung ist eine Publikation geplant.

### **Stapes-Implantatfixierung mittels Laser**

Ronald Sroka, Fabian Suchan

Kooperation: Prof. J. Müller (HNO)

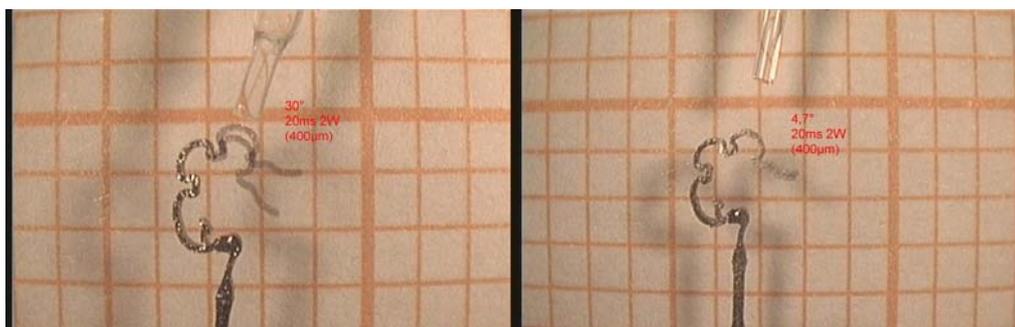
Förderung: Industrie

Stapesimplantate werden weitestgehend mittels Crimpen am Amboss fixiert. Das schwer reproduzierbare Crimpen (Abhängigkeit von Druck, Festigkeit, Länge des Implantats) ist dabei Ausgangspunkt für eine Reihe klinischer Nebenwirkungen. Aus diesem Grunde wurden Implantate auf Nitinol-Basis entwickelt, welche sich mittels Wärmeeintrag an den Amboss fixieren. Radiofrequenz und CO<sub>2</sub>-Laserstrahlung beherbergen dabei wiederum Gefahrenpotential bei der Applikation. Mit Hilfe von Diodenlaser ist die fasergestützte Energieapplikation an das Implantat unkompliziert und reproduzierbar.

In einer klinischen Studie wurden Patienten erfolgreich mit Nitinol-Implantaten versorgt. Eine Publikation wurde bereits eingereicht.

In Folge dieser Studie wurden nun in experimentellen Untersuchungen die optimalen Laser-Parameter und Applikationsmöglichkeiten erforscht. Der Eintrag der Energie ist im NIR-Bereich geringfügig von der Wellenlänge abhängig. Ein Abstand Faserende zum Target ermöglicht zwar einen ausreichenden Energieeintrag, birgt jedoch mit grösser werdendem Abstand Gefahrenpotential zur Schädigung benachbarter Gewebeareale. Ein Eintrag von 40 mJ auf das Implantat erzeugt eine optimale Verformung, jedoch sind die Parameter Zeit und Bestrahlungsstärke kritisch zu wählen. Die Ergebnisse wurden auf der *Photonics West 2013* präsentiert, eine Publikation ist in Vorbereitung.

Eine Gebrauchsmusteranmeldung für ein *Feedback*-gesteuertes Applikationsbesteck wurde beim Deutschen Patent- und Markenamt in 2012 eingereicht (Erfinder: Sroka, Müller).



**Stapes-Implantatfixierung mittels Laser.** Im linken Bild führt die Applikation von 40 mJ bei nahezu Kontakt zwischen Faserende und Implantat zu einer gezielten und gewünschten Verformung von 30°, während im rechten Bild die Laser induzierte Verformung bei einem Abstand von 1 mm lediglich 5° beträgt.

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

*Sprecher: Herbert Stepp*

Das im November 2008 gegründete Kompetenznetzwerk T.E.A.M. führte seine Aktivitäten auch 2012 kontinuierlich fort.

Zur effektiven Betreuung der zahlreichen Aktivitäten wäre eine Personalstelle erforderlich. Der Klinikumsvorstand hat einen entsprechenden Antrag der T.E.A.M.-Sprecher bisher nicht bewilligt. Trotzdem werden die im Verbund angeschafften diagnostischen Geräte von mehreren Kliniken genutzt und seitens des LFL betreut.

Die Rolle des LFL bei diesen Projekten besteht in der Einführung neuer Mitarbeiter, Mitbetreuung von Medizindoktoranden und Medizindoktorandinnen, Geräteversorgung, wissenschaftliche Planung, Hilfestellung beim Verfassen von Ethikanträgen, Assistenz bei Messungen, Unterstützung bei Messungen im Labor – auch mit anderen Geräten. Leider geht dies auf Kosten der Personalkapazität der festen Mitarbeiter, die diese Leistungen „nebenbei“ erbringen müssen. Angesichts der Fülle der Aufgaben (auch *homepage* pflegen, systematische Auswertungen durchführen, weitere Indikationen vorbereiten) wäre die oben erwähnte Personalstelle sehr hilfreich.

2012 waren vor allem die Arbeitsgruppen in der Frauenklinik (OCT, PD Dr. Gallwas<sup>7, 8, 9</sup>), der Medizinischen Klinik II (pCLE, Prof. Schirra), der HNO (OCT und pCLE (zur Erläuterung von OCT und pCLE, siehe nächsten Abschnitt), PD Dr. Betz<sup>10, 11</sup>), der Urologie (pCLE und OCT, Dr. Trottmann, Prof. Kölle, Konferenzbeiträge) und der Dermatologie (OCT und konfokale Mikroskopie, Prof. Berking, PD Dr. Mayer, unterstützt durch zwei chinesische Gastärzte (Stipendium)) aktiv. Die Pulmologische Klinik Gauting hat einen Ethikantrag zum Einsatz der pCLE gestellt.

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

---

<sup>7</sup> Gallwas J, Gaschler R, **Stepp H**, Friese K, Dannecker C: 3D optical coherence tomography of cervical intraepithelial neoplasia-early experience and some pitfalls. *Eur J Gynaecol Oncol* 33(1), 37-41 (2012). **IF 0.474**

<sup>8</sup> Gallwas J, Mortensen U, Gaschler R, Ochsenkühn R, **Stepp H**, Friese K, Dannecker C: Validation of an ex vivo human cervical tissue model for optical imaging studies. *Laser Surg Med* 44(3), 245-8 (2012). **IF 2.748**

<sup>9</sup> Gallwas J, Mortensen U, Gaschler R, **Stepp H**, Friese K, Dannecker C.: Diagnostic efficacy of backscattering intensity measurements in optical coherence tomography of cervical intraepithelial dysplasia. *Lasers Surg Med* 44(1):11-19, (2012) **IF 2.748**

<sup>10</sup> Betz CS, **Stepp H**, Ledderose JG, Kissner U, Leunig A: Probe-Based Confocal Laser Endomicroscopy in Upper Aerodigestive Tract Lesions: First Results. *Laser Surg Med* 44, 24- (2012). **IF 2.748**

<sup>11</sup> Betz CS, Volgger V, **Stepp H**, Ihrler S, Kraft M, Leunig A, Hopper C: Evaluation of OCT to Discriminate Lesions of the Upper Aerodigestive Tract. *Laser Surg Med* 44, 23-4 (2012). **IF 2.748**

## ***Klinische Untersuchungen mit endoskopisch eingesetzter optischer Kohärenztomographie (OCT)***

*Herbert Stepp*

*Kooperation: Christian Betz (HNO), Julia Gallwas (Gynäkologie), Matthias Trottmann, Sabine Kölle (Urologie)*

*Förderung: Industrie*

Dieses Vorhaben wird in Kooperation mit dem US-Unternehmen *Imalux* durchgeführt. Es ist Bestandteil des Verbundes T.E.A.M. am Klinikum.

In der HNO wird das endoskopische OCT durch Herrn PD Dr. Betz fast routinemäßig zur Befundkontrolle verdächtiger Läsionen im oberen Aerodigestivtrakt eingesetzt. Es bewährt sich in der Identifizierung frühinvasiver maligner Läsionen durch die dann festzustellende Auflösung von Schichtgrenzen. Die OCT wird gezielt auch in einer klinischen Studie eingesetzt, die den Stellenwert der pCLE (*probe-based confocal laser endomicroscopy*) bewerten soll (s.u.), indem die Einschlusskriterien überprüft werden.

In der Frauenklinik finden weiterhin Untersuchungen des Zervixkarzinoms statt. Auch hier gelingt eine gute intraoperative Einschätzung der CIN-grade.

Zwei auf Vermittlung des LFL für 1 Jahr hospitierende Dermatologen aus Nanchang, China, wurden in der Dermatologischen Klinik betreut und führten Evaluationen mit dem dortigen hochauflösenden dermatologischen OCT-Gerät an Patienten mit Basaliomen und aktinischer Keratose durch.

Die Erweiterung des Anwendungsspektrums der OCT wird im Fachbereich Urologie getestet. Dr. Trottmann und Mitarbeiter untersuchen den Verschluss des Samenleiters durch thermische Lasereinwirkung, wobei dieser Vorgang mit OCT aufgezeichnet wird. Es wird getestet, ob OCT in der Lage ist, das Lumen des Samenleiters und dessen Verschluss während und nach Laserbestrahlung darzustellen.

## ***Konfokale Fluoreszenzendoskopie (pCLE) zur hochaufgelösten intraoperativen Gewebediagnostik***

*Herbert Stepp*

*Kooperation: Christian Betz (HNO), Julia Gallwas, Christian Dannecker (Gynäkologie), Jörg Schirra (Medizinische Klinik II), Carola Berking, Tanja Maier (Dermatologie), Matthias Trottmann, Sabine Kölle (Urologie)*

*Förderung: Großgeräteantrag*

Dieses Vorhaben ist Bestandteil des Verbundes T.E.A.M. am Klinikum. Aufbauend auf der LFL-Entwicklung der Fluoreszenzendoskopie, die als *Red-flag*-Technologie mit hoher Sensitivität auf makroskopischer Ebene malignes Gewebe identifiziert, besteht die Erwartung, dass mithilfe von weiteren optischen Technologien mit höherer räumlicher Auflösung, wie der OCT (siehe oben) oder der pCLE, eine sehr weitgehende Gewebecharakterisierung intraoperativ möglich ist.

2012 fanden mehrere Evaluationen im Labor und in klinischen Einsätzen statt:

Dr. Trottmann et al. untersuchten die Leistungsfähigkeit der pCLE zur Darstellung von Hoden und Eileitern. Es gelang, Samen tragende Hodenkanälchen darzustellen.

Die Untersuchungen erfolgten im Vergleich mit der Konfokalmikroskopie an verschiedenen Präparaten, zumeist Rinderhoden.

In Kooperation mit PD Dr. Betz untersuchte ein Gastarzt aus Irvine, CA die pCLE zur Darstellung der Mundschleimhaut im Vergleich zur Kontaktendoskopie mit verschiedenen breit- und schmalbandigen Beleuchtungsquellen und im Vergleich zur Autofluoreszenzendoskopie. Derzeit läuft in der HNO eine klinische Studie zur Darstellung von frühmalignen Läsionen in der Mundhöhle.

Prof. Schirra aus der Medizinischen Klinik II setzt die pCLE zur Befundsicherung bei Cholangiokarzinompatienten ein. Die morphologischen Bildkriterien sind hier wohl definiert, anhand derer malignes Gallengangewebe erkannt werden kann.

2012 bereitete die Pulmologische Klinik Gauting einen Ethikantrag zur Validierung der pCLE bei obstruktiven Lungenerkrankungen vor.

### **3.1.5 Kooperationsverbände**

#### ***Deutsch-Russischen Kooperationsverbund Biotechnologie***

*Michael Fedorov, Ronald Sroka*

Mit einer Förderung in Höhe von 1,1 Mio. Euro unterstützt das BMBF bis Ende 2013 die Zusammenarbeit zwischen Russland und Deutschland in der Biotechnologie.

Das primäre Ziel des Verbunds ist es, die Zusammenarbeit zwischen Unternehmen und wissenschaftlichen Einrichtungen beider Länder zu initiieren bzw. auf eine systematische und nachhaltige Grundlage zu stellen. Hierbei werden klassische Felder, wie z. B. die Molekularbiologie oder Biochemie, ebenso angesprochen wie jüngere Forschungsgebiete, so z. B. klinische Forschung.

Zu den Serviceangeboten des Kooperationsverbunds gehören neben der Durchführung von unterschiedlichen Veranstaltungen, wie z. B. größer angelegten bilateralen Foren oder individuell zugeschnittenen Qualifizierungsseminaren, die Bereitstellung von fachspezifischen Informationen, Publikation von Trends und Kooperationsangeboten im monatlichen *News Letter* und vor allem die individuelle Betreuung von Kooperationsgesuchen bzw. Projektteams.

Das Laser-Forschungslabor ist Koordinator für die medizinische Forschung. Zu den Aufgaben im Rahmen des Verbundes gehören die Gründung, Etablierung und Weiterentwicklung eines deutsch-russischen wissenschaftlichen Sub-Netzwerks zum Themenschwerpunkt *Medical Research* (speziell *Clinical Research*). Für die russischen und deutschen Partner spielt die Vernetzung eine zentrale Rolle bei der gemeinsamen Entwicklung innovativer klinisch-orientierter Produkte. Durch die geplante Struktur wird die Expertise auf deutscher und russischer Seite zusammengeführt. Die Zusammenführung in einem Netzwerk verspricht synergistisch gute Ergebnisse, da sich die Kompetenzen beider Seiten ergänzen.

Weitere Verbundpartner sind das Ost-West-Wissenschaftszentrum Hessen an der Universität Kassel, das Cluster Industrielle Biotechnologie (CLIB2021), die Universität Bielefeld als Sprecher für den Bereich, das A.-N.-Bach-Institut für Biochemie der Russischen Akademie der Wissenschaften und die russische Nationale Kontaktstelle zur Zusammenarbeit im 7. Rahmenprogramm der Europäischen Union im Bereich Biotechnologie.

In 2012 wurde das Netzwerk durch Kooperation mit Forschungseinrichtung und *Spin-off*-Unternehmen in den russischen Städten Voronezh, Lipezk, Tomsk, Penza ausgebaut. Ferner wurden auf Basis des Netzwerkes Konferenzen und Seminare in St. Petersburg, Novosibirsk und Moskau durchgeführt und vor Ort betreut. Das BMBF organisiert thematische Delegationsreisen nach Russland. Für den Themenbereich: klinischen Biotechnologie nahm Herr Fedorov an einer Reise teil. Schließlich wurden kurzzeitige Forschungsaufenthalte junger russischer Wissenschaftler (z.B.: Chemiker von TU Lipezk (RUS) an der TU Munich organisiert.

### ***Light4LIFE - Netzwerk***

*Ronald Sroka, Michael Fedorov*

*Förderung: BMBF Land of Ideas*

Die Internationalisierung und Verbreitungen biophotonischer Technologien ist wesentlicher Bestandteil des neuen Netzwerkes Light4LIFE, welches einerseits zur Förderung der internationalen wissenschaftlichen Ausbildung, dem Identifizieren internationaler wissenschaftlicher Partnerschaften dienen, als auch unter Mitwirkung von industriellen Partnern den Wirtschaftsstandort Bayern international sichtbar machen.

Ziel von Light4LIFE ist die Installation von technischer und wissenschaftlicher Zusammenarbeit auf dem Gebiet der Optischen Kohärenztomographie und deren Anwendung in der Klinik. Hierfür wurde 2012 eine Delegationsreise nach Moskau, Nishni Novgorod und Novosibirsk durchgeführt. Hierbei konnte ein vertiefter Einblick in den Wirtschaftsstandort Russland auf diesem Themengebiet gewonnen werden. Entsprechende Industriekontakte wurden initiiert.

Für 2013 ist die Teilnahme an den zwei Internationalen Ausstellungen: *Photonica* in Moskau und *Laser World of Photonics Munich* vorgesehen.

### ***NanoBridge - Netzwerk***

*Ronald Sroka, Michael Fedorov*

*Förderung: BMBF Land of Ideas*

Die Internationalisierung und Verbreitungen biophotonischer Technologien ist wesentlicher Bestandteil des neuen Netzwerkes *NanoBridge*, welches einerseits zur Förderung der internationalen wissenschaftlichen Ausbildung, dem Identifizieren internationaler wissenschaftlicher Partnerschaften dienen, als auch unter Mitwirkung von industriellen Partnern den Wirtschaftsstandort Bayern international sichtbar machen.

Ziel von *NanoBridge* ist die Installation von technischer und wissenschaftlicher Zusammenarbeit auf dem Gebiet der angewandten Nano-Technologien. Hierfür wurde 2012 eine Delegationsreise nach Moskau durchgeführt, mit dem Zweck auf der Gesundheitsmesse 2012 in Moskau, deutsche Arbeiten auf diesem Gebiet zu vorzustellen. Im Rahmen der Veranstaltung *Saratov – Meeting Biophotonic* wurde ein Plenarvortrag via Internet zur Photodynamischen Therapie und Fluoreszenzdiagnostik (Dr. H. Stepp) präsentiert.

## 3.2 Labor für Tumorimmunologie

### **Einführung**

In der Tumorimmunologie 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, zum Teil mit klonierten oder chimären Antigenrezeptoren, sowie Antikörpertherapien.

In den letzten Jahren wurden so genannte Tumor-initiiierende Zellen oder Tumorstammzellen in Leukämien und einer Reihe solider Tumore 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 und weiteren „*rational design*“-Therapien 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 Tumorimmunologie betreffen hauptsächlich urologische Tumoren, insbesondere Nieren- und Prostata Tumoren, aber seit kurzem auch 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***

*Chiara Bellio, Mira Kronast, Johannes Meyer, Verena Passerini, Elena Vetter, Wolfgang Zimmermann*

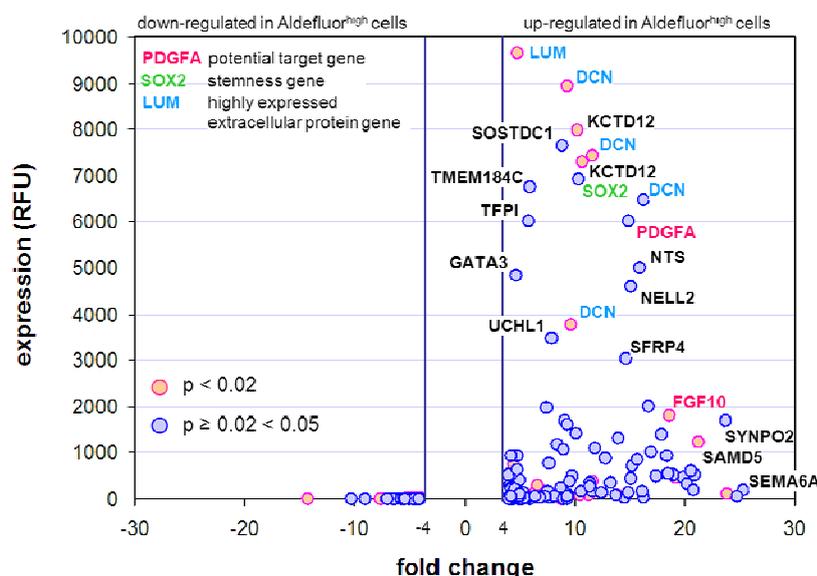
*Kooperation: Joachim W. Ellwart, Josef Mysliwietz (Institut für Molekulare Immunologie, Helmholtz Zentrum München)*

*Förderung: Graduiertenförderung der Medizinischen Fakultät, Erasmus-Programm*

In diesem Projekt möchten wir Zielstrukturen und Signalwege in Tumorzellen mit Stammzeleigenschaften identifizieren, die idealerweise nicht in normalen Stamm-

zellen exprimiert werden und sich zur Entwicklung Therapien 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). Als viel versprechend zeigte sich der funktionelle Nachweis des Stammzellmarkers Aldehyddehydrogenase 1A1 (ALDH1A1) durch den ALDEFLUOR-Assay in den von uns untersuchten menschlichen Magenkarzinomzelllinien. Mittels dieses Nachweissystems gelang es anderen Gruppen, Tumorstammzellen für bereits eine Reihe von Karzinomen anzureichern. Wir konnten zeigen, dass in Magenkarzinomzelllinien ALDEFLUOR<sup>+</sup>- und CD133-exprimierende Subpopulationen durch Behandlung mit den Chemotherapeutika Docetaxel, Oxaliplatin und 5-Fluoruracil (nur für den Marker CD133) angereichert werden.

Dieser Befund veranlasste uns ALDEFLUOR-positive und ALDEFLUOR-negative Zellpopulationen durch FACS anreichern und Transkriptomanalysen durchzuführen, um besonders in den vermuteten Stammzellpopulationen aktivierte Signalwege zu identifizieren. Bisher sind diese Untersuchungen für eine der Zelllinien (GC1, isoliert von einem Magenkarzinom gemischten Typs) durchgeführt worden. Zu den signifikant in den ALDEFLUOR<sup>high</sup>-Zellen 15-20-fach hochregulierten und stark exprimierten Genen gehören das *stemness factor gene* SOX2, sowie mehrere Wachstumsfaktorgene und ein Wachstumsfaktorrezeptorgen (siehe Abbildung).

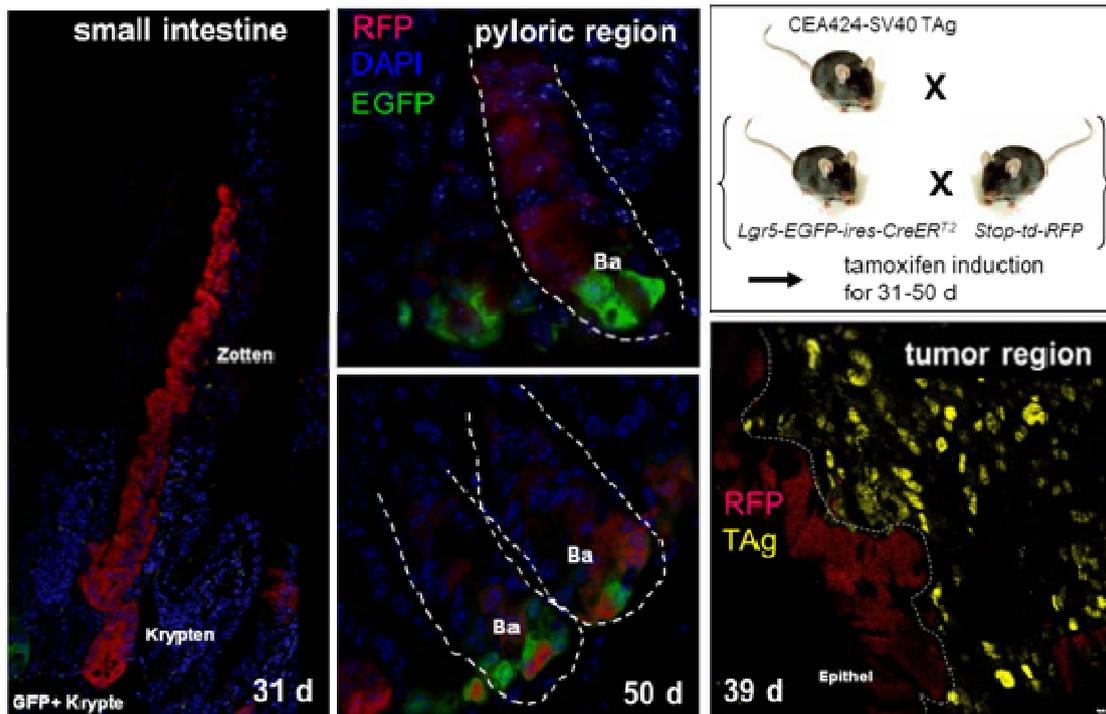


**Expressionsniveau präferentiell in ALDEFLUOR<sup>high</sup> GC1-Magenkarzinomzellen exprimierter Gene.** Humane GC1-Zellen wurden aufgrund ihrer unterschiedlichen ALDH1-Enzymaktivität in ALDEFLUOR<sup>high</sup>- und ALDEFLUOR<sup>low</sup>-Populationen durch FACS aufgetrennt und ihr Transkriptom mittels Affymetrix-Oligonukleotid-Microarray-Analysen bestimmt. Die Expressionsniveaus und das Ausmaß der Hoch- bzw. Herunterregulation signifikant deregulierter Gene sind dargestellt. Einzelne Kandidatengene sind farblich hervorgehoben.

Gegenwärtig untersuchen wir, ob die korrespondierenden Faktoren und Rezeptoren, möglicherweise in einen autokrinen oder parakrinen *loop* für die Aufrechterhaltung der vermuteten Stammzellpopulation wichtig sind. Träfe das zu, würden sich diese Proteine als Ziele für therapeutische Ansätze anbieten. Es gibt bereits pharmakologische Inhibitoren für diese Proteine, die nun auf ihren (selektiven) Einfluss auf das Wachstum und Überleben von ALDEFLUOR<sup>high</sup>-GC1-Zellen getestet werden. Des Weiteren wurden durch FACS angereicherte ALDEFLUOR<sup>high</sup>- und ALDEFLUOR<sup>low</sup>-Zellpopulationen einer weiteren Magenkarzinomzelllinie (GC20, intestinaler Typ) ebenfalls durch Transkriptomanalysen analysiert. Von besonderem Interesse werden potentielle *target genes* und Signalwege sein, die in den ALDEFLUOR<sup>high</sup>-Subpopulationen beider Karzinomlinien überexprimiert sind.

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*-EGFP 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), wurden so genannte *Tracing*-Experimente nach Einkreuzung eines Reporterstamms (ROSA-Stop-tdRFP) durchgeführt. Es konnten genetisch markierte Nachkommen der *Lgr5*-exprimierenden Magenepithelstammzellen nicht in Tumoren jedoch in normaler Nachbarschleimhaut von ca. 8 Wochen alten Mäusen (Anhand ihrer Expression von rot fluoreszierendem tdRFP-Protein) nachgewiesen werden (siehe Abbildung).

Diese Befunde können u. a. dadurch erklärt werden, dass zum Zeitpunkt der genetischen Markierung (Aktivierung einer Rekombinase-Östrogenrezeptorvariante mittels Tamoxifen, deren Expression durch den *Lgr5*-Promoter gesteuert wird) *Lgr5*-Expression durch SV40-T-Antigen unterdrückt wird. Diese Hypothese wollten wir durch Transfektion von SV40-T-Antigen-Expressionskonstrukten in LGR5-exprimierende Zellen (HepG2) untersuchen. Da aufgrund geringer Transfektionseffizienz der HepG2-Zellen der Versuchsansatz nicht erfolgreich war, haben wir nun ganz generell nach einer Beeinflussung des Wnt-Signalweges durch T-Antigen geschaut. LGR5-Expression wird durch WNT/ $\beta$ -Catenin-Signaltransduktion gesteuert. Diese kann durch ein WNT *signalling* steuerbares Promotor-Luziferasegenkonstrukt analysiert werden. Entgegen unserer Hypothese ist T-Antigen nicht in der Lage, WNT-Signaltransduktion zu unterdrücken, sondern kann sogar die endogene  $\beta$ -Catenin- sowie die durch ein konstitutiv aktives  $\beta$ -Catenin-vermittelte Aktivierung des Promotor-Luziferasegenkonstrukts weiter erhöhen.



**Genetische Markierung von Pylorusstammzellen in CEA424-SV40-TAg-Mäusen.** Durch Tamoxifengabe wird die aufgrund des *Lgr5*-Promotors nur in Stammzellen exprimierte Cre-Rekombinase in den Kern transloziert, wo sie eine Stoppkassette vor dem tdRFP-Gen durch Rekombination entfernt. Dies führt in dreifach transgenen Mäusen (Verpaarungsschema rechts oben) zur irreversiblen Aktivierung des tdRFP-Gens in Stammzellen und allen davon abstammenden Tochterzellen, mit der Konsequenz, dass alle Tochterzellen rot fluoreszieren (in linker Abbildung im Dünndarm als Durchgängige Färbung von Krypten- und Zottenzellen zu sehen). In der Pylorusregion des Magens sind Stammzellen aufgrund der *Lgr5*-Promotor-gesteuerten EGFP-Expression (Mitte oben; Grünfärbung) zu sehen. In diesen Zellen hat Rekombination stattgefunden (Rot/Grünfärbung). Tochterzellen exprimieren den Stammzellmarker LGR5 nicht mehr (nur Rotfärbung; Mitte unten). In der Tumorregion (Kerne von Tumorzellen aufgrund der TAg-Expression durch Immunfluoreszenz nachgewiesen). Die meisten dieser Tumorzellen sind nicht rot gefärbt, stammen also nicht von einer Tumorzelle ab, die zum Zeitpunkt der Tamoxifengabe *Lgr5*-exprimierend war. Benachbarte normale Zellen sind dagegen rot gefärbt,; sie stammen also von einer LGR5-positiven Elternzelle ab.

### **Identifizierung von Zielantigenen in Tumorstammzellen des Nierenzellkarzinom**

*Heike Pohla, Maximilian Gassenmaier, Alexander Buchner, Dong Chen, Rainer Riesenberger, Birgit Stadlbauer, Wolfgang Zimmermann*

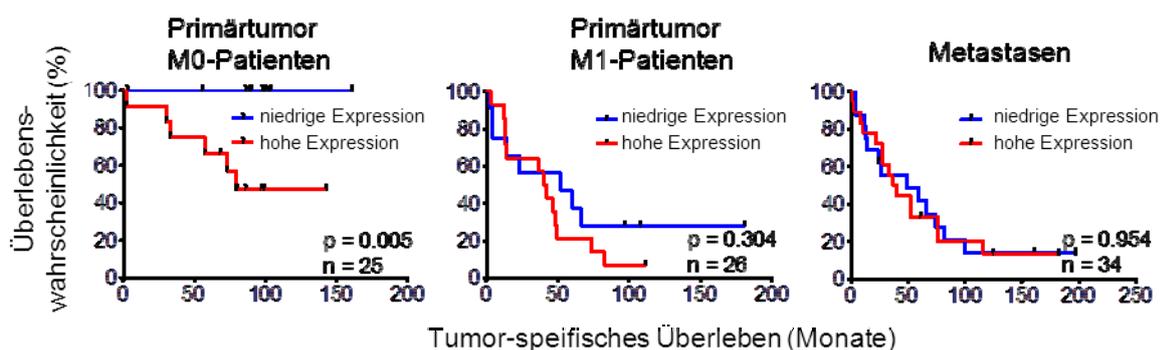
*Kooperation: Dolores J. Schendel; Elfriede Nössner (Institut für Molekulare Immunologie, Helmholtz Zentrum München); Brigitte Mack (Molekulare Onkologie, Klinik für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Ludwig-Maximilians-Universität, München); Lynette Henkel, Matthias Schiemann (Institut für Medizinische Mikrobiologie, Technische Universität München)*

In den vergangenen Jahren wurden mehrere Tumorzelllinien von Patienten mit klarzelligem Nierenzellkarzinom (RCC) isoliert. Zwei Zelllinien (RCC-26, RCC-53) zeigten sich sowohl *in vitro* als auch *in vivo* im NOD/SCID-Mausmodell sehr unterschiedlich bzgl. ihres Wachstumspotentials (RCC-53 >> RCC-26). Beide Zelllinien wurden auch hinsichtlich der Expression putativer Stammzellmarker, ihrer

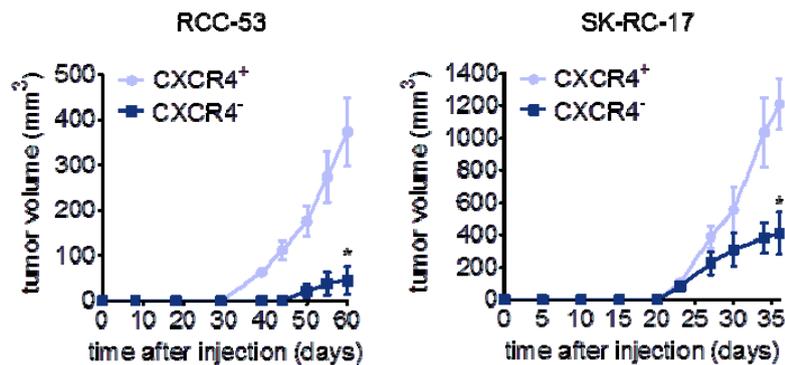
*Sphere-forming*-Kapazität, ihrer Klonogenität und Differenzierungsfähigkeit untersucht. Dabei zeigten sich gravierende Unterschiede. RCC-53 vermag mehr *Spheres* zu bilden, eine charakteristische Eigenschaft von Tumorstammzellen, exprimiert stärker die Marker CD133, CD105, CD34, CD90, CXCR1 und CXCR4 und ist in der Lage, im entsprechenden Differenzierungsmedium Adipozyten-ähnliche Zellen zu bilden.

Da CXCR4-Expression auf mRNA-Ebene stark mit einer schlechten Prognose von RCC-Patienten ohne disseminierte Erkrankung (M0) vergesellschaftet ist und somit prädiktiv für Metastasenbildung ist (siehe Abbildung unten), haben wir diesen Marker genauer untersucht. Es zeigte sich, dass CXCR4-positive Zellen in *Spheres* relativ zu adhärent wachsenden Zellen angereichert werden und diese Zellen vermehrt Gene exprimieren, die typischerweise in gering differenzierten Stammzellen überexprimiert werden. Des Weiteren zeigte sich, dass CXCR4-exprimierende Zellen zweier unterschiedlicher humaner RCC-Linien (RCC-53 und SK-RC-17) bevorzugt Tumoren in immundefizienten Mäusen zu bilden, was wiederum typisch für Tumorstammzellen oder Tumor-initiiierende Zellen ist (wie der Name nahelegt; siehe Abbildung weiter unten). Da Tumorstammzellen im Verdacht stehen, aufgrund ihrer höheren Toleranz gegenüber schädigenden Behandlungen (wie Chemo- und Strahlentherapie), verantwortlich für Therapieresistenz von Tumoren zu sein, untersuchten wir die Empfindlichkeit von RCC-Zellpopulationen mit einem erhöhten Gehalt CXCR4-positiver Zellen (*Sphere*-Zellen) auf ihre Empfindlichkeit gegenüber Tyrosinkinaseinhibitoren (TKI), die aktuell als First- und Second-Line-Therapeutika beim RCC eingesetzt werden. Es zeigte sich, dass CXCR4-positive Zellpopulationen in der Tat eine höhere Resistenz im Vergleich zur Elternzelllinie aufweisen.

Bindung des CXCR4-Liganden (CXCL12) an seinen Rezeptor aktiviert eine Reihe von Signalwegen, die Überlebenssignale, Migration und Wachstum auslösen. Durch Vorbehandlung mit einem antagonistisch wirkenden CXCR4-Inhibitor (AMD3100) konnte die *Sphere*-Bildungskapazität der Zellen deutlich gesenkt und die Empfindlichkeit gegenüber der TKI gesteigert werden.



**RCC-Patienten mit einem niedrigen CXCR4-mRNA-Gehalt im Primärtumor zeigen ein vermindertes Risiko zur Metastasierung.** CXCR4-mRNA wurde in Primärtumoren von RCC-Patienten ohne (M0) oder mit disseminierter Erkrankung (M1) sowie in RCC-Metastasen quantifiziert und mit dem Tumor-bedingten Überleben der Patienten korreliert. Der Median des CXCR4-mRNA-Gehalts diente als *Cut-off*-Wert. n, Zahl der Patienten.



**CXCR4-exprimierende Subpopulationen zeigen rascheres Tumorwachstum.** Mittels FACS wurden hoch und niedrig CXCR4-exprimierende Zellpopulationen aus RCC-53 und SK-RC-17-Zellen gewonnen und ihr Tumorbildungsvermögen nach subkutaner Injektion in immundefizienten NOD/SCID-Mäusen bestimmt.

In zukünftigen Experimenten wollen wir mittels Transkriptomanalysen die wichtigen Signalwege und Zielstrukturen dieser möglichen therapieresistenten RCC-Stammzellen identifizieren und den Einfluss der Hemmung von CXCR4-Signalwegen auf die Ausbildung von Therapieresistenz *in vivo* untersuchen. Ein Manuskript wurde von *Stem Cells* zur Publikation angenommen<sup>12</sup>.

### **Prognostische Bedeutung von EMT (epithelial-mesenchymale Transition)-assoziierten Genen beim Nierenzellkarzinom**

*Alexander Buchner, Dong Chen*

*Kooperation: Matthias Maruschke (Urologische Klinik, Universität Rostock)*

Die epithelial-mesenchymale Transition (EMT) ist ein wichtiger biologischer Prozess bei verschiedenen Tumorentitäten (z. B. Kolon- und Mammakarzinom). Dabei führen verschiedene Reize (z. B. Hypoxie) und Signale (z. B. über Rezeptor-Tyrosinkinasen) zu einer Aktivierung von Signal- und Stoffwechselwegen im Tumor, die eine Verschiebung des Phänotyps vom Epithel hin zu mesenchymalen Eigenschaften bewirken, was u. a. einhergeht mit erhöhter Mobilität und Invasivität der Tumorzellen. Eine gezielte Inhibierung dieser EMT *pathways* stellt einen neuartigen Ansatz der Tumorthherapie dar, mit dem man den Phänotyp der Tumorzellen möglicherweise im Sinne einer *mesenchymal-epithelial transition* (MET) wieder in einen weniger aggressiven umwandeln kann. Außerdem zeigen Studien (etwa beim Mammakarzinom), dass EMT im Tumor mit der Prognose der Patienten korreliert.

Zur Bedeutung von EMT beim Nierenzellkarzinom gibt es erst wenige Daten. Um zu erforschen, ob EMT bei diesem Tumor in relevantem Ausmaß stattfindet und ob die Expression der beteiligten Gene mit der Prognose korrelieren, wurden 112 kryokonservierte Gewebeproben von 82 Patienten mit klarzelligem Nierenzellkarzinom und bekanntem Krankheitsverlauf untersucht (19 x normales Nierenparenchym, 55 x Primärtumor, 38 x Metastase). Die Expression von zwölf

<sup>12</sup> **Gassenmaier M, Chen D, Buchner A, Henkel L, Schiemann M, Mack B, Schendel DJ, Zimmermann W, Pohla H.** CXC chemokine receptor 4 is essential for maintenance of renal cell carcinoma-initiating cells and predicts metastasis. *Stem Cells*, in press. IF 7.781

EMT-assoziierten Genen wurde mittels quantitativer RT-PCR analysiert; neben dem Vergleich von Normalgewebe, Primärtumor und Metastase wurde der Zusammenhang zwischen Genexpression und tumorspezifischem Überleben untersucht.

In der univariaten Analyse (log rank-Test) korrelierte ein besseres Überleben der Patienten signifikant mit einer erniedrigten Expression von CXCR4, TWIST und MMP2 sowie mit einer erhöhten Expression von E-Cadherin, CXCR7 und CXCL12. In der multivariaten Analyse (Cox-Regression) waren MMP2 und E-Cadherin unabhängige prognostische Faktoren. Der Tumorstammzellmarker CXCR4 war der stärkste univariate Risikofaktor ( $p < 0,001$ ), seine Inhibition könnte eine Therapieoption für die Zukunft darstellen. Es konnte gezeigt werden, dass die Expression von CXCR4 im Verlauf der malignen Progression auf RNA- und Proteinebene signifikant zunimmt. Einige EMT-assoziierte Gene sind gegenüber dem Normalgewebe im Primärtumor deutlich erhöht, was für EMT beim Nierenzellkarzinom spricht. Interessanterweise sprechen einige Expressionsbefunde in den Metastasen dafür, dass hier im Vergleich zum Primärtumor ein Stück weit eine gegenteilige Entwicklung (*mesenchymal-epithelial transition* = MET) vorliegen könnte. Dieses Phänomen wird gegenwärtig u. a. mit Hilfe von Analysen an Microarray-Daten aus München und Rostock weiter untersucht, dabei kommen auch moderne biostatistische Verfahren wie GSEA (*gene set enrichment analysis*) zum Einsatz. Eine Publikation zu diesem Thema wird in Kürze eingereicht.

### **3.2.2 Entwicklung, Optimierung und klinische Testung von Tumorzellvakzinen**

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

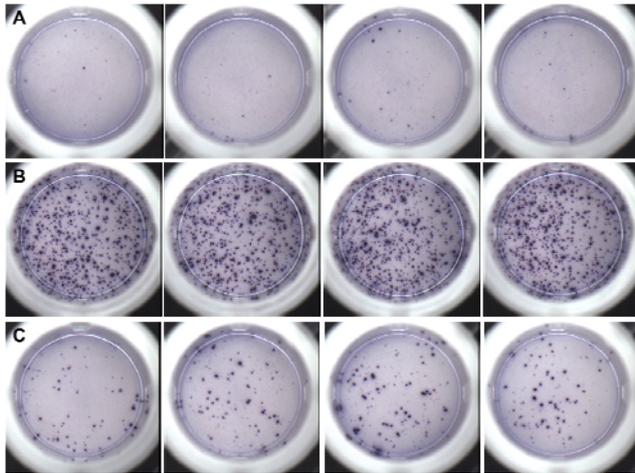
*Heike Pohla, Alexander Buchner, Birgit Stadlbauer*

*Förderung: DFG, BMBF, beendet*

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 12 der immunologisch evaluierbaren Patienten beobachtet, und hier insbesondere in den Patienten mit längerem Überleben. 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.

Alle Patienten wiesen im ELISPOT eine Immunantwort gegen mindestens eines der getesteten Tumor-assoziierten Peptidantigene auf.

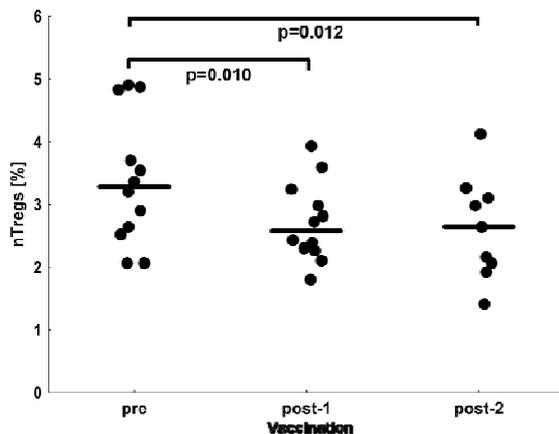


**Messung der Tumorpeptid-spezifischen Immunantwort der vakzinieren Patienten.** IFN- $\gamma$  Reaktivität im ELISPOT: A) ohne Antigen, B) virusspezifische Kontrollantigene, C) Tumorantigen

In 75% der Patienten konnte eine Vakzine-induzierte Immunantwort nachgewiesen werden, was die hohe Immunogenität dieser Vakzine demonstriert. Insgesamt war ein Trend zu längerem Gesamtüberleben bei den Patienten zu beobachten, die gegen mehr als zwei Peptide reagierten ( $p=0,066$ ).

Die am häufigsten erkannten Antigene waren: ILGF-BP3, MMP7, Ceruloplasmin, *transcriptional intermediary factor 1*, Adipophilin, und RGS-5. Einige Patienten reagierten sogar auf Peptide von Antigenen, die nicht von der Vakzine exprimiert werden, was auf *epitope spreading* hindeutet.

Des Weiteren konnte eine signifikante Abnahme der Frequenz regulatorischer T-Zellen (Treg) nach Vakzinierung festgestellt werden ( $p = 0,012$ ).



**Abnehmende Frequenz von nTreg nach Vakzinierung.** Die Quantifizierung von nTregs erfolgte mit Hilfe eines *real time* PCR-basierten Methylierungsassays mit Methylierungs- und Demethylierungs-spezifischen Primern.

Fünf Subpopulationen myeloider Suppressorzellen (MDSC) konnten identifiziert werden, wobei die Frequenz von MDSC4 ( $SSCimCD14^+HLA-DR^-$ ) und MDSC5 ( $CD14^-CD15^+CD11b^+$ ) mit dem Gesamtüberleben negativ korrelierte.

Wir analysierten auch das Zytokinprofil im Serum und in den Haut-infiltrierenden Lymphozyten und konnten gleichermaßen IFN- $\gamma$  und IL-10 detektieren. Dieses entspricht einem gemischten  $T_H1/T_H2$ -like Profil. Ähnliche Befunde wurden auch in Melanompatienten nach Immuntherapie beobachtet. Diese Patienten wiesen ein längeres Überleben auf. In den Haut-infiltrierenden Lymphozyten wurden erhöhte

Mengen IFN- $\gamma$ -indizierbarer Chemokine (RANTES, IP-10/CXCL10, MIG) gefunden. IP-10 spielt eine bedeutende Rolle bei der *delayed type hypersensitivity* (DTH-Reaktion) und ist chemotaktisch für T- und NK-Zellen.

Die Komplexität des Zytokinnetzwerks macht es nicht einfach, eine Relation zwischen klinischem Ergebnis, *immune response rate* (IRR) und systemischer Zytokinmenge zu sehen. Es konnte jedoch festgestellt werden, dass die Patienten mit höherer IRR, einer stärkeren DTH-Reaktion und stabiler Erkrankung bei längerem Überleben generell höhere Zytokinkonzentrationen eines gemischten T<sub>H</sub>1/T<sub>H</sub>2-like Profils aufwiesen<sup>13,14</sup>.

*Klinische Phase-I/II-Studie mit LNCaP/IL-2/IFN- $\gamma$  zur Behandlung von 30 Prostatakarzinompatienten:* Es konnte eine signifikante Verlängerung der PSA-Verdopplungszeit ( $p < 0,01$ ) und eine Stabilisierung des PSA-Wertes von mindestens 12 Wochen in 50% der Patienten erreicht werden, wobei 10% dieser Patienten sogar eine 50%ige Verringerung des PSA-Wertes aufwiesen.

Nach Vakzinierung konnte in 93% der Patienten eine Immunantwort gegenüber mindestens eines der getesteten Peptidantigene beobachtet werden (PSA, PSMA, PAP, PSCA, PSGR-1, STEAP, PRAME, Survivin, PTHLH, PCTA-1, NY-ESO1, Her2/neu). Eine Vakzine-induzierte Immunantwort konnte auch hier in 73% der Patienten nachgewiesen werden und auch hier war ein Trend zu längerem Gesamtüberleben bei den Patienten zu beobachten, die gegen mehr als zwei Peptide reagierten ( $p = 0,120$ ).

Bei einigen „PSA-Respondern“, d. h. den Patienten, die eine Stabilisierung des PSA-Wertes über mehr als 12 Wochen aufwiesen, ließ sich eine inverse Korrelation zur Immunantwort beobachten, da sie häufig eine niedrigere Frequenz an Peptidreaktiven T-Zellen zum Zeitpunkt des Abfalls bzw. der Stabilisierung des PSA-Wertes zeigten. Dieses Phänomen würde die Hypothese stützen, dass die Antigen-reaktiven T-Zellen während der klinischen Antwort aus der Peripherie verschwinden. Ähnliches wurde ebenfalls bei drei klinischen Langzeit-Respondern in der RCC-Studie beobachtet.

Erstmals wendeten wir bei der Prostatakarzinomstudie die *Artificial Neural Network* (ANN)-Analyse an, die es ermöglichen sollte, Zusammenhänge zwischen komplexen Datensätzen aus dem klinischen und immunologischen *Monitoring* zu entdecken. Es zeigte sich, dass die Immunreaktion gegenüber dem Antigen Survivin am Tag 36 der Vakzinierung den größten Einfluss auf die Entscheidung hatte, ob ein Patient zur PSA-Responder- oder zur PSA-Nonresponder-Gruppe gehörte ( $p = 0,007$ ).

Im Vergleich zu gesunden Spendern wiesen etwa 50% der Patienten eine leicht erhöhte Frequenz an natürlichen Treg (nTreg) auf. Eine signifikante Abnahme der nTreg konnte nicht beobachtet werden. FACS-Analysen zeigte jedoch eine Abnahme

---

<sup>13</sup> 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 1 trial of allogeneic gene-modified tumor cell vaccine RCC-26/CD80/IL-2 in patients with metastatic renal cell carcinoma. *Hum Gene Ther* 21(3):285-97 (2010).

<sup>14</sup> Pohla H, Buchner A, Stadlbauer B, Frankenberger B, Stevanovic S, Walter S, Frank R, Schwachula T, Olek S, Kopp J, Willimsky G, Stief CG, Hofstetter A, Pezzutto A, Blankenstein T, Oberneder R, Schendel DJ. High immune response rates and decreased frequencies of regulatory T cells in metastatic renal cell carcinoma patients after tumor cell vaccination. *Mol Med*. 18:1499-508 (2013).

der CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>CD127<sup>low/-</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD39<sup>+</sup> Treg. Eine erhöhte Frequenz von MDSCs im Vergleich zu gesunden Spendern wurde nicht gefunden, ebenso keine Korrelation zum PSA-Wert oder zur *immune response rate*.

Zur Analyse des Zytokinprofils im Serum und in Haut-infiltrierenden Lymphozyten wurden auch hier multiplexe Zytokinassays eingesetzt. Höhere IL-10 Werte im Serum zum Zeitpunkt vor Immunisierung wurden oft bei Patienten mit schnellerer PSA-Progression und kürzerer Überlebenszeit beobachtet. Aber auch in Patienten, die vermehrt IFN- $\gamma$  sezernierten, wurden moderate Mengen an IL-10 gemessen. Diese Patienten zeigten sowohl eine längere Überlebenszeit als auch eine längere Zeit bis zur PSA-Progression. Damit konnten wir dasselbe Phänomen wie bei den Patienten der RCC-Studie beobachten. Patienten, die einen erfolgreichen Verlauf unter Immuntherapie nahmen, wiesen ein gemischtes T<sub>H</sub>1/T<sub>H</sub>2-Zytokinprofil und grundsätzlich höhere Zytokinkonzentrationen auf.

Die Haut-infiltrierenden Lymphozyten sezernierten bei einigen Patienten die T<sub>H</sub>1-*like* Zytokine IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  und weniger T<sub>H</sub>2-*like* Zytokine (IL-4, IL-5, IL-13, und IL-10), bei anderen Patienten zeigte sich genau das gegenteilige Profil. Auch hier waren die Patienten, die entweder ein T<sub>H</sub>1- oder ein gemischtes Profil zeigten, zumeist die *PSA-Responder*. Bezüglich der Chemokinsekretion der Haut-infiltrierenden Lymphozyten wurde die gleiche Beobachtung wie bei den Patienten der RCC-Studie gemacht. In allen Fällen, in denen uns Biopsiematerial zur Verfügung stand, wurden erhöhte Mengen an IP-10, RANTES und MIG gefunden, was mit der starken Lymphozyteninfiltration korreliert (Brill, Pohla *et al.* 2007, 2009, eine dritte Publikation wird derzeit eingereicht).

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 Tumorigenstoffe durchaus als sinnvolle Option für zukünftige Kombinationstherapien zu bewerten.

### ***Individualisierte DC-Vakzine für Patienten mit hormonrefraktärem Prostatakarzinom***

*Heike Pohla, Birgit Stadlbauer*

*Kooperation: D. J. Schendel, Christiane Geiger (Institut für Molekulare Immunologie, Helmholtz Zentrum München)*

Aus den Immunmonitoringdaten unserer Prostatakarzinomstudie haben wir die besten d.h. immunogensten Tumor-assoziierten Antigene herausgesucht (PSMA, STEAP, PSCA, Survivin, PSGR, PAP, PTHLH), um cDNA herzustellen und *in vitro* transkribierte RNA (*ivt*-RNA) via Elektroporation in dendritische Zellen (DC) einzuschleusen. Diese DC werden für die Generierung Tumor-reaktiver CD8<sup>+</sup> T-Zellen verwendet. Derzeit wird die Expression der entsprechenden Antigene auf den DC überprüft. Die DC sollen später als Vakzine verwendet werden. Falls T-Zellklone generiert werden können, werden die T-Zellrezeptoren (TCR) charakterisiert, um diese dann auch für den adoptiven Transfer TCR-transduzierter T-Zellen nutzen zu können. Für diese Projekte müsste jedoch ein neuer Antrag geschrieben werden.

## **Einsatz einer Multipeptidvaccine zur Behandlung von Patienten mit metastasiertem Nierenzellkarzinoms (Klinische Phase-I- und Phase-II-Studie)**

Heike Pohla, Birgit Stadlbauer

Kooperation: *immatics biotechnologies GmbH*

IMA901 ist eine auf mehreren Tumor-assoziierten Peptiden basierende therapeutische Tumorstoffimpfung. 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<sup>+</sup> zytotoxische T-Zellen (CTL) und CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen zu aktivieren. Entwickelt wurde diese Impfung von der Firma *immatics biotechnologies GmbH* in Tübingen. IMA901 stellte sich in einer multizentrischen klinischen Phase-I-Studie als eine sehr sichere gut verträgliche und immunogene Multipeptidvaccine heraus (IMA901-101, Kooperation: M. Staehler, Urologische Klinik, LMU), so dass eine multizentrische klinische Phase-II-Studie (IMA901-202; Kooperation: R. Oberneder, Urologische Klinik München-Planegg) ebenfalls durchgeführt wurde.

Diese Phase-II-Studie zeigte, dass niedrig dosiertes Cyclophosphamid die Frequenz der Treg reduzierte und sich ein verlängertes Gesamtüberleben bei den Patienten zeigte, die mit einer stärkeren Immunantwort auf die Impfung reagierten. In einer Analyse der MDSC wurden die Subpopulationen MDSC4 und MDSC5 als prognostische Marker für das Gesamtüberleben identifiziert. Außerdem ließen sich die Biomarker Apolipoprotein A1 und das CCL17 als prädiktive Marker für sowohl die Immunantwort als auch das Überleben identifizieren<sup>15</sup>.

Die Rekrutierung für eine klinische Phase-III-Studie (IMA901-301) ist mittlerweile ebenfalls abgeschlossen. Hier soll festgestellt werden, ob eine Kombinationstherapie von IMA901 und der derzeitigen Standardtherapie mit Sunitinib gegenüber der Sunitinibtherapie alleine den Tumor stärker kontrollieren und möglicherweise sogar das *Overall Survival* verlängern kann. Auch hier bearbeiten wir wieder die Blutproben für das immunologische *Monitoring* (in Kooperation mit der Urologischen Klinik München-Planegg, der Urologischen Klinik rechts der Isar und der Urologischen Klinik des Klinikums Straubing).

### **Modulation der Funktion regulatorischer T-Zellen**

Heike Pohla, Birgit Stadlbauer, Leonie Lang; Förderung: DFG FOR 535 (beendet 03/2012), SFB TR 127 (07/2012 - 06/2016)

Kooperation: Dolores J. Schendel, Judith Eckl, Isabel Römer (Institut für Molekulare Immunologie, Helmholtz Zentrum München)

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

---

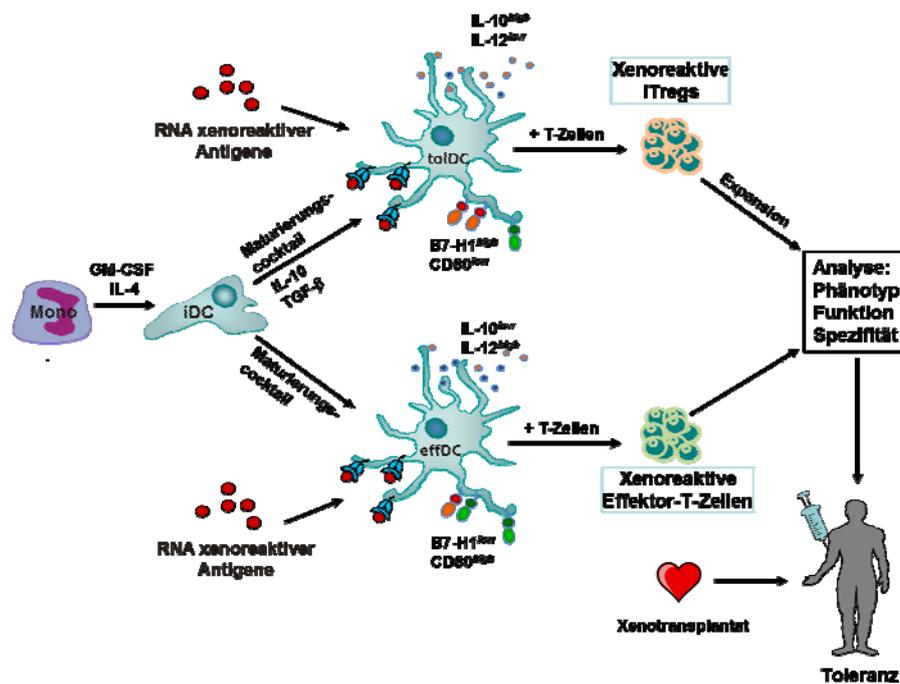
<sup>15</sup> Walter S, Weinschenk T, Stenzl A, Zdrojowy R, Pluzanska A, Szczylik C, Staehler M, Brugger W, Dietrich P-Y, Hilf N, Schoor O, Fritsche J, Mahr A, Mendrzyk R, Maurer D, Vass V, Trautwein C, Lewandrowski P, Flohr C, **Pohla H**, Stanczak JJ, Bronte V, Mandruzzato S, Biedermann T, Pawelec G, Derhovanessian E, Yamagishi H, Tsuneharu M, Hongo F, Takaha N, Hirakawa K, Tanaka H, Stevanovic S, Rammensee H-G, Frisch J, Mayer-Mokler A, Kirner A, Reinhard C, Singh-Jasuja H. Prolonged survival of patients with advanced renal cancer responding to multi-peptide vaccine IMA901 after single-dose cyclophosphamide. *Nat Med*, Jul 29. doi: 10.1038/nm.2883 (2012). **IF 22.462**

kontrollieren. So kann eine Depletierung der Zellen oder die Dysfunktion zwar zur Entstehung oder Aufrechterhaltung von Autoimmunerkrankungen oder Allergien führen, aber 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 versuchen wir derzeit aufzuklären. Treg, nachteilig in der Tumorummunologie, sind beispielsweise in der Transplantationsimmunologie zur Blockade der Gewebeabstoßung durchaus erwünscht.

In Deutschland warten derzeit etwa 12.000 Patienten auf ein Spenderorgan. Nur 4.700 Transplantationen können pro Jahr durchgeführt werden. 20% der Patienten sterben auf der Warteliste. Eine Alternative, an der derzeit intensiv geforscht wird, ist die Xenotransplantation, wobei hier das Schwein in Frage kommt. Um die Abstoßung der Xenotransplantate zu verhindern, kommen u. a. neben den Immunsuppressiva, der adoptive Transfer von Treg in Betracht sowie die Verwendung von Organen und Zellen aus multitransgenen Schweinen. Als Transgene werden hier humane Gene verwendet, die z. B. das Gefäßsystem schützen oder das Komplement regulieren.

Im vergangenen Jahr wurden Methoden zur Isolierung, Anreicherung und Expansion humaner und nicht-humaner Primaten nTreg aus Blut und Lymphknoten etabliert. Die Expansion erfolgt auf CD3/CD28-beschichteten Mikrotiterplatten oder MACSiBeads (Miltenyi) unter Zugabe von hohen Dosen IL-2 und 1 nM Rapamycin. Ebenso wurde die Generierung von zwei verschiedenen DC-Zellpopulationen etabliert. Zum einen sog. tolerogene DC (tolDC), die zur Herstellung xenoreaktiver Treg dienen, zum anderen normale DC zur Herstellung xenoreaktiver Effektor-T-Zellen. Hierzu werden zunächst unreife DC (iDC) aus Monozyten unter Zugabe von GM-CSF und IL-4 generiert, die man dann unter Zugabe eines komplexen Maturierungscocktails reifen lässt (siehe Abbildung). Für tolDC werden IL-10 und TGF- $\beta$  (+ GM-CSF, IL-4, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , PGE<sub>2</sub>, IL-6) zugegeben, für Effektor-DC (effDC) GM-CSF, IL-4, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , PGE<sub>2</sub>, IFN- $\gamma$  und Resiquimod (R848, Toll-like Rezeptor 7/8 Agonist). Anschließend werden die DC mit xenospezifischer *ivt*-RNA über Elektroporation beladen. Die so generierten tolerogenen DC, die zur Herstellung der xenoreaktiven iTreg dienen, sind dadurch charakterisiert, dass sie kaum IL-12 aber viel IL-10 sezernieren und verstärkt negativ-kostimulatorische Moleküle wie z. B. B7-H1 und B7-DC exprimieren (siehe Abbildung).

Die *In-vivo*-Funktion der xenoreaktiven Treg soll zukünftig in zwei Transplantationsmodellen getestet werden: (1) bei der Transplantation von multitransgenen Schweineherzen in Paviane und (2) bei der Transplantation von Inselzellen, ebenfalls aus multitransgenen Schweinen, in humanisierte NOD/SCID-Mäuse. Für die Herstellung der humanisierten NOD/SCID-Mäuse werden CD34<sup>+</sup>-Zellen aus Nabelschnurblut angereichert.



Schema zur Herstellung und Testung xenoreaktiver Treg für den adoptiven Transfer.

Ferner werden derzeit Blutproben von Pavianen vor und nach Xenotransplantation für ein Immunmonitoring gesammelt.

Ein wichtiger Punkt für die weitere Forschung ist die Analyse der Stabilität der Treg-Suppressorfunktion. Die Erkenntnisse hieraus sollen dann sowohl dem Tumor- als auch dem Transplantations-immunologischen Projekt zugutekommen.

### 3.2.3 Weiterentwicklung des Immunmonitorings

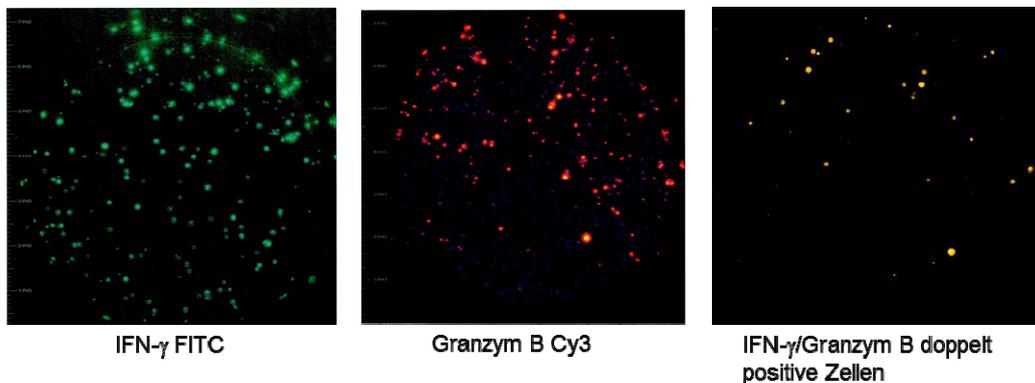
*Heike Pohla, Birgit Stadlbauer*

*Kooperation: Dolores J. Schendel, Judith Eckl (Institut für Molekulare Immunologie, Helmholtz Zentrum München), Tanja Bauer (Institut für Virologie, TUM)*

*(<http://www.helmholtz-muenchen.de/immunmonitoring/startseite/index.html>)*

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* und die Luminex-Technologie 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<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Tumorspezifischer 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, die quantitative TCR-Analyse mittels *Real-time*-RT-PCR sowie die Frequenzbestimmung von nTreg und MDSCs. Die AG H. Pohla ist auch hier weiterhin in die Immunmonitoring-Plattform des Helmholtz-Zentrums München eingebunden und hat an mehreren internationalen Ringversuchen des *Cancer Immunotherapy Consortiums* (CIC) des *Cancer Research Institutes*, New York und der *Monitoring Working Group* der *Association for Cancer Immunotherapy* zur Standardisierung der Immunmonitoring-Technologien erfolgreich teilgenommen (Einsatz serumfreien Mediums und unterschiedlicher Einfriermedien beim ELISPOT, Panel zur *Gating*-Strategie bei intrazellulären FACS-Analysen, Einsatz Qdot-konjugierter Multimere, Luminex-Technologie). Geplant ist im nächsten Jahr ein Panel zur standardisierten Auswertung von ELISPOTs. Im Helmholtz-Zentrum wurde ein neuer Reader (C.T.L. Series 5 UV Core ELISPOT Analyzer) angeschafft, der eine automatische Spoterkennung, Auto-Gating und Qualitätskontrolle erlaubt. Auswertungen auf diesem Reader wurden etabliert. Die Ergebnisse zeigten, dass es hier besser möglich ist falsch positive Spots auszuschließen. Außerdem wurde erstmalig ein Fluorospot etabliert, der es erlaubt z. B. gleichzeitig zwei Zytokine oder zytotoxische Moleküle auf Einzelzellebene zu detektieren (siehe Abbildung).



Detektion IFN- $\gamma$  und Granzym B positiver Zellen im Fluorospot.

### 3.2.4 Rolle von Mitgliedern der CEA-Familie in Gesunden und bei malignen Prozessen

#### ***Ist CEACAM20 durch seine Anti-Adhäsionsfunktion an Tumorprogression beteiligt?***

*Rainer Riesenberg, Andreas Eisenried, Michaela Paptistella, Carina Hoffmann, Birgit Stadlbauer, Wolfgang Zimmermann*

*Kooperation: John Shively (City of Hope, Duarte, CA)*

*Förderung: Graduiertenförderung der Medizinischen Fakultät*

Das von uns entdeckte Mitglied der *carcinoembryonic antigen* (CEA)-Familie *CEACAM20* wird sehr selektiv in Enterozyten des Dünndarms und in Sertolizellen des Hodens exprimiert. Interessanterweise findet man *CEACAM20* *de novo* exprimiert auch in Epithelzellen der Prostata bei benigner Prostatahyperplasie und in Magenkarzinomen. *CEACAM20* stellt eines der wenigen epithelial exprimierten Proteine dar, das ein so genanntes ITAM (*immunoreceptor tyrosin-based activation motif*) enthält. Von anderen Gruppen konnte gezeigt werden, dass Überexpression von Proteinen mit solchen Motiven zu maligner Transformation führen kann. Bei

bestimmten Retroviren und dem Epstein-Barr-Virus finden sich virale Proteine mit ITAM-Motiven, die eine wichtige Rolle bei der Transformation von normalen Epithelzellen durch diese Viren spielen.

Aufgrund dieser Befunde postulierten wir, dass CEACAM20-Neuexpression in epithelialen Zellen bei der Tumorentstehung beteiligt sein könnte. Um den Einfluss von CEACAM20 auf Zellwachstum und invasivem Verhalten untersuchen zu können, stellten wir durch stabile Transfektion HEK293T-Zellen her, die konditional nach Zugabe von Doxycyclin CEACAM20 exprimierten. Unerwarteterweise zeigten die Zellen mit und ohne CEACAM20 identisches Wachstumsverhalten, jedoch lösten sich die Zellen nach CEACAM20-Induktion innerhalb weniger Stunden vom Zellkultursubstrat ab. Mutation des ITAM-Motivs oder die Entfernung der gesamten zytoplasmatischen Domäne hatte keinen Einfluss auf den durch Überexpression ausgelösten CEACAM20-Phänotyp.

Diese Befunde legen nahe, dass CEACAM20 Zell-Zell- oder Zell-Matrix-Interaktionen schwächt. Um dies zu überprüfen, exprimierten wir Glykosylphosphatidylinositol (GPI) verankertes CEACAM16 (ein weiteres Mitglied der CEA-Familie) durch transiente Transfektion, was zu ausgeprägter Zell-Zelladhäsion führt, und induzierten wenige Stunden später die Expression von CEACAM20 durch Doxycyclin. In der Tat beobachteten wir, dass die normalerweise durch CEACAM16-Expression vermittelte Adhäsion durch CEACAM20 unterbunden wird. Falls CEACAM20 diese Eigenschaft auch bei Expression in Tumoren zeigt, könnte CEACAM20 das Herauslösen von Tumorzellen aus dem Gewebeverband fördern und so zum Invasiven Wachstum von Tumorzellen beitragen. Diese Befunde werden nun an einem physiologisch koexprimierten, ebenfalls zur CEACAM-Familie gehörenden Zelladhäsionsmolekül (CEACAM1) überprüft.

Eine Förderung der Zellmobilität wird jedoch auch bei normalen Entwicklungsvorgängen benötigt. Die Bildung von Acini und Röhren durch Epithelzellen im Drüsengewebe der Prostata ist ein dynamischer Prozess, der durch intensive Zellbewegungen und Wanderungen begleitet wird und *in vitro* im 3D-Matrigel-Modell beobachtbar ist. Die Gruppe von J. Shively konnte in Zusammenarbeit mit uns zeigen, dass CEACAM20 an der *In-vitro*-Lumenbildung von Prostataepithelzellen beteiligt ist. Eine Herunterregulation von CEACAM20, wie im Prostatakarzinom beobachtet, führte zum Verlust der Acini- und Röhrenbildung in dem *In-vitro*-Modell. Da im Prostatakarzinom oft ein Verlust der CEACAM20-Expression beobachtet wird, könnte dies die häufig verminderte epitheliale Lumenbildung im Prostatakarzinom erklären. Eine Publikation zu diesem Thema ist in *PLOS ONE* erschienen<sup>16</sup>.

---

<sup>16</sup> Zhang H, Eisenried A, Zimmermann W, Shively J. Role of CEACAM1 and CEACAM20 in an in vitro model of prostate morphogenesis. *PLOS ONE*, 8(1):e53359 (2013). **IF 4.092**

## **Das Tektorialmembranprotein CEACAM16 ist an der Erweiterung des Hörspektrums in Säugern beteiligt**

Rainer Riesenberg, Constanze Hörner, Birgit Stadlbauer, Wolfgang Zimmermann; Förderung: Graduiertenförderung der Medizinischen Fakultät

Kooperation: Andreas Breß, Lukas Rüttiger (Uni Tübingen); Robert Kammerer, (Friedrich-Löffler Institut, Greifswald); Heinrich Schrewe (MPI für Molekulare Genetik, Berlin); Marlon Schneider (Genzentrum); Martin Hennenberg (Experimentelle Urologie)

Förderung: Graduiertenförderung der Medizinischen Fakultät

Viele Mitglieder der CEA-Familie sind an der Entstehung und Progression von Tumoren aktiv beteiligt. Das von uns entdeckte Säuger-spezifische CEACAM16 dagegen zeigt ein extrem enges Expressionsspektrum: es wird praktisch ausschließlich in der Tektorialmembran, einem essentiellen Teil des für das Hören wichtigen Cortiorgans der Hörschnecke (Cochlea) exprimiert. Um seine Bedeutung für das Hören zu untersuchen, haben wir in Zusammenarbeit mit M. Schneider (Genzentrum) Ceacam16 in der Maus durch homologe Rekombination inaktiviert. Hörteste zeigten (Zusammenarbeit L. Rüttiger), dass Ceacam16-knock-out-Mäuse Frequenzen unterhalb von 10 und oberhalb von 22 kHz schlechter wahrnehmen konnten. Dieser Phänotyp wird auch bei betroffenen Mitgliedern einer Familie (1070) beobachtet, die an einem nicht-syndromischen autosomal dominanten Hörverlust (DFNA4) leiden. Dieser Defekt kartiert in dem Bereich von Chromosom 19, in dem die CEA-Genfamilie des Menschen lokalisiert ist. Diese Tatsache, zusammen mit der cochleaspezifischen Expression von CEACAM16 veranlasste uns, CEACAM16 als Kandidatengen für DFNA4 zu postulieren. Kürzlich konnte eine amerikanische Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass die Betroffenen dieser Familie eine Mutation im CEACAM16-Gen tragen und somit unsere Vorhersage bestätigen. Wir fanden, dass CEACAM16 in der Maus 12-15 Tage nach Geburt (einem Zeitpunkt, wo das Gehör von Mäusen gerade erst voll entwickelt ist) in der Tektorialmembran vollständig abgeschieden worden ist. Gebildet wird das Protein in den Stützzellen der äußeren Haarzellen (so genannten Deiters-Zellen) und in den Interdentalzellen des Limbus, so dass das CEACAM16 von 2 unterschiedlichen Seiten in der azellulären Membran eingelagert wird. Außerdem konnten wir zeigen, dass CEACAM16 vermutlich die Elastizität der Tektorialmembran durch Bildung eines polymeren Komplexes mit  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tektorin, zwei weiteren Tektorialmembrankomponenten, erhöht und dadurch zur Frequenzerweiterung des Säugerhörens beiträgt. Die Ergebnisse wurden im Berichtszeitraum in *J. Biol. Chem.* publiziert<sup>17</sup>. In weiterführenden Versuchen sollen die für die Interaktion mit weiteren Komponenten des Polymerkomplexes verantwortlichen Domänen identifiziert werden.

---

<sup>17</sup> Kammerer R, Rüttiger L, Riesenberg R, Schäuble C, Krupar R, Kamp A, Sunami K, Eisenried A, Hennenberg M, Grunert F, Breß A, Battaglia S, Schrewe H, Knipper M, Schneider MR, Zimmermann W. Loss of the Mammal-Specific Tectorial Membrane Component CEA Cell Adhesion Molecule 16 (CEACAM16) Leads to Hearing Impairment at Low and High Frequencies. *J Biol Chem*, 287, 21584–21598 (2012). ). IF 4.773

## 3.3 Experimentelle Urologie

### 3.3.1 Projektgruppe Endocannabinoide

*Frank Strittmatter, Claudius Füllhase, Martin Hennenberg, Christian Gratzke*

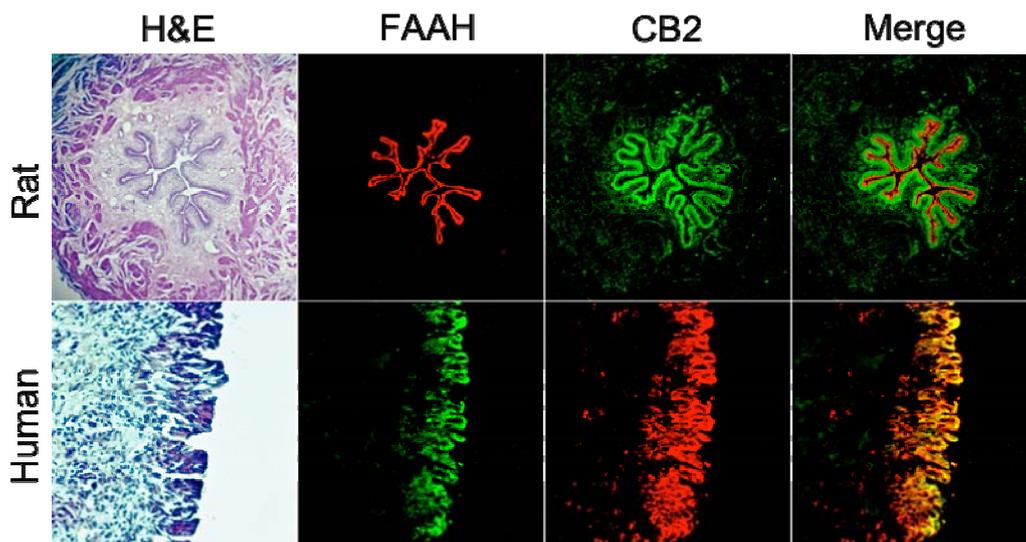
Die klinische Grundlage des vorgestellten Forschungsvorhabens basiert auf der Tatsache, dass Patienten mit einer Überaktiven Blase (*over active bladder*; OAB) und damit assoziierten Symptomen des unteren Harntraktes (LUTS) massiv in ihrer Lebensqualität eingeschränkt sind. Zusätzlich zeigen die im klinischen Alltag verschriebenen Standard-Medikamente wie Antimuskarinika häufig nicht die gewünschte Wirkung. Aus diesem Grund ist das Erforschen und Identifizieren neuer Therapieansätze zur Behandlung der OAB von höchstem wissenschaftlichem und demnach auch klinischem Interesse. Beispielsweise sind Patienten mit Multipler Sklerose (MS), bei denen wegen einer demyelinisierenden Läsion des Rückenmarks eine Überaktivität der Harnblase (Detrusorüberaktivität) mit zusätzlicher Dranginkontinenz vorliegen kann, sehr häufig therapierefraktär. Anhand klinischer Studien konnte gezeigt werden, dass es durch den Konsum von Cannabinoid-Extrakten zu einer deutlichen Verbesserung der Symptome kommt [1, 2]. Der genaue Wirkungsmechanismus war jedoch unbekannt und Anlass für vorherige Forschungsarbeiten unserer Arbeitsgruppe. Gratzke et al. konnten die Lokalisation der wohl bekanntesten Cannabinoid-Rezeptoren CB1 und CB2 im Bereich des unteren Harntraktes von Menschen, Affen und Ratten nachweisen [3]. Füllhase et al konnte die Präsenz dieser Rezeptoren in mehreren, für die neuronale Kontrolle der Miktions zuständigen, zentralnervösen Strukturen nachweisen [4]. Weiterhin wurde neben der Rezeptorlokalisierung auch gezeigt, inwieweit diese Rezeptoren an der Regulation des Tonus der Blasenmuskulatur beteiligt sind. Dies wurde nicht nur in vitro-, sondern auch in vivo-Versuchen durch die Verwendung spezifischer Antagonisten und Agonisten bewiesen. In urodynamischen Untersuchungen an Ratten zeigte sich z.B. eine Erhöhung des Miktionsintervalls, des Blasenschwellendruckes, der Blasenkapazität und des Blasenvolumens durch selektiv peripher wirksame CB2-Agonisten [3]. Aufbauend auf diesen Arbeiten wurde weiterhin die Wirkung des hoch-selektiven CB2-Rezeptor Agonisten Cannabinor an Ratten in urodynamischen Untersuchungen erforscht. Die intravenöse Applikation von Cannabinor in verschiedenen Dosierungen führte zu ähnlichen Effekten wie die Verwendung des hochpotenten CB1/CB2-Rezeptor-Agonisten CP 55,940. Durch diese Arbeit konnte der Beweis der Wirkung exogen-selektiver Cannabinoide in der Blasenfunktion erbracht werden [5, 6]. Dennoch scheint die Applikation exogener Cannabinoid-Derivate wegen ihrer potentiell negativen und unerwünschten zentralen Effekten limitiert.

Aus diesem Grund sieht unsere Arbeitsgruppe in dem körpereigenen Cannabinoid-System einen äußerst innovativen und neuen therapeutischen Ansatz zur Therapie der OAB.

Das endogene Cannabinoid-System besteht aus seinen Rezeptoren, seinen endogenen Liganden und Enzymen, welche für die Regulation der Biosynthese und den Abbau der endogenen Cannabinoide verantwortlich sind [7, 8]. Ein ganz entscheidendes Schlüsselenzym stellt die Fettsäureamid-Hydrolase (FAAH) dar, welche für den Abbau des endogenen Anandamides (Arachidonylethanolamid) und anderer Fettsäureamide verantwortlich ist [9]. Es ist bekannt, dass die FAAH sowohl zentral als auch peripher an einer Vielfalt von physiologischen Prozessen beteiligt ist.

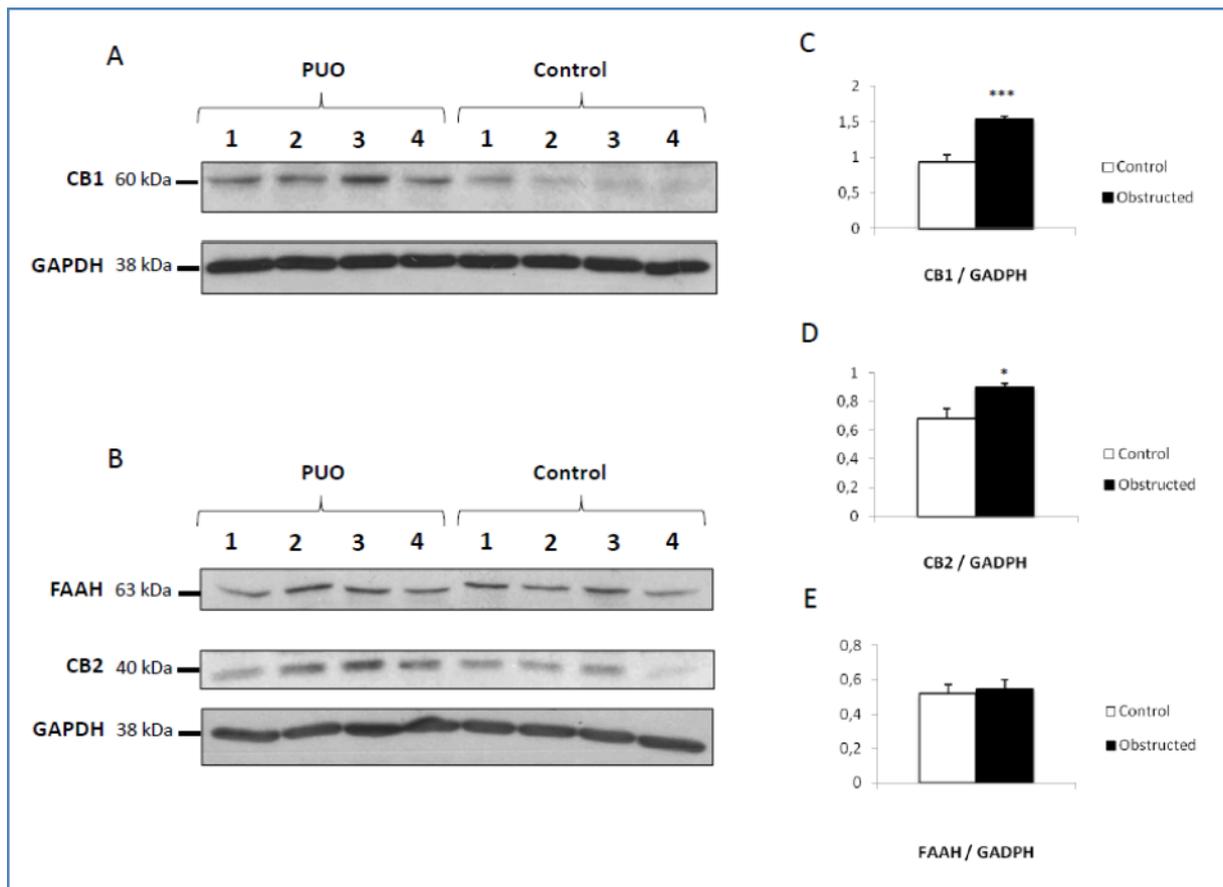
So konnte z.B. gezeigt werden, dass es durch die Inhibierung von FAAH durch spezifische FAAH-Inhibitoren wegen der Erhöhung endogener Cannabinoide zu einer reduzierten Schmerzwahrnehmung kommen kann [9]. Weiterhin konnte durch die FAAH-Inhibierung eine Stress induzierte Schmerzwahrnehmung und eine Hyperreflexie nach inflammatorischen- und neuropathischen-Verletzungen reduziert werden [10, 11]. Dies sind alles pathophysiologische Prozesse, welche in ihrer Pathogenese mit der Pathogenese der OAB verwandt sind [12].

Inwieweit jedoch die Inhibierung der FAAH einen Einfluss auf die Miktions hat, wurde bis dato noch nicht untersucht und war Anlass unserer Arbeitsgruppe, sowohl in vivo-Versuche an Ratten als auch in vitro-Versuche an humanem Blasengewebe sowie an Ratten- und Mäuse-Blasengewebe durchzuführen [13]. Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass die FAAH-mRNA durch PCR-Analyse als auch das FAAH-Protein selber mit Hilfe von Western-blot-Analysen im Urothel der Harnblase von Mäusen, Ratten und Menschen nachgewiesen werden können. Immunohistochemische Untersuchungen zeigten eine deutliche Kolokalisation von FAAH und CB2-Rezeptoren im Urothel (siehe Abbildung 3.3.1). Füllhase und Hennenberg zeigten mittels *Western blot* und Immunhistochemie das Vorhandensein der CB-Rezeptoren sowie FAAH-Enzyms im spinalen Miktionszentrum einem miktionsrelevanten Abschnitt des Rückenmarks (Abbildung 3.3.2).

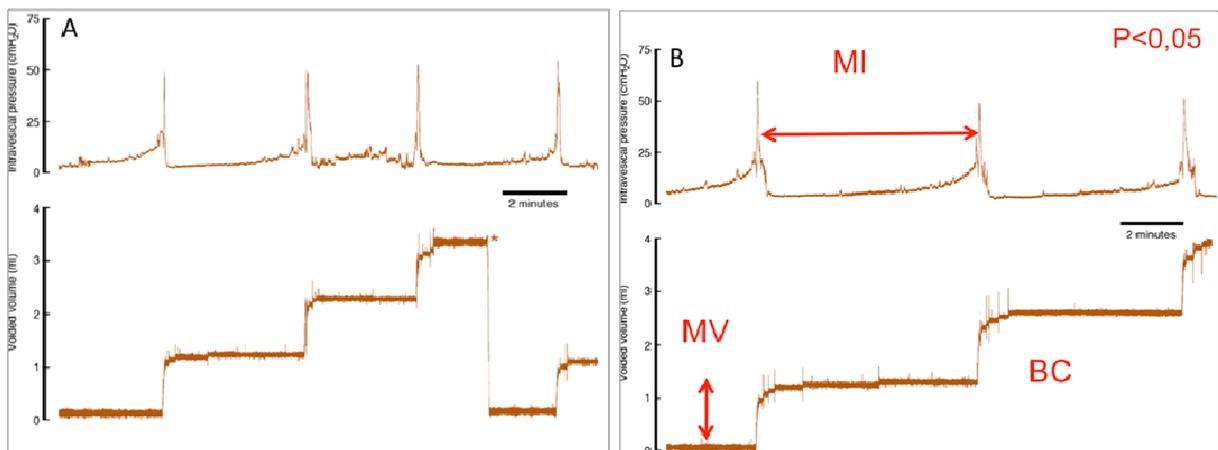


**Abb. 3.3.1: Kolokalisation von Fettsäureamid-Hydrolase (FAAH) und Cannabinoidrezeptor CB2 in Blasenurothel.** Gezeigt ist exemplarisch eine histologische und immunohistochemische Untersuchung einer Rattenblase und Blase eines Menschen mit deutlicher Kolokalisation von FAAH und dem CB2-Rezeptor.

Mit Hilfe des FAAH-Inhibitors Oleoylethanolamide (OEtA) wurden durch intravenöse und intravesikale Infusion, Miktionsparameter wie das Miktionsintervall (MI), das Miktionsvolumen (MV), der Schwellendruck (TP) als auch die Blasenkapazität (BC) signifikant im Vergleich zur Vehikelgruppe beeinflusst. Dies sind Parameter, welche dem sensorisch, afferenten Schenkel des Miktionszyklus zugeordnet werden. Diese Ergebnisse stimmen mit den Ergebnissen durch exogene Applikation von Cannabinoid-Derivaten von Gratzke et al. überein (siehe Abbildung 3.3.3).



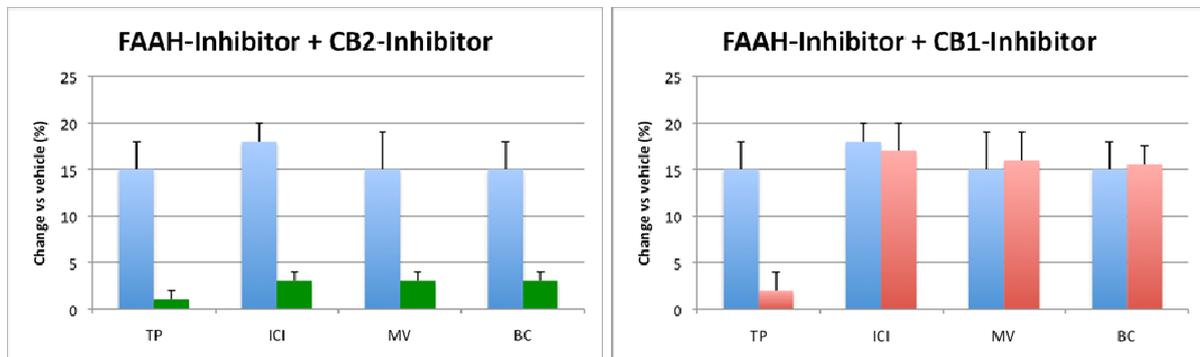
**Abb 3.3.2: Nachweis der Expression von CB-Rezeptoren und FAAH im spinalen Miktionszentrum.** (A, B) *Western-blot*-Banden für FAAH, CB1, CB2, und GAPDH im sakralen Rückenmark von normalen und obstruierten Ratten (PUO). Signalquantifizierung (in Relation zu GAPDH) für CB1 (C), CB2 (D), und FAAH (E) in normalen und obstruierten Tieren, \* =  $p < 0.05$ , \*\*\* =  $p < 0.001$  zwischen verschiedenen Gruppen (*Student's t test*).



**Abb. 3.3.3: Einfluss des FAAH-Inhibitors OEtA auf das Miktionsverhalten der Ratte.** Gezeigt ist exemplarisch die signifikante Veränderung von Miktionsintervall (MI), Miktionsvolumen (MV) und des Schwellendrucks vor (A) und nach (B) intravenöser und intravesikaler Applikation des FAAH-Inhibitors während einer urodynamischen Untersuchung einer weiblichen Ratte.

Interessanterweise konnten durch die intravesikale Infusion eines potenten CB2-Rezeptor-Antagonisten, dem SR144528, eben diese signifikanten Veränderungen

komplett aufgehoben werden. Durch die intravesikale Applikation des CB1-Rezeptor-Antagonisten Rimonabant wurde nur die Veränderung des TP aufgehoben (siehe Abbildung 3.3.3).



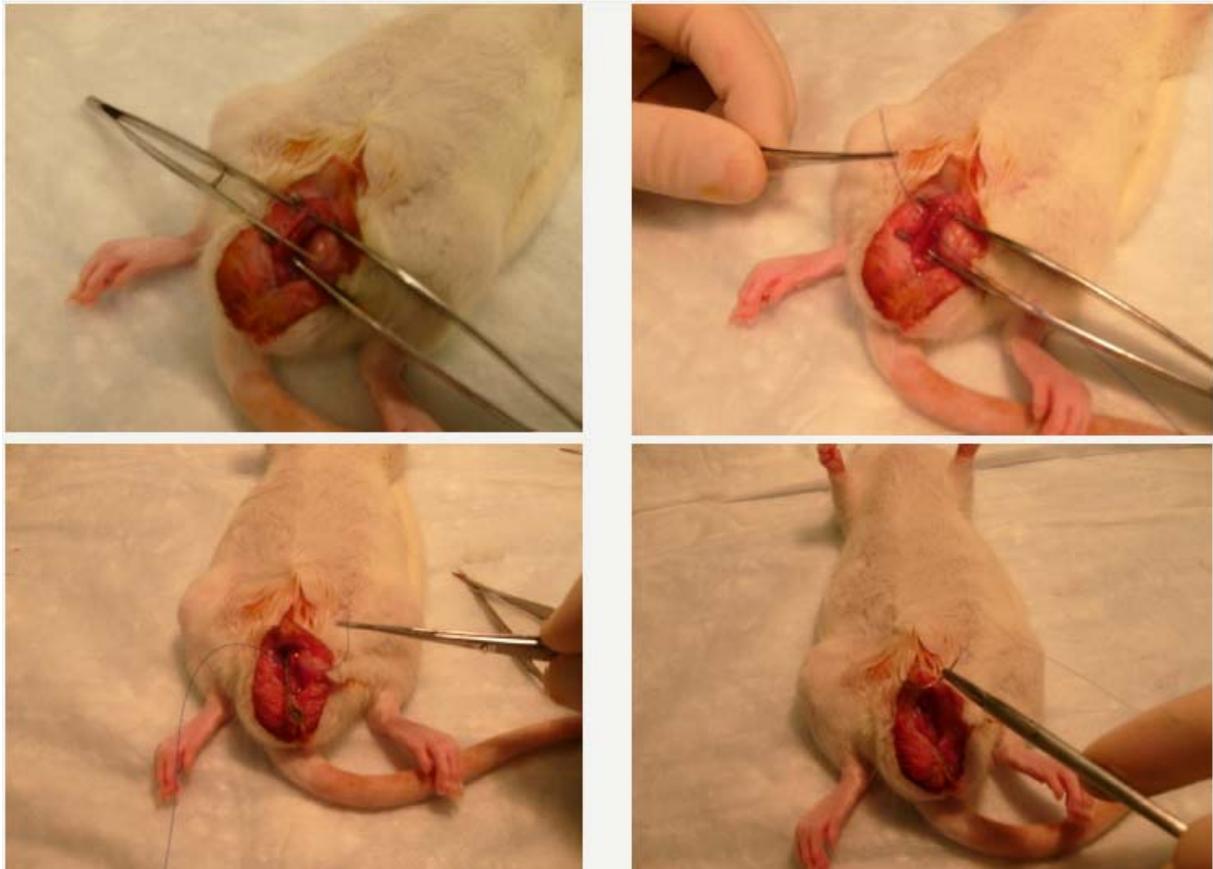
**Abb. 3.3.4: Einfluss von CB-Rezeptor-Blockade auf die Veränderung urodynamischer Parameter durch FAAH-Inhibition.** Gezeigt ist in der linken Abbildung die Aufhebung aller signifikanten Veränderungen durch CB2-Rezeptor-Blockade, welche durch die Inhibition der FAAH erzielt werden. Dagegen wird durch die Blockade der CB1-Rezeptoren nur der Schwellendruck (TP) beeinflusst.

Interessanterweise konnte der gleiche urodynamische Effekt, welcher mittels systemischer (i.v.) Applikation eines FAAH Inhibitors erreicht wurde, auch gezeigt werden wenn ein FAAH Inhibitor in einer geringsten Dosis (Faktor 1000 kleiner als i.v.) mittels Intrathekalkatheter direkt an das sakrale Rückenmark appliziert wurde, wo er lediglich direkt auf Nerven (nicht jedoch direkt auf den Blasenmuskel selbst) wirken kann [4].

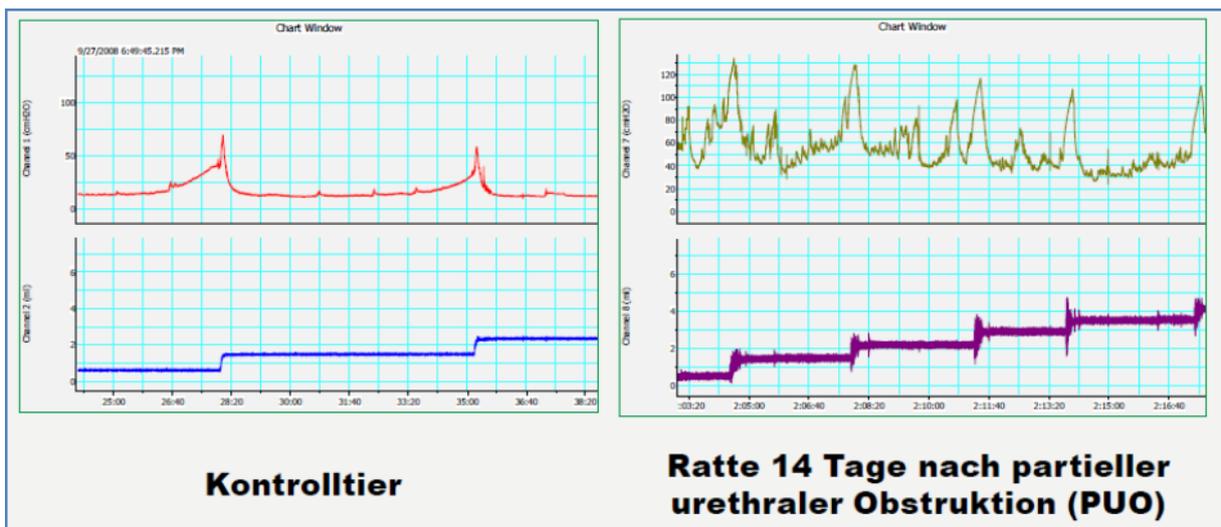
Durch chirurgisches teilweises Einengen der Harnröhre (partielle urethrale Obstruktion, PUO) (Abbildung 3.3.5) kann in Ratten eine Blasenüberaktivität induziert werden (Abbildung 3.3.6), welche als Modell der menschlichen Blasenüberaktivität bei gutartiger Prostatavergrößerung (benigne Prostatahyperplasie, BPH) dient.

Füllhase et al. konnte zeigen, dass der Effekt von FAAH-Inhibitoren bei Tieren mit obstruktionsbedingter Blasenüberaktivität deutlich ausgeprägter ist als bei nicht-obstruierten Tieren mit normaler Miktionszyklus (Tabelle 1).

Diese Ergebnisse zeigen, dass FAAH in der Blase und zentralnervösen Miktionszentren exprimiert wird. In der Blase von Mensch, Ratte und Maus zeigt sich eine deutliche Kollokalisation mit CB2-Rezeptoren. Durch sowohl intravenöse, intravesikale, als auch intrathekale Applikation des FAAH-Inhibitors OEtA lassen sich signifikant urodynamische Parameter beeinflussen, die sensorische afferente Parameter im Miktionszyklus darstellen. Die Effekte des FAAH-Inhibitors sind hierbei deutlich ausgeprägter wenn eine obstruktionsbedingte Blasenüberaktivität vorliegt. Dies legt zum einen eine Hochregulierung (und somit vermehrte Bedeutung) des Endocannabinoidsystems bei pathologischer Blasenfunktion nahe, und impliziert andererseits somit auch eine höhere Effizienz von FAAH-Inhibition bei eben diesen Krankheitsszenarien (BPH), was therapeutisch als Vorteil zu sehen wäre (geringerer Effekt bei Gesunden und stärker ausgeprägter Effekt bei Erkrankten).



**Abb. 3.3.5: Chirurgisches partielles Einengen der Harnröhre (PUO).** Wichtige Schritte des Operationsverlaufs sind von links oben nach rechts unten gezeigt: Darstellung der Harnröhre auf den Schwellkörpern über perinealen Schnitt, Unterfahrung der isolierten Harnröhre mittels nicht-resorbierbarem Faden, Knoten des Fadens und somit Schließen einer Schlaufe um die Harnröhre und einem passager eingebrachten Mandrin, Hautnaht (nach Mandrinentfernung).



**Abb. 3.3.6: Messung der Blasenaktivität in einem Rattenmodell für Blasenüberaktivität.** Das Modell der menschlichen Blasenüberaktivität bei gutartiger Prostatavergrößerung (benigne Prostatahyperplasie, BPH) wird durch partielle Ligatur der Harnröhre der Ratte generiert. Repräsentative 15-minütige urodynamische Aufzeichnungen eines normalen Kontrolltieres (links) sowie eines obstruierten Versuchstieres (rechts) sind gezeigt. Intravesikaler Druck (obere Kurve), synchron hierzu aufgezeichnete Miktionsvolumina (untere Kurve).

**Tab. 1: Einfluss von FAAH-Inhibitoren auf urodynamische Parameter bei Tieren mit obstruktionsbedingter Blasenüberaktivität.** Ausgewählte urodynamische Parameter vor und nach Applikation eines FAAH-Inhibitors (FAAH-I) in normalen Kontrolltieren und obstruierten Versuchstieren; \* =  $p < 0,05$  im Vergleich 'vor vs. nach' FAAH-I Applikation (*paired Student's t test*).

	<b>Miktionsintervall</b> Zeit zwischen zwei Miktionen (ml)	<b>Miktionsvolumen</b> (ml)	<b>Schwellendruck</b> Blasendruck zu Beginn der Miktion (cm H <sub>2</sub> O)	<b>Maximaler Druck</b> Blasendruck während der Miktion (cm H <sub>2</sub> O)
normale Ratten vor FAAH-I	6.8 ±0.5	1.07 ±0.07	22.0 ±2.2	70.1 ±8.7
normale Ratten nach FAAH-I	<b>7.7. ±0.4 *</b>	<b>1.19 ±0.05 *</b>	26.1 ±4.5	75.8 ±6.3
obstruierte Ratten vor FAAH-I	4.2 ±0.5	1.37 ±0.11	63.1 ±8.8	134.7 ±24.4
obstruierte Ratten nach FAAH-I	<b>5.2 ±0.7 *</b>	<b>1.68 ±0.10 *</b>	<b>52.2 ±9.1 *</b>	<b>117.0 ±24.7 *</b>

Die durch FAAH-Inhibierung durch OEtA erzielten Effekte lassen sich durch eine intravesikale Applikation eines CB2-Rezeptor-Blockers vollständig und durch einen CB1-Rezeptor-Blocker nur vereinzelt aufheben. Diese gewonnenen Ergebnisse zeigen erstmalig eine mögliche Rolle des endogenen Cannabinoid-Systems im Bereich der mechanoafferenten Blasenfunktion der Ratte.

Diese Ergebnisse stimmen mit den Untersuchungen zur chronischen FAAH-Inhibierung (siehe Leistungsbericht 2011) und deren positiven Effekt auf urodynamische Parameter der normalen Blasenfunktion und der überaktiven Blase überein.

## Literatur

1. Freeman, R.M., et al., The effect of cannabis on urge incontinence in patients with multiple sclerosis: a multicentre, randomised placebo-controlled trial (CAMS-LUTS). *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct*, 2006. 17(6): p. 636-41.
2. Brady, C.M., et al., An open-label pilot study of cannabis-based extracts for bladder dysfunction in advanced multiple sclerosis. *Mult Scler*, 2004. 10(4): p. 425-33.
3. Gratzke, C., et al., Distribution and function of cannabinoid receptors 1 and 2 in the rat, monkey and human bladder. *J Urol*, 2009. 181(4): p. 1939-48.
4. Fullhase, C., et al., Spinal Cord FAAH in Normal Micturition Control and Bladder Overactivity in Awake Rats. *J Urol*, 2012. pii: S0022-5347(12)05797-7.
5. Gratzke, C., et al., Effects of cannabimor, a novel selective cannabinoid 2 receptor agonist, on bladder function in normal rats. *Eur Urol*, 2010. 57(6): p. 1093-100.
6. Gratzke, C., et al., Cannabimor, a selective cannabinoid-2 receptor agonist, improves bladder emptying in rats with partial urethral obstruction. *J Urol*, 2011. 185(2): p. 731-6.
7. Pertwee, R.G., et al., International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXIX. Cannabinoid receptors and their ligands: beyond CB and CB. *Pharmacol Rev*, 2010. 62(4): p. 588-631.
8. Russo, R., et al., The fatty acid amide hydrolase inhibitor URB597 (cyclohexylcarbamic acid 3'-carbamoylbiphenyl-3-yl ester) reduces neuropathic pain after oral administration in mice. *J Pharmacol Exp Ther*, 2007. 322(1): p. 236-42.
9. Cravatt, B.F., et al., Supersensitivity to anandamide and enhanced endogenous cannabinoid signaling in mice lacking fatty acid amide hydrolase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. 98(16): p. 9371-6.

10. Cravatt, B.F., et al., Functional disassociation of the central and peripheral fatty acid amide signaling systems. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. 101(29): p. 10821-6.
11. Daniels, L.K., Rapid in-office and in-vivo desensitization of an injection phobia utilizing hypnosis. *Am J Clin Hypn*, 1976. 18(3): p. 200-3.
12. Andersson, K.E. and A.J. Wein, Pharmacology of the lower urinary tract: basis for current and future treatments of urinary incontinence. *Pharmacol Rev*, 2004. 56(4): p. 581-631.
13. Strittmatter, F., et al., Expression of fatty acid amide hydrolase (FAAH) in human, mouse, and rat urinary bladder and effects of FAAH inhibition on bladder function in awake rats. *Eur Urol*, 2012. 61(1): p. 98-106.

### 3.3.2 Projektgruppe „glattmuskuläre Kontraktion und $\alpha_1$ -adrenerge Funktion im unteren Harntrakt“

*Martin Hennenberg, Frank Strittmatter, Sebastian Walther, Andrea Schreiber, Beata Rutz, Christian Gratzke*

Bei Patienten mit benignem Prostata-Syndrom (BPS) führen Wachstum und Vergrößerung der Prostata, sowie ein erhöhter glattmuskulärer Tonus in der Prostata häufig zu Miktionsbeschwerden. Der glattmuskuläre Tonus in der Prostata wird in erheblichem Ausmaß durch die  $\alpha_1$ -adrenerge Kontraktion reguliert. Prostata-Wachstum und prostatistische  $\alpha_1$ -Adrenozeptoren sind daher die wichtigsten Angriffspunkte für die pharmakologische Therapie von Symptomen des unteren Harntraktes (*lower urinary tract symptoms*, LUTS) bei Patienten mit benigner Prostata-Hyperplasie. Durch die Behandlung mit alpha1-Blockern kommt es zu einer Erschlaffung der glatten Prostata-Muskulatur, und dadurch zu einer Verbesserung von Harnfluss und Symptomen. Aufgrund der hohen Inzidenz dieser Symptome und der Bedeutung des  $\alpha_1$ -Adrenozeptors für die LUTS-Therapie sind Funktion und Regulation des prostatistischen  $\alpha_1$ -Adrenozeptors von größtem Interesse.

Obwohl Prostata-Wachstum und der erhöhte alpha1-adrenerge Tonus zusammen auftreten und gemeinsam zu Miktionsbeschwerden führen, sind mögliche Zusammenhänge zwischen beiden Faktoren nahezu unbekannt. Ergebnisse aus Teilprojekten der Arbeitsgruppe sowie anderen Gruppen unterstützen die Vermutung, dass zwischen beiden Faktoren Zusammenhänge bestehen könnten. Untersuchungen der berichtenden Arbeitsgruppe zeigen, dass die bisherigen Modelle des prostatistischen  $\alpha_1$ -Adrenozeptors nicht ausreichen, um dessen tatsächliche Regulation und Funktion zu beschreiben. Während die Expression und Subtyp-Verteilung prostatistischer alpha1-Adrenozeptoren in der Vergangenheit Gegenstand zahlreicher Untersuchungen war, sind die posttranslationalen Regulation und intrazelluläre Signalgebung dieses Rezeptors bislang nur unzureichend verstanden. In verschiedenen Teilprojekten sollen daher neue Regulations- und Funktions-Prinzipien prostatistischer  $\alpha_1$ -Adrenozeptoren identifiziert werden.

Die aktuellen medikamentösen Therapien ( $\alpha_1$ -Blocker, Steroid-5 $\alpha$ -Reduktase-Inhibitoren) führen zwar zu einer spür- und messbaren Verbesserung der Symptome. Jedoch kann weder durch Mono- noch durch Kombinations-Therapien eine vollständige Verminderung der Beschwerden erreicht werden. Hinzu kommt, dass der Anteil von Placebo-Effekten am Benefit dieser Therapien beträchtlich ist. Je nach Studie konnte eine 30-50%ige Verbesserung der Symptome durch  $\alpha_1$ -Blocker bzw. Kombinations-Therapien beobachtet werden, während Placebos zu einer 20-40%igen Verbesserung führten. Auf Grund der limitierten Effekte wären alternative, bessere Optionen wünschenswert. Neue Strategien, die in experimentellen Modellen die Kontraktion der glatten Prostata-Muskulatur hemmen,

können im Idealfall die Grundlage für zukünftige Therapien darstellen und sind daher von großem Interesse.

### **Teilprojekt 1: Akzessorische Interaktionspartner des $\alpha_1$ -Adrenozeptors in der humanen Prostata**

Die Regulation des  $\alpha_1$ -Adrenozeptors in der Prostata wurde auf Expressionsebene eingehend untersucht. Verschiedene Faktoren und Bedingungen, wie Alter, hyperplastische Umbildungen, oder medikamentöse Therapien führen in der Prostata zu Änderungen der  $\alpha_1$ -Adrenozeptor-Expression. Über die Expression hinaus können G-Protein-gekoppelte Rezeptoren jedoch auch stark durch eine posttranslationale Expression reguliert werden. Diese erfolgt durch die Bindung verschiedener Proteine, sog. akzessorischer Bindungspartner, an die Rezeptoren.

Eine solche posttranslationale Regulation des prostatistischen  $\alpha_1$ -Adrenozeptors wurde erstmals 2011 in Betracht gezogen, als die Arbeitsgruppe die Interaktion von  $\beta$ -Arrestin-2 und GRK2-vermittelte Phosphorylierung von Adrenozeptoren beschrieb (Hennenberg et al, BJUI 2011; Hennenberg et al., WJU 2011). Ausgangspunkt ist oft eine Interaktion des Rezeptors mit der „G-Protein-gekoppelten Rezeptor-Kinase 2“ (GRK2) und  $\beta$ -Arrestin-2. In Folge der Rezeptor-Aktivierung kommt es zunächst zu einer Aktivierung der GRK2, und so zu einer (homologen und/oder heterologen) Rezeptor-Phosphorylierung durch GRK2. Die Phosphorylierung ermöglicht die Bindung von  $\beta$ -Arrestin-2 an die Rezeptoren. Die Interaktion der Rezeptoren mit  $\beta$ -Arrestin-2 verhindert die Reassoziierung der Rezeptoren mit heterotrimeren G-Proteinen, bzw. führt zur Verdrängung der G-Proteine von ihren Rezeptoren. Folge ist eine Entkopplung der Rezeptoren von G-Proteinen, und daher eine Unterbrechung der G-Protein-abhängigen Signaltransduktion durch den Rezeptor, also eine massive Änderung von Rezeptor-Aktivität und -Funktion.

$\beta$ -Arrestin-2-gebundene Rezeptoren können entweder über Clathrin oder über Caveolin internalisiert werden. Diese Endozytose führt zur Lokalisation der Rezeptoren in zytosolischen Endosomen. Hier sind die Rezeptoren einer weiteren Aktivierung durch Agonisten entzogen, und können entweder zurück zur Membran gelangen, gebunden im Zytosol verbleiben, oder aber weiter zu Lysosomen transportiert und dort abgebaut werden. In jedem Fall kommt es aber zu einem Verlust der normalen, Agonisten-stimulierten Rezeptor-Antwort, und so zu Änderungen von Rezeptor-Aktivität und -Funktion. Bei diesen Prozessen kommt es anschließend an die Rekrutierung von  $\beta$ -Arrestin-2 zu einer Bindung von Dynamin-2 an den Rezeptor. Dies ist Voraussetzung für die weitere Internalisierung, die über Clathrin erfolgen kann. Clathrine binden direkt an den Rezeptor/ $\beta$ -Arrestin-2-Komplex. Bei der Clathrin-vermittelten Regulation kommt es zur Bildung von Multiprotein-Komplexen, die neben dem Rezeptor aus Clathrin *heavy chains* (HC), sowie den *light chains* A und B (LCA, LCB) bestehen. Durch die Bindung von Clathrin kommt es zur Interaktion des Multiprotein-Komplexes mit weiteren Partnern, insbesondere  $\beta$ -Adaptin. Die Clathrin/ $\beta$ -Adaptin-vermittelte Endozytose wird durch ARF6 reguliert.

In Untersuchungen durch die Arbeitsgruppe konnte über RT-PCR, Western-Blot-Analysen und immunohistochemische Färbungen die Expression von Clathrin HC, LCA, LCB, Caveolin-1, Dynamin-2,  $\beta$ -Adaptin, und ARF6 im humanen Prostata-Gewebe demonstriert werden. Doppelfluoreszenz-Färbungen mit  $\alpha_{1A}$ -Adrenozeptoren und *alpha-smooth muscle actin* ( $\alpha$ -SMA) zeigten das Vorkommen dieser Faktoren in glatten Muskelzellen. Zudem wurde die Expression aller Faktoren über

Peroxidase-Färbungen von Prostata-Schnitten bestätigt. Koimmunopräzipitations-experimente zeigten, dass ein Teil der prostatistischen  $\alpha_{1A}$ -Adrenozeptor-Population an Clathrin HC und LCB gebunden ist, jedoch nicht an Caveolin-1. Die Stimulation von Prostata-Gewebe mit Noradrenalin führte zu einer Rekrutierung von Clathrin LCA zum  $\alpha_{1A}$ -Adrenozeptor, was einer Vervollständigung des Clathrin-Komplexes am  $\alpha_{1A}$ -Adrenozeptor gleichkommt.

Zusammenfassend belegen diese Studien erstmalig eine posttranslationale Regulation des prostatistischen  $\alpha_1$ -Adrenozeptors durch eine Reihe von akzessorischen Bindungspartnern, und eine umfassende Interaktion des Rezeptors mit diesen Faktoren. Die Aktivierung des Rezeptors führt zu Änderungen der Rezeptor-Interaktion mit Bindungspartnern. Der prostatistische  $\alpha_1$ -Adrenozeptor ist nicht statisch an G-Proteine gekoppelt, sondern ein Rezeptor, der verschiedene Interaktions-Muster mit Bindungspartnern aufweisen kann.

Diese Ergebnisse wurden 2012 zur Publikation in der Zeitschrift „*The Prostate*“ angenommen<sup>18</sup>.

### **Teilprojekt 2: $\alpha_1$ -adrenerge Regulation der Transkriptionsfaktoren Elk1 und SRF in der humanen Prostata**

*Förderung: Recordati Pharma*

Der Transkriptions-Faktor Elk1 ist aus verschiedenen Zelltypen und Organen außerhalb des Urogenitaltraktes als Effektor des ERK1/2-Signalweges, bzw. als Regulator des Zellzyklus bekannt. Der *serum response factor* (SRF) ist dagegen insbesondere in glatten Muskelzellen von Bedeutung, wo er Phänotyp, Differenzierung und Proliferation reguliert. Während Elk1 durch eine Phosphorylierung aktiviert wird, erfordert die Aktivierung von SRF eine Interaktion mit dem Kofaktor Myokardin. Prinzipiell erfordern Prozesse wie Wachstum und Differenzierung, die bei der Prostata-Hyperplasie von Bedeutung sind, Änderungen der Transkriptionsaktivität, was wiederum über Transkriptionsfaktoren erfolgt. Da eine Rolle des  $\alpha_1$ -Adrenozeptors für das Wachstum der Prostata und die hyperplastischen Änderungen postuliert wurde, soll in diesem Teilprojekt die Regulation von der Transkriptionsfaktoren Elk1 und SRF durch  $\alpha_1$ -Adrenozeptoren in der humanen Prostata untersucht werden.

Über Western-Blot-Analysen mit einem phosphospezifischen Antikörper wurde die Phosphorylierung von Elk1 am Serin-383 untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Stimulation von Prostata-Gewebe mit Phenylephrin und Noradrenalin zu einer Zunahme der Elk1-Phosphorylierung führt. Folge dieser Phosphorylierung ist üblicherweise die Bindung von Elk1 an eine spezifische DNA-Sequenz in Promoter-Regionen von Elk1-regulierten Zielgenen. Zur Untersuchung dieser DNA-Bindung wurde im Labor der Arbeitsgruppe der *electromobility shift assay* (EMSA) etabliert, bei dem diese DNA-Bindung von Transkriptionsfaktoren mit Hilfe von Biotin-markierten DNA-Sonden simuliert und nachgewiesen werden kann. Diese Untersuchungen ergaben, dass die Stimulation von Prostata-Gewebe mit Noradrenalin tatsächlich die Bindung von Elk1 an solche DNA-Sequenzen auslöst. Solche Prozesse erfordern eine nukleäre Lokalisation von Elk1. Immunhistochemische

---

<sup>18</sup> **Hennenberg M**, Miersch J, Rutz B, Strittmatter F, Waidelich R, Stief CG, Gratzke C. Noradrenaline induces binding of clathrin light chain A to  $\alpha_1$ -adrenoceptors in the human prostate. *The Prostate*, 2013; 73(7):715-23. **IF 3.485**

Färbungen bestätigten, dass ein Teil der prostatistischen Elk1-Population in Zellkernen zu finden ist. Dies unterstützt die Vorstellung von einer Elk1-Aktivierung durch endogenes Noradrenalin.

In einem ähnlichen Ansatz konnte über EMSA die Aktivierung von SRF durch Noradrenalin in der humanen Prostata gezeigt werden. Die Expression von SRF und Myokardin wurde über RT-PCR und Western-Blot-Analysen in Prostata-Proben aller untersuchten Patienten nachgewiesen. Über immunohistochemische Färbungen konnte diese Expression stromalen Zellen zugeordnet werden. Doppel-Fluoreszenzfärbungen zeigten eine Kolo-kalisation von SRF und Myokardin, bzw. der beiden einzelnen Proteine mit  $\alpha_{1A}$ -Adrenozeptoren.

In weiteren Versuchen wurde der Effekt des  $\alpha_1$ -Adrenozeptor-Antagonisten Silodosin auf die Aktivierung von Elk1 und SRF untersucht. Silodosin wurde vor wenigen Jahren in verschiedenen EU-Ländern und den USA zur Behandlung von LUTS zugelassen. Die Applikation von Silodosin vor der Stimulation mit Noradrenalin führte zu einer Hemmung der Noradrenalin-induzierten Aktivierung von Elk1 und SRF.

Diese Ergebnisse zeigen erstmalig, dass die Funktionen des prostatistischen  $\alpha_1$ -Adrenozeptors neben der Kontraktion auch eine transkriptionelle Regulation umfassen. Die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren ist unbedingte Voraussetzung für Wachstums- und Differenzierungsprozesse. Daher könnten SRF und Elk1 wichtige Bindeglieder darstellen, welche den glattmuskulären Tonus mit dem Wachstum in der humanen Prostata verknüpfen. Die Ergebnisse mit Silodosin könnten auf Kontraktions-unabhängige Effekte hinweisen, die bei der LUTS-Therapie mit diesem  $\alpha_1$ -Blocker zum Benefit beitragen könnten.

Diese Ergebnisse wurden 2012 in der Zeitschrift „*PLoS One*“ publiziert<sup>19</sup>.

### ***Teilprojekt 3: Aktivierung der Akt/Proteinkinase B durch $\alpha_1$ -Adrenozeptoren in der humanen Prostata***

In diesem Teilprojekt wurde die adrenerge Aktivierung der Akt-Kinase (Synonym Proteinkinase B) in der humanen Prostata untersucht. Akt ist ein weit verbreiteter Mediator von Proliferation, Wachstum, und Differenzierung, und wird durch Phosphorylierungen aktiviert. Für die nicht-maligne Prostata fehlten bislang jedoch einschlägige Untersuchungen zur Expression und Funktion. Über quantitative RT-PCR, Western-Blot Analyse, und immunhistochemische Färbungen konnte nun erstmalig die Expression aller drei Akt-Isoformen in der glatten Muskulatur der humanen Prostata nachgewiesen werden. Durch Western-Blot-Analyse mit einem phosphospezifischen Antikörper konnte eine Noradrenalin- und Phenylephrin-induzierte Akt-Phosphorylierung am Serin-473 beobachtet werden, was eine Aktivierung der Akt reflektiert. Diese Aktivierung über Serin-473-Phosphorylierung konnte über einen ELISA bestätigt werden. Auf die Threonin-308-Phosphorylierung blieb die adrenerge Stimulation jedoch ohne Effekt. Dies legt nahe, dass über die adrenerge Regulation hinaus auch nicht-adrenerge Faktoren von Bedeutung für die Akt-Regulation sind. In myographischen Organbadmessungen wurde schließlich überprüft, ob Akt an der glattmuskulären Kontraktion beteiligt ist bzw. diese moduliert, was aus verschiedenen Typen glatter Muskulatur außerhalb des

---

<sup>19</sup> **Hennenberg M**, Strittmatter F, Beckmann C, Rutz B, Füllhase C, Waidelich R, Montorsi F, Hedlund P, Andersson KE, Stief CG, Gratzke C. Silodosin inhibits noradrenaline-activated transcription factors Elk1 and SRF in human prostate smooth muscle. *PLoS One* 2012; 7(11):e50904. **IF 4.092**

Urogenitaltraktes bekannt ist. Es wurden zwei verschiedene Akt-Inhibitoren getestet (FPA124, 10-DEBC), die jedoch ohne Effekt auf die Phenylephrin-, Noradrenalin- und EFS-induzierte Kontraktion des Prostatagewebes blieben.

Insgesamt zeigt dies, dass an den nicht-motorischen Funktionen prostatischer  $\alpha_1$ -Adrenozeptoren Akt-vermittelte Mechanismen beteiligt sind. Das Beispiel der fehlenden adrenergen Regulation des Threonin-308 verdeutlicht jedoch, dass Adrenozeptoren nicht der alleinige Regulator dieser Prozesse sind. Dies wiederum könnte den limitierten Effekt von  $\alpha_1$ -Blockern auf das Prostata-Volumen bei BPS-Patienten erklären, obwohl zahlreiche experimentelle Studien eine Beteiligung von  $\alpha_1$ -Adrenozeptoren an der Regulation des Prostata-Wachstums belegten. Vermutlich ist hierbei ein komplexes Zusammenspiel zwischen adrenerger Signalgebung, Wachstumsfaktoren, und Hormonen zu berücksichtigen.

Diese Ergebnisse wurden 2012 in der Zeitschrift „*Life Sciences*“ publiziert<sup>20</sup>.

#### **Teilprojekt 4: Caldesmon als neuer Effektor prostatischer $\alpha_1$ -Adrenozeptoren**

Caldesmon wurde aus verschiedenen Typen glatter Muskulatur außerhalb der Prostata als wichtiger Mediator und Regulator der Kontraktion beschrieben. Caldesmon unterstützt die Aktin-Polymerisation, also das Vorliegen von Aktin in filamentöser Form, sowie die Anheftung der Filamente an die Zellmembran. Beides sind essentielle Voraussetzungen für die Kontraktion. Untersuchungen zum Vorkommen von Caldesmon und seiner Regulation in der Prostata fehlten bislang jedoch. Über RT-PCR, Western-Blot-Analyse und immunhistochemische Färbungen konnte nun die Expression von Caldesmon in der glatten Muskulatur der humanen Prostata nachgewiesen werden. Über Doppel-Fluoreszenz-Färbungen wurde die Kolokalisation von Caldesmon mit *alpha smooth muscle actin* (Marker für glatte Muskelzellen) bzw.  $\alpha_{1A}$ -Adrenozeptoren gezeigt. Caldesmon wird unter anderem durch eine Phosphorylierung am Serin-789 aktiviert. Western-Blot-Analysen mit einem phosphospezifischen Antikörper ergaben, dass es bei der Stimulation von humanem Prostatagewebe mit Noradrenalin oder Phenylephrin zu einer Phosphorylierung von Caldesmon an dieser Stelle kommt. Dies legt nahe, dass Caldesmon einen bislang unbekanntem Effektor des prostatischen  $\alpha_1$ -Adrenozeptors darstellt, dessen Aktivierung an der adrenergen Kontraktion der glatten Prostata-Muskulatur beteiligt ist.

Diese Ergebnisse wurden 2012 in der Zeitschrift „*Urology*“ publiziert<sup>21</sup>.

#### **Teilprojekt 5: Hemmung der adrenergen Prostata-Kontraktion durch die JNK-Inhibitoren SP600125 und BI-78D3**

In diesem Teilprojekt wurden die Effekte von Inhibitoren der c-Jun N-terminalen Kinase (JNK), SP600125 und BI-78D3, sowie die adrenerge JNK-Aktivierung im humanen Prostata-Gewebe untersucht. Den bisherigen Vorstellungen entsprechend

---

<sup>20</sup> Strittmatter F, Walther S, Roosen A, Rutz B, Schlenker B, Limmer S, Waidelich R, Stief CG, Gratzke C, **Hennenberg M**. Activation of protein kinase B/Akt by alpha1-adrenoceptors in the human prostate. *Life Sciences* 2012;90(11-12):446-453. **IF 2.732**

<sup>21</sup> Walther S, Strittmatter F, Roosen A, Heinzer F, Rutz B, Stief CG, Gratzke C, **Hennenberg M**. Expression and alpha1-adrenoceptor regulation of caldesmon in human prostate smooth muscle. *Urology* 2012;79(3):745.e5-12. **IF 2.428**

erfolgt die adrenerge Kontraktion der glatten Prostatamuskulatur durch eine Aktivierung von  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Signalwegen, sowie der Rho-Kinase und Proteinkinase C (PKC). Die Ergebnisse des Teilprojektes zeigen, dass offenbar auch die Aktivierung der JNK als intrazellulärer Mediator von Bedeutung für die  $\alpha_1$ -adrenerge Kontraktion in der humanen Prostata ist.

Untersuchungen im Organbad zeigten, dass SP600125 und BI-78D3 zu einer deutlichen, signifikanten Hemmung der Kontraktion durch Noradrenalin, Phenylephrin, oder EFS führten. JNK wird durch eine Phosphorylierung aktiviert, die mit Hilfe von phosphospezifischen Antikörpern untersucht wurde. Dabei wurde eine Aktivierung der JNK nach Stimulation von Prostata-Geweben mit Noradrenalin und Phenylephrin beobachtet. Immunohistochemische Färbungen zeigten die Expression von JNK in stromalen Zellen. Über Doppel-Fluoreszenzfärbungen wurde die Kolokalisation von JNK mit *alpha smooth muscle actin* und dem  $\alpha_{1A}$ -Adrenozeptor gezeigt.

Diese Ergebnisse führen zu einem neuen Modell der  $\alpha_1$ -adrenergen Prostata-Kontraktion, und überdies zu einer neuen Strategie zur Hemmung der Prostata-Kontraktion. Solche Strategien können im Idealfall die Grundlage für neue LUTS-Therapien darstellen. Auch der Effekt bei der weitverbreiteten Therapie mit  $\alpha_1$ -Blockern ist auf eine Hemmung der Prostata-Kontraktion zurückzuführen. Die Hemmung der adrenergen Prostata-Kontraktion ist verantwortlich für die therapeutischen Effekte bei der Behandlung von LUTS-Patienten mit  $\alpha_1$ -Blockern. Daher sind neue Strategien zur Hemmung der adrenergen Prostata-Kontraktion von großem Interesse. JNK ist neben der hier vorgestellten Funktion für die glattmuskuläre Kontraktion ein überaus wichtiger Regulator des Zellzyklus in zahlreichen Zelltypen und Organen. Die Effekte einer JNK-Hemmung könnten daher denen von Zytostatika ähneln, deren Nebenwirkungen einschlägig bekannt sind und äußerst drastisch verlaufen. Das Verhältnis von unerwünschten Wirkungen zum Benefit dürfte bei der Anwendung von JNK-Inhibitoren zur LUTS-Therapie aller Voraussicht nach nicht zu vertreten sein.

Diese Ergebnisse wurden 2012 im „*British Journal of Pharmacology*“ publiziert<sup>22</sup>.

### **Teilprojekt 6: EPAC-Expression und -Regulation in der humanen Prostata**

Der *second messenger* cAMP führt in der glatten Muskulatur des unteren Harntraktes und außerhalb desselben zur Relaxation. Der klassischen Vorstellung entsprechend geschieht dies über eine cAMP-vermittelte Aktivierung der Proteinkinase A (PKA). In verschiedenen Studien der letzten Jahre wurde mit EPAC (*exchange proteins directly activated by cAMP*) ein weiterer cAMP-Effektor beschrieben, welcher PKA-unabhängige cAMP-Funktionen vermittelt. In der glatten Muskulatur der Atemwege lösen EPAC-Aktivatoren eine Relaxation aus. Über die motorischen Effekte hinaus kommt es durch cAMP bzw. EPAC in vielen Zelltypen zu einer Aktivierung von Transkriptionsfaktoren. Vorgänge wie Wachstum, Differenzierung und Proliferation, die bei der benignen Prostatahyperplasie von großer Bedeutung sind, erfordern Änderungen auf transkriptioneller Ebene. In der glatten Muskulatur des unteren Harntraktes wurde die Expression oder Funktion von

---

<sup>22</sup> Strittmatter F, Walther S, Gratzke C, Göttinger J, Beckmann C, Roosen A, Schlenker B, Hedlund P, Andersson KE, Stief CG, **Hennenberg M**. Inhibition of adrenergic human prostate smooth muscle contraction by the inhibitors of c-Jun N-terminal kinase, SP600125 and BI-78D3. *Br J Pharmacol* 2012;166(6):1926-1935. **IF 4.409**

EPAC bislang jedoch nicht untersucht. In diesem Teilprojekt wurden daher erste Untersuchungen zum Vorkommen und der Funktion von EPAC in der humanen Prostata vorgenommen.

Über quantitative RT-PCR und *Western-blot*-Analysen mit Isoform-spezifischen Antikörpern konnte die Expression von EPAC1 und EPAC2 in Prostata-Proben aller untersuchten Patienten nachgewiesen werden. Immunohistochemische Färbungen ergaben eine deutliche Immunreaktivität für beide Isoformen in stromalen Zellen. Im Organbad wurden die Effekte von zwei verschiedenen EPAC-Aktivatoren auf die Kontraktion von humanem Prostata-Gewebe untersucht. Sowohl 8-(4-Chlorophenylthio)-2'-O-methyladenosin-3',5'-zyklisches Monophosphat (Na-Salz) (OME) als auch 8-(4-Chlorophenylthio)-2'-O-methyladenosin-3',5'-zyklisches Monophosphorothioat SP-isomer (pCPT) führten zu einer signifikanten Hemmung der Kontraktion bei niedrigen Phenylephrin-Konzentrationen, jedoch nur wenn gleichzeitig eine Cyclooxygenase-Hemmung durch Indomethacin vorgenommen wurde. Ohne Indomethacin oder bei Kontraktion mit Noradrenalin anstatt Phenylephrin blieben beide EPAC-Aktivatoren ohne Effekt. Dies zeigt, dass EPAC eine Rolle für die cAMP-vermittelte Kontraktion der glatten Prostatamuskulatur spielen könnte, die jedoch bestenfalls von untergeordneter Rolle zu sein scheint. Offenbar wird der Beitrag der EPAC-vermittelten Relaxation in der humanen Prostata unter physiologischen Bedingungen von Cyclooxygenase- und  $\beta$ -Adrenozeptor-Aktivitäten überdeckt.

*Western-blot*-Analysen mit einem phosphospezifischen Antikörper zeigten, dass die Inkubation humaner Prostata-Gewebe mit OME oder pCPT zu einer Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors Elk1 führt. Diese Phosphorylierung von Elk1 führt zu einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors. Die OME- und pCPT-vermittelte Elk1-Aktivierung konnte über EMSA bestätigt werden. Folge der Elk1-Aktivierung ist die Bindung von Elk1 an eine spezifische DNA-Sequenz in Promoter-Regionen von Zielgenen. Im EMSA wird diese DNA-Bindung mit Hilfe von Biotin-markierten DNA-Sonden simuliert und nachgewiesen. Diese Untersuchungen ergaben, dass die Stimulation von Prostata-Gewebe mit OME und pCPT tatsächlich die Bindung von Elk1 an solche DNA-Sequenzen auslöst.

Eine der Hauptfunktionen von EPAC in der humanen Prostata könnte also in der transkriptionellen Regulation bzw. der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren liegen. Die Funktion von Elk1 wird aktuell in WPMY-1-Zellen, einer immortalisierten Linie nicht-maligner Stromazellen aus der humanen Prostata untersucht, in denen mit Hilfe von RNAi ein knockout von Elk1 etabliert wurde. Da zumindest ein geringer Effekt von EPAC-Aktivatoren auf die  $\alpha_1$ -adrenerge Kontraktion nachgewiesen werden konnte, ist insgesamt von einer multiplen EPAC-Funktion in der humanen Prostata auszugehen.

Die Ergebnisse wurden 2012 beim „American Journal of Physiology“ eingereicht. Aktuell wird an einer revidierten Fassung („major revision“) gearbeitet, welche im März 2013 erneut eingereicht wird.

### **Teilprojekt 7: Effekte von Thromboxan-Rezeptor-Antagonisten auf die Kontraktion der humanen Prostata**

Bei Patienten mit BPS führt die Verabreichung von  $\alpha_1$ -Blockern über eine Relaxation der glatten Prostatamuskulatur zu einer Verbesserung der Symptome, und stellt eine Standard-Therapie zur medikamentösen Behandlung von LUTS dar. Dennoch ist die Effektivität von  $\alpha_1$ -Blockern limitiert: während durch  $\alpha_1$ -Blocker eine

Verbesserung der Symptome von 30-50% erzielt werden kann, wurde durch Placebos eine Verbesserung von bis zu 40% beobachtet. Die limitierten Effekte von  $\alpha_1$ -Blockern zeigen, dass neben  $\alpha_1$ -Adrenozeptoren auch nicht-adrenerge Faktoren zur Kontraktion der glatten Prostatamuskulatur beitragen. In diesem Zusammenhang konnte 2011 durch die Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass auch Thromboxan A2 (TXA2) durch eine Aktivierung von TXA2-Rezeptoren (TXA2R) zu einer Kontraktion der glatten Prostata-Muskulatur führt (Strittmatter et al., *Eur J Pharmacol* 2011). Interessanterweise teilt sich der TXA2R zur intrazellulären Weiterleitung des kontraktiven Signals verschiedene intrazelluläre Effektoren mit dem  $\alpha_1$ -Adrenozeptor. Dies erklärt, warum durch  $\alpha_1$ -Blocker keine vollständige Verbesserung der Symptome erzielt werden kann. Folgerichtig wurden nun die Effekte von TXA2R-Antagonisten auf die Kontraktion von humanem Prostata-Gewebe untersucht.

Im Organbad induzierte das stabile Thromboxan-Analogon U46619 eine Kontraktion von humanem Prostata-Gewebe. Diese U46619-induzierte Kontraktion ließ sich durch die drei verschiedenen TXA2R-Antagonisten, Picotamid, Seratrodast und L-665,240 hemmen. Interessanterweise hemmte Picotamid darüber hinaus auch die Kontraktion durch Noradrenalin, Phenylephrin, und elektrische Feldstimulation (EFS). Bei letzterer werden durch exogene elektrische Impulse in der Organbadkammer Aktionspotentiale simuliert, was durch Ausschüttung endogener Neurotransmitter zur Kontraktion führt. Im Gegensatz dazu blieben Seratrodast und L-665,240 ohne Effekte auf die EFS-induzierte Kontraktion. Dies zeigt, dass TXA2 nicht als Neurotransmitter, sondern offenbar vielmehr als parakriner Mediator in der Prostata auftritt. Über Doppelfluoreszenz-Färbungen mit Calponin und alpha *smooth muscle actin* als glattmuskuläre Marker, sowie Zytokeratin und dem *prostate-specific antigen* (PSA) als epitheliale Marker wurde die Verteilung des TXA2R und der TXA2-Synthese in der Prostata untersucht.

Die erzielten Ergebnisse zeigen, dass Picotamid nicht nur die TXA2-induzierte Kontraktion der humanen Prostata hemmt, sondern auch die adrenerge bzw. neurogene Kontraktion.

Mit Picotamid wurde daher erstmalig eine Substanz gefunden, die gleichzeitig in verschiedene kontraktile Systeme der Prostata eingreift. Bisherige Substanzen, wie die  $\alpha_1$ -Blocker (die zur LUTS-Therapie sehr häufig eingesetzt werden) greifen nur in eines der Systeme ein. Picotamid ist prinzipiell bei Patienten anwendbar, und wurde bereits in zahlreichen klinischen Studien als Blutverdünner bzw. im Zusammenhang mit Herzerkrankungen geprüft. Picotamid hemmt neben seinem Effekt auf den TXA2R auch die TXA2-Synthese, also die Bildung von Thromboxan. Auf der Basis der beschriebenen Ergebnisse wurde ein DFG-Antrag eingereicht, welcher im Berichtsjahr (Ende 2012) bewilligt wurde (HE 5825/2-1, ca. 141 k€). Dort sollen die Effekte von Picotamid auf die Kontraktion von humanem Blasengewebe getestet werden, sowie die urodynamischen Effekte in einem Tiermodell mit Miktionsbeschwerden.

Ein Manuskript über diese Ergebnisse wird 2013 verfasst und eingereicht.

## 4. Drittmittel

Die Gesamtsumme der bewilligten Drittmittel der 2012 laufenden (bewilligten) Projekte ist aufgeführt.

#	Drittmittelgeber (Aktenzeichen)	Empfänger	Laufzeit	T€
<b>Laser- Forschungslabor</b>				
1	BMBF (13N10172) Neurotax	Stepp, Rühm, Johansson	09-12	255
2	TMWAF – Landesförderung Thüringen	Sroka	09-12	59
3	BMBF (13N11180) Flendos und Unterauftrag FISBA	Stepp, Rühm, Betz	09-13	168
4	Firma Photonamic	Stepp	10-12	10
5	Firma Electro Medical Systems S.A.	Sroka	11-12	10
6	EU-Exzellenznetzwerk (Photonics4Life)	Sroka	11-12	12
7	EU-Exzellenznetzwerk (Photonics4Life)	Stepp, Karl	11-12	10
8	BMBF (FK2: 0313451C)	Fedorov	11-13	287
9	NanoBridge	Sroka, Fedorov	11-13	10
10	Light 4LIFE	Sroka, Fedorov	11-13	50
11	Firma Dornier	Sroka	11-12	5
12	Firma BioLitec	Sroka	11-12	15
13	Firma Kurz	Sroka	11-12	10
14	Erasmus	Kiris, Sroka	12	6
15	DAAD-Stipendium	Abdel Hamid, Stepp	12-13	12
16	Firma Nestlé	Stepp	11-14	200
17	Firma Electro Medical Systems S.A.	Sroka	12-13	5
<b>Summe</b>				<b>1124</b>
<b>Labor für Tumorummunologie</b>				
1	„Molekulare und systembiologische Medizin“ der LMU München (19/2010)	Zimmermann, Tölge	11-12	16
2	„Molekulare und systembiologische Medizin“ der LMU München (10/2011)	Zimmermann	12-13	16
3	„Molekulare und systembiologische Medizin“ der LMU München (17/2012)	Pohla, Zimmermann	13-14	16
4	DFG Transregio FOR 535, Projekt X	Pohla	10-12	202
5	DFG Transregio SFB	Pohla, Jaeckel	12-16	333
<b>Summe</b>				<b>583</b>
<b>Experimentelle Urologie</b>				
1	Recordati Pharma	Gratzke	11-12	20
2	DFG (HE 5825/2-1), bewilligt 2012	Hennenberg	13-16	141
<b>Summe</b>				<b>161</b>
<b>Gesamt</b>				<b>1.868</b>

## **5. Ernennungen, Preise und Diplom- und Promotionsarbeiten**

### **5.1 Laser-Forschungslabor**

#### **5.1.1 Ernennungen und Preise**

Dr. hum. biol. Ronald Sroka:

*Executive Committee Member* der European Laser Association (ELA)

Dr. hum. biol. Herbert Stepp:

EU-Projekt „BladderMap“ – Partner:

1. Preis für das beste Projekt in der dritten Phase der Ausschreibung zum Era-Net Photonics4Life

#### **5.1.2 Abgeschlossene Habilitationen, Promotionen und Diplomarbeiten**

##### **Habilitationsarbeiten mit LFL-Unterstützung**

Markus Bader

Wael Khoder

##### **Diplom-Master-Bachelor-Arbeiten**

Christian Gruber

Floriana Lugauer

Jonathan Brons

##### **Praktikanten**

Christoph Polzer

Sebastian Fiedler

Anna von Berg

Kiris Tugba

Christian Conderman

Lisa Winkler

Daniel Haffa

Judith Mittag

Moritz Schirra

### **5.2 Labor für Tumorummunologie**

#### **5.2.1 Ernennungen und Preise**

#### **5.2.2 Abgeschlossene Habilitationen, Promotionen und Diplomarbeiten**

##### **Habilitationen**

PD Dr. med. Alexander Buchner

PD Dr. rer. nat. Heike Pohla

## Medizinische Doktorarbeiten

Dr. med. Rosemarie Krupar

## 5.3 Experimentelle Urologie

### 5.3.1 Ernennungen und Preise

Dr. Frank Strittmatter:

Innovationspreis der Nordrhein-Westfälischen Gesellschaft für Urologie zum Thema: „In-vivo Untersuchung zur Bedeutung der Fettsäure-Hydrolase bei der Therapie der überaktiven Blase“; April 2012

### 5.3.2 Abgeschlossene Habilitationen, Promotionen und Diplomarbeiten

#### Medizinische Doktorarbeiten

Dr. med. Johanna Göttinger

Dr. med. Frauke Heinzer

## 6. Publikationen (Originalarbeiten)

### 6.1 Laser-Forschungslabor

1. Assmann W, Becker R, Otto H, Bader M, Clemente L, Reinhardt S, Schäfer C, Schirra J, Uschold S, Welzmüller A, **Sroka R**: (32)P-haltige Folien als Implantate für die LDR-Brachytherapie gutartiger Stenosen in der Urologie und Gastroenterologie. *Z Med Phys*, (2012). **IF 1.212**
2. Bach T, Muschter R, **Sroka R**, Gravas S, Skolarikos A, Herrmann TR, Bayer T, Knoll T, Abbou CC, Janetschek G, Bachmann A, Rassweiler JJ: Laser treatment of benign prostatic obstruction: basics and physical differences. *Eur Urol* 61(2), 317-325 (2012). **IF 8.439**
3. Bader MJ, **Stepp H**, **Beyer W**, **Pongratz T**, **Sroka R**, Kriegmair M, Zaak D, Welschhof M, Tilki D, Stief CG, Waidelich R: Photodynamic Therapy of Bladder Cancer - A Phase I Study Using Hexaminolevulinate (HAL). *Urol Oncol-Semin Ori*, (2012). **IF 3.216**
4. Bader MJ, Zilinberg K, Weidlich P, Waidelich R, Puls M, Gratzke C, Stief CG, **Stepp H**, **Sroka R**: Encrustation of urologic double pigtail catheters-an ex vivo optical coherence tomography (OCT) study. *Laser Med Sci*, (2012). **IF 2.004**
5. Betz CS, **Stepp H**, Ledderose JG, Kisser U, Leunig A: Probe-Based Confocal Laser Endomicroscopy in Upper Aerodigestive Tract Lesions: First Results. *Laser Surg Med* 44, 24- (2012). **IF 2.748**
6. Betz CS, Volgger V, **Stepp H**, Ihrler S, Kraft M, Leunig A, Hopper C: Evaluation of OCT to Discriminate Lesions of the Upper Aerodigestive Tract. *Laser Surg Med* 44, 23-4 (2012). **IF 2.748**

7. Gallwas J, Gaschler R, **Stepp H**, Friese K, Dannecker C: 3D optical coherence tomography of cervical intraepithelial neoplasia-early experience and some pitfalls. *Eur J Gynaecol Oncol* 33(1), 37-41 (2012). **IF 0.474**
8. Gallwas J, Mortensen U, Gaschler R, Ochsenkühn R, **Stepp H**, Friese K, Dannecker C: Validation of an ex vivo human cervical tissue model for optical imaging studies. *Laser Surg Med* 44(3), 245-8 (2012). **IF 2.748**
9. Gallwas J, Mortensen U, Gaschler R, **Stepp H**, Friese K, Dannecker C.: Diagnostic efficacy of backscattering intensity measurements in optical coherence tomography of cervical intraepithelial dysplasia. *Lasers Surg Med* 44(1):11-19, (2012) **IF IF 2.748**
10. Göbel W, Brucker D, Kienast Y, **Johansson A**, **Kniebühler G**, **Rühm A**, Eigenbrod S, Fischer S, Goetz M, Kreth F-W, Ehrhardt A, **Stepp H**, Irion K-M, Herms J: Optical needle endoscope for safe and precise stereotactically guided biopsy sampling in neurosurgery. *Opt Express* 20(24), 26117-26 (2012). **IF 3.587**
11. Havel M, **Sroka R**, Englert E, Stelter K, Leunig A, Betz CS: Intraindividual comparison of 1,470 nm diode laser versus carbon dioxide laser for tonsillotomy: a prospective, randomized, double blind, controlled feasibility trial. *Lasers Surg Med* 44(7), 558-63 (2012). **IF 2.748**
12. Khoder WY, **Sroka R**, Siegert S, Stief CG, Becker AJ: Outcome of laser-assisted laparoscopic partial nephrectomy without ischaemia for peripheral renal tumours. *World J Urol* 30(5), 633-8 (2012). **IF 2.411**
13. Khoder WY, Zilinberg K, Waidelich R, Stief CG, Becker AJ, **Pongratz T**, **Hennig G**, **Sroka R**: Ex vivo comparison of the tissue effects of six laser wavelengths for potential use in laser supported partial nephrectomy. *J Biomed Opt* 17(6), 2012 Jun;17(6):068005. doi: 10.1117/1.JBO.17.6.068005 (2012). **IF 3.157**
14. **Sroka R**, Haseke N, **Pongratz T**, **Hecht V**, Tilki D, Stief CG, Bader MJ: In vitro investigations of repulsion during laser lithotripsy using a pendulum set-up. *Laser Med Sci* 27(3), 637-43 (2012). **IF 2.004**
15. **Sroka R**, Havel M, Betz C, Kremser T, Leunig A. Clinical feasibility trial on 1940 nm Tm: fiber laser intervention of hyperplastic inferior nasal turbinates. *Photonics & Lasers in Medicine* 1:215–222 (2012)
16. **Hennig G**, **Stepp H**, **Sroka R**, **Beyer W**. Comparison of an accelerated weighted fluorescence Monte Carlo simulation method with reference methods in multi-layered turbid media. *Appl Optics* 52:1066-1075 (2013). **IF 1.748**
17. **Hennig G**, **Gruber C**, Vogeser M, Stepp H, **Dittmar S**, **Sroka R**, Brittenham GM. Dual-wavelength excitation for fluorescence-based quantification of zinc protoporphyrin IX and protoporphyrin IX in whole blood. *J Biophotonics*, im Druck (2013). **IF 4.343**
18. **Kniebühler G**, **Pongratz T**, Betz CS, Göke B, **Sroka R**, **Stepp H**, Schirra J: Photodynamic therapy for cholangiocarcinoma using low dose mTHPC (Foscan®). *Photodiagn Photodyn*, im Druck (2013). **IF 2.522**

## 6.2 Labor für Tumorimmunologie

1. Buchner A, Kendlbacher M, Nuhn P, Tüllmann C, Haseke N, Stief CG, Staehler M. Outcome assessment of patients with metastatic renal cell carcinoma under systemic therapy using artificial neural networks. *Clin Genitourin Cancer*, 10(1):37-42 (2012). **IF 2.605**
2. Eckl J\*, Buchner A\*, Prinz PU, Riesenberger R, Siegert S, Kammerer R, Nelson PJ, Noessner E. Transcript signature predicts tissue NK-cell content and defines renal cell carcinoma subgroups independent of TNM staging. (\*co-first authorship) *J Mol Med*, 90(1):55-66 (2012). **IF 5.192**
3. Ihler F, Vetter E, Pan J, Kammerer R, Debey-Pascher S, Schultze JL, Zimmermann W\*, Enders G\*. Expression of a neuroendocrine gene signature in gastric tumor cells from CEA424-SV40 large T antigen-transgenic mice depends on SV40 large T antigen. *PLoS ONE*, 7(1): e29846 (2012). **IF 4.092**  
\*Joint last author.
4. Tschoep-Lechner K, Drexler I, Hammer D, Neumann D, Pohla H, Sutter G, Noessner E, Issels RD. Modified vaccinia virus Ankara delivers a robust surrogate marker for immune monitoring to sarcoma cells even if cells are being exposed to chemotherapy and heat treatment. *Int J Hyperthermia* 28(1):33-42 (2012). **IF 1.923**
5. Regel I, Merkl L, Friedrich T, Burgermeister E, Zimmermann W, Einwächter H, Herrmann K, Langer R, Röcken C, Schmid RM, Ebert MPA. The pan-histone deacetylase inhibitor panobinostat (LBH589) overcomes anthracycline resistance in gastric cancer cells via induction of CITED2. *Gastroenterology*, 143(1):99-109 (2012). **IF 11.675**
6. Kammerer R, Rüttiger L, Riesenberger R, Schäuble C, Krupar R, Kamp A, Sunami K, Eisenried A, Hennenberg M, Grunert F, Breß A, Battaglia S, Schrewe H, Knipper M, Schneider MR, Zimmermann W. Loss of the mammal-specific tectorial membrane component CEA Cell Adhesion Molecule 16 (CEACAM16) leads to hearing impairment at low and high frequencies. *J Biol Chem*, 287:21584-21598 (2012). **IF 4.773**
7. Walter S, Weinschenk T, Stenzl A, Zdrojowy R, Pluzanska A, Szczylik C, Staehler M, Brugger W, Dietrich P-Y, Hilf N, Schoor O, Fritsche J, Mahr A, Mendrzyk R, Maurer D, Vass V, Trautwein C, Lewandrowski P, Flohr C, Pohla H, Stanczak JJ, Bronte V, Mandruzzato S, Biedermann T, Pawelec G, Derhovanessian E, Yamagishi H, Tsuneharu M, Hongo F, Takaha N, Hirakawa K, Tanaka H, Stevanovic S, Rammensee H-G, Frisch J, Mayer-Mokler A, Kirner A, Reinhard C, Singh-Jasuja H. Prolonged survival of patients with advanced renal cancer responding to multi-peptide vaccine IMA901 after single-dose cyclophosphamide. *Nat Med*, Jul 29. doi: 10.1038/nm.2883 (2012). **IF 22.462**
8. Schichor C, Albrecht V, Korte B, Buchner A, Riesenberger R, Mysliwietz J, Paron I, Motaln H, Tursek TL, Jürchott K, Selbig J, Tonn J-C. Mesenchymal stem cells and glioma cells form a structural as well as a functional syncytium *in vitro*. *Exp Neurol*, 234(1):208-19 (2012). **IF 4.699**

9. **Pohla H, Buchner A, Stadlbauer B**, Frankenberger B, Stevanovic S, Walter S, Frank R, Schwachula T, Olek S, Kopp J, Willimsky G, Stief CG, Hofstetter A, Pezzutto A, Blankenstein T, Oberneder R, Schendel DJ. High immune response rates and decreased frequencies of regulatory T cells in metastatic renal cell carcinoma patients after tumor cell vaccination. *Mol Med*. 18:1499-508 (2013). **IF 3.757**
10. Zhang H, **Eisenried A, Zimmermann W**, Shively J. Role of CEACAM1 and CEACAM20 in an in vitro model of prostate morphogenesis. *PLOS ONE*, 8(1):e53359 (2013). **IF 4.092**
11. Yuan G, Regel I, Lian F, Friedrich T, Hofheinz R, Langer R, Röcken C, **Zimmermann W**, Schmid RM, Ebert MPA, Burgermeister E. WNT6 is a novel target gene of caveolin-1 promoting chemoresistance to epirubicin in human gastric cancer cells. *Oncogene*, 32(3):375-87 (2013). **IF 6.373**
12. **Gassenmaier M, Chen D, Buchner A**, Henkel L, Schiemann M, Mack B, Schendel DJ, **Zimmermann W, Pohla H**. CXC chemokine receptor 4 is essential for maintenance of renal cell carcinoma-initiating cells and predicts metastasis. *Stem Cells*, im Druck. **IF 7.781**

### 6.3 Experimentelle Urologie

1. **Hennenberg M**, Strittmatter F, Beckmann C, Rutz B, Füllhase C, Waidelich R, Montorsi F, Hedlund P, Andersson KE, Stief CG, Gratzke C. Silodosin inhibits noradrenaline-activated transcription factors Elk1 and SRF in human prostate smooth muscle. *PLoS One* 2012;7(11):e50904. **IF 4.092**
2. Kammerer R, Rüttiger L, Riesenberger R, Schäuble C, Krupar R, Kamp A, Sunami K, Eisenried A, **Hennenberg M**, Grunert F, Breß A, Battaglia S, Schrewe H, Knipper M, Schneider MR, Zimmermann W. Loss of the mammalian-specific tectorial membrane component CEA cell adhesion molecule 16 (CEACAM16) leads to hearing impairment at low and high frequencies. *J Biol Chem* 2012; 287(26):21584-21598. **IF 4.773**
3. Strittmatter F, Walther S, Gratzke C, Göttinger J, Beckmann C, Roosen A, Schlenker B, Hedlund P, Andersson KE, Stief CG, **Hennenberg M**. Inhibition of adrenergic human prostate smooth muscle contraction by the inhibitors of c-Jun N-terminal kinase, SP600125 and BI-78D3. *Br J Pharmacol* 2012; 166(6):1926-1935. **IF 4.409**
4. Strittmatter F, Walther S, Roosen A, Rutz B, Schlenker B, Limmer S, Waidelich R, Stief CG, Gratzke C, **Hennenberg M**. Activation of protein kinase B/Akt by alpha1-adrenoceptors in the human prostate. *Life Sciences* 2012; 90(11-12):446-453. **IF 2.732**
5. Walther S, Strittmatter F, Roosen A, Heinzer F, Rutz B, Stief CG, Gratzke C, **Hennenberg M**. Expression and alpha1-adrenoceptor regulation of caldesmon in human prostate smooth muscle. *Urology* 2012; 79(3):745.e5-12. **IF 2.428**
6. Füllhase C, Russo A, Castiglione F, Benigni F, Campeau L, Montorsi F, **Gratzke C**, Bettiga A, Stief C, Andersson KE, Hedlund P. Spinal cord fatty

- acid amide hydrolase (FAAH) in normal micturition control and bladder overactivity in awake rats. *J Urol* 2012; pii: S0022-5347(12)05797-7. **IF 4.02**
7. **Gratzke C**. Of mice and men: animal models in functional urology. *Eur Urol* 2012; 62(6):1086-7. **IF 8.493**
  8. Streng T, Andersson KE, Hedlund P, **Gratzke C**, Baroni E, D'Ambrosio D, Benigni F. Effects of bladder function of combining elocalcitol and tolterodine in rats with outflow obstruction. *BJU Int* 2012; 110(2Pt2):E125-31. **IF 2.844**
  9. Kutlu O, Ross AE, Schaeffer EM, **Gratzke C**, Stief CG, Strong TD, Burnett AL, Hedlund P, Bivalacqua TJ. Increased expression of nestin in the major pelvic ganglion following cavernous nerve injury. *Int J Impot Res* 2012; 24(2):84-90. **IF 1.712**
  10. Strittmatter F, Gandaglia G, Benigni F, Bettiga A, Rigatti P, Montorsi F, **Gratzke C**, Stief C, Colciago G, Hedlund P. Expression of fatty acid amide hydrolase (FAAH) in human, mouse, and rat urinary bladder and effects of FAAH inhibition on bladder function in awake rats. *Eur Urol* 2012; 61(1):98-106. **IF 8.493**
  11. May F, Buchner A, Schlenker B, **Gratzke C**, Arndt C, Stief C, Weidner N, Matiasek K. Schwann cell-mediated delivery of glial cell line-derived neurotrophic factor restores erectile function after cavernous nerve injury. *Int J Urol*, 2013; 20(3):344-8. **IF 1.747**
  12. Hannan JL, Albersen M, Kutlu O, **Gratzke C**, Stief CG, Burnett AL, Lysiak JJ, Hedlund P, Bivalacqua TJ. Inhibition of Rho-Kinase improves erectile function, increases nitric oxide signaling and decreases penile apoptosis in a rat model of cavernous nerve injury. *J Urol* 2013; 189(3):1155-61. **IF 4.02**
  13. **Hennenberg M**, Miersch J, Rutz B, Strittmatter F, Waidelich R, Stief CG, Gratzke C. Noradrenaline induces binding of clathrin light chain A to  $\alpha$ 1-adrenoceptors in the human prostate. *The Prostate*, 2013; 73(7):715-23. **IF 3.485**