LIFE

FORSCHUNG FÜR DAS LEBEN

Laser- und Immunologie Forschungseinrichtungen an der Urologischen Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München

Forschungsbericht 2001-2002

LTI
Labor für Tumorimmunologie

LFL
Laser-Forschungslabor
Urologische Klinik
Klinikum Großhadern

Vorwort

Rückblickend auf die vergangenen beiden Jahre 2001/2002 dient der Forschungsbericht des LIFE-Zentrums der Demonstration der anhaltenden klinisch-wissenschaftlichen Leistungsfähigkeit dieser Einrichtung. Für alle Freunde und Förderer des LIFE-Zentrums sowie Kooperationspartner aus Universität und Industrie fasst er zusammen, welcher Stand der Forschung und Entwicklung in den Bereichen Laser und Immunologie erreicht wurde. Der Forschungsbericht dokumentiert neue Erkenntnisse in den Forschungsschwerpunkten Medizintechnologie, Photodynamik und Fluoreszenzdetektion von Tumoren sowie der Weiterentwicklung immunologischer Therapieverfahren bis hin zur aktiven spezifischen Vakzinierung zur Behandlung des Nieren- und Prostatakarzinoms.

Der Tradition folgend entwickelt sich der Forschungsschwerpunkt Photodynamik zunehmend erfolgreich im LFL. Hier ist der Hinweis erlaubt, dass vor genau 100 Jahren am 10. September 1903 die erst photodynamische Therapie eines Hautkarzinoms in München unter Anleitung des Direktors des pharmakologischen Instituts Prof. v. Tappeiner und dem Dermatologen Jesionek stattfand. Darüber hinaus legten v. Tappeiners Studenten mit ihren Arbeiten den Grundstein zum Verständnis der photodynamischen Wirkung fluoreszierender Farbstoffe. Hier spannt sich der Bogen zu „OPAL“, als Akronym für optische Pathologie. In einem integrativen Konzept aus Tumordetektion durch Fluoreszenz, konfokaler Mikroendoskopie und optischer Kohärenztomographie, sollte es in Zukunft möglich sein, eine pathologische Begutachtung an jedem subjektiv verdächtigen Gewebeareal mithilfe von Endoskopen durchzuführen, ohne Gewebeproben zu entnehmen. Diese Techniken in einem „OPAL-oskop“ zu bündeln, sehen wir als die Herausforderung der Zukunft.

Neue Wege in der Umsetzung medizintechnischer Entwicklungen werden seit kurzem beschritten mit der Einbeziehung der Initiative „Bayern Patent“, die in Kooperation mit dem Büro für Technologietransfer und der Fraunhofer-Patentstelle Hilfestellung bei Verhandlungen mit Firmen und der Ausarbeitung von Verträgen bieten sollen. Hier besteht für beide Seiten Lernbedarf und die Bereitschaft gemeinsam an Optimierungsprozessen für die Zukunft mitzuwirken.

Obwohl verschiedene immuntherapeutische Verfahren (Zytokintherapie zum Teil in Kombination mit Chemotherapie) in den letzten Jahren einen festen Platz in der Klinik gefunden haben, wird weltweit mit großem Einsatz an der Etablierung von aktiv-spezifischen Vakzinierungsstrategien gegen verschiedene Tumorentitäten gearbeitet. Erste internationale Erfolge vor allem bei Melanompatienten zeigen, dass diese Strategie erfolgversprechend ist. Bis die aktive Immunisierung bei der Behandlung von malignen Erkrankungen ähnlich erfolgreich werden kann, wie sie bei der Bekämpfung von Infektionskrankheiten in den letzten hundert Jahren wurde, ist jedoch noch viel Arbeit zur Optimierung dieser Therapieform zu leisten. Folgende Fragen stehen dabei im Mittelpunkt, auf die in diesem Bericht näher eingegangen wird: Identifizierung von Zielantigenen, Weg der Antigen-Präsentation, klinisches Management der Therapie und die Überprüfung der im Patienten stattfindenden Immunreaktion („Immunmonitoring“). Auch hier scheint es sich zu bewahrheiten, dass große Ziele nur durch viele kleine Schritte erreicht werden können.

Begleitet und immer wieder stimuliert wurden diese Schritte sowohl bei medizintechnologischen Entwicklungen im LFL als auch in der tumorimmunologischen Forschung im LTI durch Prof. Dr. med. Dr. h. c. mult. A. Hofstetter, dem Direktor der gemeinsamen Einrichtung LIFE-Zentrum. Ihm widmen wir diesen Forschungsbericht zu seinem 65. Geburtstag in Anerkennung für seine herausragenden Verdienste sowohl bei der Entstehung als auch dem wissenschaftlichen Fortgang dieser Einheit. Dies ist darüber hinaus verbunden mit dem Wunsch, dass seine Verbindung mit unserem LIFE-Zentrum noch lange erhalten bleibt.

Dr. R. Baumgartner Prof. W. Zimmermann

Inhalt

Vorwort 1

Inhalt 2

Historie und Struktur 5

Forschungsberichte Laser-Forschungslabor (LFL)

Urologie

Die Photodynamische Therapie des Harnblasenkarzinoms mit Weißlicht 7

PDT mit 5-ALA am Prostata-Tumormodel in vivo 8

Photodynamische Therapie des humanen Prostatakarzinoms mit 5-ALA-induziertem Protoporphyrin IX – Vorläufige Ergebnisse 9

Fluoreszenzdetektion Rhodamin-markierter kationischer Liposomen 10

Bestimmung optischer Gewebeeigenschaften in vivo: Messungen an Blasenwand und Gehirngewebe 11

Neurochirurgie

Histopathologisches Korrelat der 5-ALA-induzierten Gewebsfluoreszenz bei der Operation maligner Gliome 12

Photodynamische Therapie experimenteller maligner Gliome mit 5-ALA-induziertem Protoporphyrin IX 14

Klinische Studien zur Behandlung des malignen Glioms mit 5-ALA 16

Präklinische und klinische Evaluierung radioaktiv markierter Tenascin-Antikörper zur adjuvanten lokoregionalen Endoradiotherapie von Gliomen (Radioimmuntherapie) 18

Hals-, Nasen- und Ohren-Heilkunde

Endolaryngeale Laserchirurgie der juvenilen Larynxpapillomatose mit einem neuen Lichtwellenleiter-Führungssystem 21

In-vitro-Untersuchung von Gewebeeffekten nach Laserbestrahlung im Kontaktverfahren 22

Fluoreszenzdiagnostik von Kopf-Halstumoren nach systemischer Applikation von 5-Aminolävulinsäure 23

Laser-Biomodulation zur Therapie von Tinnitus 25

Optische Kohärenztomographie am Mittelohr 26

Gynäkologie

Pharmakokinetik und Selektivität von 5-Aminolävulinsäure aus 5-ALA-Thermogel bei zervikaler intraepithelialer Neoplasie (CIN 1-3) 27

Klinische Phase-I-Studie zur Pharmakokinetik von 5-Aminolivulinsäure aus 5-ALA-Thermogel bei zervikaler intraepithelialer Neoplasie (CIN 1-3) mittels Video-Imaging und Spektroskopie 28

Fluoreszenzdiagnostik des Ovarialkarzinoms – Erste Ergebnisse einer Pilotstudie 29

Radiologische Forschung

Interstitielle Laserthermotherapie unter MRT-Monitoring am Beispiel von Hirntumoren 30

Technische Entwicklungen

Simulator für die minimal invasive Chirurgie: Der Urotrainer 31

Konfokale Mikroendoskopie 33

Mitarbeiter 35

Publikationen 36

Diplomarbeiten, Dissertationen und Habilitationen 39

Förderprogramme 40

Kooperationen 41

Ausbildung und Lehre 42

Herausgeber:
Laser- und Immunologie -
Forschungseinrichtungen (LIFE)
Urologische Klinik und Poliklinik
Ludwig-Maximilians-Universität
Marchioninistraße 23
81377 München
Fax.: 089/7095-4864
http://life.klinikum.uni-muenchen.de

Redaktion: Dr. Reinhold Baumgartner
Dr. Ronald Sroka
Daniel Behr
Druck: Offsetandruck GmbH, Großhadern

Forschungsberichte Labor für Tumorimmunologie (LTI)

Einleitung 45

Disseminierte Tumorzellen im Knochenmark von Patienten mit urologischen Tumoren 47

Strategien zur Optimierung von DC-basierten Tumorzellvakazinen 49

Beladung von dendritischen Zellen (DC) mit Tumorantigen-cRNA 49

Die Identifizierung antigener Zielstrukturen für die DC-basierte Therapie des Nierenzellkarzinoms (RCC) 50

Entwicklung von DC-stimulierenden Tumorvakazinen 52

Untersuchung von Tumor-immune-escape-Mechanismen 55

Mechanismen der funktionellen Inaktivierung Tumor-infiltrierender Lymphozyten (TIL) und DC am Beispiel des Nierenzellkarzinoms 55

Bedeutung von CEACAM1 (CEA-verwandtes Zelladhäsionsmolekül 1) beim Nierenzellkarzinom 57

Manipulieren Tumorzellen die Infiltration von Lymphozyten in soliden Tumoren? 59

Entwicklung eines computergesteuerten Langzeit-Video-Inkubationssystems für Zellkulturexperimente 63

Evaluation von neuen immuntherapeutischen Ansätzen im Tiermodell 66

Weiterentwicklung standardisierter, hoch sensitiver Methoden zum *immune monitoring* 68

Anreicherung Tumor-spezifischer T-Lymphozyten mit Hilfe des Zytokin-capture-assays für die adoptive Tumortherapie 70

Allogene, genetisch modifizierte Tumorzellvakzine für das Nierenzellkarzinom 72

Analyse der Immunogenität des RCC 72

Genmodifikation von RCC-26 zur Verbesserung der natürlichen Immunogenität 72

Etablierung einer funktionellen Qualitätskontrolle unter GMP-Bedingungen 73

Klinische Studie (Phase I) zur Evaluation einer allogenen, gentechnisch modifizierten Tumorzellvakzine für das Prostatakarzinom 74

Ausblick 76

Mitarbeiter 77

Kooperationen 78

Dissertationen 80

Publikationen 81

Veranstaltungen 82

Historie

Bereits Anfang der 70er Jahre wurde in der damaligen GSF (Gesellschaft für Strahlen und Umweltforschung) intensive Lasermedizinforschung in den Arbeitsgruppen Urologie (Prof. Hofstetter), Gastroenterologie (Prof. Kiefhaber) und Neurochirurgie (Prof. Leheta) unter der wissenschaftlichen Betreuung durch das Institut für angewandte Optik (Prof. Waidelich) betrieben. Nach den ersten Laseranwendungen in der Klinik im Jahr 1975 (Thalkirchner Straße) entstanden mit zunehmendem Forschungsbedarf neue medizinische Lasereinrichtungen in Berlin (Prof. Müller), Düsseldorf (Prof. Kaufmann), Lübeck (Prof. Hofstetter) und Ulm (Prof. Steiner). Mit zunehmend innovativen Applikationstechniken auf dem Gebiet der Laser-Technologie zeigte sich immer mehr das Defizit einer technisch-wissenschaftlich orientierten Schnittstelle zwischen Industrie und Klinik. Die Effizienz einer derartigen Einrichtung wird bestimmt durch die räumliche Nähe der klinischen Anwender und einen in Bezug auf Qualität und Zeit optimierten Technologietransfer. Diese Argumente bildeten die Basis für die Errichtung eines Laser-Forschungslabors auf dem Gelände des Klinikums Großhadern. Mit der offiziellen Eröffnung im Oktober 1995 nahm das Labor den Forschungsbetrieb auf.

Struktur

Trotz seiner offiziellen Zuordnung an die Urologische Klinik war das Laser-Forschungslabor von Beginn an als fach- und standortübergreifende Einrichtung gedacht, mit den Möglichkeiten, klinische Forschung mit allen interessierten medizinischen Fachdisziplinen durchzuführen. Intensiviert werden auch bestehende bzw. neue Kontakte zu externen Instituten und Kliniken.

Für die Kooperation mit der Industrie bestehen ideale Möglichkeiten, da im Großraum München mehrere Firmen mit Geschäftsbereichen in der Medizintechnologie angesiedelt sind. Für diese Firmen ist es ein wesentlicher Vorteil, dass die Produktentwicklung in möglichst enger und direkter Abstimmung mit den Anwendern vollzogen werden kann. Hier bietet das Laser-Forschungslabor durch die direkte Anbindung an den klinischen Betrieb ausgezeichnete Voraussetzungen.

Das Laser-Forschungslabor steht in engem Kontakt mit dem Labor für Tumorimmunologie (LTI) der Urologischen Klinik. Beide Institutionen bilden zusammen die Laser- und Immunologie-Forschungseinrichtungen (LIFE) und sind gemeinsam in einem Pavillion in unmittelbarer Nähe des Klinikums untergebracht.

Dr. R. Baumgartner

Leiter des Laser-Forschungslabors

LIFE

Laser- und Immunologie-Forschungseinrichtungen

Forschungsberichte
Laser-Forschungslabor (LFL)

Die Photodynamische Therapie des Harnblasenkarzinoms mit Weißlicht

Es wurde ein Konzept für die Lichtapplikation bei der photodynamischen Therapie mit 5-ALA zur Rezidivprophylaxe beim oberflächlichen Harnblasenkarzinom entwickelt, das sich durch Einfachheit und reduzierte Kosten auszeichnet. An Stelle eines Lasers wurde eine Weißlichtquelle auf der Grundlage einer 500W-Xe-Lampe verwendet (s. Abb. 1). Der Lichttransport erfolgt mit einer Glasfaser mit 1,5mm Durchmesser. Es gelang, eine Lichtleistung von 5W einzukoppeln. Die Glasfaser wird über einen Bestrahlungskatheter in die Harnblase eingeführt (s. Abb. 2). Ein mit Streumedium dotierter Kunststoffzylinder vor dem Faserende verteilt das Licht über die Blasenwand.

Abb. 1: Prototyp der Weißlichtquelle auf der Basis einer Xe-Kurzbogenlampe mit 500W Leistung (T-Light System, Karl Storz, Tuttlingen).

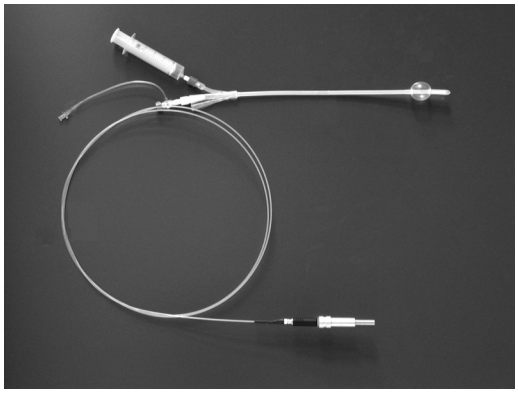


Abb. 2: Spezialkatheter für die Lichtapplikation (OptiMed GmbH, Ettlingen). Über eine Glasfaser mit 1,5mm Durchmesser und einem speziell entwickelten hitzebeständigen Stecker können 5W appliziert werden. Die Lichtemission erfolgt isotrop am distalen Ende des Katheterballons.

Auch die Lichtdosimetrie wurde erheblich vereinfacht. Dazu wurde die wirksame Lichtdosis derart gesteigert, dass der Sensibilisator weitgehend ausbleicht. In diesem Fall hängt die therapeutische Wirkung nur noch unwesentlich von Variationen der Lichtdosis ab, so dass sich die erforderliche Präzision der Lichtdosimetrie erheblich verringert. Diese Steigerung beruht im Wesentlichen auf der Nutzung der Blau-violett-Anteile der Lichtquelle, die deutlich stärker vom verwendeten Photosensibilisator Protoporphyrin IX (PPIX) absorbiert werden als die Rotanteile. Da die zu therapierenden Läsionen nur eine Gewebetiefe von wenigen 100µm aufweisen, kann die im Vergleich zu den Rotanteilen reduzierte Eindringtiefe der Blau-violett-Anteile ohne weiteres in Kauf genommen werden.

Zur Dosisfindung wurde die Ausbleichdynamik von PPIX in vivo gemessen. Dazu wurde unmittelbar vor der PDT ein kleiner Bereich der Blasenwand endoskopisch mit blau-violettem Licht bestrahlt und die zeitliche Abnahme des Fluoreszenzsignals gemessen (s. Abb. 3). Danach wird das PPIX bei einer blau-violetten Lichtdosis von 30J/cm² zu über 95% ausgeblichen. Anhand einer Analyse des Lampenspektrums und des PPIX-Absorptionsspektrums erwartet man für eine Weißlichtdosis von 100J/cm², dem klinisch verwendeten Wert, die gleiche Wirkung. Diese Analyse deckt sich gut mit den Ergebnissen der qualitativen fluoreszenzendoskopischen Untersuchungen, die bei Patienten jeweils vor und nach PDT durchgeführt wurden. Sie deckt sich ferner mit der Beobachtung, dass die Gabe von Narkotika bereits nach ca. 25% der Bestrahlungszeit deutlich reduziert werden konnte.

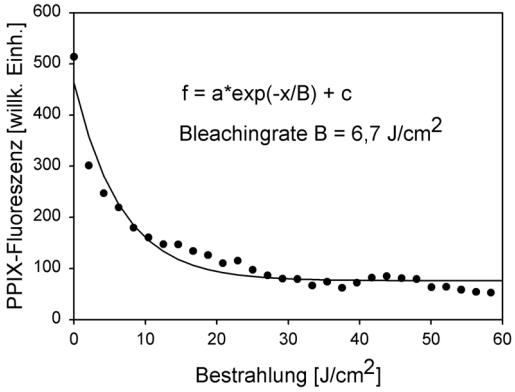


Abb. 3: Ausbleichen von PPIX bei breitbandiger Bestrahlung mit blau-violettem Licht im Bereich zwischen 400 und 450nm. Dargestellt sind Messergebnis und exponentielle Anpassung. Die klinisch applizierte Lichtdosis von 100J/cm² Weißlicht entspricht in dieser Kurve der Stelle bei 30J/cm².

W. Beyer, **H. Stepp, S. Wagner, T. Pongratz**, R. Waidelich

PDT mit 5-ALA am Prostata-Tumormodel in vivo

Einführung: Radikale Prostatektomie, externe Strahlentherapie und Brachytherapie sind die Hauptbehandlungsmethoden für das lokal begrenzte Prostatakarzinom (PCA). Da jedoch sowohl Früh- als auch Spätkomplikationen wie Blutungen, Inkontinenz und Impotenz auftreten, besteht der Bedarf an einer selektiven minimal-invasiven Methode zur Tumorzerstörung. Vor der klinischen Einführung eines neuen Therapieverfahrens sind jedoch grundlegende Untersuchungen zur Selektivität der 5-ALA-induzierten PDT an einem Prostatakarzinommodell in vivo empfehlenswert.

Material und Methode: Als Tumormodell diente der Dunning R3327 Tumor (MatLyLu-Zelllinie), subkutan transplantiert in die Flanke männlicher Copenhagen-Ratten. Bei einem Tumordurchmesser von 5mm wurden nach i.v. Applikation von 5-ALA (150mg/kg) zunächst Fluoreszenzmessungen und in einem zweiten Ansatz die PDT durchgeführt.

Die **Fluoreszenzmessungen** dienten einerseits der Ermittlung der zeitabhängigen PPIX-Anreicherung im Tumorgewebe (Pharmakokinetik) und andererseits zur Verifizierung der Lokalisation der PPIX-Fluoreszenz. Die Fluoreszenzanregung erfolgte mittels D-Light (λ=385-440nm, Karl STORZ GmbH, Tuttlingen). Zum eindeutigen Nachweis von PPIX wurden Fluoreszenzspektren im Wellenlängenbereich zwischen 500 und 750 nm mit einem optischen Vielkanalanalysator aufgezeichnet. In Zeitintervallen von 15-30 min wurden diese Spektren über eine Gesamtdauer von 8h post injectionem aufgenommen. Die Fluoreszenzintensität der PPIX-Hauptemissionsbande um λ=635nm wurde in Abhängigkeit der Zeit aufgetragen. Die Lokalisation der PPIX-Fluoreszenz wurde mittels Vergleich benachbarter Gewebe in der Fluoreszenzmikroskopie zur HE-Lichtmikroskopie ermittelt.

Aufbauend auf den Ergebnissen der Fluoreszenzuntersuchungen wurde die **PDT** zum Zeitpunkt maximaler Fluoreszenzintensität durch großflächige homogene Beleuchtung des Tumorareals mit Licht der Wellenlänge λ=633nm (100mW/cm², 100J/cm²) durchgeführt. 48h nach PDT wurden die Tumore explantiert und zur histopathologischen Beurteilung des prozentualen Nekroseanteils aufbereitet.

Ergebnisse: In den **Fluoreszenz**untersuchungen wurde PPIX anhand des spezifischen Emissionsspektrums identifiziert. Die Kinetik ergab erhöhte PPIX Akkumulation in einem Zeitraum von 3-4h post 5-ALA-Applikation. Die rote PPIX-Fluoreszenz wurde selektiv im Tumor nachgewiesen, während benachbartes Normalgewebe lediglich grüne Autofluoreszenz zeigte.

Infolge der **PDT** wurde das Tumorwachstum makroskopisch gegenüber den Kontrollgruppen verzögert. Histologisch konnte eine signifikante Nekrose mit Nestern vitaler Tumorzellen in der PDT-Gruppe nachgewiesen werden (siehe Tabelle).

	Tiere	Parameter		Nekrose
	n	[J/cm²]	[mg/kg K.G.]	%
I	6	0	0	6 ± 4
II	3	0	150	8 ± 3
III	3	100	0	7 ± 4
IV	18	100	150	94 ± 12

Tab. 1. PDT-induzierte prozentuale Nekrose (Mittelwert ± Standardabweichung) entsprechend der unterschiedlichen Behandlungen: Kontrollgruppen I-III, PDT-Gruppe IV

Diskussion: Die systemische Applikation, die rasche Kinetik und die hohe Selektivität von 5-ALA-induziertem PPIX machen 5-ALA zu einer attraktiven Substanz für die PDT. Auch die vorliegende Untersuchung am Prostata-Karzinom-Modell belegt diese Qualitäten und das Potenzial für eine selektive und effektive Zerstörung des Tumorgewebes was Ziel dieser tierexperimentellen Studie war, um somit die Vorbedingungen für den klinischen Einsatz zu erfüllen.

Diese Erkenntnisse sind zunächst in eine klinische Studie zu übertragen, um in deren Folge die PDT-relevanten Parameter, Dosierung von 5-ALA und Licht zu optimieren (siehe dazu nachfolgenden Bericht).

D. Zaak**, R. Sroka, S. Stocker**, K. Bise, M. Höppner, R. Knüchel

Photodynamische Therapie des humanen Prostatakarzinoms mit 5-ALA-induziertem Protoporphyrin IX – Vorläufige Ergebnisse

Einführung: Die radikale retropubische Prostatektomie (RRP), externe Bestrahlung und Brachytherapie stellen die zentralen Behandlungsformen des Prostatakarzinoms (PCA) dar. Aufgrund des Auftretens von Nebenwirkungen und Komplikationen besteht ein Bedarf an alternativen Behandlungsmethoden, zu denen die Photodynamische Therapie (PDT) zählt. Ziel dieser Untersuchung war es die Lokalisation von 5-ALA-induziertem PPIX im PCA zu ermitteln, um dann eine interstitielle PDT an Patienten durchführen zu können.

Material: Zunächst wurde die Lokalisation von 5-ALA-induziertem PPIX im humanen PCA untersucht. Patienten (n=14) mit histologisch nachgewiesenem PCA erhielten eine RRP. Unmittelbar vor Anästhesie wurde ihnen eine Lösung von 5-ALA von 20mg/kg Körpergewicht oral zugeführt. Das ektomierte Gewebe wurde fluoreszenz-mikroskopisch auf die Präsenz von PPIX untersucht.

Auf der Basis dieser Erfahrungen erhielten 5 Patienten eine interstitielle PDT, drei Patienten mit transurethralem und zwei mit transperinealem Zugang der Lichtapplikation unter Ultraschallkontrolle. Hierfür wurde das Licht eines Diodenlasers (λ=633nm) in einen Lichtwellenleiter mit einer 1cm langen Diffuserspitze eingekoppelt und dieser in das Gewebe gestochen. Die Lichtdosimetrie wurde mittels Monte-Carlo-Simulation auf der Basis der optischen Parameter der Prostata berechnet. Es wurde je Position eine Lichtenergie von 250J/cm (Bestrahlungsstärke: 0,5W/cm, Bestrahlungsdauer: 500s) appliziert.

Ergebnisse: Die Fluoreszenzuntersuchungen belegen die selektive Akkumulation von PPIX in Tumorzellen, während normales epitheliales und stromales Gewebe nur Autofluoreszenz zeigte. Innerhalb von 6 Wochen nach interstitieller PDT waren die PSA Werte um 20 bis 70% reduziert. Die individuellen PSA-Werte sind in Tabelle 1 aufgelistet. Ein Jahr post PDT konnte jedoch wieder ein Anstieg des PSA-Wertes festgestellt werden. Nebenwirkungen wie Inkontinenz, Dysurie, kutane Photosensibilisierung sowie intolerable Veränderungen von Parametern des kardiovaskulären Systems wurden nicht beobachtet.

Diskussion: Unter Berücksichtigung einer Inkubationsdauer von 4-6 Stunden zur 5-ALA-Aufnahme und -Metabolisierung zu PPIX ist eine selektive Akkumulation im humanem prostatischem Tumorgewebe festzustellen. Eine PDT in diesem Zeitraum bewirkt eine Reduktion des PSA-Wertes. Diese hielt über einen Beobachtungszeitraum von 6 Monaten an. Jedoch 1 Jahr post PDT wurden PSA-Werte vergleichbar den Pre-PDT-Werten gemessen. Eine Wiederholung der PDT bei einigen Patienten zeigte die gleichen Wirkungen.

Im Rahmen einer Einzelbehandlung wurden unmittelbar post PDT erste Zelldissoziationsprozesse als initiale Hinweise der sich entwickelnden Nekrose festgestellt. Bei Verkürzung der Inkubationsdauer auf 2 konnte nur eine geringe PPIX-Fluoreszenz nachgewiesen werden. Eine selektive PDT ist somit obsolet.

Entsprechende PDT-Studien mit Photofrin® und Foscan® belegen ebenfalls eine Reduktion des PSA-Wertes nach PDT, jedoch sind die Nebenwirkungen und die Patientenbelastung durch diese Photosensibilisatoren zu berücksichtigen.

Die vorliegende Studie belegt, dass die interstitielle PDT mittels 5-ALA-induziertem PPIX eine sichere und einfache Behandlungsmethode des Prostatakarzinoms mit Reduktion des PSA-Wertes darstellen kann. In weiteren Untersuchungen sind insbesondere die Lichtverteilung und die Lichtdosimetrie zu optimieren, mit dem Ziel eine vollständige und kurative Behandlungsmethode des PCA zu entwickeln.

Patient	PSA	
	vor PDT	nach PDT
1 TU	8,7	2,8
2 TU	5,7	4,9
3 TU	7,0	3,9
4 PE	4,9	3,9
5 PE	10,9	7,2

Tab. 1: Vergleich der individuellen PSA-Werte vor und 6 Wochen nach PDT. (TU: transurethrale PDT, PE: perineale PDT)

D. Zaak, **R. Sroka, S. Stocker**, K. Bise, M. Höppner, R. Knüchel

Fluoreszenzdetektion Rhodamin-markierter kationischer Liposomen

Einführung: Intravenös injizierte kationische Liposomen (winzige Lipidmembrankügelchen) zeigen eine Affinität zu den Endothelien von Tumorkapillaren. Mit Hilfe einer Rhodaminmarkierung der Liposomen (LipoRed™, Munich Biotech AG, Neuried) kann dieses Verhalten durch Fluoreszenznachweis untersucht werden. Ziel der hier dargestellten Arbeit war der Aufbau eines endoskopischen Fluoreszenzdetektionssystems für den klinischen Einsatz beim Harnblasenkarzinom und die Durchführung pharmakokinetischer Untersuchungen an Tumor- und Normalgewebe.

Material und Methoden: Durch Einbau eines geeignet beschichteten Bandpassfilters (520 nm $< \lambda <$ 570 nm) in ein D-Light-System (K. Storz, Tuttlingen) konnte über Standardzystoskope ausreichend Anregungslicht für den bildgebenden und spektralen Fluoreszenznachweis zur Verfügung gestellt werden. Vor das Okular wurde während der Fluoreszenzmessungen ein Langpassfilter ($\lambda >$ 580 nm) vorgeschaltet.

Fluoreszenzbilder wurden mit einer integrationsfähigen 3-chip-Kamera (Tricam sl, K. Storz, Tuttlingen) auf Band gespeichert. Der (semi-) quantitative Fluoreszenznachweis erfolgte anhand von Fluoreszenzspektren, die fasergestützt aus dem Zentralbereich des Gesichtsfeldes erfasst wurden (S2000, Ocean Optics, Mikropack, Ostfildern).

Vor Liposomenapplikation erfolgte die Identifizierung und Markierung mehrerer Tumor- und Normalgewebsareale und jeweils der bildgebende und spektrale (Auto-) Fluoreszenznachweis. Nach Beginn der intravenösen Liposomenapplikation in einer Dosierung von 2 mg/kg KG wurden diese Messungen in ca. 10-minütigen Intervallen wiederholt. Zur Auswertung wurden die bei 600 nm gemessenen Intensitäten (maximale Rhodaminfluoreszenz) auf die jeweilige Intensität bei 690 nm (minimale Rhodaminfluoreszenz) und auf die Autofluoreszenz vor Liposomen-Applikation normiert. 60 bis 90 Minuten nach Applikationsbeginn erfolgte eine möglichst präzise Probenentnahme aus allen vermessenen Arealen. An Gefrierschnitten dieser Proben wurden fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen durchgeführt und der histopathologische Befund erhoben.

Ergebnisse: Abb. 1 zeigt Fluoreszenz-spektren vor und nach Applikation von LipoRed™ an einem Tumorareal nach Normierung auf die Intensität bei 690 nm. Der rhodaminbedingte Signalzuwachs ist deutlich zu erkennen.

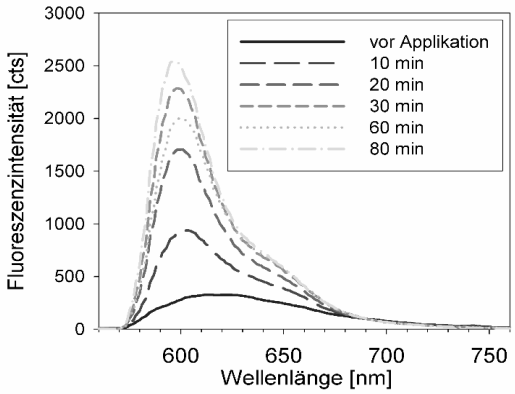


Abb. 1: Gewebefluoreszenz vor und nach Applikation Rhodamin-markierter Liposomen bei einem Harnblasentumor (pT1G3).

In Abb. 2 ist der relative Signalzuwachs, der in gutartigen und bösartigen Gewebearealen gemessen wurde gegenübergestellt. Der Trend einer deutlich stärkeren Rhodaminfluoreszenz aus Tumorarealen ist allerdings aufgrund der niedrigen Fallzahlen (4 Patienten, 15 Messpunkte) nicht statistisch signifikant.

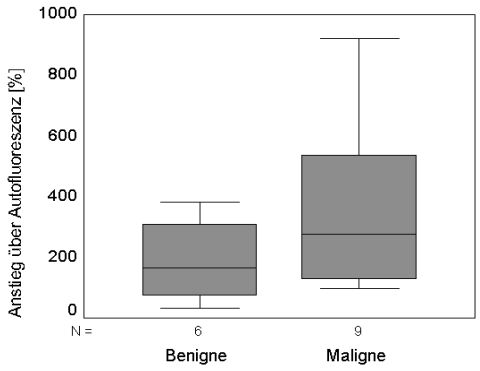


Abb. 2: Prozentualer, durch Rhodamin bedingter Anstieg der Fluoreszenzintensität bei 600 nm, 60 min nach Applikationsbeginn.

Das selektive Targeting von Tumorgefäßen zeigte sich auch eindrucksvoll in den fluoreszenzmikroskopisch untersuchten Gefrierschnitten.

Fazit: Die Untersuchungen sind ein erster Hinweis für eine tumorgefäßselektive Anreicherung kationischer Liposomen. Dies könnte diagnostisch und therapeutisch zukünftig von großer klinischer Bedeutung sein.

H. Stepp, O. Reich, R. Oberneder, R. Knüchel, B. Sauer, K. Bartelheim

Bestimmung optischer Gewebeeigenschaften in vivo: Messungen an Blasenwand und Gehirngewebe

Einführung: Für die klinische Anwendung der Photodynamischen Diagnostik und Therapie (PDD, PDT) spielt die effektive Eindringtiefe des Lichts eine entscheidende Rolle. Diese ist abhängig von der Wellenlänge des verwendeten Lichts und begrenzt das Gewebevolumen, welches untersucht bzw. behandelt wird. Daher ist es für eine verlässliche Beurteilung der angewendeten Methoden notwendig, die tatsächliche Eindringtiefe des Lichts und damit auch die optischen Eigenschaften des Gewebes zu kennen. Da es sich bei Gewebe um ein streuendes Medium handelt, kann man dessen optische Eigenschaften in guter Näherung durch zwei Parameter beschreiben: den Absorptionskoeffizienten μ_a und den reduzierten Streukoeffizienten μ_s'.

Material und Methoden: Zur Bestimmung der beiden gewebespezifischen Parameter wurden zwei unabhängige Messungen durchgeführt. Im ersten Schritt wurde die zu untersuchende Gewebestelle mit Weißlicht beleuchtet und das diffus zurückgestreute Licht spektral gemessen. Das so erhaltene Rückstreuvermögen ergibt das Verhältnis von μ_a zu μ_s'. Im zweiten Schritt wurde Licht mit einer bestimmter Wellenlänge (λ = 420-450nm, 532nm, und 635nm) über eine Lichtleitfaser punktuell eingestrahlt mit einer CCD-Kamera die Rückstreuung in Abhängigkeit vom seitlichen Abstand zur Faser vermessen (Abbildung 1). Dies geschah entweder direkt bei der offenen Operation (Gehirn) oder durch den Arbeitskanal eines Endoskops (Blasenwand). Zu dem Verhältnis μ_a / μ_s' wurden Monte-Carlo-Rechungen durchgeführt, an welche die gemessenen Rückstreuprofile angepaßt wurden. Der Fit der Kurve erfolgte über eine Anpassung der x-Achse (Abstand) und die y-Achse (Skalierungsfaktor) angepaßt. Das Ergebnis dieser Anpassung ergab die effektive Eindringtiefe als resultierenden Fitparameter, wodurch über das ermittelte Verhältnis μ_a / μ_s' der Absorptionskoeffizient und der reduzierte Streukoeffizient abgeleitet werden konnten.

Ergebnisse und Diskussion: Insgesamt wurden 12 Patienten in der Urologie und 11 Patienten in Neurochirurgie untersucht. Als wichtiger Parameter wurde in Abbildung 2 die effektiven Eindringtiefen für die drei Farben rot, grün und blau dargestellt.

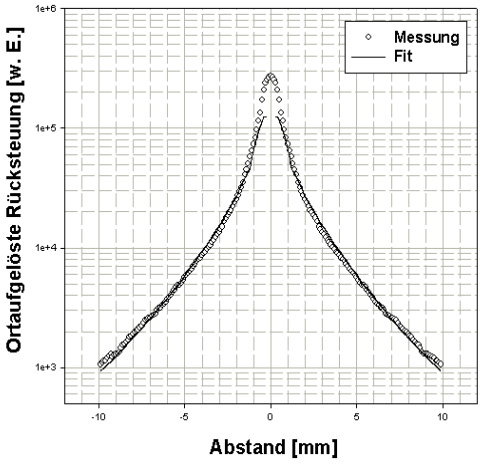


Abb. 1: Ortaufgelöste Rückstreuung in Abhängigkeit vom seitlichen Abstand zur Faser. Messung für punktuelle Beleuchtung mit λ=635nm an der Blasenwand. Das Rückstreuvermögen betrug 65% und die resultierende effektive Eindringtiefe war 8,1mm.

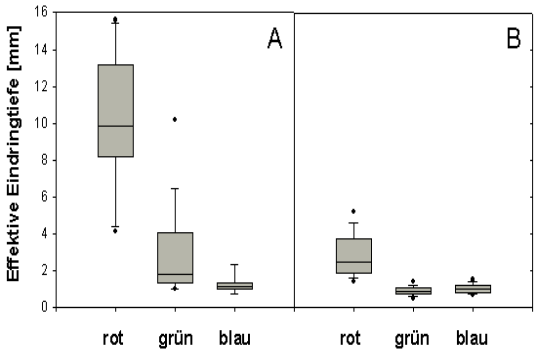


Abb. 2: Effektive Eindringtiefe von rotem, grünem und blauem Licht für die Blasenwand (A) und für Gehirngewebe (B).

Beide Gewebearten zeigen eine deutlich höhere Eindringtiefe für rot, als für grün und blau. Im Vergleich der beiden Gewebetypen untereinander zeigt sich, dass für alle drei Wellenlängen das Gehirngewebe eine um den Faktor 3 geringere Eindringtiefe aufweist als die Blasenwand.

T. Beck, **W. Beyer**, S. Wagner, **H. Stepp, T. Pongratz,** W. Stummer, R. Waidelich

Histopathologisches Korrelat der 5-ALA-induzierten Gewebefluoreszenz bei der Operation maligner Gliome

Einführung: Das maligne Gliom ist nach wie vor eine der Tumorentitäten mit einer quoad vitam sehr schlechten Prognose. In den vergangenen Jahrzehnten hat sich die Überlebenszeit und auch die Überlebensqualität durch die Einführung der Mikrochirurgie, verbesserte Bildgebung, engmaschige Nachsorge, Chemotherapie, sowie Fortschritten in der Radiotherapie entscheidend verbessert. Neue adjuvante Therapiemethoden, wie die Radioimmuntherapie und gentherapeutische Ansätze werden jedoch auch weiterhin auf eine vorausgehende größtmögliche Tumorzellreduktion angewiesen sein.

In diesem Kontext ist die von Stummer et al. 1998 erstmals beschriebene Methode der fluoreszenzgestützten Resektion zu sehen. Weitere Untersuchungen haben gezeigt, dass sich mit ihrer Hilfe eine chirurgisch bestmögliche Radikalität erzielen lässt, die selbst den strengen Kriterien der postoperativen MRT-Bildgebung standhält, diese möglicherweise bezüglich Sensitivität sogar übertrifft. Selbst gemessen an dem Goldstandard bei der Bewertung onkologischer Therapien, der Überlebenszeit, zeigt sich ein eindeutiger Nutzen dieser Methode.

Um die vielversprechende Methode besser zu definieren und ihre Chancen aber auch Grenzen zu erkennen, war es nötig, der PPIX-Fluoreszenz nach systematischer Gabe von 5-ALA mit etablierten Methoden der Neuropathologie zu analysieren. Im Rahmen dieser Arbeit wurde nach der Ursache für die inhomogene Fluoreszenzanreicherung im malignen Gliomgewebe auf der Basis histopathologischer und spektrographischer Analysen gesucht.

Material und Methoden: Im Rahmen der von Dezember 1995 bis Dezember 1998 in der Neurochirurgischen Klinik des Klinikums Großhadern durchgeführten Phase-I/II-Studie wurden bei 52 Patienten mit malignen Gliomen 264 Biopsien aus dem Tumorandbereich entnommen. Der intraoperative Fluoreszenzeindruck wurde dokumentiert und die Biopsien anschließend in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und Gefrierschnitte in Serie angefertigt. Hierbei wurde der erste Schnitt einer Serie für die neuropathologische Routinediagnostik HE gefärbt. Die Quantifizierung der PPIX-Fluoreszenz erfolgte mit Hilfe eines Spektrometers. Nach spektroskopischer Analyse wurde im selben Schnitt die proliferative Aktivität festgestellt. Dabei bedienten wir uns des monoklonalen Antikörpers MIB-1, welcher selektiv gegen das Ki-67 Antigen gerichtet ist. Hierbei handelt es sich um ein Zellkernprotein, das in allen aktiven Zellzyklusphasen (G1, S, G2) exprimiert wird. Durch Division der Anzahl aller Mib-1-markierten Zellkerne durch die Anzahl aller Zellkerne pro Flächeneinheit lässt sich ein Färbeindex errechnen, welcher die proliferative Aktivität des Gewebes widerspiegelt.

In einem weiteren Gefrierschnitt der Serie wurde die Neovaskularisation quantifiziert. Hierzu wurde der monoklonalen Mausantikörper JC/70A der Firma Dako verwendet. Ein spezifisches Charakteristikum dieses Antikörpers ist seine starke Reaktivität mit auf CD31 von Endothelzellen in normalem Gewebe und gutartigen sowie bösartigen Proliferationen. Im Hirngewebe und auch im Gewebe maligner Gliome gelingt mit seiner Hilfe ein hochselektiver Nachweis von Kapillaren und Kapillarproliferation**.** Die quantitative Auswertung der immunhistochemischen Färbungen erfolgte mit Hilfe eines Bildverarbeitungssystems. Damit war sowohl eine exakte Unterscheidung zwischen markierten und unmarkierten Zellkernen möglich als auch eine Bestimmung der Tumorzelldichte im selben Schnitt.

Ergebnisse: Primäres Ziel der Untersuchung war der Nachweis von Sensitivität und Spezifität von PPIX im Gehirngewebe. Die Ergebnisse sind in Tab. 1 gezeigt. 211 Biopsien zeigten eine makroskopische Fluoreszenz und ebenfalls eine histologische Tumormanifestation. 26 Biopsien zeigten normales Hirngewebe ohne Fluoreszenz. Andererseits konnten in 26 nichtfluoreszierenden Biopsien Tumorzellen nachgewiesen werden. Von denn 26 Gewebeproben mit positivem Tumornachweis zeigten 21 (81%) diffus infiltrierende Tumorzellen niedriger Zelldichte, während 5 (9%) soliden Tumor zeigten. Eine Probe erwies sich als falsch positiv, aus den Daten lässt sich somit eine spezifität von 96% bei eingeschränkter Sensitivität, insbesondere bei infiltrierendem Tumor geringer Zelldichte errechnet.

	Fl. +	Fl. –
Tumor +	211/264 (79,9%)	26/264 (9,9%)
Tumor –	1/264 (0,4%)	26/264 (9,9%)

Tab. 1: Verteilung der Biopsien bezüglich Fluoreszenzeindruck und histologischem Tumornachweis

Es konnte festgestellt werden, dass sich die Fluoreszenzanreicherung anaplastischer Astrozytome nicht wesentlich von jener der Glioblastome unterscheidet. Des weiteren konnte gezeigt werden, dass der Grad der PPIX-Akkumulation signifikant von der Höhe der Zelldichte, der Höhe des MIB-1-Färbeindex und dem Grad der Neovaskularisation (Abb. 1) abhängt.

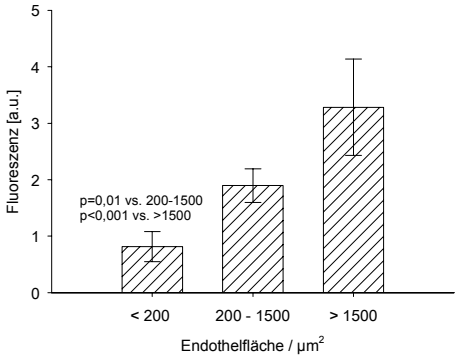


Abb. 1: Einfluss der Kapillardichte, dargestellt als Endothelfläche in µm² pro Gesichtsfeld auf die spektrographische Fluoreszenzanreicherung. Messwerte als MW ± SEM angegeben („<200“: n=34, „200-1500“: n=84, „>1500“: n=36); Endothelflächen von 200 bzw. 1500 µm² / HPF entsprechen der 25er bzw. 75er Perzentile der empirischen Verteilung.

Hierbei schien die proliferative Aktivität und die Zelldichte des Tumorgewebes von besonderer Bedeutung für die Fluoreszenzanreicherung zu sein (Abb. 2).

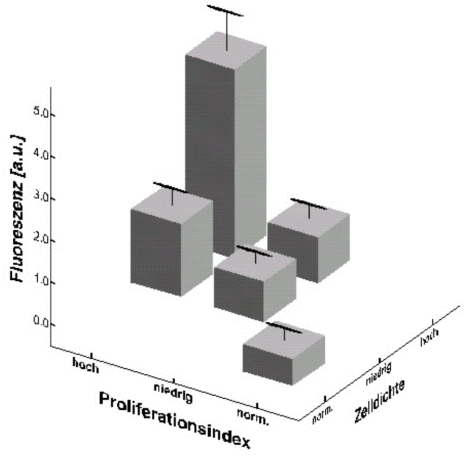


Abb. 2: PPIX-Fluoreszenzanreicherung in Abhängigkeit von der proliferativen Aktivität und der Zelldichte.

Durch den Nachweis einer spektrographisch stärkeren Fluoreszenz bei der Gabe von 20 mg/kg KG 5-ALA statt 10 mg/kg KG konnte der subjektive Eindruck einer besseren Fluoreszenzausbeute objektiviert werden (Abb. 3).

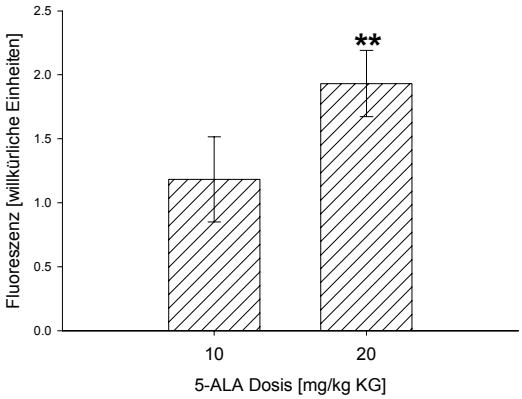


Abb. 3: Spektrographische PPIX-Anreicherung in Abhängigkeit von der applizierten 5-ALA-Dosis angegeben in mg/kg KG.

Die Methode war hochspezifisch, was eine ausreichende Schonung des Normalgewebes bei der Resektion gewährleistete. Im Bereich infiltrierenden Tumorgewebes mit geringer Zelldichte fand die Methode ihre Grenzen.

Schlussfolgerung: Die Detektion malignen Gliomgewebes durch 5-ALA-induziertes PPIX ist eine hochspezifische Methode, was eine größtmögliche Schonung gesunden Hirngewebes gewährleistet.

Die Fluoreszenzanreicherung ist in soliden Tumorrandbereichen besonders ausgeprägt; diese Areale können vom Operateur makroskopisch gut identifiziert und sicher entfernt werden.

Die Blut-Hirnschrankenstörung, im Bereich extensiver Neovaskularisation besonders ausgeprägt, ist nicht allein für die Porphyrinanreicherung im malignen Gliom bedeutend.

Die spektrographischen Untersuchungen bestätigten den makroskopischen Eindruck einer intensiveren Fluoreszenz bei Dosissteigerung von 10 auf 20 mg/kg KG 5-ALA.

A. Novotny, W. Stummer, K. Bise, **S. Stocker**, S. Wagner

Photodynamische Therapie experimenteller maligner Gliome mit 5-ALA-induziertem Protoporphyrin IX

Einführung: Unter den Tumoren des zentralen Nervensystems weisen die der malignen Gliome, eine sehr schlechte Prognose auf. Diese Tumoren reichern nach Gabe von 5-Aminolävulinsäure (5 ALA) selektiv fluoreszierendes Protoporphyrin IX (PPIX) an. Dies wird bereits mit gutem Erfolg und ohne wesentliche Nebenwirkungen zur intraoperativen Darstellung des Tumorrandes verwendet. Sie erlaubt eine fluoreszenzgestützte Resektion maligner Areale mit einer höheren Radikalität verglichen zur konventionellen Weißlichtresektion. Trotzdem ist eine vollständige Tumorentfernung wegen der weitläufigen Infiltration des umliegenden Normalgewebes meist nicht ohne das Risiko zusätzlicher neurologischer Ausfälle möglich. Da PPIX auch phototoxische Eigenschaften besitzt, wurde der Möglichkeit nachgegangen, verbleibendes Tumorgewebe durch Bestrahlung mit Laserlicht geeigneter Wellenlänge selektiv zu zerstören. Eine erste Versuchsreihe diente dem Ausschluss einer schädigenden Wirkung der photodynamischen Therapie (PDT) mit 5-ALA auf normales und ödematöses Hirngewebe. Weitere Versuche anhand eines C6-Gliommodells in der Ratte sollten klären, ob sich im Tierversuch eine selektive Tumorzerstörung erzielen lässt.

Material und Methoden: Männliche Wistar-Ratten wurden unter Isoflurannarkose kraniotomiert und den folgenden Gruppen zugeordnet.

1. Ausschließlich cortikale Laserbestrahlung (Arrgon-Laser-gepumpter Farbstofflaser, 635 nm, 100 mW/cm², 200 J/cm²).
2. Laserbestrahlung des Cortex sechs Stunden nach intravenöser Applikation von 5-ALA (100 mg/kg Körpergewicht).
3. Laserbestrahlung des Cortex sechs Stunden nach 5-ALA-Applikation und drei Stunden nach Setzen einer cortikalen Kälteläsion (zur Induktion eines Hirnödems)
4. Laserbestrahlung des Cortex sechs Stunden nach intravenöser Gabe von Photofrin II (630 nm, 5 mg/kg Körpergewicht).

Zur Tumorinduktion wurden 10^5 C6-Gliomzellen stereotaktisch in die Hirne von Ratten inokuliert. Am neunten Tag nach Inokulation wurde den Tieren nach MRT-Kontrolle des Tumorwachstums 5-ALA (100 mg/kg KG) i.v. verabreicht und die Gehirne drei bzw. sechs Stunden später bestrahlt (635 nm, 100 mW/cm², 100 J/cm²).

72 Stunden nach Laserbestrahlung wurden die Gehirne entnommen und histologisch untersucht.

Ergebnisse: Laserbestrahlung nach Gabe von 5-ALA hinterließ oberflächliche Läsionen von weniger als 0,5 mm Tiefe, die sich nicht von denen durch alleinige Laserbestrahlung unterschieden. Demgegenüber – wie auch gegenüber der isolierten Kälteläsion – induzierte die Laserbestrahlung nach 5-ALA-Gabe auf dem Boden einer Kälteläsion signifikant tiefere Schäden (Mittelwert 0,82 mm). Die mit Abstand tiefsten Läsionen von fast 2 mm Tiefe wurden bei Laserbestrahlung nach Gabe des Photosensibilisators Photofrin® beobachtet.

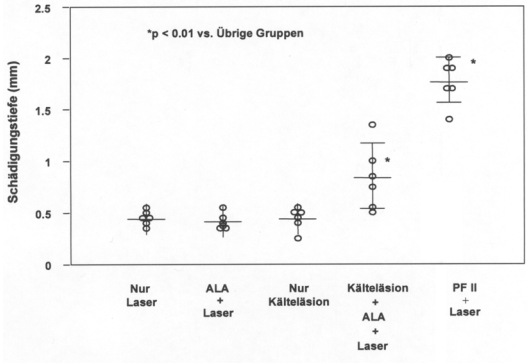


Abb. 1: Tiefe der Läsionen (Mittelwert und Standardabweichung) an nicht tumortragenden Rattenhirnen

Die jeweiligen Ausdehnungen der photodynamischen Schädigung an tumortragenden Rattenhirnen stimmten mit dem Areal der Kontrastmittelaufnahme in den vor der Behandlung angefertigten MRTs überein.

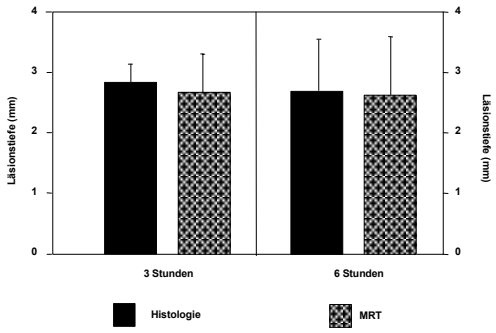


Abb. 2: Mittelwert und Standardabweichung der Läsionstiefen an C6-Gliomen, die 3 bzw. 6 Stunden nach 5-ALA-Gabe mit Laserlicht bestrahlt wurden, sowie der Tiefe der Kontrastmittelaufnahme in den zugehörigen MRTs.

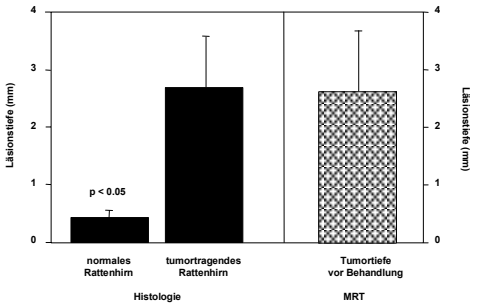


Abb. 3: Mittelwert und Standardabweichungen der Läsionstiefen an C6-Gliomen und der Tiefe der Kontrastmittelaufnahme in den zugehörigen MRTs für3 bzw.6 Stunden nach 5-ALA-Gabe mit Laserlicht bestrahlten Gruppen zusammengefasst. Dazu im Vergleich die Läsionstiefen am normalen Rattenhirn.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass am normalen Rattenhirn durch die Photodynamische Therapie mit 5-ALA-induziertem PPIX kein nennenswerter Schaden entsteht. Für ödematöses Hirngewebe wurde eine leichte Photosensibilisierung beobachtet, die für die klinische Situation kaum von Bedeutung sein dürfte. Für den bereits klinisch verwendeten Photosensibilisator Photofrin II wurden in den vorliegenden Experimenten signifikant höhere Schäden an normalem Hirngewebe beobachtet. Im Hinblick auf Sicherheit gegen Schädigung von Normalgewebe ergibt sich also ein deutlicher Vorteil von 5-ALA gegenüber Photofrin II. Eine klinische Erprobung der PDT mit 5-ALA-induziertem PPIX in der Therapie maligner Gliome ist vertretbar.

Im C6-Gliommodell konnte eine selektive Tumorzerstörung unter Schonung von Normalgewebe erreicht werden. Wie aufgrund des Fluoreszenzverteilung von C6-Gliomen nach 5-ALA-Applikation zu erwarten, war diese in den meisten Fällen nicht vollständig. Vergleicht man jedoch die Fluoreszenzverteilung von C6-Gliomen und humanen Gliomen, sind für die klinische Anwendung bessere Resultate zu erwarten.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie, sowie der positiven klinischen Erfahrungen mit der fluoreszenzgesteuerten Resektion maligner Gliome mit 5-ALA-induziertem PPIX hinsichtlich Nebenwirkungen und Spezifität der Anreicherung, sind nun klinische Studien wünschenswert. Als adjuvante Therapieform nach fluoreszenzgesteuerter Resektion maligner Gliome, sowie in der gezielten Behandlung fluoreszierender Tumorreste, die der chirurgischen Entfernung aufgrund ihrer Lokalisation nicht zugänglich sind, könnte die photodynamische Therapie mit 5-ALA-induziertem PPIX einen Fortschritt für die medizinische Handhabung maligner Gliome bedeuten.

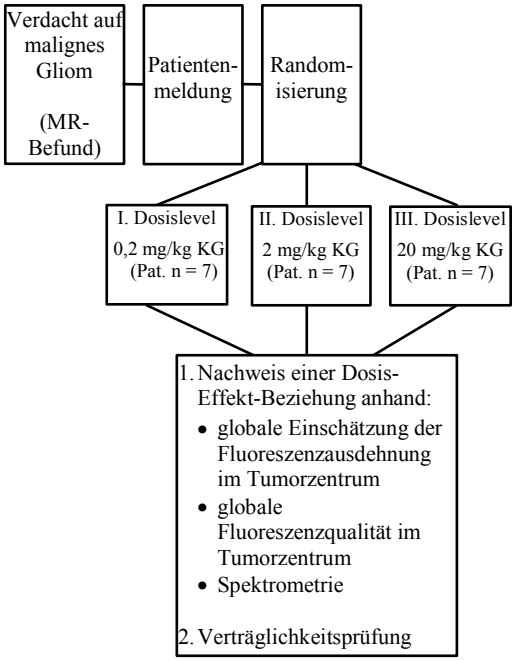
B. Olzovy, K. Bise, **T. Pongratz**, **S. Stocker**, W. Stummer

Klinische Studien zur Behandlung des malignen Glioms mit 5-ALA

Die fluoreszenzgeführte Resektion des malignen Glioms mithilfe der Protoporphyrin-IX-Fluoreszenz (PPIX) nach oraler Gabe von 5-ALA hat nach erfolgreich abgeschlossenen experimentellen Untersuchungen Einzug in die Klinik gehalten. Mehrere Studien sind auf den Weg gebracht um eine Zulassung von 5-ALA in der Neurochirurgie zu erreichen. Der aktuelle Stand wir im Folgenden zusammengefasst.

Klinische Phase-I-Studie

Bei dieser an 21 Patienten durchgeführten monozentrischen Studie wurde bei Gruppen von je 7 Patienten die 5-ALA Dosis in absteigender Reihe von 20 mg/kg KG zu 2 mg/kg KG und 0,2 mg/kg KG appliziert. Der Studienplan dieser randomisierten doppelblinden 3-armigen Studie ist in der folgenden Abbildung gezeigt.



Klinische Phase-II-Studie

Im Rahmen des Zulassungsverfahrens neu begonnen wurde eine multizentrische, konfirmatorische Phase-II-Studie zur fluoreszenzgestützten Resektion maligner Gliome, die unter der Leitung der Neurochirurgischen Klinik in enger Zusammenarbeit mit dem LFL stattfindet. An der Untersuchung nehmen neben dem Klinikum Großhadern auch die Universitätsklinika Essen und Regensburg teil. Bei dieser Untersuchung wird besonderes Augenmerk auf die Spezifität der Fluoreszenz gelegt, die im Randbereich der Resektionshöhle maligner Gliome nach Gabe von 5-ALA beobachtet wird und für die Verbesserung der Resektion herangezogen wird. Zur Bewertung wird die Fluoreszenzspektroskopie eingesetzt und die Daten mit dem makroskopischen Fluoreszenzeindruck und der Histopathologie korreliert. Das zweite Augenmerk ist auf mögliche Substanznebenwirkungen gerichtet. Inzwischen sind 8 von geplanten 30 Patienten rekrutiert.

Klinische Phase-III-Studie

Bei dieser Studie, deren Teilnehmer in der Abbildung auf der folgenden Seite aufgeführt sind, handelt es sich um eine zweiarmige prospektiv-randomisierte Studie mit dem primären Ziel, den Anteil der Patienten mit ursprünglich malignem Gliom festzustellen, der nach fluoreszenzgestützter Resektion verglichen zur konventionellen Tumorentfernung im frühen postoperativen Kernspintomogramm keinen Resttumor mehr aufweist.

Gegenwärtig sind 320 Patienten in die Studie randomisiert. Damit sind alle für eine Zwischenauswertung notwendigen Patienten erfasst. Das Ergebnis der Zwischenauswertung wird nach 6 Monaten Nachbeobachtungszeit zur Verfügung stehen. Die Überwachung sicherheitsrelevanter Parameter hat bislang kein höheres Risiko für Patienten erkennen lassen, die mit der Technik der fluoreszenzgestützten Resektion nach Gabe von 5-ALA operiert wurden.

Klinische Phase-I/II-Studie (PDT)

Neben den Fluoreszenzeigenschaften von PPIX zur visuellen Unterstützung bei der Resektion des malignen Glioms wird zukünftig auch die photodynamische Wirkung im Hinblick auf eine Therapie nicht entfernbarer Tumorreste bzw. den diffus infiltrierenden Tumorzellen untersucht. Dazu wurde eine Phase-I/II–Studie begonnen. Im Rahmen einer Dosiseskalation werden zunächst sequentiell steigende Lichtmengen (100 - 150 - 200 J/cm^2) zur Aktivierung des PPIX im fluoreszierenden makroskopisch erkennbaren Resttumoren eingesetzt, um gegebenenfalls eine effektlimitierende Lichtmenge zu ermitteln. Die Tumore werden dabei intraoperativ mithilfe einer fasergekoppelten Mikrolinse gezielt fokal bestrahlt. Biopsien werden vor und nach der PDT entnommen, um mithilfe der Elektronenmikroskopie erste Hinweise einer Wirksamkeit zu ermitteln. Diese Untersuchungen werden in Kooperation mit dem pathologischen Institut der Universität

Regensburg vorgenommen (Prof. Knüchel, Dr. Schröder). Zusätzlich werden Patienten engmaschig klinisch und durch Kernspintomographie untersucht, um Wirkungen und v.a. Nebenwirkungen zu erfassen. Inzwischen wurde die erste Dosisstufe (100 J/cm^2) mit 7 Patienten abgeschlossen. 4 weitere Patienten wurden innerhalb der zweiten Dosisstufe (150 J/cm^2) behandelt. Spezifische Nebenwirkungen wurden bislang nicht beobachtet.

Aufbauend auf dieser Dosiseskalationsstudie werden in einem zweiten Schritt die nach Resektion verbleibenden Tumorhöhlen integral bestrahlt.

Die Studie wird durch die Deutsche Krebshilfe unterstützt (Förderkennzeichen: 70-2864-St).

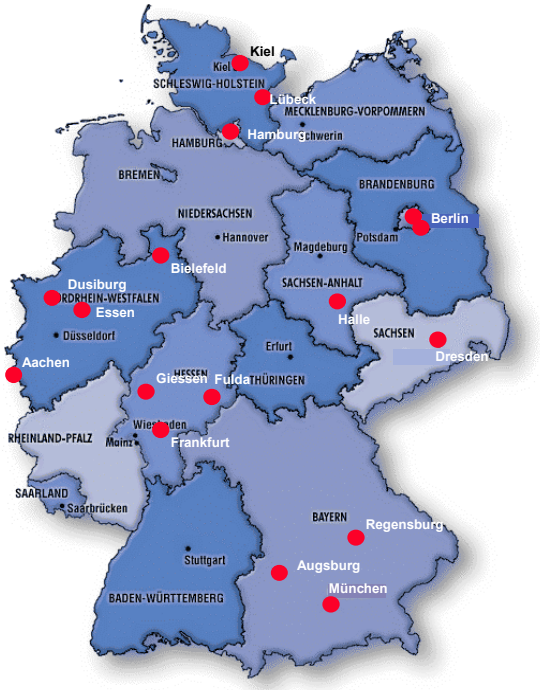
W. Stummer, **T. Beck**, **W. Beyer**, **Th. Pongratz**, C. Goetz, J. Mehrkens

Teilnehmer Phase III ALA -Studie

- Medizinische Einrichtung RWTH Aachen
- Zentralklinikum Augsburg
- Charité HU Campus Virchow Berlin
- Universitätsklinikum Benjamin-Franklin Berlin
- Universitätsklinikum Essen
- Neurochirurgische Klinik Giessen
- Krankenanstalten Gilead gGmbH Bielefeld
- JWG Universitätsklinikum Frankfurt
- Technisches Universitätsklinikum Dresden
- Klinikum Duisburg gGmbH
- Universitätsklinik Hamburg-Eppendorf
- Bergmannstrost Krankenhaus (BG) Halle
- Universitätsklinikum Kiel
- Medizinische Universität zu Lübeck
- LMU Universitätsklinik Großhadern München
- Klinikum der Universität Regensburg
- Klinikum Saarbrücken

Referenzzentren

- Institut für Neuropathologie, Universitäts-kliniken Bonn
- Neuroradiologie, Klinikum der J.-W. Goethe Universität Frankfurt



Präklinische und klinische Evaluierung radioaktiv markierter Tenascin-Antikörper zur adjuvanten lokoregionalen Endoradiotherapie von Gliomen (Radioimmuntherapie)

Die Prognose maligner Gliome hat sich in den letzten 20 Jahren trotz multipler neuer Therapieansätze nicht wesentlich verbessert. Die derzeitige Standardtherapie besteht in Operation und Bestrahlung, bei jüngeren Patienten auch Chemotherapie. Darunter beträgt die mittlere Überlebenszeit für anaplastische Astrozytome 3,1 Jahre und für Glioblastome 1,1 Jahre. Mehr als 80% der Tumorrezidive entstehen in enger Nachbarschaft zum Primärtumor. Ursache hierfür sind kleinste Tumorreste, die intraoperativ nicht zu erkennen und resistent gegen strahlentherapeutische Maßnahmen sind. Eine Therapie, die in der Lage ist, tumorizide Substanzen an den Ort der Rezidiventstehung bzw. des Tumorrestes zu bringen, würde einen wesentlichen Erfolg in der Behandlung dieser Tumore darstellen. Bei der Radioimmuntherapie (RIT) werden radioaktiv markierte monoklonale Antikörper appliziert, welche gegen Antigene von Tumorzellen gerichtet sind. Als geeignetes Zielantigen stellt sich Tenascin dar, ein hochmolekulares, polymorphes Glykoprotein der extrazellulären Matrix, da es auf über 90% aller Gliome exprimiert wird. Sowohl in unserer Arbeitsgruppe als auch in anderen Zentren konnten bisher positive Ergebnisse mit dieser Therapieform erzielt werden. Bei der lokoregionalen RIT wird nach der Operation in die Tumorhöhle ein Katheter mit einem subgalealen Reservoir implantiert. Über dieses Reservoir kann das Therapeutikum injiziert werden, außerdem kann über das Reservoir Flüssigkeit zu diagnostischen Zwecken entnommen werden. Dieses Verfahren wird bereits seit einigen Jahren von verschiedenen Arbeitsgruppen mit spezifischen oder unspezifischen intakten Antikörpern angewandt. Dabei können vor allem sehr hohe Dosen erzielt werden, während Nebenwirkungen nur sehr selten beschrieben sind.

In Abb. 1 sind die Überlebenskurven zweier Gruppen von Patienten gezeigt, die hier im Klinikum seit 1999 zum einen konventionell und zum anderen zusätzlich mit der Radioimmuntherapie behandelt wurden. Aus der Kurve wird die signifikant verbesserte Überlebenszeit deutlich.

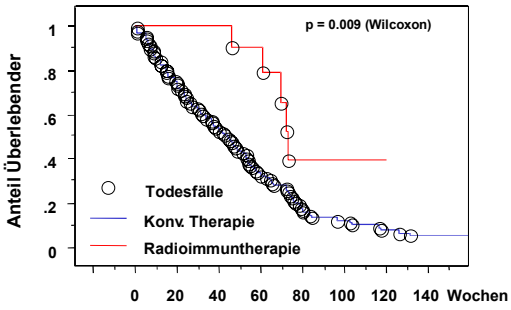


Abb. 1: Vergleich der Überlebenskurven zweier Patientenkollektive, die zum einen nach der konventionellen Therapie (Operation und Strahlentherapie) und zum anderen zusätzlich mit einer Radioimmuntherapie (Operation, Strahlentherapie und Radioimmuntherapie) behandelt wurden.

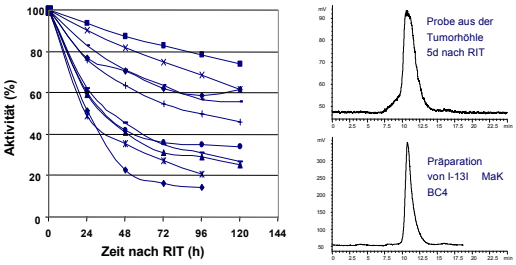
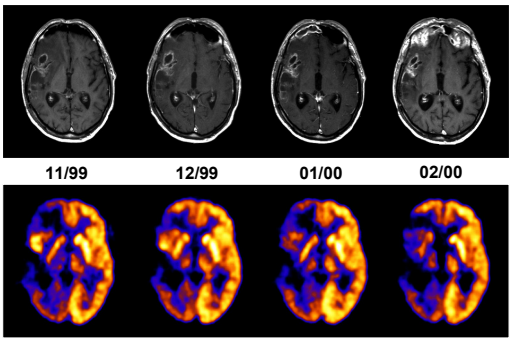


Abb. 2: Effektive Halbwertszeiten des Radioimmunkonjugats in der Tumorhöhle von Patienten (links) und ein HPLC-Chromatogramme des Radioimmunkonjugats vor Applikation und 5 d nach Applikation (Liquorprobe aus der Resektionshöhle).

Mit der Bestimmung der effektiven Halbwertszeit in der Tumorhöhle konnte zudem ein weiterer prognostischer Faktor gefunden werden, der mit der Überlebensrate korreliert. In Abb. 2 ist die Verweildauer der Radioaktivität in der Tumorhöhle aufgetragen, wobei für Werte >3,5 d eine deutliche Verlängerung der Überlebenszeit abgeleitet werden konnte, während dies für effektive Halbwertszeiten <3,0 d nicht zutrifft. Die molekulare Integrität des markierten Antikörpers wurde durch wiederholte Entnahme von Liquorflüssigkeit und anschließender Chromatographie nachgewiesen. Die weiteren Untersuchungen und Kontrolle der Patienten wird mit der Magnetresonanztomographie (MRT) und der Positronenemissionstomographie (PET) bezüglich des Glukose- (F-18 FDG) und Aminosäurestoffwechsels (F-18 FET) durchgeführt (Abb. 3).



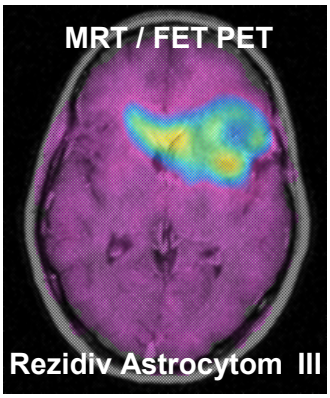


Abb. 3: Beispiel eines Patienten mit Glioblastom: Tumorrest nach Operation und Radiatio (11/99) mit partieller Remission unter RIT (4 Zyklen). MRT und FDG-PET (Glucose-Stoffwechsel) im Verlauf. Daneben ein Patient mit rezidivierendem Astrocytom Grad III im fusionierten MRT/FET-PET (Aminosäure-Stoffwechsel).

Neben den intakten Antikörpern (Ak) stehen in der Arbeitsgruppe auch Fragmente zur Verfügung, die ebenfalls hinsichtlich ihrer pharmakokinetischen Eigenschaften untersucht werden. Aus der systemischen RIT ist bekannt, dass durch die Verwendung von Antikörper-Fragmenten ein höheres Tumor/Nicht-Tumor-Verhältnis erzielt werden kann. Allerdings ist dabei der Uptake der Fragmente gegenüber intakten Antikörpern niedriger. Im Vergleich zu intakten Antikörpern zeigen Fragmente wie $(F(ab')_2$, Fab oder single-chain Fv) allerdings ein schnelleres und homogeneres Anreicherungsverhalten in normalem und Tumorgewebe. Da bei der lokoregionalen Applikation eine hohe Gewebsaufnahme sichergestellt ist, gewinnt die Frage nach der Penetrationstiefe der Radioimmunkonjugate eine größere Bedeutung. Dies um so mehr, da ca. 95% aller Rezidive in unmittelbarer Nachbarschaft zum Primärtumor entstehen. Bei einer erfolgreichen Therapie kommt es also darauf an, einen möglichst großen Bereich abzudecken. Daher wurde mit [I-125]Iod-markierten Ak und Fab im C6-Modell der Ratte die Ausbreitung nach lokaler Applikation in einen intakten Tumor und nach Resektion in die Tumorhöhle mittels Autoradiographie bestimmt. Die Korrelation zur Morphologie wurde durch Bildfusion mit HE-gefärbten Nachbarschniten durchgeführt (Abb. 4). Nach Implantation (10^5 C6-Gliomzellen) und MRT-Kontrolle des Tumorwachstums in Wistar-Ratten wurden 9 d nach Implantation Iod-125-markierte Tenascin-Antikörper (TN-Ak) und Tenascin-Fragmente (TN-Fab) appliziert. Bei zwei Gruppen erfolgte stereotaktisch eine intratumorale Applikation, bei zwei weiteren eine Injektion in die Höhle des am Tag zuvor reserzierten Tumors. Bei intratumoraler Applikation stellte sich im Vergleich zwischen TN-Ak und TN-Fab heraus, dass zu jedem einzelnen Zeitpunkt bzgl. der Strecke, Fläche und Durchmesser ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Proteinformen besteht, der am deutlichsten 24 h p.i. ausfällt ($p<0,001$). Die mittlere Ausbreitungsgeschwindigkeit betrug beim TN-Ak 0,27±0,08 mm/h und beim TN-Fab 0,41±0,07 mm/h. In der Varianzanalyse zeigt sich, dass die Zeitabhängigkeit in Bezug auf Strecke und Durchmesser signifikant ist ($p<0,05$), aber nicht bezüglich der Fläche ($p=0,37$). Nach Resektion des Tumors beträgt die Ausbreitungsstrecke in das Gewebe 24 h p.i. beim TN-Fab 3,38±0,14 mm und beim TN-Ak 2,64±0,09 mm ($p<0,05$) (Abb. 5). Bei intratumoraler Applikation breitet sich der TN-Fab also weiter und schneller aus als der TN-Ak. Dieser Effekt ist nach Resektion nicht mehr so deutlich. Das lässt bei vorhandenem Tumor auf einen verstärkten Abstrom (höherer Druck im Extrazellularraum) schließen, der primär die Ausbreitung bestimmt. Wahrscheinlich sind nach Resektion die Druckverhältnisse wieder normalisiert und jetzt könnte der mehr diffusionsabhängige Anteil den Stofftransport dominieren. Hierbei würde sich dann der größere Diffusionskoeffizient der Fab auswirken.

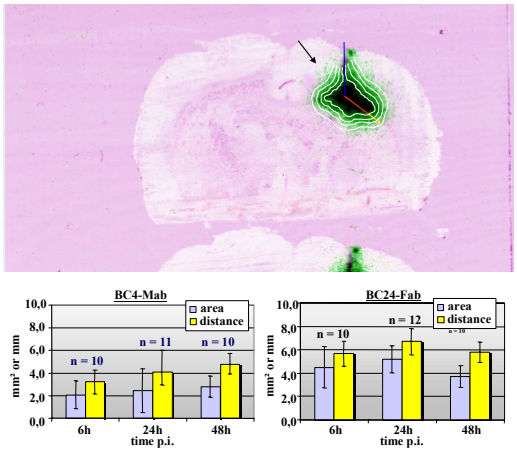


Abb. 4: Ausbreitung von [I-125]Iod-markiertem TN-Ak im Rattenmodell nach Applikation in den intakten Tumor. Bildfusion von HE-gefärbten Schnitten und der Autoradiographie (links). Bestimmung von Ausbreitungsfläche und -strecke (rechts)

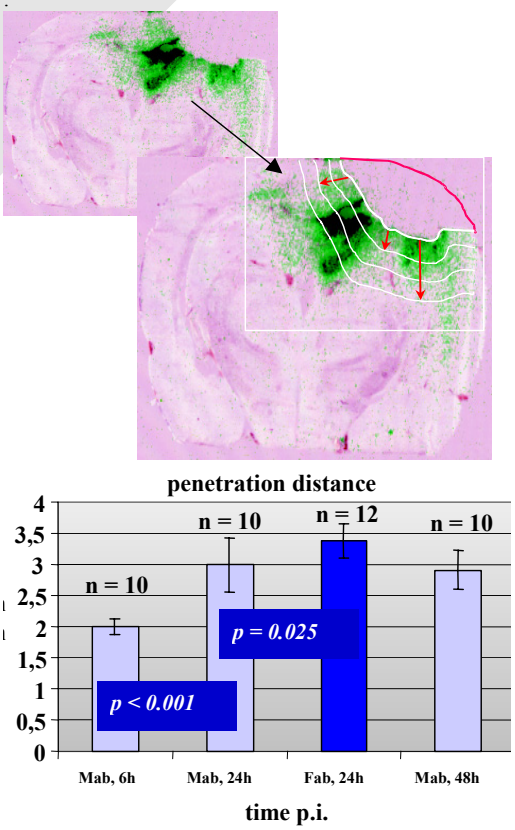


Abb. 5: Ausbreitung von [I-125]Iod-markiertem TN-Ak im Rattenmodell nach Applikation in die Resektionshöhle. Bildfusion von HE-gefärbten Schnitten und der Autoradiographie (links). Bestimmung von Ausbreitungsfläche und -strecke (rechts).

In den letzten Jahren hat die Radioimmuntherapie durch den Einsatz von Iod-131-, Rhenium-186/188- bzw. Yttrium-90-markierter Antikörper als adjuvante Tumortherapie neue Hoffnungen geweckt. So wurden erste positive Ergebnisse u.a. bei der Behandlung von Lymphomen, bei der Rezidivbehandlung von malignen Gliomen und bei HNO-Tumoren erzielt. Die Direktmarkierung monoklonaler Antikörper mit [I-131]Iod und [Re-188]Rhenium oder über verschiedene chelatisierende Gruppen mit Metallen wie z.B. [Y-90]Yttrium, [Re-186/188]Rhenium oder [Cu-64]Kupfer eröffnete die Möglichkeit, diese Substanzen für die Radioimmuntherapie einzusetzen. Ein Vorteil metallischer Nuklide ergibt sich u.a. aus der Tatsache, dass man Strahler mit einer höheren therapeutisch nutzbaren ß⁻-Energie einsetzen kann. So könnte mit dem Isotop [Re-188]Rhenium, dessen Halbwertszeit von 0,7 d im Vergleich zu [^{131}I]Iod mit einer Halbwertszeit von 8,0 d deutlich kürzer ist, das aber andererseits eine höhere mittlere ß⁻-Energie von 0,76 MeV im Vergleich zu 0,18 MeV beim [I-131]Iod aufweist, wesentlich höhere Dosisleistungen und eine um den Faktor 3-4 größere mittlere Reichweite im Gewebe erzielt werden. Weiterhin eignet sich die begleitende γ-Emission von 155 keV zur Bildgebung für eine begleitende Dosimetrie, während dies bei der höher energetischen γ-Komponente von [I-131]Iod (364 keV) erschwert wird. Dies und die bessere Verfügbarkeit des [Re-188]Rhenium als trägerfreies Generatornuklid könnten die therapeutischen Möglichkeiten einer Radioimmuntherapie deutlich verbessern. Im Tierversuch mit einem [Re-188]Rhenium-direktmarkierten Antikörper zeigten sich nach systemischer Applikation keinerlei toxische Effekte und es konnten Tumor-zu-Hirngewebe-Verhältnisse von 5,2 (2 h p.i.) bis zu 16,4 (96 h p.i.) ermittelt werden. Aufgrund der vorliegenden Daten wurde eine entsprechende klinische Phase-I/II-Studie bei den Aufsichtsbehörden (BfS, BfArM) beantragt. In Kooperation mit dem Arbeitskreis Prof. Klüfers (Bioanorganische und Koordinations-Chemie, Department Chemie der LMU) konnte ein neuer Chelatbildner charakterisiert werden, der es erlaubt, über Kohlenhydratreste im Protein das [Re-188]Rhenium stabil zu komplexieren. Mit der Einführung chelatisierender Gruppen wird eine größere Stabilität und eine höhere Bioverfügbarkeit der Radioimmunkonjugate erreicht.

F.J. Gildehaus**,** W. Rachinger, M. Decker**, S. Stocker**, C. Goetz, G. Pöpperl, K. Bise, K. Tatsch, H.J. Reulen, C.J. Tonn

Endolaryngeale Laserchirurgie der juvenilen Larynxpapillomatose mit einem neuen Lichtwellenleiter-Führungssystem

Die rezidivierende respiratorische Papillomatose ist die häufigste Raumforderung des Larynx im Kindesalter. Da sie eine Verbreitungstendenz über den ganzen Respirationtrakt aufweist und häufig rezidiviert, liegt bei dieser Erkrankung eine potentielle Morbidität vor. Ein Therapieansatz der Papillomatose liegt in der wiederholten Lasertherapie. Neben der CO_2-Lasertherapie ist gerade bei Rezidiven in der Trachea eine unblutige und nicht ablative Behandlung mit dem Nd:YAG-Laser erfolgsversprechend. Um diese zu verbessern, wurde ein neuartiges Lichtwellenleiter-Führungssystem mit integrierter Absaugvorrichtung entwickelt, das die lasergestützte Therapie im Larynxbereich erleichtert.

Die Ansprüche an das Lichtwellenleiter-Führungssystem bestanden in einem ausreichend langen Faserleitungssystem mit flexibler Beweglichkeit des distalen Lichtwellenleiterendes über einen Bereich von –5° bis 45° und der implementierten Absaugung von Rauch und Pyrolyseprodukten. Mit einem Prototypen wurden klinische Laserbehandlungen der Larynx- und Trachealpapillomatose in Intubationsnarkose durchgeführt. Bisher wurden 5 Patienten (Alter zw. 3 und 9 J) mit einem Nd:YAG-Laser (λ=1064nm, 10W) in Rezidivsituationen behandelt.

Abb. 1: Lichtwellenleiter-Führungssystem zur Behandlung von distal gelegenen Bereichen des Respirationstraktes

Aufgrund der Länge und der distalen Abwinkelungsmöglichkeit des Handstückes (Lichtverlust weniger als 10%!), konnte die Larynxpapillomatose problemlos mit einem Nd:YAG-Laser behandelt werden. Die Absaugvorrichtung sorgte für einen freien Blick auf das Operationsfeld und minimierte die Belastung von Patient und Arzt. Die Laserbehandlung mit dem Gerät ist präzise und damit wenig traumatisch. Die klinischen Ergebnisse nach einem Follow-up von 1 Jahr zeigten einen Rückgang der Rezidive der Larynxpapillomatose.

Zusammenfassend, wird durch das neuartige Lichtwellenleiter-Führungssystem eine wirkungsvolle und präzise operative Therapie der Larynxpapillomatose auch mit Laserstrahlung von Nd:YAG-, Dioden- und KTP-Lasern ermöglicht.

P. Janda, **R. Sroka**, G. Rasp, A. Leunig

In-vitro-Untersuchung von Gewebeeffekten nach Laserbestrahlung im Kontaktverfahren

Im Fachbereich HNO werden unterschiedliche fasergeleitete Lasersysteme in der klinischen Routine angewendet. Um eine Aussage über die Gewebewechselwirkungen dieser Behandlungssysteme zu erhalten, wurden deren Koagulations-, Ablations- und Karbonisationseigenschaften in der vorliegenden Studie in vitro vergleichend untersucht.

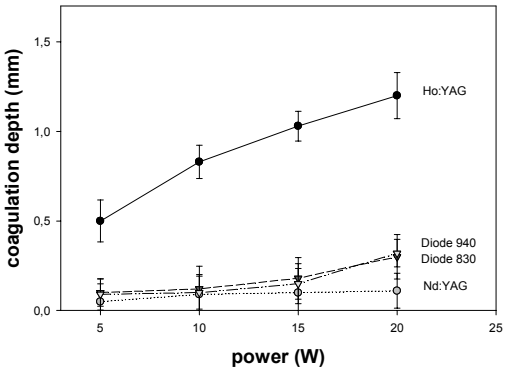


Abb. 1: Vergleich der Koagulationstiefen nach Applikation von verschiedenen Lasersystemen im Kontakt-Modus

Hierfür wurden die Lichtwellenleiter der Lasersysteme auf einen computergesteuerten Schrittmotor befestigt, wodurch die Laserstrahlung unter reproduzierbaren Bedingungen (Laserparameter, konstante Schrittgeschwindigkeit, gleichbleibender Winkel von 30°) im Kontakt-Modus auf das Gewebe (Putenmuskel) appliziert werden konnte. Die resultierenden thermischen Effekte (Koagulation, Ablation und Karbonisation) wurden lichtmikroskopisch beurteilt und ausgewertet.

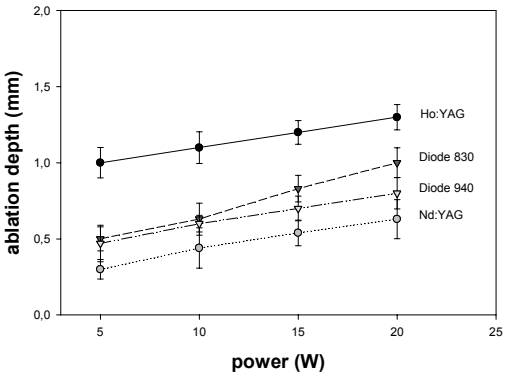


Abb. 2: Vergleich der Ablationstiefen nach Applikation von verschiedenen Lasersystemen im Kontakt-Modus

Ein qualitativer Vergleich der Ergebnisse nach Laserbehandlung im Kontakt-Modus zeigte die Ausbildung von tiefen Ablationszonen bei Verwendung des Ho:YAG-Lasers, während der Dioden- und Nd:YAG-Laser vorwiegend oberflächlich abladierten und zusätzlich die stärkste Karbonisation induzierten. Zusätzlich bewirkte die Ho:YAG-Laserapplikation auch die größten Koagulationszonen, während diese nach Anwendung von Dioden- und Nd:YAG-Laserlicht im Kontakt-Modus geringeren Ausmaßes waren.

Entsprechend der präsentierten Ergebnisse zeigen die im „Kontakt-Modus“ angewendeten Lasersysteme sehr unterschiedliche Gewebewechselwirkungen im Vergleich zu einer „Non-Kontakt“-Laser-Applikation. Dies ist von großer Wichtigkeit und sollte vom behandelnden HNO-Arzt beachtet werden, um eine gezielte Wirkung des Laserlichtes zu erhalten und auch Komplikationen zu vermeiden.

P. Janda, B. Mundweil, **R. Sroka**, A. Leunig

Fluoreszenzdiagnostik von Kopf-Halstumoren nach systemischer Applikation von 5-Aminolävulinsäure

Einführung: Die Prognose von Patienten mit Karzinomen des oberen Aerodigestivtraktes (OADT) ist abhängig von frühzeitiger Diagnostik sowie schnell eingeleiteter Behandlung. Fluoreszenzgestützte Untersuchungen nach topischer Applikation von 5-Aminolävulinsäure (5-ALA) zeigen als diagnostisches Hilfsmittel ein vielversprechendes Potenzial, um eine bessere Erkennung und Abgrenzung derartiger Erkrankungen zu erreichen (siehe Forschungsberichte 1997 und 1998). Hierauf aufbauend wurde die selektive Anreicherung von Protoporphyrin IX (PPIX) in Malignomen des OADT nach systemischer Applikation von 5-ALA untersucht.

Material und Methoden: 60 Patienten mit Verdacht auf oder histologisch gesichertem Karzinom im OADT erhielten über eine Magensonde wässrige 5-ALA-Lösung in Konzentrationen zwischen 2,5 und 25 mg/kg KG. Nach Inkubationszeiten von 1,5 bis 3 Stunden konnte mit Hilfe des D-LIGHT/AF-Systems und einer Farb-CCD-Kamera (Tricam PDD, Storz, Tuttlingen) mit vorgeschaltetem Beobachtungsfilter (Schott OG515) die Untersuchung vorgenommen werden. Durch den Operateur erfolgte eine Beurteilung der Qualität der Befunderkennung unter Weißlicht (WLU) und nach Umschalten auf blaues Anregungslicht für die PPIX-Fluoreszenz (PPIX FU). Als wesentliche subjektive Kriterien zur Bewertung der diagnostischen Qualität galten die makroskopische Erkennung des Befundes sowie die Abgrenzbarkeit gegenüber gesundem Gewebe (Tabelle 1).

Um eine Korrelation zwischen der Ausprägung der makroskopischen Rotfluoreszenz und der zugrundeliegenden Histologie herstellen zu können wurden während der Fluoreszenzuntersuchung Biopsien (n=109) aus Tumor- und umgebenden Normalgewebe entnommen.

Ergebnisse: Bei zwei von 60 untersuchten Patienten bestätigte sich nach systemischer 5-ALA-Applikation histopathologisch der unter PPIX FU erhobene Verdacht auf ein Zweitkarzinom. In drei Fällen wurde eine Verbesserung der Abgrenzung des Tumors mit Hilfe der Fluoreszenzdiagnostik erzielt. In den Stadien pT1 bis pT3 waren invasiv wachsende Tumoren bei 8 von 24 Patienten durch die PPIX FU nicht nachweisbar, während sie unter Weißlicht sichtbar waren (Tabelle 1). Auch im Fall zweier Patienten mit Dysplasien konnten die Befunde nur unter Weißlicht erkannt werden, eine Fluoreszenz der Befunde konnte nicht nachgewiesen werden.

Während unter Weißlichtbetrachtung in 98,6 % histologisch „positive“ Biopsien (D III, Cis, Karzinom) korrekterweise als makroskopisch auffällige Schleimhaut gewertet wurden, ergab sich die korrespondierende Sensitivität der PPIX FU nach oraler Gabe von 82,7 %. Mit diesem Wert liegt die PPIX FU nach systemischer Applikation von 5-ALA deutlich unter den von unserer Gruppe überprüften Ergebnissen für die 5-ALA-Mundspülung bzw. Inhalation eines 5-ALA-Aerosols, deren Sensitivitätswerte bei 100 % bzw. 93,6 % lagen.

Bewertungskriterien	WLU / PPIX FU nach pT – Stadium						
	D I-III	pTis	pT_1	pT_2	pT_3	pT_4	pT_x
gute Erkennung histologisch malignen Gewebes klare Abgrenzung gegenüber unauffälligem Gewebe	- / -	- / 2	1 / 2	- / 1	2 / 1	- / -	- / 1
gute Erkennung histologisch malignen Gewebes keine klare Abgrenzung gegenüber unauffälligem Gewebe	1 / -	2 / -	11 / 6	7 / 4	3 / 2	1 / 1	2 / 1
keine eindeutige Erkennung histologisch malignen Gewebes keine klare Abgrenzung gegenüber unauffälligem Gewebe	1 / 2	- / -	- / 4	- / 2	- / 2	- / -	1 / 1
Summe der Biopsien	4	4	12	7	5	1	3

Tabelle 1: Vergleich der diagnostischen Qualität von WLU und PPIX-FU nach systemischer 5-ALA-Applikation.

Klinischer Vorteil: Bei allen untersuchten Patienten wurde der klinische Vorteil für den Patienten nach zwei Gesichtspunkten klassifiziert. Erster Gesichtspunkt war die Erkennung eines Zusatzbefundes im Sinne eines Zweittumors. Zweiter Gesichtspunkt war die verbesserte subjektive Abgrenzung des Tumors vom umliegenden Normalgewebe oder die Erkennung von Tumorausläufern, die in der WLU nicht erkennbar waren. Während durch die PPIX FU nach Mundspülung mit 5-ALA bzw. Inhalation eines 5-ALA-Aerosols ein klinischer Zugewinn von 14 % bzw. 26 % erzielt werden konnte liegt der diagnostische Vorteil der systemischen Anwendung nur bei 8 %.

P. Heinrich, C.S. Betz, **H. Stepp**, A. Leunig

Laser-Biomodulation zur Therapie von Tinnitus

Einführung: Die Anwendung der Laser-Biomodulation zur Bestrahlung des kochleovestibulären Systems könnte ein neues Therapieverfahren bei komplexen Innenohrerkrankungen darstellen. Im allgemeinen werden bei akutem Tinnitus und Hörsturz als Standardtherapien durchblutungsfördernde (rheologische) Maßnahmen ergriffen. Wie aus den klinischen Untersuchungen an den Probanden in der klinischen Strahlentherapie hervorgeht, kann durch den Einsatz der Laser-Biomodulation ebenso eine Steigerung des Blutflusses in dem Zielorgan erreicht werden. Somit könnte neben einer direkten regenerativen Wirkung der Biomodulation auf zellulärer Ebene, auch eine mögliche Durchblutungsförderung involviert sein.

Abb. 1: Head-set-Applikator zur Positionierung und Fixierung eines Mikrolinsenstrahlers vor dem Trommelfell.

Material und Methoden: Nach einer abgeschlossenen Phase-II-Studie mit einem am LFL entwickelten Bestrahlungsgerät mit 4 Lasern und mit Head-Set-Applikator (s. Abb. 1) wird z. Zt. eine doppelblindkontrollierte Phase-III-Studie durchgeführt. Bislang haben 133 von 240 Patienten mit chronischem, therapierefraktären Tinnitus teilgenommen. Es wurden die Wellenlängen λ = 635, 690, 780 und 830 nm eingesetzt. Bei jeder Bestrahlung wurde eine bestimmte Lichtdosis zwischen 1 und 30 J/cm² an der zu therapierenden Stelle in der Cochlea entsprechend der Frequenz des Tinnitusgeräusches appliziert. Die dazu erforderliche Lichtdosis am Trommelfell wurde anhand der früher am LFL experimentell ermittelten Transmission von Licht durch das Promontorium zu den einzelnen Lokalisationen der Cochlea berechnet.

Für jeden Patienten wurde jeweils randomisiert nur eine Wellenlänge mit einer Dosierung verwendet. Jeder Patient erhielt 3 Einzelbestrahlungen und wurde über einen Nachbeobachtungszeitraum von 6 Monaten mehrfach untersucht. Der Therapieerfolg wurde anhand von 3 Bewertungsparametern beurteilt, einer audiometrischen Tinnitusmessung in dB mit Schmalbandrauschen, einer visuellen Analogskala (VAS) zur Befindlichkeit und ein strukturiertes Tinnitusinterview nach Goebel/Hiller (GH).

Ergebnisse: Die Laseranwendung konnte ohne nennenswerte Nebenwirkungen ambulant durchgeführt werden. Insgesamt war in dem vorläufigen Kollektiv keine signifikante Änderung der gemessenen Hörschwellen zu beobachten. Die Veränderungen der Bewertungsparameter direkt nach Therapie sind in Tab. 1 dargestellt. Danach sind in dem bisher untersuchten Patientenkollektiv keine signifikanten Veränderungen festzustellen. Dennoch zeigten einzelne untersuchte Wellenlängen wie z.B. 635nm und 690nm tendenziell bessere Ergebnisse als die Placebogruppe. Die Tinnituslautstärkemessungen fielen im Vergleich zur Placebogruppe auch prozentual günstiger aus. Eine endgültige Bewertung wird erst in einem größeren Patientenkollektiv bzw. nach Abschluss der Doppelblindstudie möglich sein.

λ[nm]	635	690	780	830	Placebo
Dosis [J/cm²]	1-2 und 4	4	20	15 und 30	-
Patienten	19	27	27	10	50
Δ(dB) ±SEM	3,7 ±6,1	1,3 ±13,2	3,2 ±11,2	-9,3 ±19,1	0,4 ±10,6
Δ(VAS) ±SEM	0,3 ±1,6	-0,2 ±3,0	0,7 ±2,7	1,4 ±1,9	0,1 ±2,3
Δ(GH) ±SEM	-	1,1 ±8,2	-1,8 ±5,5	-	0,5 ±5,9
Pat. mit Δ(dB)>0	78%	56%	57%	57%	51%

Tab. 1: Veränderungen der verschiedenen Bewertungsparameter zur Erfolgskontrolle für die verschiedenen Patientengruppen. Positive Werte entsprechen einer Verbesserung. Angegeben sind Mittelwerte und ihre Fehler (SEM). Bei Δ(dB) wurden nur Fälle mit frequenzstabilem Tinnitus berücksichtigt.

Ein Businessplan für die industrielle Umsetzung wurde bereits im Jahre 2000 erstellt. Weiterhin wurden Einzelkomponenten des Bestrahlungsgerätes zum Patent angemeldet.

S. Tauber, A. DeNigris, **W. Beyer**, K. Schorn

Optische Kohärenztomographie am Mittelohr

Die optische Kohärenztomographie (OCT) ist ein Verfahren, das die Darstellung von Gewebestrukturen bis zu einer Tiefe von einigen Millimetern z. B. in Form von Schnittbildern senkrecht zur Oberfläche gestattet. Dabei wird Licht mit einer Kohärenzlänge von nur ca. 20µm senkrecht zur Gewebeoberfläche eingestrahlt und das zurückgestreute Licht mit Hilfe einer interferometrischen Anordnung nach Art eines Michelson-Interferometers analysiert. Nur einfach gestreutes Licht, dessen Wegstrecke der des Referenzarms des Interferometers entspricht, trägt zum Interferenzsignal bei. Die kontinuierliche Variation der Referenzarmlänge in Kombination mit lateralem Vorschub der Optik erlaubt schließlich die Darstellung von Schnittbildern. Das Verfahren wird bereits in der Dermatologie und Ophthalmologie eingesetzt.

Nach ersten erfolgreichen Pilotexperimenten in Zusammenarbeit mit dem Medizinischen Laserzentrum Lübeck zur Darstellbarkeit von Strukturen im Mittelohr durch das Trommelfell hindurch wurde eine OCT-Anlage (Firma 4optics, Lübeck) für den klinischen Einsatz ausgebaut.

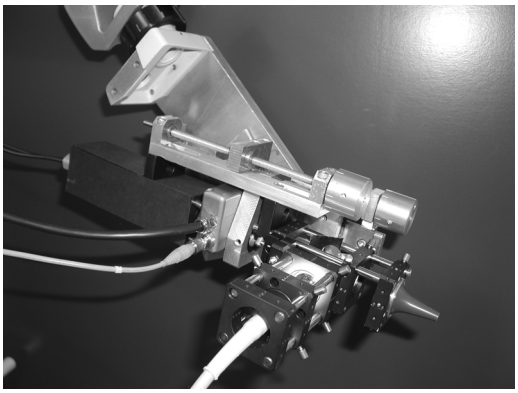


Abb. 1: Optischer Kopf der OCT-Anlage zur Darstellung von Strukturen im Mittelohr durch das Trommelfell hindurch.

Dazu wurde ein optischer Kopf entwickelt, der über eine mobile Stativsäule mit Operationsmikroskophalter erschütterungsarm am Ohr des Patienten positioniert werden kann (s. Abb. 1). Zur Orientierung dient eine CCD-Kamera, deren Strahlengang in den des OCT-Kopfes eingespiegelt wird. Das Licht zur Beleuchtung wird über einen ringförmigen 45°-Spiegel koaxial eingekoppelt. Gekreutzte Polarisatoren unterdrücken störende Reflexe von Linsen- und Gewebeoberflächen. Die darstellbare Tiefe der Gewebestrukturen ist konstruktionsbedingt auf 2,3mm beschränkt. Zur Darstellung größerer Tiefen kann der optische Kopf per Schrittmotor mehrfach um 2,3mm verschoben werden. Eine Steuerungsprogramm setzt die dabei ermittelten Einzelbilder zu einem Gesamtbild zusammen.

Der optische Kopf des OCT-Systems wurde an einen mobilen Stativarm mit Operationsmikroskopständer adaptiert, so dass eine Positionierung an beliebiger Stelle im Raum mit beliebiger Orientierung möglich ist. Damit kann der OCT-Kopf frei schwebend, berührungsfrei und erschütterungsarm in der Nähe des Untersuchungsobjektes (Kopf des Patienten) optimal positioniert werden. Zur Immobilisierung des Patientenkopfes wurde eine herkömmliche ophthalmologische Untersuchungs-Kopfstütze modifiziert und mit seitlichen Zusatzstützen versehen, die laterale Bewegungen des Patientenkopfes verhindern.

Mit dem entwickelten OCT-System wurden erste klinische Analysen im Sinne von Einzelmessungen an Probanden und an anatomischen Mittelohrpräparaten durchgeführt. Die ersten akquirierten Bilder zeigten, dass die optische Darstellung des Mittelohrraumes zunächst aufgrund anatomischer Gegebenheiten zwar deutlich begrenzt ist, aber dennoch für weitere Untersuchungen interessant und vielversprechend erscheint. Zu den weiteren Problemen bei der Bildakquisition zählten kleine menschliche Gehörgangsdurchmesser mit unzureichender Beleuchtungssituation und eine Verminderung der Bildqualität durch minimale Restbewegungen des Patientenkopfes. Diese Bewegungsartefakte waren auch mit den bereits erwähnten Modifikationen nicht vollständig zu vermeiden.

Potentielle Indikationen für dieses Verfahren wären die Diagnose von Missbildungen des Mittelohres bei Kindern, von Cholesteatomen, Gehörknöchelchenluxationen und die Untersuchung von Tympanoplastiken. Systematische Untersuchungen dazu sind in Vorbereitung.

A. Obermeier, W. Beyer, S. Tauber

Pharmakokinetik und Selektivität von 5-Aminolävulinsäure aus 5-ALA-Thermogel bei zervikaler intraepithelialer Neoplasie (CIN 1-3)

Die Studie untersuchte die Pharmakokinetik und Selektivität von 5-ALA, welches für eine verbesserte topische Applikation in Form eines thermolabilen Gels Pluronic F127 vor die Cervix uteri appliziert wurde. Pluronic F127 liegt im kalten Zustand in flüssiger Form vor, jenseits von 31°C geht es in einen gelartigen Zustand über. Nach Kolposkopie, Zytologie und HPV DNA Bestimmung erfolgte die Inkubation des 5-ALA-Thermogels (4%, 10%, 20%) mit anschließender klinisch indizierter Konisation bei 27 Patientinnen mit zervikaler intraepithelialer Neoplasie (CIN 1-3). An Gefrierschnitten wurden parallel zur histologischen HE-Färbung Schnitte für die semiquantitative, topographische Fluoreszenzmikroskopie sowie für die quantitative Fluoreszenzspektrometrie entnommen. Bei einer Applikationsdauer von 0 bis 2 Stunden zeigte sich eine sehr geringe Fluoreszenz im dysplastischen Epithel. Nach 2 bis 4 Stunden kam es zu einem fast linearen Anstieg der Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit der Inkubationszeit. In dem Zeitabschnitt zwischen 4 und 6 Stunden wurde das Fluoreszenzmaximum erreicht, mit einem deutlichen Abfall zwischen 6 und 8 Stunden. Im Vergleich der Protoporphyrin IX Fluoreszenzintensitäten zeigte sich ein signifikanter Unterschied in der maximalen Intensität mit 1116 + 241 wE im dysplastischen Epithel (CIN 1—3) im Vergleich zu 704 + 166 wE beim normalen Plattenepithel ($p<0,05$). Unter Vernachlässigung der Inkubationszeiten ergaben sich für die verschiedenen Grade der CIN keine signifikanten Unterschiede in der maximalen Fluoreszenzintensität.

Bei der Analyse der Protoporphyrin-IX-Fluoreszenz in Abhängigkeit von der applizierten Konzentration des 5-ALA-Thermogels ergab sich eine maximale Fluoreszenzintensität bei 10%igem Gel. Allerdings fanden sich keine signifikanten Unterschiede bei Applikationszeiten jenseits von 2 Stunden.

Die Selektivität der Protoporphyrinfluoreszenz gemessen anhand der Ratio zwischen dysplastischem und normalem Epithel ergab nach einer Applikationsdauer von 3 bis 4 Stunden für die CIN 1 eine maximale Ratio von 2,0 und für die CIN 2 eine von 3,0. Für CIN 3 wurde die höchste Tumorselektivität mit einer Ratio von 4,0 nach 3-4h erzielt. Die hierdurch erzielte Tumorselektivität zeigte im Vergleich zur ähnlich konzipierten Studie von Pahernik et al. (Int. J. Cancer, 1998), die eine 5-ALA-Kieselgel-Lösung verwendeten, eine um den Faktor 2 verbesserte Tumorselektivität.

In der semiquantitativen, topographischen Fluoreszenzmikroskopie ergaben sich höhere Intensitäten im Bereich der basalen Epithelschichten mit einer graduellen Abnahme zum superfiziellen Stratum. Neben einer Epithelzellschicht-spezifischen Pharmakokinetik reflektiert dies zum einen die höhere Zahl basaler wie parabasaler Zellen pro Fläche, wie auch die erhöhte Kern-Plasma-Relation der unteren im Vergleich zu den oberen Schichten.

Zusammenfassend ergaben sich in dieser fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung zur Pharmakokinetik und Selektivität von 5-ALA-Thermogel eine maximale Fluoreszenzintensitäten nach einem Zeitintervall von 4 bis 6 Stunden und eine maximale Tumorselektion mit einer CIN zu Normalgewebe-Ratio von 4 nach 3 bis 4 Stunden. Im Vergleich zu einem historischen Kollektiv konnte durch die Verwendung des thermolabilen Gels eine doppelt so hohe Tumorselektivität erzielt werden. Für die klinische Umsetzung einer photodynamischen Therapie der CIN unter Verwendung von 5-ALA-Thermogel empfiehlt sich eine Konzentration von 10% mit einem Zeitintervall von ca. 4 Stunden.

V. Andikyan, M. Kronschnabl, M. Hillemanns, **H. Stepp**, P. Hillemanns

Klinische Phase-I-Studie zur Pharmakokinetik von 5-Aminolivulinsäure aus 5-ALA-Thermogel bei zervikaler intraepithelialer Neoplasie (CIN 1-3) mittels Video-Imaging und Spektroskopie

Die Studie untersuchte die Pharmakokinetik von 5-Aminolävulinsäure, welches in Form des thermolabilen Gels Pluronic F 127 zur verbesserten topischen Applikation vor die Cervix uteri gebracht wurde. Pluronic F 127 liegt im kalten Zustand in flüssiger Form vor, jenseits von 31 °C geht es in einen gelartigen Zustand über. Nach Kolposkopie, Zytologie und HPV-DNA-Bestimmung erfolgte die Inkubation des 5-ALA-Thermogels (1%, 4%, 10%, 20%) mit anschließender Durchführung von Spektroskopie und Video-Imaging vor klinisch indizierter Konisation bei 28 Patientinnen mit zervikaler intraepithelialer Neoplasie (CIN 1-3).

Nach Auftragen von 1% 5-ALA-Thermogel zeigte sich in der semiquantitativen Videobildanalyse eine gute Selektivität (Tumor-Normalgewebsratio: 3,5) für dysplastisch veränderte Areale mit einer relativ niedrigen absoluten Fluoreszenzintensität (68 w. E.) in der Spektroskopie. Nach Applikation von 4% 5-ALA-Thermogel blieb die Tumorselektivität weiterhin konstant bei 3,0 mit einem leichten Anstieg der absoluten Fluoreszenzintensität (162 w. E.). Auch mit 10% 5-ALA-Thermogel konnte eine gute Tumorselektivität von 2,5 erzielt werden, die spektroskopisch gemessene Fluoreszenzintensität war bei dieser Konzentration sogar am höchsten mit 244 w. E.. Eine kinetische Messung bei derselben Konzentration zeigt eine Zunahme der Fluoreszenzintensität mit Dauer der Expositionszeit (206 w. E. nach 2,5 h; 371 w. E. nach 10 h), jedoch auf Kosten einer Abnahme der Tumorselektivität. Auch mit 20% 5-ALA-Thermogel konnte eine ausreichende Tumorselektivität von 2,0 erzielt werden ohne aber eine weitere Steigerung der absoluten Fluoreszenzintensität (181 w. E.).

Neben Konzentration und Expositionsdauer scheinen auch andere Faktoren einen Einfluß auf die Fluoreszenzintensität zu haben, so ist die Verwendung einer Portiokappe sinnvoll. Die quantitative Fluoreszenzintensität nach zweistündiger Exposition von 10% 5-ALA-Thermogel beträgt im CIN-Areal 75 w. E. mit Verwendung eines Tupfers und 325 w. E. mit Verwendung einer Portiokappe. Auch vom Schweregrad der CIN ist die Fluoreszenzintensität abhängig. Je ausgeprägter die CIN umso intensiver ist die Fluoreszenz.

Zusammenfassend konnte die maximale Fluoreszenzintensität bei einer guten Tumorselektivität bei einer Konzentration von 10% erzielt werden, so dass auch ein entsprechend effizienter photodynamischer Effekt bei dieser Konzentration zu erwarten ist. Nach diesen Ergebnissen sowie der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen ist eine Expositionsdauer von 4 bis 6 Stunden für die PDT der CIN mit 5-ALA-Thermogel zu empfehlen.

M. Kronschnabl, V. Andikyan, **H. Stepp,** P. Hillemanns.

Fluoreszenzdiagnostik des Ovarialkarzinoms – Erste Ergebnisse einer Pilotstudie

Fragestellung: Die maximale, zytoreduktive Chirurgie des Ovarialkarzinoms mit Resektion auf R0 gilt als die Voraussetzung für eine bestmögliche Wirkung in Kombination mit der Chemotherapie. Die vollständige Entfernung makroskopisch erkennbarer Tumorreste ist sowohl für die Primär-, die Interventions- als auch für die Rezidivoperation der entscheidende Faktor.

Methodik: Im Rahmen einer Pilotstudie wurden 24 Patientinnen mit Ovarialkarzinom eingeschlossen. Ziel dieses Forschungsvorhabens war die Evaluierung der Parameter 5-ALA-Konzentration und Applikationsintervall für eine optimale Protoporphyrin-Fluoreszenzdiagnostik. Patientinnen mit einem Ovarialkarzinom erhielten eine orale Gabe von 5-ALA in den Konzentrationen 1mg/kg KG und 10mg/kg KG jeweils 4h, 6h, und 12h vor der Fluoreszenzdiagnostik, die bildgebend und spektroskopisch durchgeführt wurde. Ergänzt wurden die Erkenntnisse durch die Fluoreszenzmikroskopie an Gewebeschnitten (Abb. 1 oben).

Ergebnisse: Die orale Applikation von 1mg/kg KG 5-ALA 4-12h vor der Fluoreszenzdetektion erzielte keine klinisch zufriedenstellenden Ergebnisse. Die sowohl fluoreszenzspektroskopisch wie auch -mikroskopisch gemessenen Intensitäten von Protoporphyrin IX waren extrem niedrig. Die orale Applikation von 10mg/kg KG führte zu einer deutlich erkennbaren Fluoreszenz auch kleiner Peritonealkarzinoseherde mit einem hohen Tumor/Normalgewebe-Ratio. Es konnten keine relevanten Nebenwirkungen verzeichnet werden. Unter Vermeidung intensiver Lichtexposition trat in unserem Kollektiv keine kutane Photosensibilisierung auf.

Schlussfolgerung: Eine hohe und vor allem sehr selektive Fluoreszenz des Tumorgewebes zeigte sich nach oraler Applikation von 10mg/kg KG 5-ALA. Aufgrund dieser Ergebnisse empfiehlt sich die Fluoreszenzdiagnostik zur Detektion kleiner Tumorherde bei der Second-look-Diagnostik, Z.n. neoadjuvanter Therapie, suspekten Ovarialtumoren in der Laparoskopie oder Borderline-Tumoren.

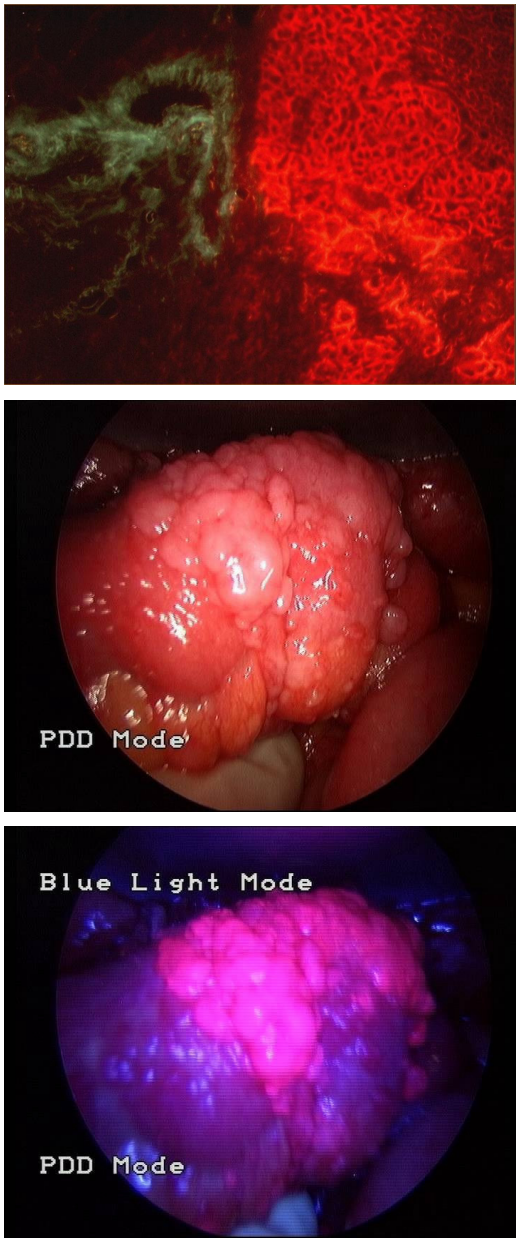


Abb. 1: Oben: rote PPIX-Fluoreszenz demarkiert Tumor von Normalgewebe. Mitte und unten: Fluoreszenzdiagnostik am Ovarialtumoren in der Laparoskopie.

P. Hillemanns, J. Reiff, P. Wimberger, R. Kimmig, M. Kronschnabl, **H. Stepp**

Interstitielle Laserthermotherapie unter MRT-Monitoring am Beispiel von Hirntumoren

Einleitung: Die Kombination von Thermotherapien, wie der interstitiellen Laserthermotherapie (LITT), und der Magnetresonanztomographie (MRT) greifen den Trend nach minimal-invasiven Behandlungs- und Untersuchungsmethoden auf. Durch die kernspintomographische Überwachung der jeweiligen Therapie (z.B. LITT) wird eine Verbesserung des Therapieerfolges erwartet. Mit Hilfe einer nicht-invasiven Darstellung können temperaturinduzierte Gewebe- und Temperaturänderungen erfasst werden. Hierfür bietet sich die Verwendung der temperaturempfindlichen Protonenresonanzfrequenz an.

Methodik: Es wurde eine Laserquelle mit einer Wellenlänge von 830 nm verwendet. Neu ist besonders die Temperatursteuerung des Laservorgangs durch die Vorgabe der Zeit (10 min), der maximalen Leistung (< 10W) und der maximalen Temperatur (90°C). An einem Großtiermodell (18 Versuche) wurden die Effekte der LITT über einen Zeitraum von drei Monaten systematisch untersucht. Hierbei wurden erstmals die biologischen Grundlagen (Ausmaß der Bluthirnschrankenstörung) mit Hilfe der quantitativen Autoradiographie und einer histologischen Analyse charakterisiert. Die LITT wurde mit temperatursensitiven MR-Methoden überwacht. Für die MR-Thermometrie kam die chemische Verschiebung der Protonenresonanzfrequenz zur Anwendung. Alle MR-Untersuchungen wurden bei 1,5 Tesla (Siemens Magnetom Vision) durchgeführt. Die entwickelte Methode wurde bei zwei Patienten hirneignen malignen Tumoren angewandt.

Ergebnisse: Im Langzeitverhalten von bis zu 3 Monaten zeigte sich ein Maximum in der Läsionsausdehnung bereits nach 24 h. Die Blut-Hirnschrankenstörung war transient mit einem Maximum 14 Tage nach LITT. Bei der Anwendung der chemischen Verschiebung für die Thermometrie ergaben sich neue Effekte, die für eine Thermometrie berücksichtigt werden müssen,. Diese Effekte basieren scheinbar auf temperaturabhängigen Suszeptibilitätseffekten, die die MR-Thermometrie beeinflussen können und damit in Zukunft besonders berücksichtigt werden müssen.

Der wesentlicher Fortschritt im Vergleich zum Bericht aus dem Vorjahr sind die ersten klinischen Anwendungen bei zwei Patienten mit Hirntumor. Hierbei wurden 2 Patienten mit malignen hirneigenen Rezidivtumoren interstitiell unter MRT-Monitoring behandelt. Der präoperative kontrastmittelaufnehmende Tumoranteil war nach der Behandlung nicht mehr nachweisbar. Die Behandlungen konnten komplikationslos durchgeführt werden.

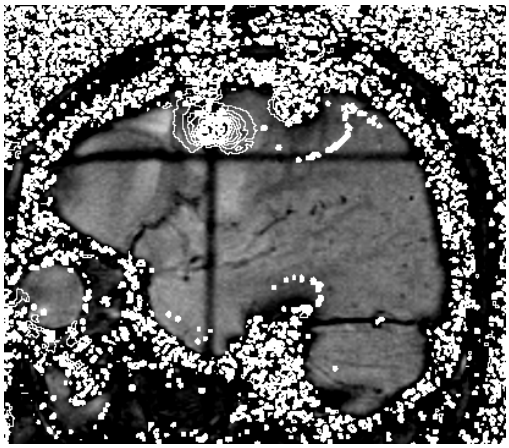


Abb. 1: Patientin mit Rezidiv eines Glioblastom während der LITT-Behandlung.

Höhenlinien mit gleicher Chemischer Verschiebung sind dem korrespondierenden Betragsbild überlagert. Ebenfalls zu erkennen sind Signalauslöschungen (dunkle Linien) durch die simultane Akquisition orthogonaler Schichten.

Ausblick: Die Voruntersuchungen und die erste klinische Anwendung der MR-gestützten LITT zeigen das große Potenzial der MRT für die Optimierung minimal-invasiver Therapieansätze von Tumoren. Weitere Untersuchungen von Phänomen, die die MR-Thermometrie beeinträchtigen können, müssen durchgeführt werden. Die Weiterentwicklung der MR-Thermometrie sollte eine Verkürzung der Akquisitionszeiten beinhalten und so eine höhere zeitliche oder räumliche Auflösung erlauben. Die Patientenstudien müssen im Rahmen einer klinischen Studie (Phase I/II) fortgeführt werden, um die experimentell gewonnen Erkenntnisse klinisch zu validieren.

M. Peller, H. Reinl, A. Muacevic, **R. Sroka**

Simulator für die minimal invasive Chirurgie: Der Urotrainer

Im Rahmen des EU-Forschungsprogramms „Esprit“ wurde das Projekt MISSIMU gefördert mit der Aufgabe, einen kostengünstigen Operationssimulator mit Steuerung durch einen Standard-PC zu entwickeln. Ziel war, Operationsabläufe realitätsnah und in Echtzeit zu simulieren. Neben der Cholezystektomie wurde die Zystoskopie als Simulationsinhalt gewählt, und während des Projektverlaufs als erstes realisiert.

Der Zystoskopiesimulator (Urotrainer) besteht aus einer optischen Simulationseinheit und der Mechatronik (siehe Abb. 1). Die Mechatronikeinheit, die Hardware des Simulators wurde von der Firma Karl Storz entwickelt. Sein Herzstück ist ein ATM (Active Trocar Modul), in das ein modifiziertes reales Zystoskop eingeschoben werden kann. Im ATM sind Motoren und Sensoren enthalten. Letztere haben die Aufgabe die Position des Instruments im ATM zu erfassen und an die Simulationseinheit im Computer weiterzugeben, die wiederum den entsprechenden Operationshintergrund generiert und auf einem Monitor darstellt. Stößt das Trainingszystoskop an die virtuelle Harnblasenwand, gibt der Computer ein Signal an die Ansteuerungseinheit des ATMs und seine Motoren werden aktiviert. Der Trainierende spürt infolgedessen einen realen Widerstand am Instrument (Force feedback). Die gesamte Operation läuft virtuell ab.

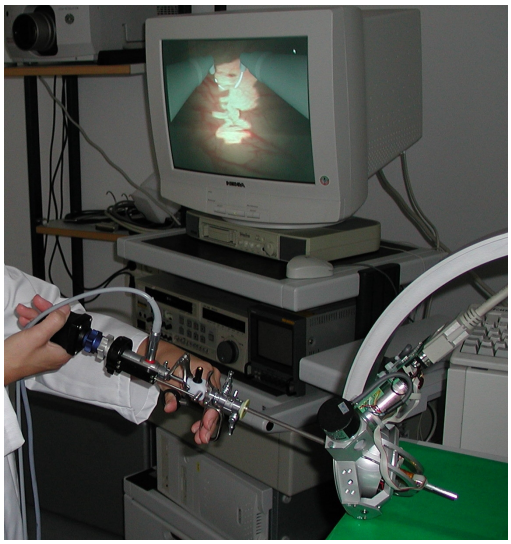


Abb. 1: Laboraufbau des Urotrainers mit Bilddarstellung und ATM

Aufgabe des LFL als Projektpartner war, in enger Zusammenarbeit mit der Urologischen Klinik die Datenbasis zu erstellen.

Dazu wurden drei Schwerpunkte bearbeitet:

1. Festlegung der Trainingsinhalte für den zukünftigen Urotrainer
2. Bereitstellung repräsentativer hochwertiger Bilddaten für die Simulationsexperten (Firma Thales, Paris) und Angabe geometrischer und physikalischer Größen für die Spezifikation des virtuellen Operationshintergrunds und des ATMs
3. Evaluation des Urotrainers durch klinisch tätige Ärzte und wissenschaftliches Personal.

Zur Erstellung des Simulationshindergrunds wurden digitale Videoaufnahmen von ca. 350 Zystoskopien und begleitenden therapeutischen Interventionen im Operationssaal aufgenommen.

Aus der Analyse dieser videodokumentierten Zystoskopien, dem Operationsablauf sowie aus den Gesprächen mit den Operateuren kristallisierten sich zwei Trainingsschwerpunkte heraus. Dazu gehörte die endoskopische Inspektion der gesamten Oberfläche der Harnblase, wobei sichergestellt werden sollte, dass die Harnblase vollständig eingesehen wurde. Das bedeutet für die Simulation zum einen die Auswahl von Optiken mit unterschiedlichen Seitblickwinkeln, zum anderen ein Trainingsfeedback. Wird demnach ein Areal der Harnblasenwand mindestens eine halbe Sekunde in einem Abstand von höchstens 20 mm untersucht, gilt diese Blasenoberfläche als inspiziert und wird als solches abgespeichert. Am Ende jeder Trainingseinheit wird angezeigt, welcher Anteil der gesamten Harnblasenoberfläche eingesehen wurde. Der Anwender bekommt somit einen Leistungsnachweis und kann durch Wiederholungen seine visuelle und manuelle Vorgehensweise optimieren.

Ein weiterer Trainingsschwerpunkt liegt in der Elektroresektion als der klinisch am häufigsten verwendeten therapeutischen Intervention. Für eine Resektion sind räumliche Orientierung und die Kombination von visuellem Eindruck und Bewegungskoordination notwendige Voraussetzung. Nur dadurch wird ein „richtiges Einstellen des Tumors“ und die nachfolgende Resektion durchführbar. Für die Simulation bedeutet dies, dass der Trainierende neben visuellen auch taktile Informationen erhalten muss. Visuell geschieht dies durch die Regelung des Lichteinfalls und der perspektivischen Verzerrung und taktil durch das Elastizitäts-

verhalten der Harnblase bei Wandkontakt. Die während des Eingriffs verursachte Resektionstiefe wird gleichzeitig durch einen optischen Farbbalken auf dem Monitor dargestellt.

Für die Bilddatenbank wurden aus geeigneten Videosequenzen Einzelbilder extrahiert und in dieser abgelegt. Unterteilt wurde die Bilddatenbank in den Operationshintergrund, in pathologische Veränderungen des Gewebes und in zystoskopische Eingriffe. Für den Operationshintergrund wurden durch lückenlose Aneinanderreihung vieler Einzelbilder sogenannte Panoramabilder erzeugt. Elektronisch gefaltet bildeten sie die Blasenwandoberfläche. Eine weitere Datenbank umfasste verschiedene pathologische Veränderungen. Diese Kategorie umfasste Tumore, Dysplasien, entzündliche Veränderungen und Narbengewebe. Sie sind in der Bilddatenbank sowohl als Weißlicht- als auch als Fluoreszenzbilder verfügbar. Je nach Bedarf können diese Bilder in die virtuelle Harnblasenwand eingebunden werden. Der dritte Teil der Bilddatenbank beinhaltet die zystoskopischen Eingriffe. Eine Serie von Einzelbildern beschreibt in Einzelschritten den gesamten Ablauf der Intervention und bildet die Basis für ein Drehbuch, das die Interaktion von Instrument und Blasenwand im Detail simuliert. Diese Bilddatenbank zusammen mit geometrischen und physikalischen Größen sorgte für eine weitere Spezifikation der Hard- bzw Software. Die Simulation wurde eine realitätsnahe Harnblasengeometrie, die die Urethra, die Ureterenleiste sowie die Ostien und die Ureteren enthielt, optisch verfeinert.

Jede Trainingseinheit kreiert einen neuen virtuellen Patienten mit unterschiedlicher Lokalisierung der Tumorareale und simuliert so das multifokale Wachstum von Blasenkarzinomen. Die virtuelle Zystoskopie kann sowohl unter Weißlicht als auch unter Fluoreszenzanregungslicht durchgeführt werden, wobei Optiken mit entsprechenden Seitblickwinkeln zur Anwendung kommen. Für die therapeutische Intervention stehen unterschiedlich ausgeführte Resektionsschlingen je nach Tumorlokalisierung (Abb. 2) sowie eine Laserfaser zur Laserkoagulation zur Verfügung. Nach jeder Trainingseinheit wird dem Anwender angezeigt, in welchem Umfang er die Harnblase eingesehen hat, wie vollständig er Tumore reseziert und wie viel Zeit er dazu benötigt hat.

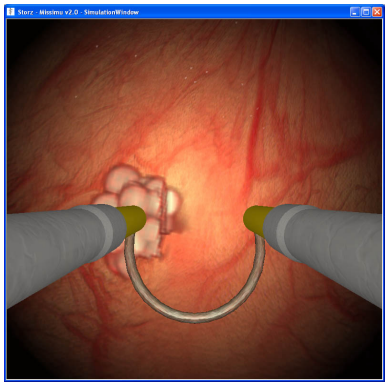


Abb. 2: Virtuelle Blasenwand mit papillärem Tumor und Resektionsschlinge

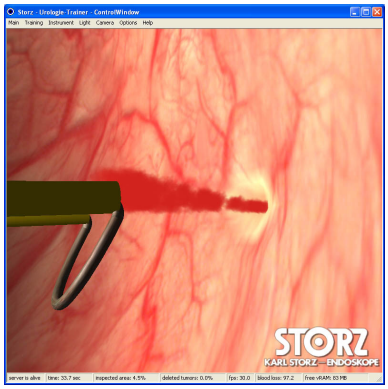


Abb. 3: Simulation einer Blutung nach Elektroresektion

Die Evaluation des im Rahmen des Esprit Projekts entwickelten Urotrainers wurde anhand eines Fragenkataloges im Anschluss an Trainingseinheiten durchgeführt. Das Ergebnis dieser Evaluation führte dazu, dass die Realitätsnähe der endoskopischen Abläufe kontinuierlich optimiert wurde, wie z. B. durch die Simulation einer Blutung aus dem Resektionsbett nach Elektroresektion (Abb. 3).

Insgesamt zeigte die vorläufige Evaluierung des Urotrainers eine steile Lernkurve bei Erstanwendern. Kliniker mit Zystoskopie-Erfahrung konnten mit der virtuellen Zystoskopie und der virtuellen Resektion auf Anhieb souverän umgehen.

Weitere Optimierungsmaßnahmen sowie die Einbindung zusätzlicher zystoskopischer Eingriffe, wie z. B. die Prostataresektion sind zukünftig vorgesehen und sollen letztendlich zur Entwicklung eines marktfähigen Medizinproduktes führen. Mit dem Urotrainer könnte damit das Ausbildungsprogramm für angehende Urologen durch eine Übungseinheit zwischen Lehrbuch und Patient abgerundet werden.

M. Noll, O. Reich**, R. Baumgartner**

Konfokale Mikroendoskopie

Einführung: Die konfokale Mikroskopie unterscheidet sich von der Standardmikroskopie dadurch, dass durch die Verwendung einer sehr kleinen Blende die Tiefenschärfe der optischen Abbildung so stark reduziert wird, dass die schichtweise Aufnahme von dreidimensionalen Objekten möglich ist.

Für die Tumordiagnostik könnte speziell dieses mikroskopische Verfahren aufgrund des hohen lateralen als auch axialen Auflösungsvermögens geeignet sein, die Bestimmung des Grading von oberflächlichen Tumorarealen zu vereinfachen. In Zukunft könnte gar die Entnahme von Biopsien und deren extrakorporale histologische Befundung ganz vermieden werden.

Die Entwicklung eines solchen, intraoperativ einsetzbaren, konfokalen Mikroendoskops ist Ziel eines zuhehörigen Verbundprojekts namens Komed (Projektträger VDI).

Material und Methoden: Der Aufbau und der Strahlengang des geplanten Mikroendoskops sind in Abbildung 1 skizziert.

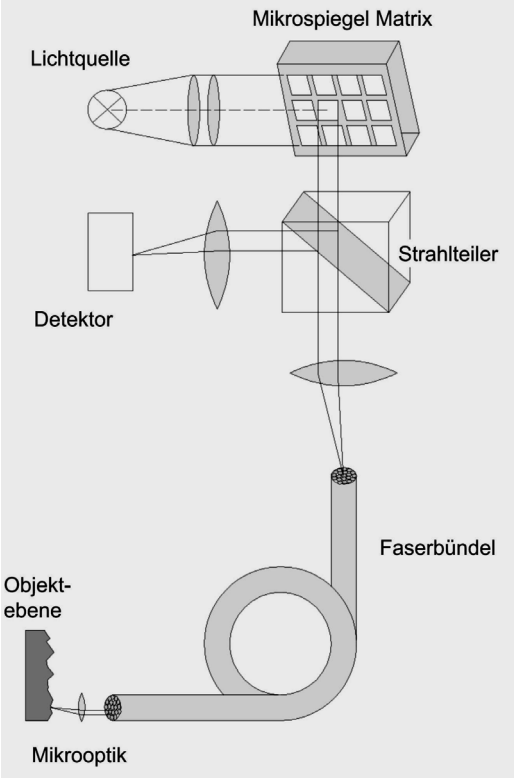


Abb. 1: Entwurfsskizze für den geplanten Aufbau eines konfokalen Mikroendoskops

Eine mit verstellbaren Mikrospiegeln besetzte Halbleiter-Matrix wird von einer Lichtquelle beleuchtet. Das so nahezu beliebig segmentierbare Strahlprofil wird in ein Faserbündel eingekoppelt und beleuchtet die verstellbare Mikrooptik am proximalen Faserausgang.

Diese projiziert dann die Einzelbilder aus unterschiedlichen Objekttiefen über dasselbe Faserbündel und den Strahlteiler auf den Detektor. Die Einzelfasern stellen dabei gleichzeitig die Blendenöffnung für das jeweilig beleuchtete Segment dar.

Die für eine In-vivo-Anwendung notwendige Geschwindigkeit bei der Bilderfassung wird bei diesem neuartigen Ansatz durch die Kombination aus extrem schnell schaltender Mikrospiegel-Matrix und ortsauflösenden Detektor erreicht.

Das in den laufenden Experimenten verwendete Setup besteht aus einem kommerziellen Leica DMIRB System, das als kombinierte lineare Scan- und Detektor-Einheit dient. Ebenso bildet noch Standardobjektivtechnik den Platzhalter für die später zu verwendende Mikrooptik. Das eingesetzte 0,75mm dicke Faserbündel besitzt ca. 30.000 Einzelfasern mit einem Einzelfaserdurchmesser von ca. 4µm. Das Faserbündel mit Mikrooptik soll später im Arbeitskanal eines Standardendoskops Platz finden.

Ergebnisse und Diskussion: Um das Prinzip der schichtweisen mikroskopischen Aufnahme zu verdeutlichen ist in Abbildung 2 links ein aus Einzelbildern rekonstruiertes Probekügelchen mit 15µm Durchmesser gezeigt, das direkt mit dem konfokalen Leica-System aufgenommen wurde.

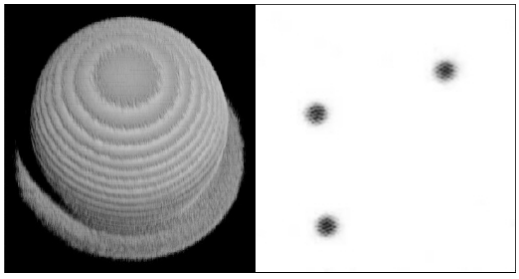


Abb. 2: Rekonstruierte 3D-Aufnahme eines Stapels von Einzelbildern eines 15µm Probekörpers (links), daneben ein Ausschnitt einer Aufnahme eines Einzelbildes von drei solchen Probekörpern durch das Faserbündel (rechts).

Die erreichbare Auflösung des Mikroendoskops hängt vom verwendeten Faserbündel und der Mikrooptik ab. Zusammen mit dem für eine histologische Beurteilung notwendigen minimalen Bildausschnitt kann dennoch eine Auflösung erreicht werden, die einzelne Zellen und sogar sub-zelluläre Strukturen erkennbar werden lassen.

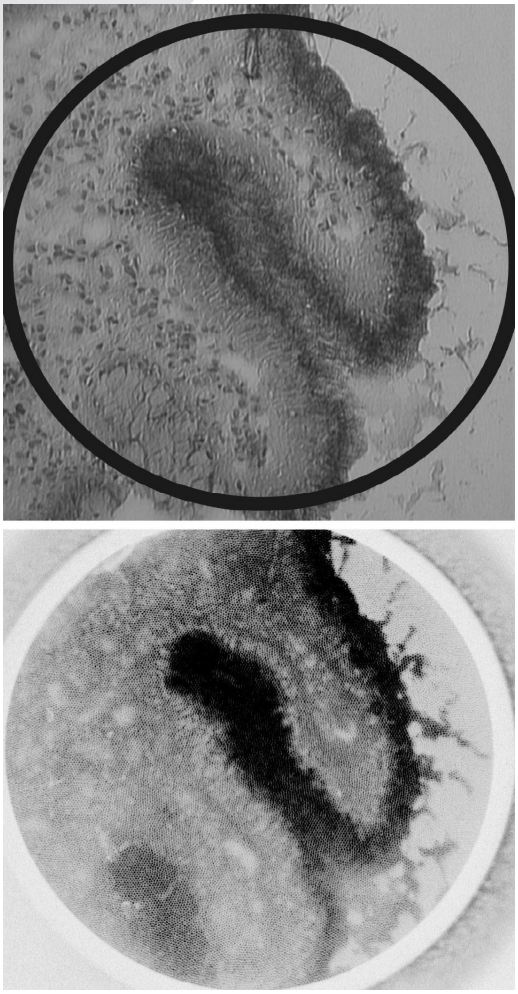


Abb. 3: Aufnahme eines H&E gefärbten Gewebeschnittes aus dem Colon mit einem Standardmikroskop (oben) und im Vergleich ein konfokaler optischer Schnitt durch das Faserbündel betrachtet (unten).

In Abbildung 2 rechts ist dies an denselben Probekügelchen demonstriert, wobei man die Segmentierung in die Einzelfasern erkennen kann.

Um die vorgestellten Ergebnisse mit Probekügelchen auf reales Gewebe zu übertragen wurde in einem ersten Schritt H&E-gefärbte Gewebeschnitte verwendet.

In Abbildung 3 oben ist eine Aufnahme mit einem Standardmikroskop einer solchen Probe aus dem Colon dargestellt. Im Bildausschnitt ist die obere Gewebeschicht mit zwei Darmzotten erkennbar.

Der markierte Bereich deutet das Bildfeld durch das Faserbündel an. Der Bildausschnitt beträgt in dieser Konfiguration einer Ausdehnung von ca. 450µm. In der konfokalen Aufnahme durch das Faserbündel (Abbildung 3 unten) sind die Schichtung, aber auch histologische Details noch deutlich erkennbar. Um den Einfluss von Störlicht zu minimieren handelt es sich um hierbei um eine Fluoreszenz-Aufnahme.

Für eine In-vivo-Anwendung ist der Kontrast in unbehandeltem Gewebe aufgrund der geringen Brechungsindexunterschiede leider sehr gering. Die in den Experimenten verwendete H&E-Färbung kann jedoch nicht in vivo eingesetzt werden. Daher wird parallel zur technischen Entwicklung die Tauglichkeit von weniger toxischen Substanzen untersucht. Vielversprechende Kandidaten dafür kommen etwa aus der Chromoendoskopie.

R. Meier, **H. Stepp**

Mitarbeiter (LFL)

Wissenschaftlicher Leiter LFL

Dr. rer. nat. Reinhold Baumgartner

Sekretariat

Kornelia Eberle
Heidi Schreckhase

Physik

Dr. rer. nat. Wolfgang Beyer
Dr. rer. biol. hum. Ronald Sroka
Dr. rer. biol. hum. Herbert Stepp

Biologie

Dr. rer. biol. hum. Susanne Stocker
Michael Heide

Ingenieure (FH)

Thomas Pongratz
Helmut Stepp

Post-doc

Wei Xiang (Dipl. Biol.)

Doktoranden (Dr. rer. biol. hum.)

Tobias Beck, Dipl. Phys.
Mirna Castro, Dipl. Phys.
Alexander Hohla, Dipl. Phys.
Frank Ließmann, Dipl. Phys.
Michael Mehlmann, Dipl. Phys.
Richard Meier, Dipl. Phys.
Margarita Noll, Dipl. Phys.
Josef Pichler, Dipl. Biol.
Simon Wagner, Dipl. Phys.

Doktoranden (Dr. med.)

Markus Bader
Patrick Bössner
Ryan Esser
Peter Heinrich
Michael Höppner
Philip Janda
Cornelia Ledderose
Jürgen Leicht
Boris Mundweil
Alexander Novotny
Bernhard Olzowy
Jan Ortmann
Walter Rachinger
Harald Wittke

Diplomanden und Praktikanten

Boris Bindl
Florian Buchner
Alex Gregoriev
Stefan Kiessl
Uschi Krüger
Amir Montazerin
Andreas Obermeier
Martin Paster
Stefan Schönherrr
Thomas Sedlmeier

Zivildienstleistende

Daniel Behr
Christian Liefhold
Franz Kost

Gastwissenschaftler

Diagaradjane Parmeswaran
Chennai, Indien
Marko Babjuk
Prag, Tschechien

Assoziierte Mitarbeiter (Urologie)

PD Dr. med. Martin Kriegmair
PD Dr. med. Rolf Muschter
Dr. med. Peter Schneede
Dr. med. Raphaela Waidelich
Dr. med. Robert-Dirk Zaak
Dr. med. Oliver Reich

Assoziierte Mitarbeiter (HNO)

PD Dr. med. Andreas Leunig
Dr. med. Christian Betz
Dr. med. Philip Janda
Dr. med. Stefan Tauber

Assoziierte Mitarbeiter (Neurochirurgie)

PD Dr. med. Walter Stummer
Dr. med. Claudia Götz
Dr. med. Jan Mehrkens
Dr. med. Alexander Muacevic

Publikationen (LFL)

Baumgartner R, Sroka R, Physikalische und technische Grundlagen, in G. Grevers, R. Baumgartner, A. Leunig (eds) Laser im Kopf-Hals-Bereich, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, (2001) 1-16

Betz CS, Lai JP, Xiang W, Janda P, Heinrich P, **Stepp H, Baumgartner R**, Leunig A, In vitro photodynamic therapy of nasopharyngeal carcinoma using 5-aminolevulinic acid, Photochem Photobiol Sci 1 (2002) 315-319

Betz CS, **Stepp H**, Janda P, Grevers G, **Baumgartner R**, Leunig A, A comparative study of normal inspection, auto-fluorescence, and 5-ALA induced PPIX fluorescence for oral cancer diagnosis, Inter J Cancer 97 (2002) 245-252

Beyer W, Waidelich R, Knüchel R, **Stepp H, Baumgartner R**, Hofstetter A, Technical concepts for white light photodynamic therapy of bladder cancer, Med Laser Appl 17 (2002) 37-40

Bogaards A, Aalders MC, Zeyl CC, de Blok S, Dannecker C, Hillemanns P, **Stepp H**, Sterenborg HJ, Localization and staging of cervical intraepithelial neoplasia using double ratio fluorescence imaging, J Biomed Opt 7(2) (2002) 215-220

Ehrhardt A, Stepp H, Hofstetter A, Medizin: Den Krebs zum Leuchten bringen – Inkohärente Lichtsysteme für die endoskopische Fluoreszenzdiagnostik, Laser und Photonik 3 (2002) 30-32

Frimberger D, Schneede P, Hungerhuber E, **Sroka R**, Zaak D, Siebels M, Hofstetter A, Autofluorescence and 5-aminolevulinic acid induced fluorescence diagnosis of penile carcinoma - New techniques to monitor Nd:YAG laser therapy, Urol Res 30(5) (2002) 295-300

Frimberger D, Zaak D, **Stepp H**, Knüchel R, **Baumgartner R**, Schneede P, Schmeller N, Hofstetter A, Autofluorescence imaging to optimize 5-ALA-induced fluorescence endoscopy of bladder carcinoma, Urology 58(3) (2001) 372-375

Gamarra F, **Wagner S**, Al-Batran S, Maier I, **Castro M,** Hautmann H, Bergner A, **Baumgartner R,** Huber RM, Kinetics of 5-aminolevulinic acid-induced fluorescence in organ cultures of bronchial epithelium and tumor, Respiration 69(5) (2002) 445-450

G. Grevers, **R. Baumgartner**, A. Leunig (eds), Laser im Kopf-Hals-Bereich, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York (2001)

Häussinger K, **Pichler J**, Stanzel F, Markus A, **Stepp H**, Morresi-Hauff A, **Baumgartner R,** Autofluorescence bronchoscopy: The D-Light System, Interventional Bronchoscopy 30 (2000) 243-252

Häussinger K, Diaz-Jimenez JP, Rodroguez AN, Stanzel F, Huber RM, **Pichler J**, **Baumgartner R**, Photodynamic therapy: Palliative and curative aspects, Interventional Bronchoscopy 30 (2000) 159-170

Hillemanns P, **Stepp H, Baumgartner R,** Peritoneal endometriosis detection - Reply American Journal of Obstetrics and Gynecology 184(5) (2001) 1047-1047

Hillemanns P, Untch M, Dannecker C, **Baumgartner R**, **Stepp H**, Diebold J, Weingandt H, Prove F, Korell M, Photodynamic therapy of vulvar intra-epithelial neoplasia using 5-aminolevulinic acid, Int J Cancer 85(5) (2000) 649-653

Hillemanns P, Weingandt H, **Baumgartner R**, Diebold J, Xiang W, **Stepp H,** Photodetection of cervical intraepithelial neoplasia using 5-aminolevulinic acid-induced porphyrin fluorescence, Cancer 88(10) (2000) 2275-2282

Hillemanns P, Weingandt H, **Stepp H**, **Baumgartner R**, Xiang W, Korell M, Assessment of 5-aminolevulinic acid-induced porphyrin fluorescence in patients with peritoneal endometriosis, Am J Obstet Gynecol 183(1) (2000) 52-57

Hohla A, **Stepp H**, **Baumgartner R**, et al, UV-excited autofluorescence for the detection of neoplasias in the urothelium Biomedical Topical Meeting, Biomedical Topical Meetings, Technical Digest, Apr 02-05 (2000) 14-17

Janda P, **Sroka R**, **Baumgartner R**, Grevers G, Leunig A, Laser treatment of hyperplastic inferior nasal turbinates: A review, Lasers Surg Med 28(5) (2001) 404-413

Janda P, **Sroka R**, Betz CS, **Baumgartner R**, Leunig A, Comparison of laser induced effects on hyperplastic inferior nasal turbinates by means of scanning electron microscopy, Lasers Surg Med 30(1) (2002) 31-39

Janda P, **Sroka R**, Betz CS, Grevers G, Leunig A, Ho:YAG and diode laser treatment of hyperplastic inferior nasal turbinates, Laryngorhinootologie 81(7) (2002) 484-490

Janda P, **Sroka R**, Tauber S, **Baumgartner R**, Grevers G, Leunig A, Diode laser treatment of hyperplastic inferior nasal turbinates, Lasers Surg Med 27(2) (2000) 129-139

Koenig F, Knittel J, **Stepp H**, Diagnosing cancer in vivo, Science 292(5520) (2001) 1401-1403

Krieg RC, Rauch J, Seidl J, **Stepp H**, Messmann H, Knüchel R, Differential accumulation and organ specific metabolism of 5-aminolevulinic acid between cancer cells, normal epithelial and stromal cell, Proc. SPIE Vol 4156, Amsterdam, Netherlands, (2000) 38-45

Leunig A, Betz CS, **Heinrich P**, Janda P, **Baumgartner R**, Fluoreszenzdiagnostik von Karzinomen im Mund-Rachen-Kehlkopf-Bereich nach Applikation von 5-Aminolävulinsäure, Laryngorhinootologie 81(11) (2002) 807-814

Leunig A, Betz CS, Mehlmann M, **Stepp H**, Arbogast S, Grevers G, **Baumgartner R**, A pilot series demonstrating fluorescence staining of laryngeal papilloma using 5-aminolevulinic acid, Laryngoscope 110 (2000) 1783-1785

Leunig A, Betz CS, Mehlmann M, **Stepp H**, Arbogast S, Grevers G, **Baumgartner R,** Detection of squamous cell carcinoma of the oral cavity by imaging 5-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX fluorescence, Laryngoscope 110(1) (2000) 78-83

Leunig A, Mehlmann M, Betz C, **Stepp H**, Arbogast S, Grevers G, **Baumgartner R,** Fluorescence staining of oral cancer using a topical application of 5-aminolevulinic acid: fluorescence microscopic studies, J Photochem Photobiol B 60(1) (2001) 44-49

Leunig A, **Sroka R**, Janda P, et al, Endonasal laser surgery with the combination of a new laser fiber guidance instrument and a diode laser, The European Congress of Oto-Rhino-Laryngology Head and Neck Surgery, Vols 1 and 2 (2000) 449-453

Leunig A, Betz CS, **Baumgartner R,** Grevers G, Issing WJ, Initial experience in the treatment of oral leukoplakia with high-dose vitamin A and follow-up 5-amino-levulinic acid induced protoporphyrin IX fluorescence, European Archives of Oto-Rhino-Laryngology 257(6) (2000) 327-331

Leunig A, Janda P, Grevers G, Laser-chirurgie in der Rhinologie. In G. Grevers, **R. Baumgartner**, A. Leunig (eds), Laser im Kopf-Hals-Bereich, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York (2001) 43-63

Leunig A, Betz C, Mehlmann M, Grevers G, Work in progress: Fluoreszenzdiagnostik von Tumoren im Mund-Rachen-Kehlkopfbereich mit 5-Aminolävulinsäure. In G. Grevers, **R. Baumgartner**, A. Leunig (eds), Laser im Kopf-Hals-Bereich, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York (2001) 139-153

Muacevic A, Peller M, **Sroka R**, Kalusche B, **Pongratz T**, Kreth FW, Steiger HJ, Reiser M, Reulen HJ, Brain protective interstitial laser thermotherapy. Therapy of brain tumors without secondary damage, MMW Fortschr Med 143(2) (2001) 87-88

Ochsenkuehn T, Tillack C, **Stepp H,** Ott SJ, **Baumgartner R,** Goeke B, Sackmann M, Low frequency of colonic dysplasias in patients with longstanding IBD-colitis, Gastroenterology 120(5) (2001) 2270

Olzowy B, Hundt CS, **Stocker S**, Bise K, Reulen HJ, Stummer W, Photoirradiation therapy of experimental malignant glioma with 5-aminolevulinic acid, J Neurosurg 97(4) (2002) 970-976

Ott SJ, Ochsenkuehn T, **Stepp H**, Holl J; Brand S, Pauletzki J, **Baumgartner R**, Sackmann M, Detection of colonic dysplasia by laser-induced fluorescence endoscopy with and without 5-aminolevulinic acid, Gastrointestinal Endoscopy 51(4) (2000) 3449

Reich O, Corvin S, Oberneder R, **Sroka R**, Muschter R, Hofstetter A, In vitro comparison of transurethral vaporization of the prostate (TUVP), resection of the prostate (TURP), and vaporization-resection of the prostate (TUVRP), Urol Res 30(1) (2002) 15-20

Schaffer M, Bonel H, **Sroka R**, Schaffer PM, Busch M, Reiser M, Dühmke E, Effects of 780 nm diode laser irradiation on blood microcirculation: preliminary findings on time-dependent T1-weighted contrast-enhanced magnetic resonance imaging (MRI), J Photochem Photobiol B 54(1) (2000) 55-60

Schaffer M, Bonel H, **Sroka R**, Schaffer PM, Busch M, Sittek H, Reiser M, Dühmke E, Magnetic resonance imaging (MRI) controlled outcome of side effects caused by ionizing radiation, treated with 780 nm-diode laser - preliminary results, J Photochem Photobiol B 59(1-3) (2000) 1-8

Seidl J, Krieg RC, Rauch J, Waidelich R, **Stepp H**, Knüchel R, Formation of 5-aminolevulinic acid (ALA)-induced protoporphyrin IX (PPIX) and photodynamic effectiveness in human urothelial cell lines, Proc. SPIE 4156, Amsterdam, Netherlands (2000) 46-53

Seidl J, Rauch J, Krieg RC, Appel S, **Baumgartner R**, Knuechel R, Optimization of differential photodynamic effectiveness between normal and tumor urothelial cells using 5-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX as sensitizer, Inter J Cancer 92(5) (2001) 671-677

Sroka R, Rösler P, Janda P, Grevers G, Leunig A, Endonasal laser surgery with a new laser fiber guidance instrument. Laryngoscope 110(2 Pt 1) (2000) 332-334

Sroka R, **Baumgartner R,** Wechselwirkung Licht - Gewebe. In G. Grevers, **R. Baumgartner**, A. Leunig (eds), Laser im Kopf-Hals-Bereich, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York (2001) 17-27

Sroka R, Laserschutz. In G. Grevers, **R. Baumgartner**, A. Leunig (eds), Laser im Kopf-Hals-Bereich, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York (2001) 183-189

Stanzel F, Häussinger K, Geiger D, Pichler J, Sauer W, **Stepp H,** Photodynamic therapy in pneumology, Pneumologie 54(7) (2000) 269-277

Stummer W, Novotny A, **Stepp H**, Goetz C, Bise K, Reulen HJ, Fluorescence guided resection of glioblastoma multiforme utilizing 5-ALA-induced porphyrins. A prospective study in 52 consecutive patients, J Neurosurg 93 (2000) 1003-1013

Tauber S, **Baumgartner R**, Schorn H, **Beyer W**, Lightdosimetric quantitative analysis of the human petrous bone: Experimental study for laser irradiation of the cochlea, Laser Surg Med 28(1) (2001) 18-26

Tauber S, **Beyer W**, Schorn K, Work in Progress: Die transmeatale kochleäre Laserstimulation bei Funktionsstörungen des Innenohres. In G. Grevers, **R. Baumgartner**, A. Leunig (eds) Laser im Kopf-Hals-Bereich, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York (2001) 155-166

Waidelich R, **Stepp H**, **Baumgartner R**, Weninger E, Hofstetter A, Kriegmair M, Clinical experience with 5-aminolevulinic acid for the photodynamic therapy of refractory superficial bladder cancer, J Urol 165 (2001) 1904-1907

Wei XN, Weingandt H, Ließmann F, Klein S, **Stepp H**, **Baumgartner R**, Hillemanns P, Photodynamic effects induced by aminolevulinic acid esters on human cervical carcinoma cells in culture, Photochem Photobiol 74(4) (2001) 617-623

Weingandt H, Ließmann F, **Stepp H**, Hillemanns P, Fluoreszenzdiagnostik der CIN nach topischer Applikation von 5-ALA, Geburts Frauenheilk 60 (2000) 146

Weingandt H, **Stepp H**, **Baumgartner R**, Diebold J, Xiang W, Hillemanns P, Autofluorescence spectroscopy for the diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia, BJOG 109(8) (2002) 947-951

Xiang W, Weingandt H, Ließmann F, Klein S, **Stepp H**, **Baumgartner R**, Hillemanns P, Photodynamic effects induced by aminolevulinic acid esters on human cervical carcinoma cells in culture, Photochem Photobiol 74(4) (2001) 617-623

Xiang W, Weingandt H, **Stepp H**, Hillemanns P, Fluoreszenzkinetik von PPIX nach Gabe von ALA-Estern beim Zervixkarzinom, Geburtsh Frauenheilk 60(6) (2000)

Zaak D, Frimberger D, **Stepp H, Wagner S, Baumgartner R**, Schneede P, Siebels M, Knuchel R, Kriegmair M, Hofstetter A, Quantification of 5-aminolevulinic acid induced fluorescence improves the specificity of bladder cancer detection, J Urol 166(5) (2001) 1665-1669

Zaak D, Hungerhuber E, Schneede P, **Stepp H**, Frimberger D, Corvin S, Schmeller N, Kriegmair M, Hofstetter A, Knüchel R, Role of 5-aminolevulinic acid in the detection of urothelial premalignant lesions, Cancer 95(6) (2002) 1234-1238

Zaak D, Kriegmair M, **Stepp H**, **Baumgartner R**, Oberneder R, Schneede P, Corvin S, Frimberger D, Knuchel R, Hofstetter A, Endoscopic detection of transitional cell carcinoma with 5-aminolevulinic acid: results of 1012 fluorescence endoscopies, Urology 57(4) (2001) 690-694

Zaak D, **Stepp H**, **Baumgartner R**, Schneede P, Waidelich R, Frimberger D, Hartmann A, Knüchel R, Hofstetter A, **Hohla A**, Ultraviolet-excited (308 nm) autofluorescence for bladder cancer detection, Urology 60(6) (2002) 1029-1033

Diplomarbeiten, Dissertationen und Habilitationen (LFL)

Diplomarbeiten

Doris Bindl (Dipl. Ing.), Optische Kohärenztomographie am Mittelohr
Fachhochschule - München, 2001

Florian Buchner (Dipl. Ing.), Aufbau eines Kamerasystems zur Visualisierung funktioneller Areale des Cortex
Fachhochschule - München, 2000

Uschi Krüger (Dipl. Ing.), Entwicklung eines Nachweissystems von UV-Licht-induzierter Gewebeautofluoreszenz
Fachhochschule - München, 2002

Amir Montazerin (Dipl. Ing.), Planung und Konstruktion eines Handstückes zur Verbesserung der Lichtapplikation und Bildgebung im Rahmen der fluoreszenzgestützten Diagnostik von Tumoren in der Mundhöhle
Fachhochschule - München, 2001

Andreas Obermeier (Dipl. Ing.), Entwicklung eines Zervix-Applikators für die Photodynamische Therapie im gynäkologischen Bereich
Fachhochschule - München, 2001

Martin Paster (Dipl. Ing.), Entwicklung eines autofluoreszenzgesteuerten Feedbacksystems für die medizinische Gewebeablation mit dem Er:YAG-Laser
Fachhochschule - München, 2000

Stefan Schönherr (Dipl. Ing.), Entwicklung, Aufbau und Testung eines Systems zur Induktion und zum Nachweis endogener Fluoreszenzen und diffuser Remissionen
Fachhochschule - München, 2001

Thomas Sedlmaier (Dipl. Ing.), Entwicklung eines bildgebenden Systems zur Tumordiagnose durch UV-angeregte Autofluoreszenz
Fachhochschule - München, 2000

Promotionen

Christian Betz (Dr. med.) Combined Fluorescence Diagnosis (5-ALA Induced PPIX and Autofluorescence) for the Detection and Delineation of Oral Carcinomas: Fluorescence Imaging, Spectral Analysis and Kinetics, LMU München, 2000

Ryan Esser (Dr. med) In-vitro-Untersuchungen zur interstitiellen und ablativen Laserkoagulation für die Behandlung der benignen Prostatahyperplasie, LMU München, 2001

Philipp Janda (Dr. med.) Ho:YAG-Laseranwendung zur Behandlung der Nasenmuschelhyperplasie, LMU München, 2000

Michael Mehlmann (Dr. rer. biol. hum.) Spektroskopische und fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen zur Tumorselektivität von 5-Aminolävulinsäure-induzierter Protoprorphyrin-IX-Fluoreszenz im Mund/Rachenraum, LMU München, 2000

Simon Wagner (Dr. rer. biol. hum.) Fluoreszenzquantifizierung beim Harnblasen-karzinom nach Instillation von 5-Amino-lävulinsäure, LMU München, 2000

Helmut Weingandt (Dr. rer. biol. hum.) Photodynamische Diagnostik der zervikalen intraepithelialen Neoplasie, LMU München, 2000

Harald Wittke (Dr. med.) In-vitro-Untersuchungen am Myokard zum Vergleich unterschiedlicher Lasersysteme für die Transmyokardiale Laserrevaskularisation (TMLR), LMU München, 2000

Wei Xiang (Dr. rer. biol. hum.) Untersuchungen zu PDT-Effekten induziert durch 5-ALA Ester in gynäkologischen Zelllinien, LMU München, 2002

Habilitationen

Peter Hillemanns (PD Dr. med.) Neue Ansätze in Diagnostik und Therapie der intraepithelialen Neoplasien des unteren Genitaltrakts, LMU München, 2000

Andreas Leunig (PD Dr. med.) Fluoreszenzdiagnostik von Tumoren im Mund-Rachen-Kehlkopf-Bereich mit 5-Aminolävulinsäure, LMU München, 2002

Walter Stummer (PD Dr. med.) Fluoreszenzgestützte Resektion maligner Gliome mit 5-ALA, LMU München, 2001

Förderprogramme (LFL)

Projekttitel:

Minimally Invasive Surgical Simulator (MISSIMU)

Förderer:
Europäische Gemeinschaft
(Esprit Programm)

Förderungsdauer:
01.08.1999 – 30.09.2001

Projekttitel:

Community Vocational Training Action Programme

Förderer:
Europäische Gemeinschaft
(Leonardo da Vinci)

Förderungsdauer:
01.12.2000 – 30.11.2002

Projekttitel:

Entwicklung eines bildgesteuerten Systems zur Tumordiagnostik und Therapie mit einem XeCl-Excimerlaser

Förderer:
Bayerische Forschungsstiftung

Förderungsdauer:
01.03.1999 – 31.12.2002

Projekttitel:

Konfokale Mikroendoskopie (KOMED)

Förderer:
Projektträger BMBF,
VDI (Mikrosystemtechnik)

Förderungsdauer:
01.10.2001 – 31.03.2004

Projekttitel:

Etablierung der klinischen Anwendung von 5-ALA zur adjuvanten oder fokalen PDT nach Operation maligner Gliome

Förderer:
Deutsche Krebshilfe

Förderungsdauer:
01.01.2002 – 31.12.2004

Projekttitel:

Fluorescence imaging of endogeneous tumormarkers in brain cells and tissue

Förderer:
Deutsch-Israelische Stiftung
(GIF)

Förderungsdauer:
01.01.2001 – 31.12.2003

Kooperationen (LFL)

Wissenschaftliche Einrichtungen

- Universitätsklinikum München
  - Gynäkologische Klinik
  - Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde
  - Neurochirurgische Klinik
  - Institut für Neuropathologie
  - Pneumologie, Klinikum Innenstadt
  - Klinik für Strahlentherapie
  - Dermatologische Klinik
  - Institut für Radiologische Diagnostik
- Balneologie, TU München
- Pneumologie, Asklepioskliniken Gauting
- Klinikum Augsburg, Gynäkologie
- Fachhochschule Aalen
- Universität Regensburg, Pathologie
- Fachhochschule München
- LMU-München, FB Physik
- Universitäts-Klinik Paris
- University of Bristol
- University of Dundee
- Assistance Publique Hôpitaux de Paris
- University of Vilnius

Industriepartner

- 4optics, Lübeck
- ASI, Tel Aviv
- Biolitec AG, Jena
- CeramOptec GmbH, Bonn
- Clinstud GmbH, Aichach
- Dornier Medizintechnik GmbH, Germering
- ERBE, Tübingen
- Karl Storz GmbH, Tuttlingen
- Medac GmbH, Hamburg
- Mikropack, Ostfielden
- MiLaSys Technologies GmbH, Stuttgart
- Möller-Wedel GmbH, Hamburg
- Munich Biotech AG, Martinsried
- m.u.t. GmbH, Wedel
- OptiMed GmbH, Ettlingen
- P.A.L.M., Bernried
- Photocure, Oslo
- Protron-Mikrotechnik GmbH, Bremen
- Technovision GmbH, Dornach
- Thales, Paris
- TUI-Laser; Gräfelfing
- Wavelight AG, Erlangen

Ausbildung und Lehre (LFL)

LFL-Doktoranden-Seminar

In diesem Seminar sind die klinischen und wissenschaftlichen Doktoranden aufgefordert, in Form von Kurzvorträgen den aktuellen Status ihrer wissenschaftlichen Tätigkeit zu präsentieren und zu diskutieren. Das Seminar bildet ein Forum, um übergeordnete Fragestellungen zu erörtern und in den Forschungsrahmen des LFL einzupassen, sowie den Stellenwert der eigenen wissenschaftlichen Aktivitäten einzuordnen.

LFL-Journal-Club

Im Journal-Club werden aktuelle Publikationen zu ausgewählten Themen zusammenfassend dargestellt und diskutiert. Ziel ist es eigene wissenschaftliche Aktivitäten zu bewerten und Anregungen für angrenzende und zukünftige Forschungsgebiete im Grundlagenbereich und der Medizintechnologie zu erhalten.

LFL-Öffentlichkeitsarbeit

Es werden Vorträge und Führungen angeboten, bei denen einem interessierten Publikum die Struktur, das Aufgabengebiet und das Tätigkeitsfeld des LFL vermittelt werden. Bei ausgewählten Experimenten können darüber hinaus Interessierte persönliche Erfahrungen mit den Geräten machen.

Anwendungen physikalischer Methoden in der Medizin

Unter diesem Thema veranstaltet die Sektion Physik der LMU München in den Wintersemestern ein Hauptseminar (Prof. Assmann, Prof. Dünnweber) zusammen mit Medizinphysikern der Uni-Kliniken. In einer Mischung aus Vorlesung und Seminarvorträgen werden die Grundlagen der wichtigsten physikalischen Methoden in der Medizin behandelt und anhand von praktischen Anwendungsbeispielen vorgestellt. Je nach Interesse werden auch Exkursionen in die unterschiedlichen Kliniken durchgeführt.

Themengebiete sind:

- Wechselwirkung von Strahlung mit Materie
- Röntgen- und Synchrotonstrahlung
- Tumortherapie mit ionisierender Strahlung
- Bildgebung mit PET und NMR
- Diagnostik und Therapie mit Lasern
- Ultraschall in der Medizin

Das LFL betreut Themen wie:

- Laser in der Medizin
- Low-Level-Lasertherapie
- Organspezifische Konzepte zur PDT
- Fluoreszenzdiagnostik in der Medizin
- Diagnostik mit 2-Photonen-Mikroskopie
- Bildgebende Kurzzeitspektroskopie
- Lichtabschwächung im Gewebe
- Konfokale Mikroendoskopie

Fachhochschule München – Munich University of Applied Science

Im Rahmen der engen Kooperation mit dem Fachbereich 06 Feinwerk- und Mikrotechnik, Physikalische Technik übernehmen Wissenschaftler des LFL Lehr- und Betreuungsaufgaben in folgenden Lehrveranstaltungen:

Laserenstechnik	Prof. Reuter
Technische Optik	Prof. Reuter
Medizinische Optik	Prof. Wondrazek
Physik-Vorlesung	Dr. Sroka

Zusätzlich werden pro Jahr 2-4 FH-Diplomarbeiten betreut, die im LFL durchgeführt werden.

Fortbildung Lasersicherheit für Ärzte und OP-Personal

In regelmäßigen Abständen werden die Ärzte und das OP-Personal der unterschiedlichen medizinischen Fachbereiche des Klinikum Großhadern in der Lasersicherheit unterwiesen. Ausgehend von den Grundlagen der physikalischen Mechanismen, die für den Laserprozess wichtig sind, wird die Palette der Wechselwirkungen zwischen (Laser-) Licht und biologischem Gewebe erörtert. Diese theoretischen Betrachtungen werden an Beispielen aus den verschiedenen Fachbereichen verdeutlicht.

Beratung

Die Wissenschaftler des Laser- Forschungslabors (LFL) beantworteten jährlich zahlreiche schriftliche Anfragen und eine Vielzahl von telefonischen Anfragen von Patienten, deren Angehörigen sowie Kranken- und Ersatzkassen.

Aufgrund von Beiträgen in Fach- und Publikumszeitschriften oder durch Sendungen der elektronischen Medien wird das LFL als kompetente Forschungseinrichtung um Rat gefragt, welche (Laser-) Behandlungsmethoden oder welche Kliniken für bestimmte Erkrankungen empfohlen werden können.

LIFE

Laser- und Immunologie-Forschungseinrichtungen

Forschungsberichte
Labor für Tumorimmunologie

Einleitung

Krebs ist nach Erkrankungen des Herzkreislaufsystems die zweithäufigste Todesursache in den westlichen Industrienationen. Die Gefährlichkeit der Krebserkrankung ist bedingt durch das unkontrollierte, invasive Wachstum der Tumorzellen, insbesondere aber durch die Fähigkeit zur Metastasenbildung in Kombination mit einer fehlenden oder unzureichenden Reaktion der körpereigenen Abwehr. In den vergangenen zwei Jahrzehnten akkumulierte eine überwältigende Zahl von experimentellen und klinischen Befunden, die belegen, dass das Immunsystem grundsätzlich in der Lage ist, die Entstehung von Tumoren zu kontrollieren. Trotz geringer Immunogenität von Tumoren (es ist schwer für das Immunsystem, die geringen Unterschiede zwischen gesundem Gewebe und Tumorgewebe zu erkennen) gelingt es in Tier und Mensch mit Hilfe von Immuntherapien, das Wachstum der Tumoren zu vermindern oder sie sogar vollständig zu eliminieren. Als besonders immunogen haben sich im Menschen Melanome und Nierentumore erwiesen. Allerdings gelingt es den Metastasen häufig, durch Tarnung oder durch Manipulation des Immunsystems, der Immunabwehr zu entkommen und Tumoren zu bilden. Auch beobachtet man oft eine Schwächung des Immunsystems der Patienten durch die fortgeschrittene Tumorerkrankung.

Die Tumorimmunologie hat sich zur Aufgabe gemacht, nach den immunologischen Ursachen von Krebserkrankungen zu suchen, die körpereigenen Abwehrmechanismen zu erforschen und neue Wege zu finden, die Zellen des Immunsystems oder Tumorzellen gezielt therapeutisch zu beeinflussen. Aufgrund der immer besseren technischen Möglichkeiten und dem damit verbundenen enormen Wissenszuwachs wurde in den letzten Jahren eine Reihe von neuen Immuntherapien erarbeitet und in der Klinik getestet. Hierzu gehören Therapien mit Zytokinen (körpereigene Botenstoffe zur gezielten Beeinflussung von Immunzellen oder Tumorzellen), Tumorvakzinen (Impfstoffe zur spezifischen Stimulation der Immunabwehr), adoptive Zelltherapien (Immunzellen des Patienten werden außerhalb des Körpers stimuliert, vermehrt und reinfundiert), sowie Antikörpertherapien (Hemmung oder Zerstörung von Tumorzellen durch selektive Bindung von Antikörpern). Von den Fortschritten der tumorimmunologischen Forschung ermutigt, glaubt man, dass in nächster Zukunft durch Immuntherapie ein Durchbruch in der klassischen onkologischen Therapie (Tumorchirurgie, Strahlentherapie, Chemotherapie und Hormontherapie) erzielt werden wird.

Die Forschungsaktivitäten im Labor für Tumorimmunologie (LTI) betreffen hauptsächlich urologische Tumoren, insbesondere Nieren- und Prostatatumoren. Für eine erfolgreiche Immuntherapie urologischer Tumoren sehen wir Forschung- und Entwicklungsbedarf auf folgenden Gebieten:

Prognostische Bedeutung disseminierter Tumorzellen im Knochenmark

Ziel: Identifizierung von Risikopatienten; Indikation von adjuvanter Therapie

Optimierung von Tumorvakzinen (Beladung von dendritische Zellen mit Tumorantigenen; Erhöhung der Immunogenität von Tumorantigenen)

Ziel: Therapieoptimierung

Identifizierung von *immune escape*-Strategien in Tumoren

Ziel: Verständnis der Tumortoleranz des Immunsystems; neue therapeutische Ansätze

In vitro-Untersuchung der Wirkmechanismen von therapeutisch wirksamen bispezifischen Antikörpern

Ziel: Einsatz der Antikörper in der Tumortherapie

Evaluation von neuen Immuntherapien im Tiermodell

Ziel: Grundlage für klinische Versuche

Weiterentwicklung von standardisierten Methoden zum *immune monitoring*

Ziel: Überprüfung der Wirksamkeit und Vergleich von Immuntherapien

Im Rahmen der DFG geförderten, klinischen Forschergruppe „Genetisch modifizierte Tumorzellvakzine zur Immuntherapie des Nierenzell- und Prostatakarzinoms“ wurde im Berichtszeitraum in Kooperation mit der Urologischen Klinik der TU München (Prof. Rudolf Hartung) und dem Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung (Prof. Bernd Gänsbacher, Dr. Thomas Brill) eine klinische Phase I/II Studie zur Erprobung einer genmodifizierten Tumorzellvakzine bei Patienten mit hormonrefraktärem Prostatakarzinom (CaP) begonnen. Erste Analysen der Studie zeigten die Verträglichkeit der Vakzine und gaben Hinweise auf eine Verlangsamung der Tumorprogression bei einzelnen Patienten. Zur Behand-

lung von Patienten mit fortgeschrittenem Nierenzellkarzinom (RCC) wurden in Kooperation mit dem Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin und der Robert-Rössle-Klinik in Berlin (Prof. Thomas Blankenstein, Prof. Antonio Pezzutto, Dr. Joachim Kopp) zwei genmodifizierte Tumorzellvakzine produziert und die Zulassung für die Erprobung im Patienten erwirkt. Eine klinische Phase I Studie wird jetzt parallel in München und Berlin beginnen. Durch die gewonnene Erfahrung mit dem *immune monitoring* der CaP-Studie und dem Zulassungsprocedere für beide Studien wurden wichtige Grundlagen für nachfolgende Studien geschaffen.

Die bisherige erfolgreiche Zusammenarbeit zwischen dem LTI und dem Institut für Molekulare Immunologie (IMI) der GSF (Prof. Dolores Schendel) wird auch zukünftig durch die Einrichtung der neuen Klinischen Kooperationsgruppe (KKG) „Immuntherapien bei Urologischen Tumoren“ fortgesetzt. Im Mittelpunkt der gemeinsamen Forschungsarbeiten stehen dendritische Zellen, eine Immunzellpopulation, die wichtig für die optimale Stimulierung des körpereigenen Abwehrsystems für den Kampf gegen Tumorzellen ist.

In weiteren Kooperationen mit der Abteilung für Klinische Pharmakologie und Immuntherapie, Medizinische Klinik Innenstadt (Prof. Stefan Endres; PD Dr. Gunther Hartmann), dem Institut für Chirurgische Forschung (Prof. Georg Enders) und der Chirurgische Klinik (Dr. Hauke Winter, Dr. Natasja van den Engeln), beide im Klinikum Großhadern, werden neue gen- und immuntherapeutische Ansätze mit CpG-Oligonukleotidadjuvantien, Tumorzellvakzinen und neuartigen Gentransportern an einem von uns entwickelten Spontantumormodell erprobt.

Disseminierte Tumorzellen im Knochenmark von Patienten mit urologischen Tumoren

Disseminierte Tumorzellen sind seit vielen Jahren Gegenstand der Forschung im LTI. Insgesamt wurden zur Untersuchung verschiedener Fragestellungen 2183 Knochenmarkaspirationen bei Patienten der Urologischen Klinik durchgeführt, v. a. bei Nierenzell-, Prostata- und Urothelkarzinom; ein Teil der Patienten wurde im Zeitverlauf mehrfach punktiert. Nach Isolierung der mononukleären Zellen mittels Dichtegradienten-Zentrifugation wurden Zytospin-Präparate hergestellt und mit monoklonalen Antikörpern gegen Zytokeratin (CK2 und A45-B/B3) inkubiert. Epitheliale Zellen sind durch ihre Zytokeratin-Expression nachweisbar und stellen sich bei Färbung mit der APAAP-Methode (Alkalische Phosphastase anti-alkalische Phosphatase) und Neufuchsin als Chromogen rot dar. Die normalen Knochenmarkzellen bleiben ungefärbt

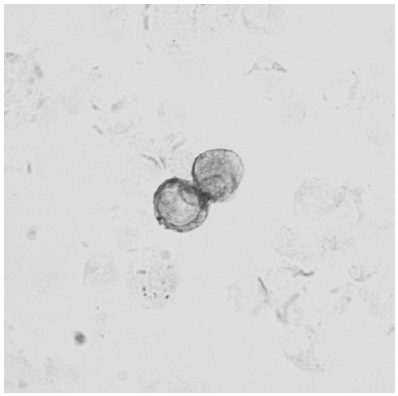


Abb 1: Immunzytochemischer Nachweis von Zytokeratin-positiven Zellen (CK^+) im Knochenmark mit der APAAP-Methode. Die normalen Zellen des Knochenmarks bleiben ungefärbt.

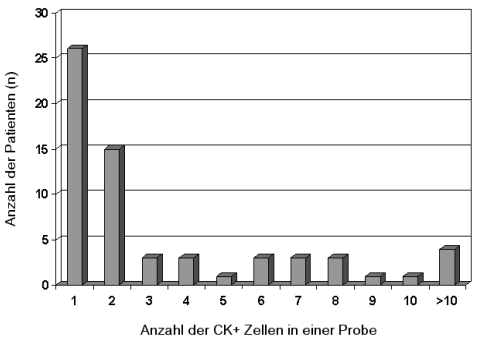


Abb. 2: Verteilung der Anzahl Zytokeratin-positiver (CK^+) Zellen im Knochenmark bei einer Studie an 256 Patienten mit Nierenzellkarzinom. Bei zwei Dritteln der 63 CK+ Patienten waren nur eine oder zwei CK^+-Zellen unter 2 x 10^6 untersuchten Zellen aus der Knochenmarkaspiration nachweisbar.

Die Häufigkeit zytokeratinhaltiger Zellen im Knochenmark bei verschiedenen Tumoren ist in Tabelle kmp-1 dargestellt. Bei positiven Befunden finden sich in der Regel nur wenige epitheliale Zellen (bei etwa zwei Dritteln der Patienten nur eine oder zwei zytokeratinhaltige Zellen unter 2 x 10^6 untersuchten Zellen, Abb. 2), was deren weitere Charakterisierung, beispielsweise mittels immunzytochemischer Doppelmarkierung, methodisch erheblich erschwert.

In einer Studie an 128 konsekutiven Patienten mit Urothelkarzinom der Harnblase (Hofmann *et al.*, in press) konnte eine signifikante Assoziation zwischen dem Nachweis zytokeratinpositiver Zellen im Knochenmark und invasivem Wachstum ($p<0,01$), Metastasierung ($p<0,01$) sowie geringem Differenzierungsgrad ($p<0,01$) gezeigt werden (Tabelle kmp-2). Dies kann als Hinweis auf einen Zusammenhang zwischen dem Auftreten disseminierter Tumorzellen und der Tumorbiologie des Urothelkarzinoms gewertet werden. Von 66 Patienten mit mehrfachem Tumornachweis im Zeitverlauf hatten diejenigen, deren Tumorrezidiv ein höheres Stadium (TNMG-Klassifikation) aufwies als der Tumor bei Erstdiagnose, signifikant häufiger einen positiven Knochenmarkbefund als die Patienten ohne TNMG-Progression (50% gegenüber 19%, $p<0,05$). In einer Kontrollgruppe von 27 Individuen ohne Nachweis einer malignen Erkrankung wurden in keinem Fall zytokeratinpositive Zellen im Knochenmark gefunden, was für die Spezifität dieser Methode spricht.

Für Patienten, bei denen ein Nierenzellkarzinom operativ entfernt wurde, gibt es neben der TNMG-Klassifikation keine etablierten Prognoseparameter. Diese sind dringend nötig, um etwa Hochrisikopatienten gezielt einer adjuvanten Therapie mit Zytokinen zuführen zu können. Disseminierte Tumorzellen erwiesen sich in verschiedenen Studien an anderen Tumorarten als ein prognostischer Parameter und stellen zugleich ein Ziel für immunologische Therapieformen dar.

Um die prognostische Relevanz solcher einzelner Tumorzellen beim Nierenzellkarzinom zu überprüfen, wurde bei 256 Patienten, die zum Diagnosezeitpunkt keine nachweisbaren Metastasen aufwiesen, nach der chirurgischen Tumorentfernung (meist radikale Tumornephrektomie; daneben auch organerhaltende Operationstechniken) der klinische Verlauf doku-

mentiert (mediane Follow-up-Dauer 40 Monate, Maximum 114 Monate). Hauptziel der Studie war die Suche nach Zusammenhängen zwischen der Detektion zytokeratinpositiver (CK^+) Zellen im Knochenmark und dem Auftreten einer Tumorprogression (Lokalrezidiv, Metastasen, tumorbedingter Tod). In der CK^+-Gruppe kam es bei 14% (9/63) zur Tumorprogression, in der CK^--Gruppe bei 11% (22/193). Nach fünf Jahren waren 83% der CK^+-Patienten und 86% der CK^--Patienten progressionsfrei. Im Logrank-Test zeigte sich kein Unterschied zwischen beiden Gruppen (p=0,76; Abb. 3), in der multivariaten Analyse war der Knochenmarkstatus kein unabhängiger prognostischer Parameter neben der TNMG-Klassifikation (Hazard-Ratio 1,0, siehe Tabelle kmp-3). Aus diesen Daten läßt sich folgern, daß beim Nierenzellkarzinom der immunzytochemische Nachweis zytokeratinpositiver Zellen per se gegenüber dem TNMG-Stadium keine zusätzliche prognostische Aussage liefert. Ein Ansatzpunkt zur Identifizierung der Subpopulation von disseminierten Tumorzellen, die zur Initiierung einer Tumorprogression in der Lage sind, stellt die phäno- und genotypische Charakterisierung der detektierten Zellen mit aktuellen molekularbiologischen Methoden (Einzelzell-PCR, Multicolor-FISH u. a.) dar.

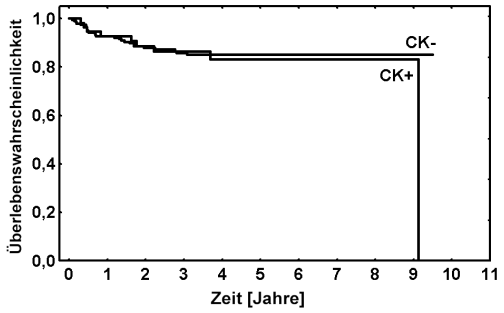


Abb. 3: Kaplan-Meier-Plot für Nierenzellkarzinom-Patienten (M0; n=256) mit (CK^+) und ohne (CK^-) Nachweis Zytokeratin-positiver Zellen im Knochenmark (Logrank-Test: p=0,76).

Diagnose	KMP (n)	auswertbare Erst-KMP (n)	CK^+ (n)	CK^+ (%)
Nierenzellkarzinom	814	592	142	24
Prostatakarzinom	728	548	158	29
Urothelkarzinom	510	312	86	28
Hodentumor	40	35	6	17

Tabelle kmp-1: Im Labor für Tumorimmunologie analysierte Knochenmarkpunktionen (KMP) mit Angabe der Zytokeratin-positiven (CK^+) Resultate. Zusammen mit 91 KMPs bei unterschiedlichen Diagnosen wurden 2183 Fälle bearbeitet.

	CK+ (n) / gesamt (n)	CK+ (%)	p-Wert (χ^2-Test)
pTa/pT1 M0	12 / 79	15	p<0,01
pT2-4 M0	23 / 41	56	
N0 M0	26 / 103	25	p<0,01
N1-3 u./o.M1	11 / 19	58	
N0 M0 G1	4 / 39	10	p<0,01
N0 M0 G2-3	22 / 64	34	

Tabelle kmp-2: Zusammenhang zwischen dem Nachweis zytokeratinpositiver (CK+) Zellen im Knochenmark von Patienten mit Urothelkarzinom der Harnblase und etablierten Prognosefaktoren (TNMG-Klassifikation).

Faktor	Hazard-Ratio	95%-Konfidenzintervall	p-Wert
T<T3b vs. T≥T3b	5.0	2.5 – 10.1	p< 0.0001
N0 vs. N+	18.9	7.3 – 49.0	p< 0.0001
G<G2-3 vs. G≥G2-3	2.8	1.3 – 5.9	p<0.01
CK^- vs. CK^+	1.0	0.5 – 2.3	p=0.96

Tabelle kmp-3: Multivarianzanalyse (Cox-Regressionsmodell) über den Einfluß des Knochenmarkstatus (zytikeratinnegativ (CK^-) oder -positiv (CK^+)) und der TNMG-Stadien auf die Prognose von Patienten mit Nierenzellkarzinom.

Strategien zur Optimierung von DC-basierten Tumorzellvakzinen

Beladung von dendritischen Zellen (DC) mit Tumorantigen-cRNA

Dendritische Zellen (DC) gehören zu den effizientesten Antigen-präsentierenden Zellen im Immunsystem und nehmen daher eine Schlüsselrolle bei der Aktivierung spezifischer Immunantworten ein. Hieraus leitet sich auch das große Interesse ab, dendritische Zellen für die Immuntherapie bei Krebspatienten zu nutzen. DC sind gewebeständig über den ganzen Körper verteilt, können aber sowohl aus pluripotenten Stammzellen als auch aus Monozyten unter definierten Zellkulturbedingungen generiert werden (Abb. 1A, 1B).

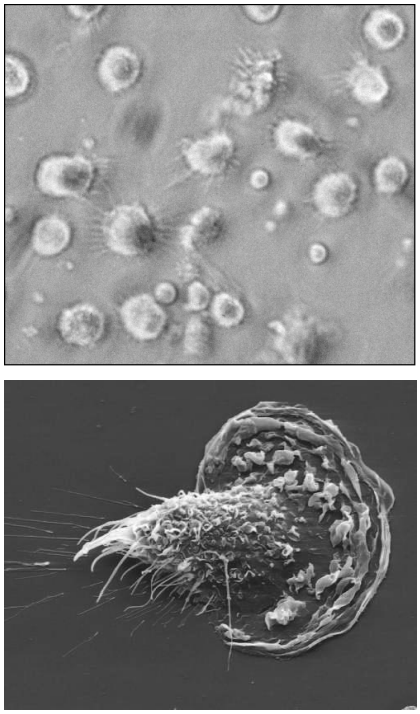


Abb. 1A, -B: Dendritische Zellen nach Kultivierung mit GM-CSF und IL-4. DC können innerhalb weniger Minuten von ihrer nicht-adhärenten in ihre adhärente Form übergehen. Gezeigt sind (A) die lichtmikroskopische und (B) die rasterelektronenmikroskopische Darstellung. Letztere wurde uns freundlicherweise von der GBF, Braunschweig, zur Verfügung gestellt.

So lassen sich beispielsweise mittels GM-CSF (*granulocyte macrophage colony stimulating factor*) und Interleukin-4 (IL-4) aus Blutmonozyten unreife DC erzeugen, die besonders gut Antigen aufnehmen können. Während eines weiteren Reifungsprozesses wird das Antigen intrazellulär prozessiert, d. h. komplexe Proteine in antigene Peptide (Epitope) zerlegt, die dann über MHC-Moleküle auf der Zelloberfläche anderen Zellen des Immunsystems, insbesondere z. B. den T-Lymphozyten präsentiert werden. Dendritische Zellen besitzen auch ausreichend akzessorische Moleküle (zur Adhäsion und Co-Stimulation) auf der Zelloberfläche, wodurch eine überaus effiziente Aktivierung der T-Zellen gewährleistet wird.

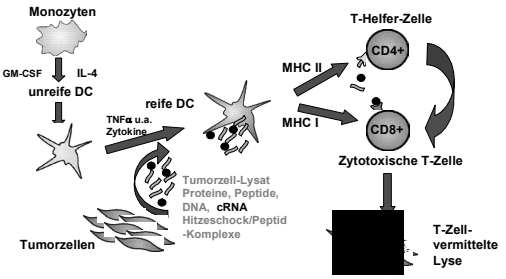


Abb. 2: Dendritische Zellen in der Tumortherapie: Generierung aus Monozyten, Beladung mit Tumorantigen und Darstellung der Immunfunktion.

Ziel einer DC-vermittelten Vakzinierung ist es, den T-Zellen der Patienten effizienter als es über die Tumorzellen selbst möglich ist, Tumor-assoziierte Antigene zu präsentieren. Intensiv wird derzeit daher die optimale *ex vivo*-Beladung von DC mit Tumorantigenen untersucht. Dabei scheint sich die Beladung in Form von Tumor- oder Tumorantigen-RNA durchzusetzen. Die Vorteile liegen auf der Hand: Selbst kleinste Tumormengen erlauben die Isolierung und Amplifizierung von RNA, die dann für zahlreiche Immunisierungen ausreicht. Außerdem können einzelne oder Sätze von bekannten oder noch zu identifizierenden Tumorantigenen in Form ihrer RNA leicht hergestellt werden. Unklar ist allerdings noch der optimale Weg der Einschleusung der Tumorantigen-RNA in die DC.

Mit Hilfe von GFP (*green fluorescent protein*) und eines sehr gut charakterisierten Melanom-Modellsystems werden derzeit unterschiedliche Beladungsstrategien mit verschiedenen Antigenformen (Peptide, einzelne Tumorantigen-RNA, Tumorgesamt-RNA) quantitativ verglichen und für die klinische Anwendung standardisiert. Dabei wird eine definierte Tumorantigen-cRNA mit Hilfe von kationischen Lipiden oder Elektroporation in DC eingebracht und die intrazelluläre Tumorantigen-cRNA durch *real time* Reverse Transkriptase (RT)-PCR quantifiziert. Abbildung 3 zeigt die Abnahme der GFP-spezifischen cRNA zu verschiedenen Zeitpunkten nach Transfektion und die Zunahme der Fluoreszenzintensität des gebildeten GFP Proteins. Bisherige Ergebnisse legen nahe, dass die RNA-Moleküle durch kationische Lipide geschützt werden und lange genug in den DC stabil bleiben, so dass genügend Peptide für die Beladung von MHCI- und

MHCII-Molekülen generiert werden können. Die Elektroporation scheint jedoch die effizientere Methode zu sein, da nahezu 90 % der DC transfiziert werden können (Abb. 4). Die Charakterisierung des Prozessierungsweges der Tumorantigene in den DC und die Induktion und Charakterisierung der dadurch erzeugten Tumor-spezifischen T-Zell-antworten sind weitere Arbeitsschwerpunkte. So lässt sich beispielsweise mit Hilfe spezifischer T-Zellklone überprüfen, ob die DC nach Transfektion mit einer spezifischen cRNA oder kompletter Tumorzell-cRNA in der Lage sind, entsprechend prozessierte Peptide des neu gebildeten Proteins den T-Zellen zu präsentieren (Abb. 5). Die Untersuchungen dienen letztendlich der Entwicklung neuer DC-Therapien, die gezielt spezifische T-Helferzellpopulationen und zytotoxische T-Zellen im Patienten ansprechen sollen.

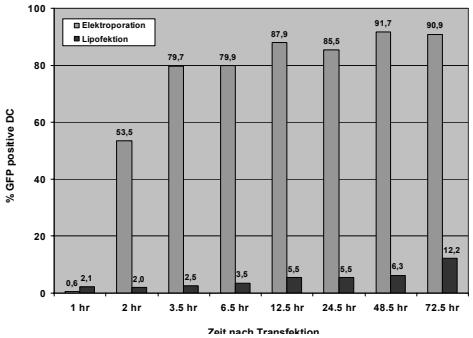


Abb. 4: Vergleich Elektroporation vs. Lipofektion reifer DC. Quantifizierung fluoreszierender GFP-positiver DC zu verschiedenen Zeitpunkten nach Transfektion der cRNA.

Die Identifizierung antigener Zielstrukturen für die DC-basierte Therapie des Nierenzellkarzinoms (RCC)

Weltweit konnten über die Methode der Expressionsklonierung bisher nur wenige RCC-assoziierte Antigene identifiziert werden, deren therapeutische Relevanz eher gering einzustufen ist, da es sich in der Mehrzahl um Mutationen – also patientenspezifische Epitope handelt – bzw. die Antigene nur bei wenigen RCC exprimiert werden.

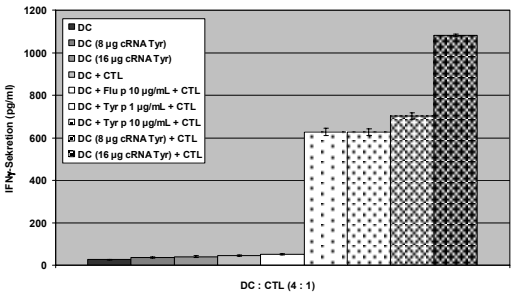


Abb. 5: IFNγ-ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*) als funktioneller Assay zur Quantifizierung spezifischer T-Zellantworten. Dendritische Zellen, generiert aus dem Blut eines HLA-A*0201 positiven Spenders wurden mit Tyrosinase-spezifischer cRNA transfiziert bzw. zur Kontrolle mit dem Tyr-Peptid YMNGTMSQV oder Influenza(Flu)-Peptid GILGFVFTL beladen. Beide Peptide weisen ein HLA-A*0201 Bindungsmotiv auf und können von entsprechenden T-Zellen HLA-A2-restringiert erkannt werden. Jeweils 20.000 Zellen eines Tyrosinase-spezifischen CTL-Klones wurden mit 80.000 DC für 24 Std. inkubiert und anschließend im Kulturüberstand IFNγ bestimmt. Der CTL-Klon erkennt nur DC, die zuvor entweder mit dem Tyr-Peptid beladen oder mit der Tyr-cRNA transfiziert worden waren. Weder die DC alleine noch die Flu-Peptid-beladenen DC werden erkannt.

In den letzten Jahren wurden jedoch mehrere neue Technologien wie subtraktive Hybridisierung, Mikroarray-Analysen, Screening von Genbanken mit Antikörpern, vergleichende Proteomanalysen usw. beschrieben, die einen Vergleich des Expressionsprofils zwischen Tumorgewebe und Normalgewebe erlauben. Mit diesen neuen Technologien können umfangreiche Datensätze gewonnen werden, und es sind zahlreiche Gene beschrieben worden, die ein unterschiedliches Expressionsprofil im Tumorgewebe gegenüber Normalgewebe aufweisen. Mit Hilfe von Computer-Algorithmen können für diese differentiell exprimierten Gene auch Epitope vorhergesagt werden, die an MHC-Moleküle binden können. Mühsam wird es dann, mit Hilfe geeigneter funktioneller Nachweissysteme die biologische und klinische Relevanz dieser Epitope abzuklären. Dennoch wurden mit diesen neuen Verfahren einige sehr interessante Kandidaten für das Nierenzellkarzinom gefunden. Antigene mit potentieller Relevanz sind das Her2/neu-Antigen, das Wilms' Tumor Suppressor-Antigen WT1 and G250, die jeweils antigene Epitope enthalten, die über HLA-A2 präsentiert und von T-Zellen erkannt werden können. In einem biochemischen Ansatz über *reverse phase* HPLC-Analyse von MHC-eluierten Peptiden aus der RCC-Linie RCC-26 konnten ebenfalls Peptide identifiziert werden, die z. T. von den autologen Tumor-infiltrierenden T-Zellen (TIL-26) erkannt wurden (Kooperation Dr. Elfriede Nössner, GSF; Dr. Stefan Stevanovic, Tübingen). Diese und weitere Peptidkandidaten werden gegenwärtig

Expressionsanalysen unterzogen (Kooperation Dr. Bernhard Frankenberger, GSF).

Abbildung 6 zeigt schematisch die Strategie zur Selektion möglicher RCC-spezifischer Antigenkandidaten und ihre Anwendung als Surrogatmarker für das *immune monitoring* und für DC-basierte Therapien.

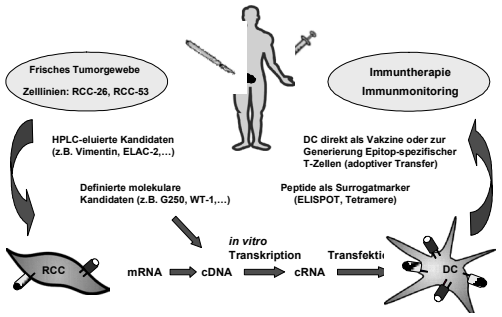


Abb. 6: Selektion von RCC-spezifischen Antigenkandidaten und ihre Anwendung als Surrogatmarker und für DC-basierte Therapien.

In einer grundlegenden Arbeit in den USA (Childs and Barrett, 2002) konnte gezeigt werden, dass durch allogene Knochenmarktransplantation prinzipiell auch große Massen solider Tumoren effektiv beseitigt werden können. Derzeit nicht akzeptabel ist jedoch die mit dieser Behandlung verbundene hohe Morbidität und Mortalität der Patienten. Die Verwendung von DC, die definierte molekulare Zielstrukturen exprimieren, bietet die Möglichkeit *in vitro* Tumor-spezifische T-Zellen zu induzieren und zu expandieren, die dann im adoptiven Transfer eingesetzt werden können. Dies könnte ein akzeptabler therapeutischer Ansatz für transplantierte Patienten nach Toleranzinduktion sein, und er wird in Zukunft in Zusammenarbeit mit Prof. H. J. Kolb, Medizinische Klinik III der LMU München, verfolgt.

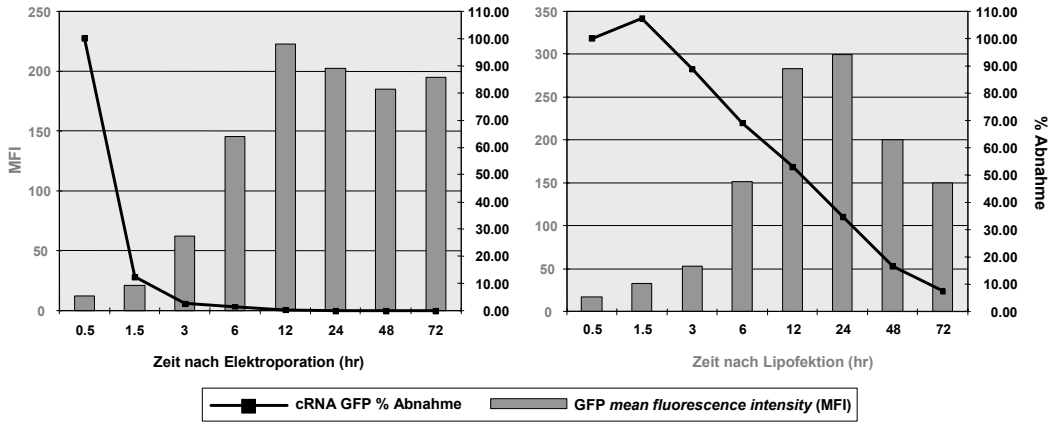


Abb. 3: Vergleich Elektroporation vs. Lipofektion reifer DC. Quantifizierung der GFP(*green fluorescence protein*)-spezifischen cRNA mittels *real time* PCR und des gebildeten Proteins durch Bestimmung der Fluoreszenzintensität am Durchflusszytometer zu verschiedenen Zeitpunkten nach Transfektion der DC. Die Elektroporation wurde mit dem *Gene Pulser Xcell* (Fa. Bio-Rad) durchgeführt, zur Lipofektion wurde *TransFast* (Fa. Promega) verwendet. Die RNA-Quantifizierung wurde mittels des LightCyclers® der Fa. Roche Molecular Diagnostics durchgeführt.

Entwicklung von DC-stimulierenden Tumorvakzinen

Dendritische Zellen (DC) befinden sich in einem unreifen Zustand als „Wächter“ gegen eine Invasion von Pathogenen (wie Viren, Bakterien und Pilze) in den unterschiedlichsten Geweben. In diesem Zustand haben die DC eine enorme Kapazität, fremdes, eine Abwehrreaktion des Immunsystem auslösendes Material (Antigene) aufzunehmen und so zu prozessieren, dass es von MHC-Molekülen spezialisierter *killer*-Zellen (T-Zellen) in Lymphgeweben präsentiert werden kann. Durch Kontakt mit bestimmten Pathogenmolekülen kommt es zu einer Aktivierung der DC, die daraufhin ausreifen und zu äußerst effektiven Stimulatoren einer spezifischen Abwehr durch das Immunsystems werden. Fehlen diese aktivierenden Signale, wie dies bei der Aufnahme von Tumorzellen in der Regel der Fall ist, ist die Immunantwort ineffektiv oder es kann sogar Toleranz gegen die Tumorzellantigene induziert werden. Deshalb ist es für die unterschiedlichsten Tumorimmuntherapien notwendig, die Tumorantigenaufnahme durch DC mit zeitlich und räumlich koordinierten DC aktivierenden Signalen zu verbinden. Zwei verschiedene Strategien, die durchaus miteinander verbunden werden können, werden von uns verfolgt, um dies zu erreichen.

Chimäre DC-stimulierende Tumorantigene

Die erste Strategie beruht darauf, dass auch bestimmte körpereigene Moleküle in der Lage sind, DC zu aktivieren. Dazu gehören die sogenannten Hitzeschockproteine (Hsp), die von Zellen unter Stresssituationen vermehrt gebildet werden. Gelingt es nun, ein Tumorantigen stabil mit Hitzeschockproteinen zu verbinden, so sollte die Aufnahme des Antigens durch die DC mit einem aktivierenden Signal verbunden sein. Ein System, das von der Arbeitsgruppe von Jörg Reimann (Universität Ulm) entwickelt wurde, macht sich die Bindungsfähigkeit eines viralen Proteins (SV40-T-Antigens) an ein Hitzeschockprotein (Hsp73) zunutze. Es genügt die Hsp-Bindungsdomäne des T-Antigens mit einem beliebigen Antigen zu fusionieren, um das resultierende chimäre Protein stabil mit dem Hsp73 zu assoziieren. Zur Immunisierung eignen sich sowohl Tumorzellen, in die die genetische Information für das chimäre Protein mit Hilfe eines Expressionsvektors eingeschleust wurde, als auch eine direkte *in vivo*-Applikation des Expressionsvektors (DNA-Vakzine), da in beiden Fällen das Fusionsprotein die Möglichkeit hat, mit dem zytoplasmatisch vorkommenden Hsp73 zu assoziieren. Um ein Modellantigen zu generieren, musste noch ein Bereich des T-Antigens entfernt werden, der das Protein normalerweise in den Kern dirigiert, wo keine Assoziation mit dem Hsp73 stattfinden kann. Die Immunogenität dieses modifizierten T-Antigens wurde mit der des kompletten, nicht Hsp assoziierten T-Antigens verglichen. Wir konnten zeigen, dass durch die Assoziation des Hsp73 mit dem T-Antigen dessen Immunogenität sowohl *in vitro* als auch *in vivo* entscheidend erhöht werden kann. Interessanterweise beruht dies auf einer verbesserten, nicht klassischen Präsentation des Antigens (Kreuzpräsentation) durch DC. Diese Strategie soll im Weiteren dazu benutzt werden, die Immunität von relevanten Tumorantigenen wie z.B. des karzinoembryonalen Antigens (CEA) zu verbessern.

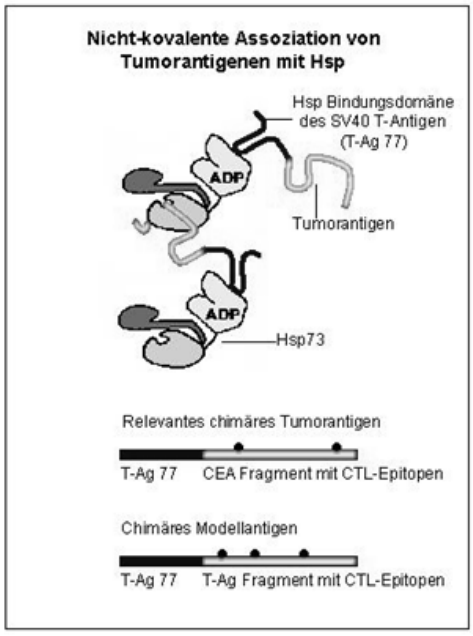


Abb. 7: Strategie zur Kopplung von T-Zellepitop-tragenden Tumorantigenfragmenten mit Stressproteinen (Hsp73). Es soll ein Fusionsprotein hergestellt werden, das aus einem T-Zellepitop-tragenden Tumorantigenfragment z.B. des CEA und der Hsp-Bindungsdomäne des T-Antigens besteht. Die Hsp-Bindungsdomäne des T-Antigens assoziiert mit der ADP-Domäne des Hsp73 und bringt dadurch das Tumorantigenfragment in Kontakt mit der Peptid-Bindungsdomäne des Hsp73. Durch das Vorhandensein von zwei Interaktionsstellen kommt es in der Realität zu der Bildung von Komplexen, die die Stabilität des Fusionsproteins in der Zelle erhöhen und die Kreuzpräsentation der Tumorantigene verbessern.

CEACAM1 als Kostimulator einer Immunantwort

In der zweiten Strategie wird versucht, die an sich schwache körpereigene Immunabwehr durch Aktivierung von auf der Oberfläche von Immunzellen vorhandenen sog. kostimulierende Proteine zu verstärken. Sie eignet sich für Vakzinetherapieansätze, in denen abgetötete Tumorzellen als Immunogen verwendet werden. Diese werden insbesondere verwendet, wenn bei einem Tumor keine definierten Tumorantigene bekannt sind, was bei den meisten Tumorentitäten heute noch der Fall ist. Als kostimulatorische Moleküle, die auf der Oberfläche von DC exprimiert werden, kommen das CD40 oder CEACAM1 in Frage.

Das CEACAM1 ist ein Glykoprotein, das zur Immunglobulinsuperfamilie gezählt wird. Es wurden verschiedene Spleißvarianten des CEACAM1 beschrieben, die eine transmembrane Region und einen intrazellulären Abschnitt von unterschiedlicher Länge besitzen. Der lange zytoplasmatische Bereich des CEACAM1 enthält zwei ITIM-Motive (*immune receptor tyrosine-based inhibition motif*), die im kurzen zytoplasmatischen Anteil fehlten. In verschiedenen Zellsystemen konnte gezeigt werden, dass CEACAM1 eine wichtige regulatorische Funktion bei der Zellaktivierung spielt. Ob CEACAM1 von DC exprimiert wird, war bisher nicht bekannt. Kürzlich konnten wir zeigen, dass aus Knochenmarkzellen hergestellte, murine DC unabhängig von ihrem Reifungszustand CEACAM1 auf ihrer Oberfläche exprimierten. CEACAM1-mRNA-Expressionsanalysen ergaben, dass beide zytoplasmatischen Varianten exprimiert werden (Abb. 8). Durch die Analyse von frisch aus der Milz bzw. Lymphknoten von C57BL/6- und BALB/c-Mäusen isolierten DC konnten wir zeigen, dass auch *in vivo* DC CEACAM1 exprimieren.

Die Expression von CEACAM1 auf unreifen DC ließ vermuten, dass CEACAM1 entweder bei der Antigenaufnahme oder bei der Reifung der DC eine Rolle spielt. Mit dem gut charakterisierten CEACAM1-spezifischen monoklonalen Antikörper AgB10 wurden Signale induziert und die Reaktion der DC analysiert. Die erste Reaktion von unreifen DC auf Kontakt mit Pathogenen ist die Freisetzung von Chemokinen - Botenstoffe, die weitere Immunzellen an den Ort der Pathogeninvasion locken. Eine Untersuchung der Überstände von über CEACAM1 stimulierten DC ergab, dass durch die CEACAM1-vermittelten Signale verschiedene Chemokine zum Teil in erheblicher Menge freigesetzt wurden. Hervorstechend war die enorme Sezernierung von MIP-1α. Wie zu erwarten, konnten wir mit Hilfe von sog. Migrationsassays zeigen, dass die Chemokinfreisetzung funktionell zur Chemoattraktion einer Reihe von immunkompetenten Zellen, wie Granulozyten, Monozyten, T-Zellen und unreifen DC führte. Nach einer Stimulation über CEACAM1 zeigten die DC eine deutliche Reifung, was sich in der erhöhten Expression von MHC-Molekülen (wichtig für die Präsentation von Antigenen) und kostimulatorischen Molekülen, wie CD80 und CD86, manifestierte. Reife DC haben die Fähigkeit durch die Produktion von Zytokinen die T-Zellantwort zu modifizieren. So induziert der Botenstoff IL-12 eine für die Tötung von Tumorzellen wichtige Art von Immunreaktion (Th-1-Immunantwort). Untersucht man die Überstände von über CEACAM1 stimulierte DC, so findet man einen relativ hohen Gehalt an IL-12. Zusätzlich wird die Produktion von IL-6 stimuliert. Das durch CEACAM1 stimulierte Zytokinmilieu impliziert, dass durch eine CEACAM1-Stimulation auf DC eine T_H1-Antwort gefördert wird. Um dies zu untersuchen haben wir $CD4^+$-T-Zellen (Vermittler einer T_H1-Antwort) von DO11-Mäusen (Ovalbuminpeptid-spezifische T-Zellrezeptor-transgene Mäuse) isoliert und sie mit Ovalbumin-beladenen DC stimuliert. Regt man diese DC über CEACAM1 an, so findet man eine Erhöhung der IFNγ- und eine Reduzierung der IL-4-Freisetzung durch Ovalbuminpeptid-spezifische $CD4^+$-T-Zellen, was gleichbedeutend mit einer T_H1-Antwort ist (Abb. 9).

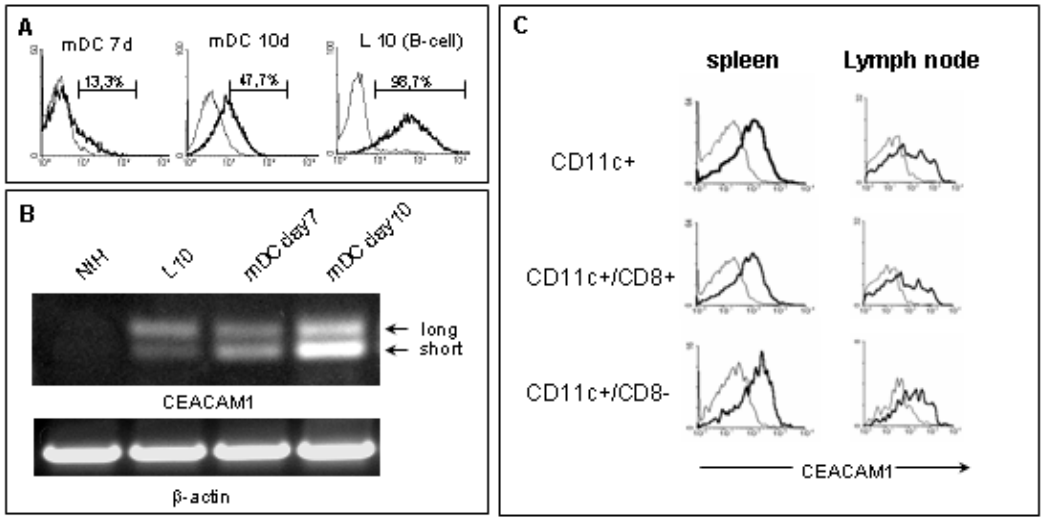


Abb. 8: Expression von CEACAM1 auf murinen DC. (A) Die Histogramme zeigen die relative Fluoreszenzintensität von DC, die mit dem Fluorochrom-konjugierten monoklonalen anti-CEACAM1-Antikörper (mAk) AgB10 (fett gedruckte Kurven), oder einem irrelevanten mAk (graue Kurven) markiert wurden. (B) Nachweis der CEACAM1-spezifischen mRNA in DC, mittels der RT-PCR. Die B-Zellline L10 wurde als Positivkontrolle und NIH 3T3-Zellen als Negativkontrolle verwendet. Durch die Verwendung geeigneter *primer* konnten zwei Produkte amplifiziert werden: das 321 bp große Produkt ist charakteristisch für die lange zytoplasmatische Spleißvariante, das 268 bp große Produkt ist charakteristisch für die kurze zytoplasmatische Spleißvariante von CEACAM1. (C) CEACAM1-Expression von $CD11c^+$-DC, die von Lymphknoten bzw. der Milz von C57BL/6J-Mäusen isoliert wurden. Sowohl $CD8\alpha^+$ als auch $CD8\alpha^-$ DC exprimieren CEACAM1 (fett gedruckte Kurven).

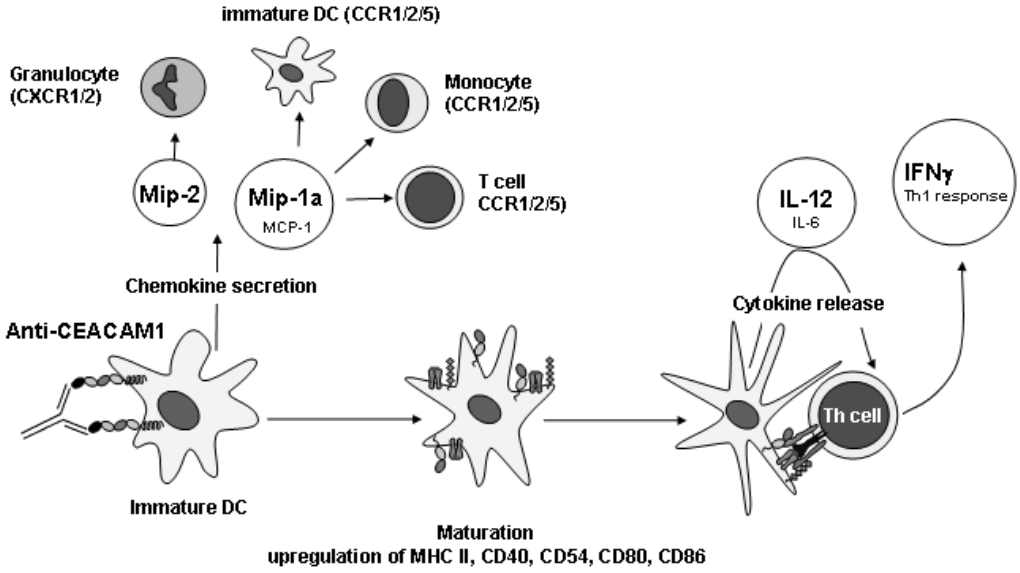


Abb. 9: Grafische Zusammenfassung der Funktion von CEACAM1 auf murinen DC. Werden CEACAM1-spezifische Signale in unreifen DC induziert kommt es zu einer raschen Freisetzung von Chemokinen, die unterschiedliche Immunzellen rekrutieren können. Gleichzeitig beginnen die DC zu reifen, was zu einer Hochregulation von kostimulatorischen Molekülen führt. Die Hochregulation dieser Moleküle ist für die Stimulation der T-Zellen durch die DC notwendig. Die Fähigkeit der reifen DC T-Zellen zu stimulieren wird durch die Freisetzung von Zytokinen, wie IL-12 und IL-6, noch zusätzlich verstärkt, worauf die T-Zellen mit einer stark erhöhten IFNγ-Sekretion reagieren.

Untersuchung von Tumor-immune-escape-Mechanismen

Mechanismen der funktionellen Inaktivierung Tumor-infiltrierender Lymphozyten (TIL) und DC am Beispiel des Nierenzellkarzinoms

Ziel eines weiteren Forschungsvorhabens ist die Analyse der Interaktion Tumor – DC – TIL beim Nierenzellkarzinom, um die Dysregulation der T-Zell-Effektorfunktion *in situ* im Tumor aufklären zu können. Ein besseres Verständnis der Mechanismen, die zur T-Zell-Anergie im Tumormilieu führen, soll letztendlich der Verbesserung immuntherapeutischer Behandlungskonzepte dienen und den Patienten zu einer effektiveren Abwehr ihres autologen Tumors verhelfen.

Seit einiger Zeit ist bekannt, dass solide Tumoren nicht nur von $CD3^+$ und $CD3^-$ Lymphozyten sondern auch von dendritischen Zellen infiltriert sind. Das *in vivo* die Immunabwehr trotzdem gestört ist und die T-Zellen scheinbar in einem Zustand der Anergie verharren, kann unterschiedliche Ursachen haben und alle Zellen in diesem Mikromilieu betreffen. Die Inaktivierung der TIL *in situ* könnte also nicht nur durch die Interaktion mit den Tumorzellen sondern auch durch die Interaktion mit Stromazellen oder intratumoralen DC induziert werden. So werden beispielsweise Faktoren wie VEGF, TGFβ oder IL-10 sezerniert, die zu einer Unterdrückung der Immunantwort ansonsten immunkompetenter Zellen führen. Apoptoseresistenz bei den Tumorzellen ist ebenso beschrieben worden wie auch Defekte in der Signaltransduktionskaskade bei den Lymphozyten. Jedoch können auch inhibitorische Rezeptoren auf den Lymphozyten oder der Reifezustand der DC eine Bedeutung für die gestörte Funktion der Lymphozyten in der Tumorabwehr haben. Insbesondere das Chemokin/Zytokin-Milieu und die Expression der entsprechenden Rezeptoren auf den Lymphozyten und DC im Tumorgewebe könnten dabei eine wesentliche Rolle spielen.

Um die komplexen zellulären Interaktionen aufklären zu können und die Faktoren zu bestimmen, die zur Inaktivierung der TIL führen, konzentrierten wir uns zunächst auf die Interaktion zwischen TIL und Tumorzellen ohne Berücksichtigung der DC und Stromazellen. Wir haben anhand von TIL aus primärem RCC-Gewebe die zellulären und molekularen Grundlagen der Immunantworten gegenüber RCC untersucht. Tumor-infiltrierende Lymphozyten wurden dazu auf verschiedene Weise gewonnen. Zum einen wurden TIL durch „Auswandern“ aus post-operativ erhaltenem Tumorgewebe in Anwesenheit niedriger Konzentration von IL-2 gewonnen. Im Regelfall wurden dabei die nach ca. 14 Tagen aus dem Tumorgewebe ausgewanderten Lymphozyten geerntet und kryokonserviert. In einigen Fällen wurden die unstimulierten *In-vitro*-TIL vor der weiteren Untersuchung expandiert, entweder durch Kultur mit immobilisiertem anti-CD3-Antikörper oder durch Kokultur mit autologen Tumorzellen, sofern diese vorhanden waren. TIL wurden auch aus Tumorgewebe direkt isoliert, indem das Gewebe entweder enzymatisch verdaut oder mechanisch zerkleinert wurde. Diese „*Ex vivo*-TIL“ dürften die Lymphozytenzusammensetzung am Ort des Tumors *„in situ*“ am besten wiedergeben. Um die Zusammensetzung der Lymphozytenpopulation *in situ* zu untersuchen, wurden immunhistologische Färbungen an kryokonserviertem Tumorgewebe durchgeführt.

Die Analysen zeigten, dass $CD3^+CD8^+$ TIL zahlenmäßig über $CD3^+CD4^+$ T-Zellen dominieren. Wenn die T-Zellen aus dem Tumormilieu entfernt werden, sind sie *in vitro* expandierbar und funktionell aktiv, auch was ihre Anti-Tumor-Reaktivität betrifft. Auch TGFβ- und VEGF-produzierende RCC sind in der Lage, autologe Tumorantigen-spezifische CTL sowie allogene CTL zu stimulieren. RCC, die nach gentechnischer Modifikation, IFNγ exprimieren können, sind ebenfalls in der Lage $CD4^+$ T-Zellen zu aktivieren und wurden verstärkt von MHC-restringierten zytotoxischen T-Lymphozyten (CTL) erkannt. Allerdings wurden diese Tumorzelllinien gegenüber nicht-MHC-restringierten CTL resistent. Letzteres deutet darauf hin, dass der Funktionsverlust zumindest einiger T-Zellen einer negativen Regulation unterliegt, die über MHC-Moleküle vermittelt wird. Während die $CD3^+$ CTL eine Perforindefizienz aufwiesen, konnte eine stark Perforin-positive Population infiltrierender Zellen *in situ* identifiziert werden. Diese Zellen sind natürliche Killerzellen (NK-Zellen), die direkt nach ihrer Isolierung aus dem Tumorgewebe keine oder nur schwache zytotoxische Aktivität besitzen. Nach 24-std. Kultur in IL-2-haltigem Medium sind sie jedoch *in vitro* in der Lage, Tumorzellen zu lysieren (Abb. 1). Mit einem neuen monoklonalen Antikörper konnte gezeigt werden, dass fast alle dieser $CD3^-$ $CD56^+$ TIL den NK-spezifischen Rezeptor NKp46 exprimieren (Abb. 2), was den Nutzen IL-2-basierter Immuntherapien beim RCC unterstreicht. Ferner scheinen diese NK-Zellen

ein Repertoire an aktivierenden und inhibitorischen Rezeptoren zu tragen, das sich von dem auf NK-Zellen aus dem peripheren Blut der Patienten unterscheidet. Dies spricht dafür, dass diese NK-Zellen selektiv ins Tumorgewebe rekrutiert werden. Der verantwortliche Mechanismus ist derzeit völlig unklar.

Die Inhibition von NK-Zellen durch Interaktionen ihrer inhibitorischen Rezeptoren (IR) und den MHC-Liganden z. B. auf den Tumoren stellt einen wichtigen negativen Rückkopplungsmechanismus in der Kontrolle zellulärer Zytotoxizität dar. Es konnte gezeigt werden, dass dieses Prinzip der negativen Regulation durch MHC auch für die zytotoxische Aktivität nicht-MHC-restringierter T-Zellen gültig ist. Behandlung von RCC-Zellen mit IFN-γ (gesteigerte MHC-Expression) führte zu nahezu kompletter Resistenz gegen die Lyse durch NK-Zellen und nicht-MHC-restringierte T-Zellen, während IFN-α nur schwache Resistenz induzieren konnte. Diese Beobachtung gewinnt an Bedeutung, wenn man die unterschiedlichen klinischen Effekte dieser beiden Interferone bei RCC-Patienten betrachtet. Die Kapazität von NK-Zellen und nicht-MHC-restringierten T-Zellen, MHC-defiziente Zellen zu lysieren, eröffnet die Möglichkeit, solche nicht-MHC-restringierten Zellen für einen Gegenschlag gegen MHC-Verlustvarianten einzusetzen, die sich in Anwesenheit einer starken MHC-restringierten CTL-Antwort entwickeln können.

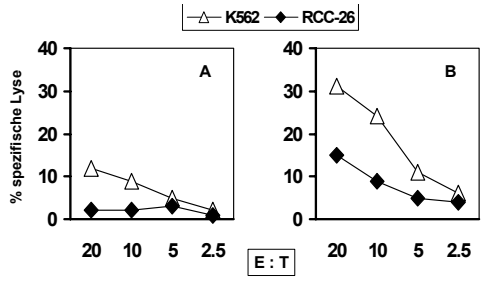


Abb. 1: Zytotoxische Aktivität isolierter TIL *ex vivo*.Die zytotoxische Aktivität der TIL eines RCC-Patienten (#2926) wurde nach 24-std. Kultivierung ohne (A) und mit (B) 20 U/ml IL-2 mittels eines radioaktiven Chromfreisetzungsassay bestimmt. Gezeigt wird die spezifische Lyse (in %) ^{53}Cr-markierter K562 (HLA-defizient) und RCC-26 Zelllinien in Abhängigkeit unterschiedlicher Effektor : Target-Verhältnisse.

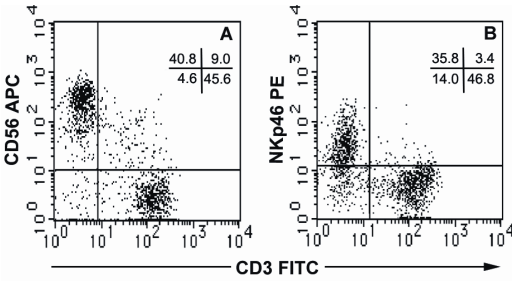


Abb. 2: Phänotypische Analyse frisch isolierter TIL .Simultane Mehrfarben-Immunfluoreszenz zeigt, dass nahezu alle $CD3^{-}CD56^{+}$ TIL auch NKp46 exprimieren. (Der PE-konjugierte NKp46 Antikörper wurde uns freundlicherweise von Prof. M. Colonna, Washington University, St. Louis, USA zur Verfügung gestellt).

Bedeutung von CEACAM1 (CEA-verwandtes Zelladhäsionsmolekül 1) beim Nierenzellkarzinom

Verschiedene Untersuchungen, die in den letzten Jahren veröffentlicht wurden, weisen darauf hin, dass CEACAM1, ein Zell-Zelladhäsionsmolekül der Immunglobulinsuperfamilie, eine wichtige Rolle bei der Tumorprogression unterschiedlicher Tumorentitäten spielt. Es wurde berichtet, dass CEACAM1 sowohl beim Prostatakarzinom als auch beim Kolonkarzinom eine Tumorsuppressorfunktion ausüben kann. Dies bedeutet, dass Tumoren die kein oder wenig CEACAM1 exprimieren ein schnelleres Wachstum zeigen als Tumoren mit hoher CEACAM1-Expression. Dementsprechend findet man in diesen Tumoren eine geringere CEACAM1-Expression als im entsprechenden Normalgewebe, von dem der Tumor abstammt. Auf der anderen Seite erschienen im letzten Jahr mehrere Publikationen, die bei anderen Tumorentitäten, wie dem Lungenkarzinom und dem malignen Melanom, eine Expression von CEACAM1 eindeutig mit einer verschlechterten Prognose für den Patienten korrelierten. Beim malignen Melanom wurde dies auf eine geringere Angreifbarkeit CEACAM1-exprimierender Tumorzellen durch Killerzellen des Immunsystems zurückgeführt. CEACAM1 wird in den letztgenannten Tumorentitäten vom entsprechenden Normalgewebe nicht synthetisiert.

Die Möglichkeit der prognostischen Relevanz von CEACAM1 bei bestimmten Tumoren als auch die scheinbaren Widersprüche der bisher erhobenen Daten über die Funktion von CEACAM1 bei der Tumorentwicklung haben uns veranlasst, die Expression von CEACAM1 beim Nierenzellkarzinom (*renal cell carcinoma*, RCC) zu untersuchen. Es ist neben dem malignen Melanom der immunogenste menschliche Tumor. Deshalb wären sowohl neue prognostische Marker als auch die Aufklärung möglicher *immune escape*-Mechanismen von großer klinischer Bedeutung. Für die Untersuchung der Expression von CEACAM1 beim Nierenzellkarzinom konnte auf die seit 13 Jahren bestehende, gut dokumentierte Tumorbank zurückgegriffen werden.

Gefrierschnitte von Primärtumor- und Metastasengewebe sowie Normalgewebe der tumortragenden Niere von 36 Nierenzellkarzinompatienten wurden immunhistochemisch mit anti-CEACAM1-Antikörpern markiert und mit der Peroxidasemethode durch Aminoethylcarbazol gefärbt. Im „normalen“ Nierengewebe waren in allen 36 Fällen Kapillarendothelien sowie Granulozyten in den Glomeruli CEACAM1-positiv. 50% der Tubuliquerschnitte - mit hoher Wahrscheinlichkeit handelt es sich um proximale Tubuli, von denen vor allem das klarzellige Nierenzellkarzinom abstammt - zeigten eine etwas schwächere, aber spezifische Färbung. Die Gefäßwände von Arteriolen und Venolen waren ebenso CEACAM1-negativ wie Epithelzellen. Vor allem im niederdifferenzierten Tumorgewebe fanden sich großflächige Nekroseareale mit intensiver unspezifischer Markierung von Zelldebris. Das umgebende vitale Tumorgewebe war in allen Fällen negativ. Eine ähnliche Färbung konnte bei Metastasen- und Cavazapfengewebe (kontinuierlich in die benachbarte *Vena cava* einwachsender Nierentumor) beobachtet werden. Auch hier konnten keine positiven Tumorzellen nachgewiesen werden.

Da die meisten Nierenzellkarzinome, namentlich das klarzellige Nierenzellkarzinom, von den Zellen der CEACAM1-positiven proximalen Tubuli abstammen, deuten unsere oben beschriebenen Ergebnisse daraufhin, dass die Nierenzellkarzinomzellen im Zuge ihrer malignen Entartung die CEACAM1-Expression vollständig einstellen. Dieser Befund konnte zusätzlich mit den sehr sensitiven Methoden der Durchflußzytometrie und RT-PCR bei verschiedenen Nierenzellkarzinomlinien erhärtet werden, die kein oder nur marginal CEACAM1 exprimieren (Abb.3). Es drängte sich daher die Frage auf, ob es sich um einen reversiblen Prozess handelt oder ob die Einstellung der CEACAM1-Expression durch Mutationen im CEACAM1-Gen verursacht wird. Der Promotor des CEACAM1-Gens besitzt, wie schon seit längerem bekannt, ein Interferon (IFN)-responsives Steuerelement. Die Expression von CEACAM1 kann deshalb in verschiedenen Zelltypen durch IFNγ induziert oder verstärkt werden. Handelt es sich um eine reversible Herunterregulation von CEACAM1 in Nierenzellkarzinomzellen, so sollte die Expression durch Stimulation der Zelllinien mit IFNγ wieder induziert werden können. In der Tat zeigten beide stimulierten Zelllinien eine deutliche CEACAM1-Expression sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene (Abb. 3).

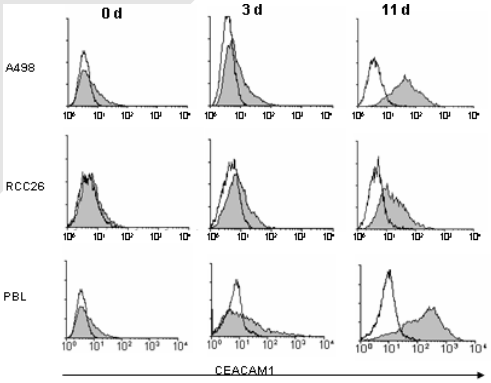


Abb. 3:. Induktion der CEACAM1-Expression in RCC-Zellen und PBL (periphere Blut-Lymphozyten) während deren Kokultur. RCC-Zellen wurden mit der doppelten Anzahl allogener PBL für 11 Tage kokultiviert und deren CEACAM1-Expression zu verschiedenen Zeitpunkten mittels Durchflußzytometrie analysiert.

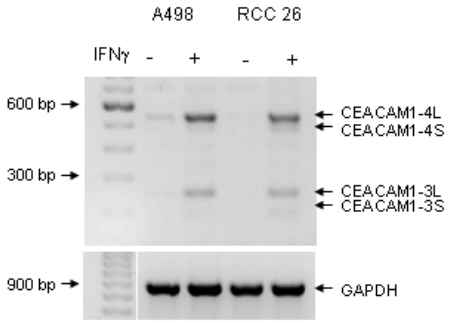


Abb. 4: Induktion der CEACAM1-Expression in RCC-Zellen (A498, RCC26) durch IFNγ (500U/ml; 48h). Mittels RT-PCR wurde die spezifische mRNA der vier Spleißvarianten von CEACAM1 in den RCC-Zelllinien untersucht. Der Nachweis der GAPDH-mRNA zeigt, dass in jeder Probe eine vergleichbare Menge an mRNA untersucht wurde.

IFNγ ist ein Zytokin, das in der frühen Phase einer Aktivierung von T-Zellen und NK-Zellen (Killerzellen) freigesetzt wird. Wir vermuten deshalb, dass CEACAM1 immer dann von Nierenkarzinomzellen exprimiert wird, wenn sie einem Angriff durch diese Killerzellen ausgesetzt sind. *In vitro* lässt sich dies durch eine Kokultur von Nierenzellkarzinomzellen mit allogenen Killerzellen, d.h. Tumorzellen und Killerzellen stammen von unterschiedlichen Spendern, überprüfen. In diesem Fall erkennen die Killerzellen unabhängig von einem spezifischen Tumorantigen die Tumorzellen als „fremd“ und werden dadurch aktiviert. Wie in Abb. 4 gezeigt, beginnen die Nierenzellkarzinomzellen in der Tat CEACAM1 in Folge dieses Angriffes zu exprimieren. Gleichzeitig beginnen auch die aktivierten Killerzellen mit der Expression von CEACAM1. CEACAM1 besitzt homophile Adhäsionseigenschaften und es konnte gezeigt werden, dass CEACAM1 aufgrund dieser Interaktion inhibitorische Signale in Killerzellen senden kann. Es ist deshalb zu vermuten, dass die Neoexpression von CEACAM1 durch die Nierenzellkarzinomzellen von diesen als *immune escape*-Mechanismus verwendet werden kann. Die Arbeitshypothese, die wir aus den bisherigen Daten entwickelt haben und die es nun durch weitere Experimente zu verifizieren gilt, ist in Abb. 5 dargestellt und detailliert beschrieben.

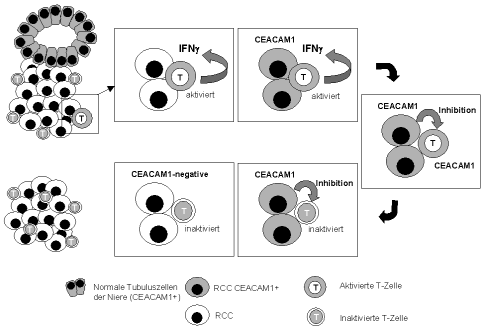


Abb. 5: Schematische Darstellung einer möglichen vorübergehenden Nutzung des Tumorsuppressors (CEACAM1) zur Umgehung der Immunüberwachung. Im normalen Nierengewebe exprimieren die Zellen der proximalen Tubuli, aus denen die meisten RCC hervorgehen, CEACAM1. Während der malignen Entartung stellen diese Zellen die Expression von CEACAM1 ein, was darauf hindeutet, dass CEACAM1 im RCC, wie bei anderen Tumorentitäten, als Tumorsuppressor wirkt. Erkennt eine T-Zelle nun ein spezifisches Antigen auf der Tumorzelle so wird die T-Zelle aktiviert und sezerniert INFγ. Das freigesetzte INFγ induziert die CEACAM1-Expression in der Tumorzelle. Das CEACAM1 auf der RCC-Zelle kann durch homophile Interaktion mit CEACAM1 auf der aktivierten T-Zelle kommunizieren. Es wurde gezeigt, dass Signale, die durch CEACAM1 in T-Zellen gegeben werden, die Aktivierung von T-Zellen inhibieren kann. Wird die T-Zelle deaktiviert, stellt sie ihre INFγ Sekretion ein. Der Stimulus für die CEACAM1-Expression in RCC-Zellen fällt weg und die Tumorzellen verlieren CEACAM1 wieder von ihrer Oberfläche.

Manipulieren Tumorzellen die Infiltration von Lymphozyten in solide Tumoren?

Grundvoraussetzung jeder Immuntherapie ist die gezielte Anreicherung der induzierten immunkompetenten Zellen am Ort der Infektion oder der malignen Erkrankung. In der Regel stellt dies bei den meisten Infektionskrankheiten kein Problem dar. Zellen des natürlichen Immunsystems besitzen eine Vielzahl von Rezeptoren, mit deren Hilfe sie Bestandteile von Pathogenen äußerst effektiv erkennen können. Signale dieser Rezeptoren führen dann zu einer explosionsartigen Freisetzung von zellulären Botenstoffen (Chemokinen), die sehr effektiv verschiedene Zellen des Immunsystems an den Ort der Infektion locken können. Dieser wirksame Mechanismus kann dann versagen, wenn nicht Fremdorganismen sondern entartete Zellen des eigenen Organismus bekämpft werden sollen. Ein interessantes Phänomen ist z.B., dass in soliden Tumoren häufig eine Lymphozytenanreicherung im Bindegewebsanteil des Tumors (Stroma) aber kaum in den Tumorzellnestern beobachtet wird. Bisher konnte nicht befriedigend geklärt werden, welche Mechanismen zu einer Anreicherung von Lymphozyten im Tumorgebiet führen. Man geht davon aus, dass es sich um eine spezifische Immunreaktion gegen die entarteten Zellen handelt, in deren Verlauf die reaktiven Lymphozyten Chemokine sezernieren und so weitere Lymphozyten rekrutieren. Es gibt jedoch weitere Erklärungsmöglichkeiten: sowohl eine Arretierung normalerweise im Gewebe patrouillierender Immunzellen als auch die Expression von Chemokinen durch die Tumorzellen selbst könnte zur Anreicherung von Lymphozyten führen. Die Kenntnis dieser Mechanismen ist eine wichtige Voraussetzung für die Entwicklung neuer Immuntherapien, da nur eine ausreichende Infiltration der "richtigen" immunkompetenten Zellen zu einer immunologischen Kontrolle der Tumorprogression führen kann.

Um die Rolle der Tumorzellen bei der lymphozytären Tumorinfiltration zu untersuchen haben wir Primärkulturen von kolorektalen Tumoren angelegt und daraus klonale und polyklonale Tumorzelllinien (n=27) etabliert und ausführlich charakterisiert, um diese als Produzenten der die Lymphozyteneinwanderung beeinflussenden Faktoren zu nutzten.

Für die Mobilität von Lymphozyten ist ihr Aktivierungszustand von entscheidender Bedeutung, da die Expression von Chemokinrezeptoren aktivierungsabhängig ist. Der Aktivierungszustand von TIL wird durch die Erkennung spezifischer Antigene und durch das vorhandene Zytokinmilieu im Tumorgebiet bestimmt. Dieses Zytokinmilieu wird wesentlich durch die Ausscheidung immunmodulierender Substanzen durch die Tumorzellen bestimmt. Wir fanden, dass die frisch etablierten Tumorzelllinien Faktoren sezernierten die sowohl die zytotoxische Aktivität als auch die Proliferationsfähigkeit von TIL inhibierten und zumindest einen der gut charakterisierten, immunsuppressiven Substanzen wie PGE_2, TGFβ und IL-10 in relevanten Mengen produzierten. Diese Resultate implizieren, dass Tumorzellen die Reaktionsfähigkeit der TIL auf im Tumorareal vorhandene Chemoattraktoren modifizieren können.

Chemotaxisexperimente, bei denen die Wirkung von Tumorzell- und Stromazellüberständen auf die Migration von Blutlymphozyten untersucht wurden, zeigten dass die Überstände potente Chemoattraktoren enthielten. Eine hemmende Wirkung der Überstände auf die Migration von Blutlymphozyten, wie von einigen Autoren berichtet, konnten nicht nachgewiesen werden.

Um die chemotaktischen Faktoren zu identifizieren haben wir die Chemokinexpression der Tumorzelllinien bestimmt. Als *screening*-Methode wurde die RT-PCR gewählt, mit der man mRNA semiquantitativ bestimmen kann. Wir konnten zeigen, dass eine kontinuierliche Chemokinexpression in allen Zelllinien stattfindet. Von den etwa 40 bekannten Chemokinen wurden 10 untersucht und GROγ und IL-8 am häufigsten nachgewiesen. Diese Chemokine gehören zu einer Chemokingruppe, die neben einer chemotaktischen Wirkung auf Immunzellen auch eine Angiogenese-fördernde Wirkung entfalten. Aber auch T-Zellaktivierende Chemokine wie RANTES und IP-10 konnten nachgewiesen werden. Interessanterweise konnte die Chemokinexpression der Tumorzellen durch Zugabe von IFNγ noch erhöht werden. Eine Stimulation mit IFNγ simuliert eine spezifische Erkennung der Tumorzellen durch T- oder NK-Zellen *in vivo,* die bei diesem Vorgang IFNγ ausschütten.

Die Expression von chemotaktischen Faktoren wirft die Frage nach dem Sinn dieser Expression, sozusagen aus Sicht des Tumors, auf. Um der Antwort auf diese Frage näher zu kommen, haben wir ein System etabliert, das es uns erlaubt, mit Hilfe von Zeitraffer-Videomikroskopie kontinuierliche *on-line*-Mobilitäts- und Zytotoxizitätsanalysen menschlicher Lymphozyten über einen Zeitraum von mehreren Tagen durchzuführen. Eine Stärke dieser Methode besteht darin, dass nicht nur das Verhalten der Lymphozyten, sondern auch die Reaktion der Tumorzellen bzw. Stromazellen (in entsprechenden Kokulturen) auf einen Lymphozytenkontakt beurteilt werden kann. Die gleichzeitige Interaktion der Lymphozyten mit unterschiedlichen Zelltypen (Tumorzelle und Stromazelle) führt zu einer Überlagerung der zwei Regulatoren der Zellbewegung (Chemotaxis und Haptotaxis), wobei die Haptotaxis durch die Expression von Zell-Zell-Adhäsionsmolekülen bestimmt wird. Wurden bei solchen Analysen Kokulturen von Kolonkarzinomzellen und Fibroblasten verwendet, traten die Lymphozyten bevorzugt mit den Fibroblasten in Kontakt. Dies führte nach wenigen Stunden zu einer Akkumulation der Lymphozyten in den Fibroblastenarealen. Nach 12 Stunden waren >90% der Lymphozyten in diesen Arealen zu finden. Dies deutet auf eine mangelnde Expression von Adhäsionsmolekülen der Tumorzellen hin. Eine Vergleichbarkeit mit der *in vivo* gefundenen bevorzugten Lokalisation der Lymphozyten im Tumorstroma ist unübersehbar. Ein höchst interessanter Befund war, dass Fibroblasten mit einer erhöhten Mobilität auf den Kontakt mit Lymphozyten reagierten (Abb. 6).

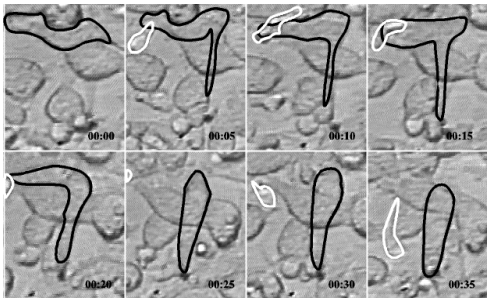


Abb. 6: Interaktion eines Lymphozyten (L-weiß umrandet) mit einer Zielzelle (T-schwarz umrandet) über einen Zeitraum von 35 min. Deutlich zu erkennen ist die Bewegung der Zielzelle nach erfolgtem Kontakt mit dem Lymphozyten.

Dabei wird die Bewegung der Fibroblasten durch den direkten Kontakt mit den Lymphozyten ausgelöst. Fänden ähnliche Reaktionen der Stromazellen auch in dreidimensionalen Geweben statt, könnte das bedeuten, dass die lymphozytäre Infiltration des Tumors zu einer Auflockerung des Tumorgewebes führen und dadurch die Invasion der Tumorzellen in benachbartes Gewebe und die Metastasierung erleichtert würde. Offensichtlich verlangt dieser theoretische Übertragungsversuch auf die *in vivo*-Situation eine Überprüfung in relevanten dreidimensionalen Modellen.

Die zu diesem Zweck von uns entwickelten neuartigen, komplexen, dreidimensionalen *in vitro*-Modelle, die wir "*artificial tumor*" (ArT) bzw. „*colon reproduction*" (CoRe) nannten, enthalten alle wesentlichen Bestandteile eines Tumors, wie extrazelluläre Matrix (EZM), Tumorzellen und Stromazellen, die für die Infiltration von Lymphozyten eine Rolle spielen. Mit Hilfe dieser Modelle kann die Bedeutung der einzelnen Tumorbestandteile für die Lymphozyteninfiltration untersucht werden, da die einzelnen Tumorkomponenten erst separiert und später wieder einzeln zusammengefügt werden können. In Abb 7 ist das methodische Vorgehen der Rekonstruktion dieser Gewebemodelle am Beispiel des CoRe schematisch dargestellt. Die Infiltration dieser Modellgewebe erfordert von den Lymphozyten alle Fähigkeiten, die sie auch *in vivo* zur Infiltration solider Gewebe benötigen, wie z.B. die Degradationsfähigkeit der EZM und die Erkennung chemotaktischer Gradienten.

Versuche mit IL-2-stimulierten Lymphozyten zeigten, dass diese sehr effektiv die Modellgewebe infiltrieren können (Abb. 8). Das völlig Neuartige an diesen Modellen ist, dass die infiltrierenden Lymphozyten nicht, wie im oft verwendeten Sphäroidmodell, ausschließlich mit Tumorzellaggregaten interagieren sondern wie *in vivo* mit Stromazellen und EZM interagieren, was der Situation in einem Primärtumor *in vivo* exakt entspricht. Durch die Infiltration der Lymphozyten kommt es zu interessanten Veränderungen der ArTs. Abhängig von der Zahl der infiltrierenden Lymphozyten kommt es zu einer Auflockerung des Gewebeverbandes, offensichtlich sind die Lymphozyten in der Lage die Faserverbindungen aufzuheben. Es ist leicht vorstellbar, dass diese Auflockerung des Stromas zu einer verstärkten Tumorzellinvasion führt.

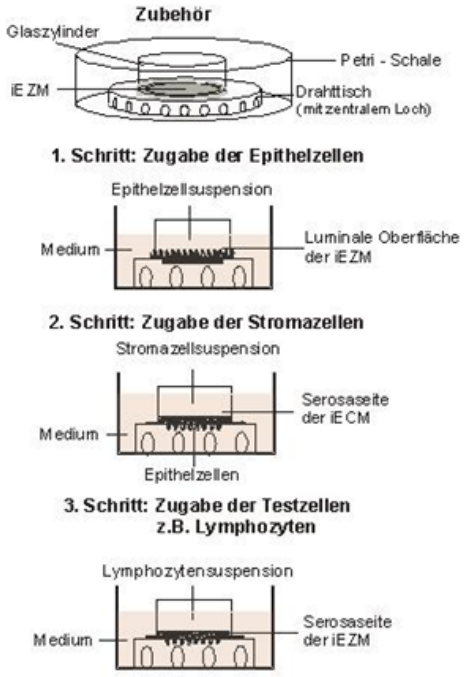


Abb. 7: Schematische Darstellung der Herstellung von komplexen *in vitro*-Modellen am Beispiel eines CoRe. Durch die Separierung der Einzelkomponenten (EZM, Epithelzellen, Fibroblasten, TIL) ist jede beliebige Kombination dieser Elemente möglich. Zuerst wird die aus Kolongewebe isolierte EZM über das zentrale Loch im Drahttisch gespannt und mit dem Glaszylinder fixiert, wodurch ein Zwei-Kammer-Kultursystem entsteht, in dem die EZM als zellundurchlässige Trennschicht fungiert. Durch Zugabe der Epithelzellen in die obere Kammer können diese auf der luminalen Seite der EZM kultiviert werden. Nach dem Anwachsen der Epithelzellen kann die EZM umgedreht werden, so dass die Stromazellen und die sich im Stroma befindenden Zellen (Fibroblasten und Lymphozyten) auf die Serosaseite der EZM gegeben werden können.

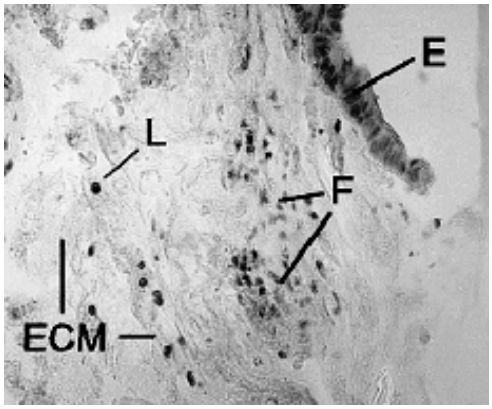


Abb. 8: Histologie eines ArTs. Hervorgehoben sind die einzelnen Bestandteile, die hier zusammengefügt wurden (Epithelzellen, E; Fibroblasten, F; extrazelluläre Matrix, ECM; Lymphozyten, L). Situation 24 h nach Zugabe der vorstimulierten Lymphozyten.

Entwicklung eines computergesteuerten Langzeit-Video-Inkubationssystems für Zellkulturexperimente

Experimente mit Zellkulturen sind ein unverzichtbarer Bestandteil der biomedizinischen Forschung. In der Tumorimmunologie werden beispielsweise Immunzellen auf unterschiedliche Weise stimuliert (durch Zytokine, Antikörper, antigenpräsentierende Zellen, Tumorzellen u. a.) und ihre Reaktion sowie ggf. die der Zielzellen mit verschiedenen Methoden (Zytotoxizitätsassays, ELISA, Durchflußzytometrie, ELISPOT etc.) gemessen. Alle Parameterbestimmungen, auch die mikroskopisch-visuelle Kontrolle der Zellen, finden nur punktuell zu definierten Zeitpunkten statt, über die morphologisch-funktionellen Abläufe während der Inkubation fehlt die Information.

Um eine permanente visuelle Kontrolle von Zellkulturexperimenten und somit Kenntnis über den dynamischen Aspekt von Zell-Zell-Interaktionen, Phagozytose, Migration, Apoptose und weiteren Abläufen während dieser Experimente zu bekommen, wurde im LTI ein Langzeit-Video-Inkubationssystem auf der Basis eines inversen Mikroskops (Zeiss Axiovert 35) entwickelt (Abb. 1, 2). Das Kernstück des Systems bildet ein verschachteltes System von Kammern, um letztlich ideale Zellkultur-Bedingungen (37°C, 5% CO_2, 100% Luftfeuchtigkeit) herzustellen. Die äußere Kammer aus Plexiglas wird sowohl vom Mikroskoptisch her als auch durch eine Umluftheizung geregelt temperiert (Abb. 3). Die innere feuchte Kammer besteht aus einem umlaufenden Wasserbad mit Glasabdeckung und wird permanent mit 5% CO_2-Atmosphäre aus dem Brutschrank versorgt. Innerhalb dieser in x- und y-Richtung von außen bewegbaren Kammer befindet sich ein gekammerter Spezial-Objektträger, in dessen Kammern die Zellkultur-Experimente angesetzt werden. Der zu beobachtende Ansatz wird im Strahlengang des Mikroskops positioniert, wobei sowohl Durchlicht als auch Fluoreszenzbeleuchtung über eine Quecksilberdampflampe (Zuschaltung über computergesteuerten Shutter) möglich sind. Die Bilderfassung erfolgt derzeit mit einer hochauflösenden Digitalkamera (Zeiss AxioCam, 3900 x 3090 Pixel), deren Software Bilderserien in praktisch beliebiger Länge mit frei wählbarem Zeitabstand der Einzelbilder ermöglicht, außerdem Einblendung von Zeit, Maßstab, Markierungen und Text. Die Einzelbilder können mit geeigneter Software (z. B. Ulead Media Studio Pro) zu Zeitrafferfilmen beliebiger Geschwindigkeit zusammengefaßt werden.

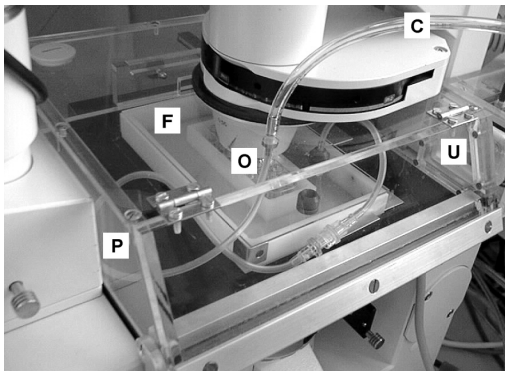


Abb. 1: Im inversen Mikroskop eingebaute Inkubationsbox mit Plexiglasgehäuse (P), feuchter Innenkammer (F), gekammertem Objektträger (O), Umluftheizung (U) und Zuleitung für die CO_2-Versorgung (C). Von oben ragt der Kondensor des Mikroskops in die Box.

Das neu entwickelte Inkubationssystem erlaubt die permanente visuelle Kontrolle von oft langsam verlaufenden morphologisch-zellbiologischen Vorgängen, die in Form von Zeitrafferfilmen erfaßbar werden. Diese zusätzliche Information ist der Ausgangspunkt für neue Erkenntnisse und weitere Experimente. Die Zellen können über mehrere Tage hinweg im System in Kultur gehalten werden, und der Spezial-Objektträger erlaubt nach Entfernung der Kammerwände die Anwendung weiterer Methoden auf die Zellen, wie etwa immunzytochemische Markierungen. Erste Versuche mit fluoreszierenden Nanokristallen (Qdot™ 605, Quantum Dot Corporation, USA) zielen auf eine Erweiterung der experimentellen Möglichkeiten durch Langzeit-Fluoreszenz-markierung der Zellen im System. Im LTI wird das Inkubationssystem v. a. zur Beobachtung der Interaktion zwischen Tumorzellen und Effektorzellen des Immunsystems eingesetzt, beispielsweise bei Experimenten mit bispezifischen Antikörpern (s. u.). Inzwischen wird das Inkubationssystem bereits von einigen anderen Arbeitsgruppen in Kooperation mit dem LTI für ganz unterschiedliche Fragestellungen verwendet:

- Interaktion von Lymphozyten und Plattenepithelkarzinom im Sphäroidmodell

  (PD Dr. B. Wollenberg, Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenkrankheiten der LMU)

- Migrationsverhalten von Gliomzellen

  (PD Dr. R. Goldbrunner, Dr. T. Demuth, Neurochirurgische Klinik der LMU)

- *In vitro*-Experimente zur epithelialen Wundheilung

  (Dr. N. Cordes, Institut für Radiobiologie, Sanitätsakademie der Bundeswehr)

- Einfluß von TPA auf die Differenzierung myeloider Zellen

  (Dr. G. Meinhardt, Dr. F. Dayyani, J. Winterhoff, AG Molekulare Onkologie, Abteilung Hämato-Onkologie, Med. Klinik Innenstadt, LMU)

Die Experimente im LTI zu bispezifischen Antikörpern sowie die der Arbeitsgruppe Molekulare Onkologie zur Differenzierung myeloider Zellen sollen im folgenden kurz vorgestellt werden.

Spezifische Lyse von Prostatakarzinomzellen durch bispezifische Antikörper

(Labor für Tumorimmunologie, Urologische Klinik der LMU)

Der Einsatz von Antikörpern ist neben Zytokinen und Vakzinestrategien eine weitere Option für die immunologische Therapie von Tumoren. Bispezifische Antikörper sind artifizielle Moleküle mit der Besonderheit, zwei (theoretisch beliebig wählbare) Zielstrukturen zu erkennen. Im LTI wurden mit dem Langzeit-Video-Inkubationssystem bispezifische Antikörper getestet, die zum einen das auf Lymphozyten exprimierte CD3 erkennen, zum anderen EpCAM (epithelial cell adhesion molecule; auf epithelialen Zellen und Karzinomzellen exprimiert) oder p185, das Genprodukt des Protoonkogens c-neu, das auf der Oberfläche vieler Tumoren (über)exprimiert wird. Die Ko-Inkubation von Tumorzellen (u. a. die Prostatakarzinomzelllinie PC3), Immunzellen aus dem peripheren Blut und bispezifischen Antikörpern führte zu spezifischer Lyse in einem definierten Zeitrahmen, ohne Antikörper erfolgte keine Reaktion. Die morphologische Analyse der Zeitrafferaufnahmen und nachfolgende Experimente zeigten, daß die Tumorzellen hierbei durch osmotische Lyse und nicht durch Apoptose-Induktion zerstört werden. Solche *in vitro*-Experimente bilden die Grundlage für einen späteren therapeutischen Antikörpereinsatz.

Einfluß von TPA auf die Differenzierung myeloider Zellen

(AG Molekulare Onkologie, Abteilung Hämato-Onkologie, Med. Klinik Innenstadt, LMU)

Die Proteinkinase C (PKC) in humanen myeloiden U937-Zellen kann durch den Phorbolester 12-0-Tetradecanoylphorbol-13-Acetat (TPA) aktiviert werden. Dieser Prozeß ist bei einem Großteil der Zellen verbunden mit der Induktion von Adhärenz, gefolgt von der Differenzierung zu Monozyten. Ein signifikanter Anteil der Zellen macht jedoch keine für die Differenzierung notwendige Adhärenz durch, trotz der Stimulation mit TPA, sondern verbleibt als einzelständige Zellen in Suspension. Viele dieser U937-Zellen befinden sich dabei deutlich häufiger im G0/G1-Zellzyklusstop als die ebenfalls inkubierten adhärenten Zellen. Markierungen mit Annexin V zeigen, daß es sich bei den Suspensionszellen um apoptotische Zellen handelt.

Bei dem aktuell im LTI stattfindenden Projekt soll mit dem Langzeit-Video-Inkubationssystem die Frage geklärt werden, ob die in Suspension befindlichen U937-Zellen nach Zugabe von TPA in die Apoptose gehen, ohne vorher zu differenzieren. Dabei werden U937-Zellen mit 5 nM TPA über einen Zeitraum von 24 bis 48 Stunden inkubiert und in kurzen Abständen vom System fotografiert. Die typischen morphologischen Veränderungen im Rahmen des Apoptoseablaufs (Abb. 4) und einer eventuell erfolgenden Zelldifferenzierung werden im Zeitrafferfilm sichtbar und können systematisch ausgewertet werden.

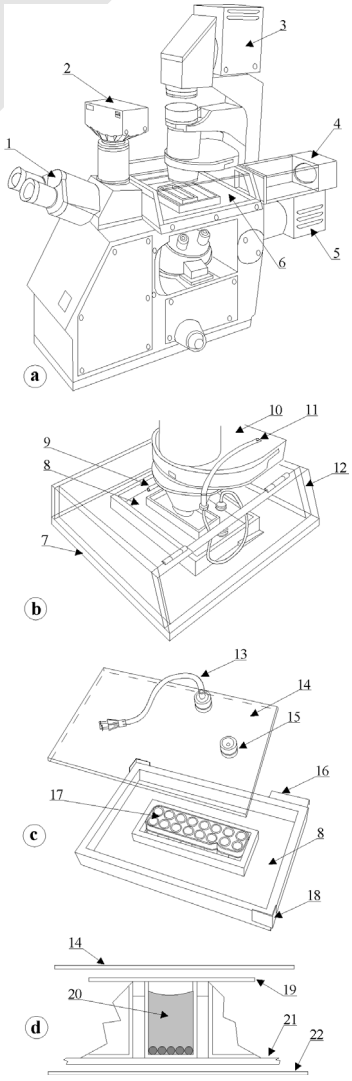


Abb. 2: Konstruktion des Video-Inkubationssystems, basierend auf einem inversen Mikroskop (Zeiss Axiovert 35).

a) Übersicht: 1= Okular, 2= Kamera, 3= Durchlicht-Quelle, 4= Umluftheizung, 5= Fluoreszenzlicht-Quelle, 6= Plexiglas-Box

b) Plexiglas-Box: 7= beheizbarer Mikroskoptisch, 8= umlaufendes Wasserreservoir, 9= Temperatursensor, 10= Mikroskopkondensor, 11= CO_2-Zufuhr, 12= Arbeitsklappe

c) feuchte Kammer: 13= Verbindungsschlauch für CO_2-Zufuhr, 14= Glasplatte, 15= CO_2-Auslaß, 16= Befestigung für Mikroskoptisch, 17= Kammer-Objektträger, 18= Arretierung für Glasplatte

d) Querschnitt durch Kammer-Objektträger: 19= Deckel, 20= Zellkultur-Kammer, 21= Bodenplatte, 22= großes Deckglas zur Gas-Abdichtung des Lichtweges

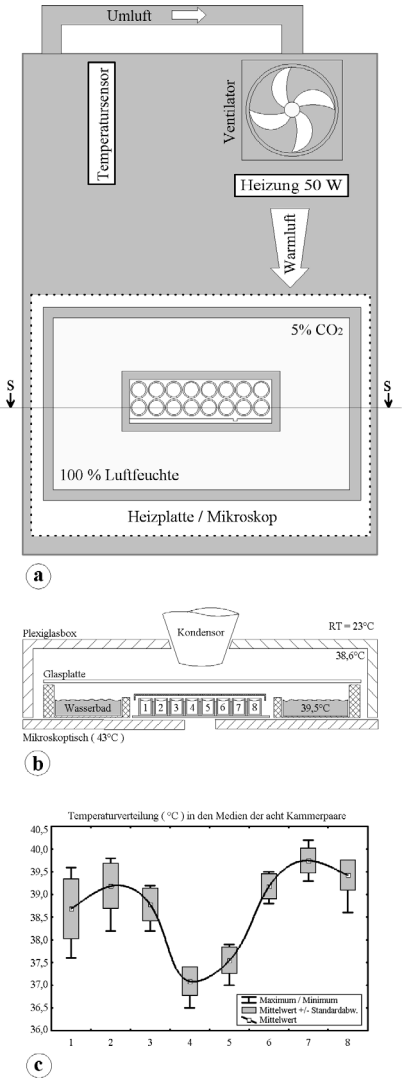


Abb. 3: Umluftheizung des Inkubationssystems. a) Blockschema, S= Schnittebene; b) Querschnitt in der Ebene S (vgl. 3a); c) Temperaturverteilung in den Zellkulturmedien der acht Kammerpaare (vgl. 3b) bei jeweils zehn Messungen.

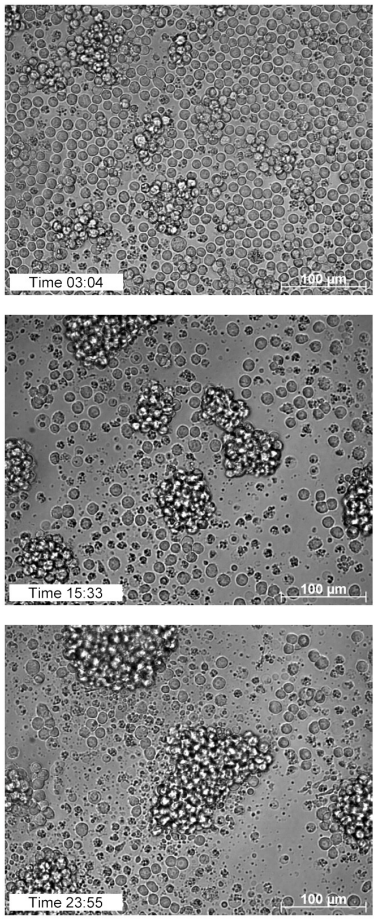


Abb. 4: TPA-induzierte Veränderungen von myeloiden Zellen (U937) in der Zellkultur. Etwa drei Stunden nach Zugabe von TPA (a) sind erste Aggregationen der normalerweise in Suspension wachsenden Zellen zu erkennen. In den folgenden Stunden (b, c; Zeitangabe seit TPA-Zugabe links unten im Bild) bildet die Subpopulation der Zellen, die Differenzierung zeigt, große Aggregate. Die übrigen Zellen gehen in Apoptose, eine zunehmende Zahl von sog. *apoptotic bodies* ist erkennbar.

Evaluation von neuen immuntherapeutischen Ansätzen im Tiermodell

Immunologische Reaktionen sind äußerst komplex und können bis heute nur unvollständig *in vitro* simuliert werden. Es ist daher unumgänglich, neue Immuntherapiestrategien auch *in vivo* zu überprüfen. Dies führt aber nur dann zu einem verlässlichen Erkenntnisgewinn, wenn das verwendete Modell so nahe wie möglich der klinischen Situation entspricht.

Auf der Basis zweier transgener Mausmodelle haben wir ein System aufgebaut, das oben genannten Kriterien sehr nahe kommt. Im ersten transgenen Mausmodell wird ein humanes Tumorantigen (CEA) in einem C57BL6-Stammhintergrund exprimiert. Expressionsanalysen zeigten, dass in diesen Mäusen das CEA in vergleichbarer Weise wie im Menschen exprimiert wird. Des Weiteren wird das CEA in diesen Mäusen als Selbstantigen akzeptiert, so dass, wie im Menschen, keine immunologische Reaktion gegen dieses Antigen induziert wird. Im zweiten transgenen Modell wird das T-Antigen, ein Onkogen des SV40-Virus, unter der Kontrolle des CEA-Promotors exprimiert. Dies führt in 100% der Tiere in einem Alter von 90-110 Tagen zu einer spontanen Tumorentwicklung im Pylorusbereich des Magens. Auch in diesen Mäusen wird das Transgen als Selbstantigen toleriert. Kreuzt man diese beiden transgenen Tierstämme, so erhält man Tiere, die wie oben beschrieben Magenkarzinome entwickeln und nun auch das humane Tumorantigen sowohl im Tumor als auch im Normalgewebe exprimieren. Zusätzlich konnten wir aus spontan entstandenen Tumoren beider transgener Mausstämme Tumorzelllinien etablieren (424GC, 424GC/CEA). Die Zelllinie der T-Antigen-transgenen Tiere wurde inzwischen ausführlich charakterisiert. Die Charakterisierung der Tumorzelllinie, die aus einer T-Antigen- und CEA-doppelttransgenen Maus etabliert wurde, wird momentan durchgeführt. Die T-Antigen-positive Zelllinie 424GC wächst interessanterweise nach subkutaner Transplantation sowohl in C57BL/6, als auch in T-Antigen-transgenen Mäusen (Abb. 1). Da wir auch die Generierung von T-Antigen-spezifischen zytotoxischen T-Zellen in C57BL/6-Mäusen ausgiebig untersucht und charakterisiert haben, ergeben sich nun vielfältige Möglichkeiten die Wirksamkeit von unterschiedlichen Immuntherapiestrategien zu überprüfen. In Tabelle 1 sind die unterschiedlichen Modelle nach aufsteigender Stringenz ihrer immunologischen Charakteristika aufgeführt.

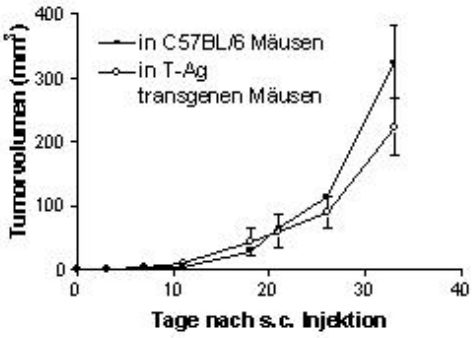


Abb. 1: *In-vivo*-Wachstum von subkutan transplantierten 424GC-Tumorzellen. 10^6 Zellen der von einem spontan entstandenen Magentumor etablierten Zelllinie 424GC wurden subkutan in C57BL/6 bzw. T-Antigen-transgene C57BL/6-Mäuse transplantiert und ihr Wachstum bestimmt. In beiden Mausstämmen zeigen die Tumorzellen ein exponentielles Wachstum.

Tumor	Empfängermäuse	Tumorantigen	Immunogenität
transplantierte 424GC-Tumorzellen	C57BL/6-Mäuse	SV40T-Antigen (Fremdantigen)	sehr groß
transplantierte 424GC/CEA-Zellen	T-Antigen-transgene C57BL/6-Mäuse	CEA (Fremdantigen)	groß
transplantierte 424GC-Tumorzellen	T-Antigen-transgene C57BL/6-Mäuse	SV40T-Antigen (Selbstantigen)	mittel
transplantierte 424GC/CEA-Zellen	T-Antigen/CEA-doppelttransgene C57BL/6-Mäuse	CEA (Selbstantigen)	sehr gering
spontaner Magentumor	entstanden in T-Antigen-transgenen C57BL/6-Mäusen	SV40T-Antigen (Selbstantigen)	gering
spontaner Magentumor	entstanden in T-Antigen-transgenen C57BL/6-Mäusen	CEA (Selbstantigen)	sehr gering

Tabelle 1: Tumormodelle mit unterschiedlichen Anforderungen an die Erkennungsfähigkeit durch das Immunsystem.

Weiterentwicklung standardisierter, hoch sensitiver Methoden zum *immune monitoring*

Für eine erfolgreiche Umsetzung klinischer Studienprotokolle müssen nicht nur Laboreinrichtungen verfügbar sein, um entsprechendes Zellmaterial der Patienten unter Bedingungen vorzubereiten, die einen Transfer zurück in die Patienten gestatten (sog. GMP *„good manufacturing practice"*-Einrichtungen). Es müssen auch Strategien zur Überprüfung des Immunstatus der behandelten Patienten entwickelt, standardisiert und validiert werden. Von besonderer Bedeutung ist dieses *immmune monitoring* immer dann, wenn Patienten mit fortgeschrittener Erkrankung in klinische Phase I/II-Studien aufgenommen werden. Bei diesen Patienten wird ein klinisches Ansprechen auf die jeweilige Therapie nur selten erwartet und somit sind *immune monitoring*-Verfahren von entscheidender Bedeutung für die Evaluierung der therapeutischen Effekte auf das Immunsystem. Um die Behandlungsstrategie herauszufinden, die am erfolgversprechendsten ist, sollten daher standardisierte und sehr sensitive Methoden zur Überprüfung der Immunantwort in den Patienten bereitstehen.

Die klassischen serologischen Analysen für ein *immune monitoring* (z. B. die Bestimmung zirkulierender Antikörper, freier Antigenkomplexe oder Zytokine), Zytokin-ELISAs, die Messung einer DTH (*„delayed type of hypersensitivity"*)-Antwort im Bereich der Injektionen oder Zytotoxizitätstests (z. B. über Chromfreisetzung) können mittlerweile durch neue sensitivere, besser quantifizierbare Methoden ergänzt bzw. ersetzt werden. Die Bestimmung disseminierter Tumorzellen im Knochenmark und peripherem Blut oder die immunhistologischen Untersuchungen der Tumoren und Hautbiopsien werden von den jeweiligen Studien abhängen.

- Für unsere Studien sind mehrere Monitoringverfahren etabliert worden, die entweder einzeln oder in Kombination Antigen-spezifische T-Zellen bis zu einer Sensitivität von 1 Zelle in 500.000 PBMC detektieren können (siehe Forschungsbericht 2000):
- Quantitative T-Zell-Rezeptor (TCR)-Analysen mittels *real time* RT-PCR
- ELISPOT (*enzyme linked immunosorbent spot*)-Assay
- CBA-Analysen (*cytometric bead array*, BD Biosciences) oder Bio-Plex Assay (Bio-Rad) für die gleichzeitige Quantifizierung verschiedener Zytokine/Chemokine
- Zytokin-Sekretions- bzw. *„capture"*-Assay (MACS® Miltenyi Technologie)
- MHC/Peptid-Tetramer-Bindungsanalysen

Die zwei letztgenannten Methoden werden dabei in Kombination mit der Durchflußzytometrie zur Anreicherung spezifischer Tumorreaktiver T-Zell-Populationen eingesetzt.

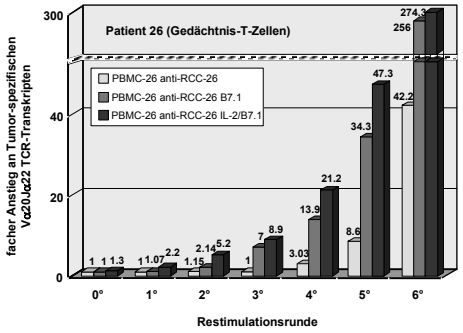


Abb. Monitor-1: Quantifizierung Tumor-spezifischer $V\alpha20^+J\alpha22^+$ TCR-Transkripte in einer autologen gemischten Lymphozyten-Tumorzell-Kultur (MLTC). Periphere mononukleäre Blutzellen des Patienten 26 wurden mit unmodifizierten Tumorzellen (RCC-26), B7.1-modifizierten Tumorzellen (RCC-26/B7.1) und IL-2/B7.1-cotransfizierten Tumorzellen (RCC-26/IL-2/B7.1) stimuliert. Nach jeder Stimulationsrunde wurde das Auftreten von Vα20Jα22-Marker-TCR-Transkripten quantitativ mit Hilfe der *real time* RT-PCR bestimmt. Dabei zeigte sich vor allem in den späteren Stimulationsrunden, dass gentechnisch-modifizierte Tumorzellen in der Induktion von Tumor-assoziierten T-Zellen den unmodifizierten Tumorzellen überlegen sind (256-facher Anstieg an spezifischem Transkript für "RCC-26/B7.1" bzw. 274-facher Anstieg für "RCC-26/IL-2/B7.1" nach sechs Restimulationen).

Speziell für unsere RCC-26 Vakzinestudie hat die quantitative Analyse des TCR über *real time* Reverse Transkriptase (RT)-PCR mittels LightCycler® große Bedeutung. Mit der Bestimmung der TCR-Sequenz eines autologen RCC-reaktiven T-Zell-Klones erhielten wir für unser Modellsystem RCC-26 einen außerordentlich nützlichen Surrogatmarker, um die Entwicklung von Tumor-assoziierten Immunantworten in autologen und allogenen Kulturen zu verfolgen. Über die Quantifizierung z. B. dieser TCR $V\alpha20^+$ T-Zellen konnten so die Effekte von unterschiedlich genmodifizierten RCC-26-Zellen auf die Expansion von Gedächtnis-CTL genau evaluiert werden (Abb. 1). Die Beobachtung, dass sich T-Zellen mit solchen charakteristischen TCR aus einem naiven

T-Zell-Repertoire stimulieren lassen, erlaubte eine quantitative kinetische Bestimmung der Induktion und Expansion dieser definierten Population Tumor-assoziierter CTL auch im Rahmen allogener Stimulationen. Artefakte, die oft bei funktionellen Untersuchungen von limitierenden Verdünnungskulturen auftreten, können auf diese Weise vermieden werden. Durch den Nachweis der Tumor-assoziierten-TCR-Sequenzen sowohl bei HLA-A2-positiven RCC-Patienten als auch bei A2-positiven gesunden Kontrollspendern wurde gezeigt, dass diese relativ einfache molekularbiologische Methode auch im klinischen Vakzinierungsansatz mit RCC26 als zellulärer Vakzine verwendet werden kann, um die sich entwickelnden Immunantworten im Patienten zu verfolgen.

Der ELISPOT-Assay bietet die Möglichkeit, hochsensitiv auf Einzelzellebene nach einer Stimulation die Immunantwort spezifischer T-Lymphozyten im Sinne beispielsweise einer Zytokinproduktion zu quantifizieren. Bei höherfrequenten Antigen-spezifischen T-Zellen erlaubt sie eine direkte *Ex-vivo*-Analyse ohne vorherige *In-vitro*-Stimulation (IVS). Als Stimulatorzellen im ELISPOT werden eingesetzt: RCC-26, als Kontrollzelllinien NKC-26, LCL-26 und K562 und evtl. weitere RCC-Zelllinien (siehe Forschungsbericht 2000).

Alternativ, falls sich aus den Expressionsanalysen der HPLC-eluierten Peptide RCC-spezifische Antigene identifizieren lassen, können auch entsprechende Peptide mit HLA-A2 Bindungsmotiv eingesetzt werden, wobei dann T2-Zellen, K562-A2-Zellen oder eine neue A2-positive „DC-like“ Zelllinie (Mutz-3) als APC verwendet werden oder die PBMC direkt mit den Peptiden auf der ELISPOT-Platte stimuliert werden.

ELISPOT-Assays wurden für verschiedene Zytokine etabliert (IFNγ, TNFα, IL4, und IL-10), um ggf. nach Anreicherung der $CD8^+$- bzw. der $CD4^+$-T-Zellen, die beteiligten Subpopulationen analysieren zu können. Insbesondere aus Mausmodellen ist bekannt, dass die über ihr Zytokinsekretionsprofil definierten Subpopulationen von sowohl CTL als auch T-Helferzellen in unterschiedlicher Weise und Zeitfolge an einer Anti-Tumorreaktivität beteiligt sind. Die Unterschiede umfassen nicht nur die *„Killing“*-Mechanismen, (Perforin/Granzym- oder Fas-vermittelt) sondern auch die Rekrutierung von T-Zellen, aktivierten Makrophagen, Eosinophilen, die Sekretion von Entzündungsmediatoren, die Beeinflussung der Tumor-angiogenese und die Entstehung von Gedächtniszellen.

Um zusätzlich auch das zytotoxische Potential der Zellen analysieren zu können, wurde ebenfalls ein ELISPOT-Assay für Granzym B etabliert. Nachteilig ist, dass mit der Analyse der Granzym B-Sekretion nur ein Mechanismus der Zell-vermittelten Lyse erfasst wird. Da der ELISPOT jedoch um den Faktor 20-100x sensitiver ist als die Chromfreisetzung und somit eine direkte *Ex-vivo*-Analyse erlaubt, lohnt es sich Antikörper im ELISPOT zu verwenden, die spezifisch sind für andere Moleküle, die ebenfalls eine Rolle bei der Zell-vermittelten Lyse spielen.

Um unter Therapie beispielsweise das Zytokinprofil der Zellen aus Biopsiematerial zu analysieren, kommt ergänzend auch der *cytometric bead array* (CBA) oder der Bio-Plex in Betracht, multiplexe Bead Assays mit denen man fluorometrisch aus einer 50 µl Probe mehrere Zytokine oder Chemokine gleichzeitig detektieren und quantifizieren kann (Abb. 2). Inwieweit Zytokinprofilanalysen eine Bedeutung als Surrogatmarker haben, werden erst die Studien zeigen, wobei besonders der Vergleich zwischen den beiden RCC-26 Vakzinezellen interessant sein wird.

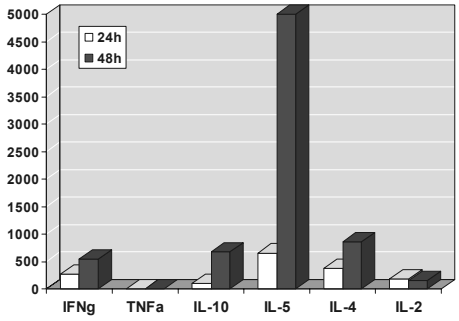


Abb. 2: Zytokinprofil von T-Zellen aus der Hautbiopsie eines Prostatakarzinom-Patienten nach der 9. Vakzinierung mit der LNCaP IL-2/IFNγ-Vakzine. Die Biopsienahme erfolgte 48 h nach intradermaler Vakzinegabe. Anschließend wurden die ausgewanderten T-Zellen *in vitro* erneut für 24 bzw. 48 h mit der Vakzine stimuliert und die Zytokine mittels des CBA (*cytometric bead array*) aus dem Kulturüberstand am Durchflusszytometer (FACSCalibur) quantifiziert (in pg/ml).

Anreicherung Tumor-spezifischer T-Lymphozyten mit Hilfe des Zytokin-capture-assays für die adoptive Tumortherapie

Aufgrund der wichtigen Rolle von IFNγ als Surrogatmarker für aktivierte T-Zellen wurde zusammen mit Dr. Christian Becker aus der Arbeitsgruppe von Prof. Blankenstein eine Methode etabliert, um murine und humane Tumor-spezifische T-Zellen, basierend auf ihrer IFNγ-Produktion, zu detektieren und anzureichern. In einem Vorversuch wurden zunächst TIL aus frisch resezierten RCC-Geweben isoliert und nach einer Kurzzeitstimulation mit Phorbolester/Ionomycin mittels des Zytokin-*„capture"*-Assays (MACS® Miltenyi) analysiert. Ohne Stimulation konnten nahezu keine, nach 4-std. Stimulation zwischen 4.5% bis 27% $IFN\gamma^+CD8^+$ T-Zellen (bei 5/5 Patienten) nachgewiesen werden, was auf eine Anreicherung von *„memory"*-Effektor-T-Zellen im Tumorgewebe hindeutet. In den PBMC der Patienten konnten vergleichsweise auch nach Stimulation nur wenige dieser Zellen gefunden werden.

In einem weiteren Experiment wurden aus dem Gewebe ausgewanderte TIL-26 Zellen verwendet, die nach einem Stimulations-zyklus mit der RCC-26 IL2-Transduktante eingefroren worden waren. Diese heterogene Zellpopulation (5% $CD3^+CD4^+$, 64% $CD3^+CD8^+$) wurde aufgetaut, für 4 Std. mit OKT3 stimuliert und mit Hilfe des Assays angereichert. Abbildung 1 zeigt die Analyse der jeweils angereicherten und nicht-angereicherten Zellfraktion.

Die TCR-Quantifizierung zeigt eine 55-fache Anreicherung des spezifischen Vα20/Jα22 Templates und die ELISPOT-Analyse beweist, dass sich der größte Prozentsatz Tumor-spezifischer T-Zellen in der angereicherten Fraktion befindet. Ein kleiner Anteil an Zellen reagiert auch mit den LCL-26 Zellen, möglicherweise aufgrund gemeinsamer Epitope zwischen RCC und den LCL.

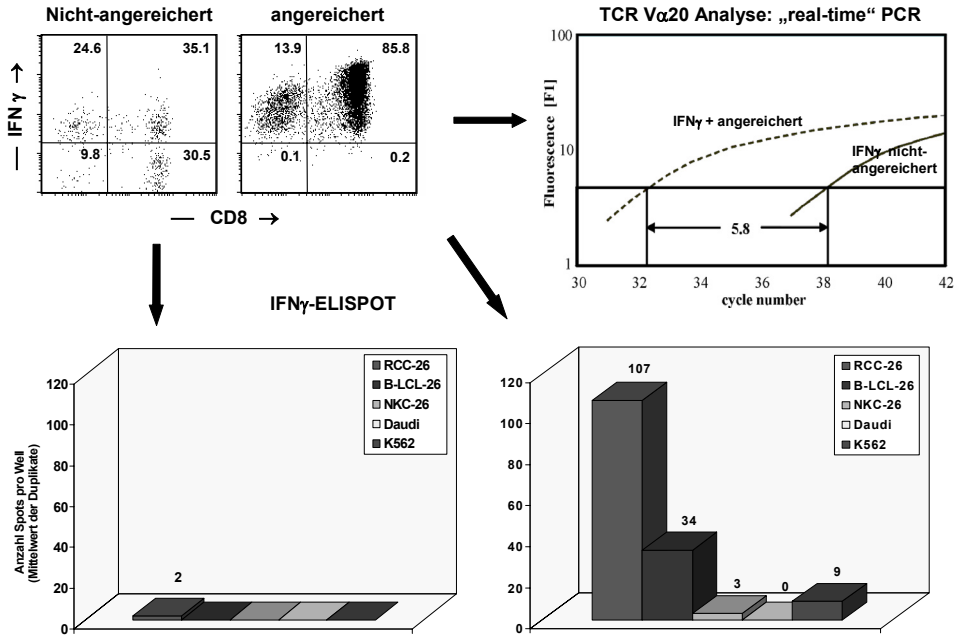


Abb. 1: Detektion und Anreicherung Tumor-spezifischer T-Zellen mit Hilfe des IFNγ-*„capture"*-Assays. Eine heterogene Population von TIL-26 Zellen wurde für 4 h mit OKT3 stimuliert und die IFNγ-produzierenden Zellen mit Hilfe des *„capture"*-Assays angereichert. Die Tumor-spezifische Immunantwort beider Zellfraktionen wurde im ELISPOT quantifiziert (400 TIL-26 Zellen/well + 5000 Stimulatorzellen/well) und der Vα20/Jα22 TCR über *„real time"*-PCR mittels LightCycler® quantifiziert.

Ob mit Hilfe eines derartigen Assays angereicherte IFNγ-produzierende T-Zellen nach z. B. 2-wöchiger *In-vitro*-Expansion ihre spezifische zytotoxische Aktivität noch behalten und nach adoptivem Transfer sogar zur Tumorabstoßung führen, konnte mit dem CT26 Kolonkarzinom-Tumormodell in Balb/c Mäusen nachgewiesen werden. In 3 von 5 Mäusen kam es nach Transfer dieser Zellen unter zusätzlicher Gabe von 20.000 U rIL-2 i.p. zur Tumorabstoßung. Ohne IL-2 Gabe wurden die Tumoren nur partiell abgestoßen (Abb. 2).

Der Vorteil dieser Strategie ist, dass sowohl $CD4^+$ als auch $CD8^+$ polyklonale Tumor-reaktive T-Zell-Populationen ohne Kenntnis des Tumorantigens angereichert und ohne zu klonieren expandiert werden können, was von eminenter Bedeutung für die adoptive T-Zell-Therapie von Tumorpatienten ist.

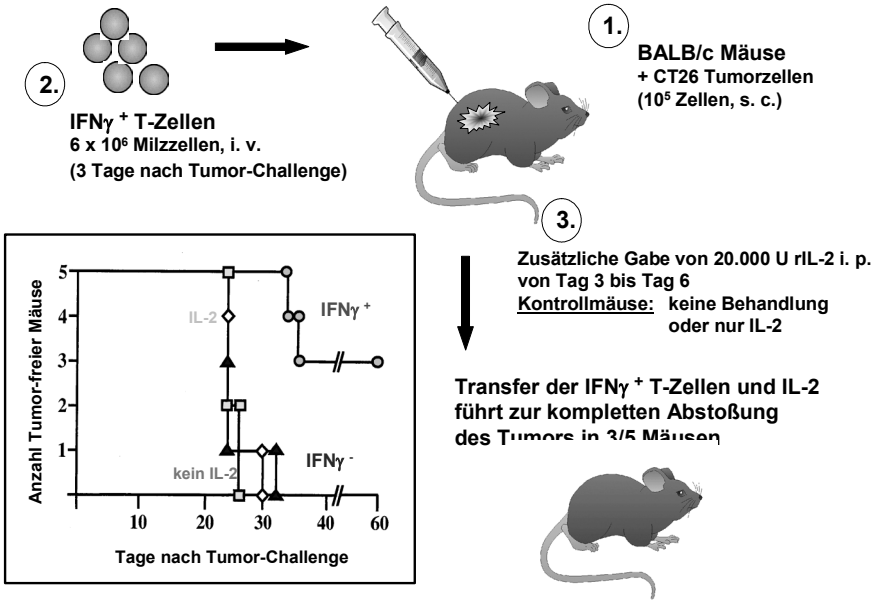


Abb. 2: Adoptiver Transfer nach Expansion *in vitro*: $IFN\gamma^+$ T-Zellen sind *in vivo* zytotoxisch.

Allogene, genetisch modifizierte Tumorzellvakzine für das Nierenzellkarzinom

Analyse der Immunogenität des RCC

Die Entscheidung, eine allogene Vakzine zu generieren, entwickelte sich aus unseren Untersuchungen zur Erkennung von RCC durch zytotoxische Effektorzellen. Diese Studien zeigten, dass die RCC-26-Zelllinie ideale Eigenschaften für eine allogene Vakzine besitzt. RCC-26 besitzt einen oder mehrere tumorassoziierte Liganden, die von dem in der Bevölkerung häufigen Allelprodukt HLA-A*0201 präsentiert werden. Diese(r) Ligand(en) werden in vielen Nierenzellkarzinomen exprimiert, so dass sie als gemeinsame (*shared antigens*) definiert werden können. Weiterhin wurden TIL, die RCC-26 erkennen, in mehreren Patienten gefunden. Dies zeigt, dass das Immunsystem gegen die vom RCC-26 exprimierten Epitope nicht tolerant ist und dass viele Patienten bereits eine T-Zell-Antwort gegen die von RCC-26 exprimierten antigenen Determinanten entwickelt haben. Sowohl die gegen diese(n) Liganden gerichteten Gedächtniszellen als auch die durch Stimulation neu induzierten T-Zellen exprimieren charakteristische TCR, die als molekulare Marker zum Nachweis dieser Tumorspezifischen T-Zellen verwendet werden können.

Genmodifikation von RCC-26 zur Verbesserung der natürlichen Immunogenität

Unter dem Gesichtspunkt, dass RCC-26 als Vakzine nicht nur Antigen exprimieren muss, sondern auch zusätzliche T-Zell-Aktivierungssignale vermitteln soll, wurden Genmodifikationen zur Verbesserung der Antigenpräsentation und T-Zellaktivierung in Betracht gezogen. Da RCC-26 keine Kostimulationsmoleküle exprimierte, wurde RCC-26 mit dem Gen für B7.1 transduziert. Zusätzlich wurden noch Einfachtransduktanten mit den Genen für IL-2, IL-7 und Interferon-γ hergestellt, sowie Doppeltransduktanten, RCC-26.IL-2/B7.1 und RCC-26.IL-7/B7.1. Die verschiedenen RCC-26-Transduktanten wurden in *In-vitro*-Testsystemen überprüft, ob die jeweilige Genmodifikation quantitativ und qualitativ Einfluss auf die Reaktivität sowohl der MHC-restringierten Effektorzellen als auch der nicht-MHC-restringierten Lymphokin-aktivierten Killer(LAK)-Zellen nimmt (Abb. 1). Die Transduktion mit dem Gen für IFN-γ führte zu einer deutlichen Steigerung der zytotoxischen Aktivität der TIL-26 und unterdrückte die Aktivität der LAK-26 vollständig. Die Transduktion mit dem Gen für B7.1 beeinflusste weder die Aktivität von TIL-26 noch LAK-26. Die Genmodifikation mit IL-2 steigerte beide Aktivitäten. Die Koexpression von B7.1 verstärkte den positiven Effekt von IL-2. Ein vergleichbar starker positiver Effekt auf beide Effektoraktivitäten wurde für die Doppeltransduktanten RCC-26.IL-2/B7.1 und RCC-26.IL-7/B7.1 beobachtet.

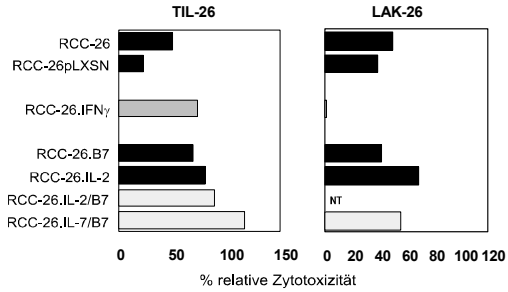


Abb. 1: Genmodifikationen von RCC-26 mit Genen für Zytokine und B7.1 beeinflussen die Effektorfunktion von MHC-restringierten (TIL-26) und nicht-MHC-restringierten (LAK-26) Lymphozyten. Die Erkennung der angegebenen Zelllinien ist dargestellt als % relative Zytotoxizität. Das Effektor-T-Zell-/Tumortarget-Verhältnis war 2:1 für TIL-26 und 20:1 für LAK-26. (RCC-26pLXSN ist Vektorkontrolle; NT *not tested*).

Das Konzept, allogene Tumorzellen als Vakzine zu verwenden, wurde anfänglich kritisiert, weil man dachte, dass dominante Alloantworten die Entwicklung Tumor-assoziierter T-Zellen unterdrücken könnten. Mit Hilfe von Tiermodellen konnte gezeigt werden, dass sich andauernde allogene Antworten nicht nachteilig auswirken, sondern die Induktion einer Tumorimmunität sogar fördern können.

International wurde bisher nur eine klinische Studie mit IL-2-modifizierten RCC-Zellen für 10 Patienten abgeschlossen (www.wiley.co.uk/wileychi/genmed/clinical). Dass bei dieser Studie keine Anzeichen einer klinischen Besserung zu sehen waren, darf nicht zu der allgemeinen Ablehnung des allogenen Konzeptes verleiten. Denn es war weder die Immunogenität der Vakzine untersucht worden, noch das HLA-A2 auf molekularer Basis typisiert worden, was für eine sinnvolle Patientenselektion nötig ist. Auch waren keine *immune monitoring*-Analysen durchgeführt worden. In unserer klinischen Studie wird für die Behandlung des RCC zum ersten Mal das B7.1 kostimulatorische Moleküle in Kombination mit Zytokinen eingesetzt. Die *In-vitro*-

Analysen hatten gezeigt, dass IL-2 und IL-7 für unterschiedliche Antworten verantwortlich sein können. Ob sich dieser Befund auch *in vivo* zeigen wird, bleibt abzuwarten. Der Einsatz identischer *immune monitoring*-Strategien bei beiden Patientengruppen wird einen direkten Vergleich beider Vakzinezellen erlauben.

Etablierung einer funktionellen Qualitätskontrolle unter GMP-Bedingungen

Für eine funktionelle Qualitätsprüfung der gentechnisch-modifizierten Zelllinien (RCC-26 IL-2/B7.1, RCC-26 IL-7/B7.1) wurde in enger Zusammenarbeit mit dem Zellkulturlabor für Klinische Prüfung (ZKP) in Berlin (Dr. J. Kopp, Herstellungsleiter und E. Wehnes, Leiter der Klinischen Prüfung) im LTI ein externes Qualitätsprüflabor entsprechend den europäischen Richtlinien für GMP (*„good manufacturing practice"*) eingerichtet und von der Regierung von Oberbayern genehmigt. Zur funktionellen Evaluierung der Vakzinen, die später einmal als Arzneimittel zugelassen werden sollen, wurde ein Testsystem mit den erforderlichen SOPs (*„standard operating procedures"*) entwickelt, das ebenfalls von der Behörde mit dem Titel „Spezifische Lymphozytenstimulierung" genehmigt wurde.

Die Sekretion der Zytokine IL-2 und IL-7, die Oberflächenexpression des B7.1 Moleküls auf den zu prüfenden Vakzine-Zelllinien sowie alle anderen Qualitätsuntersuchungen hinsichtlich Identität, Stabilität, Sterilität, Endotoxingehalt und Virenkontamination wurden intern und extern im Auftrag des ZKP von anderer Seite (Firma BioReliance) durchgeführt. Als Messparameter für die funktionelle Qualitätsprüfung im Sinne einer MHC-restringierten Erkennung des Tumorantigens wurde die spezifische IFNγ-Produktion des autologen Vα20 TCR-positiven TIL-26 T-Zellklones nach Stimulierung durch die zu prüfenden Zelllinien verwendet und als Messmethode wurde der ELISPOT eingesetzt.

Verschiedene Präparate aus den einzelnen Produktionschargen der RCC-26 IL-2/B7.1 bzw. RCC-26 IL-7/B7.1 Vakzine-Herstellung wurden für diesen Prüftest verwendet: PSB (*primary seed bank*), WCB (*working cell bank*) und unbestrahltes klinisches Lot. Als Kontrollzelllinien wurden eingesetzt: die parentale RCC-26 Zelllinie, die autologe primäre Normalnierenzelllinie (NKC-26) und die autologe B-LCL-26.

Zusätzlich wurden im Auftrag des Leiters der klinischen Prüfung die bestrahlten Präparate der klinischen Lots getestet (Abb. 2). Der Prüftest bewies nicht nur die gleichmäßige HLA-restringierte Erkennung aller Präparate aus den einzelnen Produktionschargen sondern auch den günstigen Effekt der nachträglichen Bestrahlung der fertig produzierten Vakzine auf die Aktivierung der T-Zellen, die dadurch begründet ist, das die bestrahlten Zellen mehr IL-2 bzw. IL-7 sezernieren als die unbestrahlten Vakzinezellen.

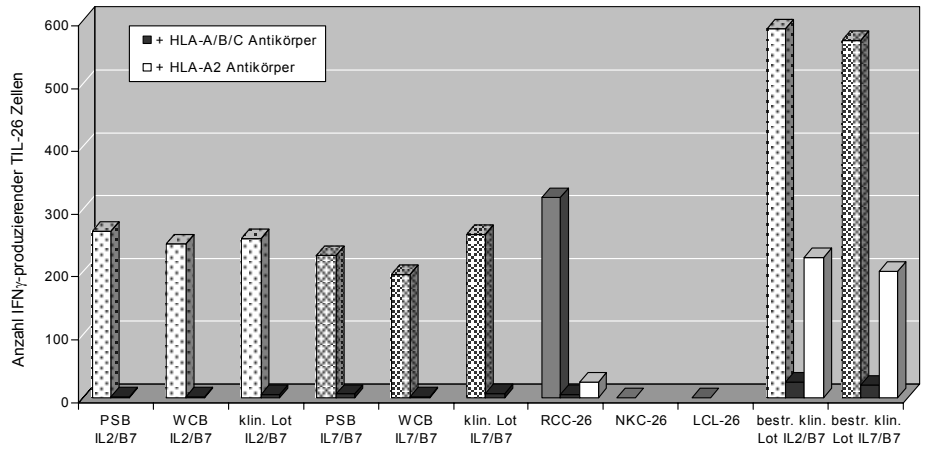


Abb. RCC-2: Prüftest „Spezifische Lymphozytenstimulierung": TIL-26 ELISPOT. Gezeigt ist die Reaktivität des Klones TIL-26-2 #47 (1000 Zellen/well) nach Stimulation mit den entsprechenden Prüfpräparaten bzw. Kontrollzelllinien (5000 Zellen/well) als Anzahl IFNγ-produzierender TIL-26 Zellen. Zur Blockierung der Reaktion wurden der HLA-Klasse-I-reaktive monoklonale Antikörper W6/32 (Fa. DAKO) und für RCC-26 bzw. die bestrahlten klinischen Lots zusätzlich der HLA-A2-reaktive monoklonale Antikörper HB 54 eingesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus Triplikaten.

Klinische Studie (Phase I) zur Evaluation einer allogenen, gentechnisch modifizierten Tumorzellvakzine für das Prostatakarzinom

Im Rahmen einer Kooperation mit dem Klinikum der TU München (FE-Vertrag DLR 01 GE 9625/4 mit Prof. B. Gänsbacher, Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung; Prof. R. Hartung, Urologische Klinik) werden im Labor für Tumorimmunologie auch die HLA-Typisierung und das *immune monitoring* für die klinische Phase I/II Studie zur Behandlung von Patienten mit hormonrefraktärem Prostatakarzinom durchgeführt. Für diese Studie wurde die allogene HLA-A*0201 positive Prostatakarzinomzelllinie LNCaP durch retroviralen Gentransfer mit den Genen für die Zytokine Interleukin-2 und Interferon-γ transfiziert. IL-2 fördert die Aktivierung und Proliferation von T-Lymphozyten und NK-Zellen, IFNγ führt u. a. zu einer gesteigerten Expression von MHC-Molekülen auf der Zelloberfläche der Tumorzellen und damit auch zu einer gesteigerten Präsentation Tumor-assoziierter Peptidfragmente. Die Zellen werden vor Injektion mit 150 Gy bestrahlt, um ein Tumorwachstum im menschlichen Körper zu verhindern. Anschließend werden die Zellen dann in einem Dosis-Eskalationsversuch den Patienten intradermal injiziert. Insgesamt werden innerhalb von drei Monaten mindestens vier Vakzinierungen durchgeführt. Phase I der klinischen Studie mit sechs Patienten und einem Follow-up von mindestens sechs Monaten bei vier Vakzinierungen ist gegenwärtig beendet und befindet sich in der Auswertung. Als klinischer Parameter für das Ansprechen von Prostatakarzinompatienten auf eine Therapie dient u. a. der PSA-Wert im Serum, der bei allen Patienten, die in die Studie aufgenommen werden, im Ansteigen ist. Bei zwei Patienten zeigte sich ein Absinken bzw. eine Stabilisierung des PSA-Wertes für länger als ein Jahr. Zwei Patienten blieben in Progress und sind nach vier Vakzinierungen aus der Studie ausgeschieden. In der Phase II werden derzeit 12 weitere Patienten von insgesamt 30 geplanten Patienten behandelt.

Das Procedere für das Monitoring ist prinzipiell das gleiche wie für die Nierenzellkarzinomstudie. Von Vorteil ist jedoch, dass es bereits definierte Prostata-spezifische Antigene mit bekannten HLA-A2-restringierten T-Zell-Epitopen gibt, beispielsweise für das Prostata-spezifische Antigen (PSA), das Prostata-spezifische Membranantigen (PSMA) und PAP (*prostatic acid phosphatase)*. Weitere Peptide werden gegenwärtig getestet: z. B. für PSCA (*prostate stem cell antigen*), STEAP (*six-transmembrane epithelial antigen of the prostate*), PSGR (*prostate-specific G protein-coupled receptor*).

Abbildung 1 zeigt eine erste Analyse von zwei Patienten nach viermaliger Vakzinierung (s.c.) mit jeweils 7.5 Mio. LNCaP IL2/IFNγ-Zellen. Zu verschiedenen Zeiten vor und nach den einzelnen Vakzinierungen wurden den Patienten Blutproben entnommen und die PBMC isoliert und eingefroren. Später wurden die Zellen aufgetaut und im ELISPOT analysiert.

Beide Patienten reagierten im klinischen Monitoring bezüglich ihres PSA-Wertes unterschiedlich. Zunächst kam es bei beiden Patienten zu einem, allerdings nur zeitlich begrenzten, Abfall des Wertes. Der PSA-Wert von Patient A stieg dann wieder an, wohingegen der PSA von Patient B nach geringem Anstieg ein Plateau erreichte und für längere Zeit konstant blieb.

Patient B zeigte im ELISPOT auch an Tag 183 und Tag 274 noch eine höhere Reaktivität gegenüber PSMA-P2. Ob diese Reaktivität jedoch relevant ist, kann noch nicht beurteilt werden, da erst die Analyse weiterer Patienten abgewartet werden muss. Zumindest wies dieser Patient auch in den Hautbiopsien eine stärkere Infiltration von T-Zellen, Makrophagen und Eosinophilen auf. Weitere ELISPOT-Analysen mit anderen Peptiden, die HLA-A2/Peptid-Tetramer-Bindungs-assays sowie die Charakterisierung der mittels Durchflußzytometrie angereicherten T-Zellen werden gegenwärtig durchgeführt.

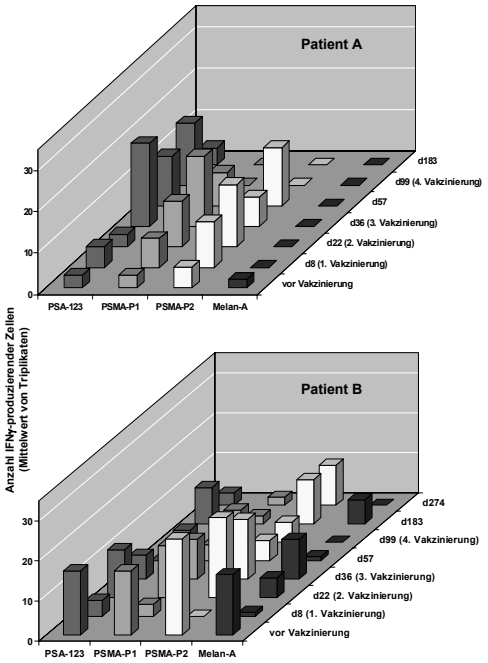


Abb. 1: IFNγ-ELISPOT zur Analyse der Immunantworten von CaP-Patienten während der Therapie. Den Patienten wurden vor und jeweils acht Tage nach den einzelnen Vakzinierungen Blutproben entnommen, die PBMC isoliert und eingefroren. Zusätzliche Blutproben wurden an den Tagen 57, 183 und 274 entnommen. Am Tag der ELISPOT-Analyse wurden die Zellen aufgetaut und jeweils 100.000 Zellen pro well direkt mit 2 µg/ml Peptid für 24 h inkubiert. Als Peptide wurden eingesetzt: PSA123 (FLTPKKLQCVDLHVISNDVCAQV), PSMA-P1 (LLHETDSAV), PSMA-P2 (ALFDIESKV) und als Kontrollpeptid Melan-A (ELAGIGILTV). Die Hintergrundreaktivität der PBMC ohne Peptid ist abgezogen.

Ausblick

Nach der ersten Euphorie über die neuen Möglichkeiten der Tumorimmunologie, die hauptsächlich durch die erfolgreiche Heilung von Tieren mit experimentell erzeugten Tumoren ausgelöst wurde, ist klar geworden, dass Heilungschancen im Menschen nur bestehen, wenn eine möglichst geringe Tumorlast vorhanden ist (*minimal residual disease*). Neue Immuntherapien werden meist Patienten mit weit fortgeschrittener Tumorerkrankung angeboten; eine Heilung ist daher wenig wahrscheinlich. In solchen Patientenstudien sollen, neben der Dosisfindung, mögliche Nebenwirkungen identifiziert werden. Um trotzdem Aussagen zu der Wirksamkeit einer Immuntherapie machen zu können, ist ein empfindlicher Nachweis einer spezifischen Immunreaktion gegen den Tumor von Nöten (*immune monitoring*). Einer unserer Forschungsschwerpunkte wird daher auch in Zukunft in der Weiterentwicklung von *immune monitoring*-Methoden liegen. Für eine standardisierte Bewertung der Immunantwort und einen direkteren Vergleich der Wirksamkeit unterschiedlicher Immuntherapieansätze wäre eine zentrale *monitoring*-Einrichtung wünschenswert.

Klinische und molekularbiologische Analysen von Tumoren haben klar gezeigt, dass Tumorerkrankungen hochkomplex und heterogen sind, so dass vermutlich Immuntherapien individuell angepasst werden müssen. Dazu werden praktikable, kostengünstige Analyseverfahren zur Bestimmung des patienteneigenen Tumorantigenmusters z.B. mit Hilfe von Antikörper-Mikroarrays benötigt. Das langfristige Ziel unserer Forschungsaktivitäten ist daher die Bereitstellung von *off shelf*-Therapeutika, wie Antikörper, Peptide oder Tumorantigen-cDNAs/RNAs, für eine optimierte, individualisierte zelluläre und humorale Tumorimmuntherapie von urologischen und anderen Tumoren. Hierzu ist eine enge Zusammenarbeit von Kliniken und assoziierten Laboratorien und Instituten, wie sie im LTI bereits besteht, eine wichtige Voraussetzung.

Personen

Klinische Forschergruppe „Gentechnisch modifizierte Tumorzellvakzine zur Immuntherapie des Nierenzell- und Prostatakarzinoms: Experimentelle und klinische Grundlagen“ (KFG, bis 31.12.2001):

Prof. Dr. med. Alfons Hofstetter

Prof. Dr. med. Gert Riethmüller

Projekt A: Prof. Dr. Dolores J. Schendel

Projekt B: OA Dr. med. Ralph Oberneder

Projekt C: PD Dr. med. Christoph Klein

Klinische Kooperationsgruppe „Immuntherapie urologischer Tumoren“ (KKG, ab 01.09.2001):

Kooperationspartner:

Urologische Klinik der LMU (Direktor: Prof. Dr. med. Alfons Hofstetter)

Institut für Molekulare Immunologie der GSF (Direktorin: Prof. Dr. Dolores J. Schendel)

Leitung der KKG: Dr. rer. nat. Heike Pohla

Mitarbeiter LTI:

Prof. Dr. rer. nat. Wolfgang Zimmermann

Dr. med. Alexander Buchner

Dr. med. vet. Robert Kammerer

Dr. rer. nat. Heike Pohla

Dr. rer. nat. Rainer Riesenberg

Miran Javorovic

Rebecca O’Dwyer

Michael Osthoff

Julia Schleypen

Birte Sievers

Tanja Brandt, TA

Roswitha Fischer, TA

Birgit Konkol, TA

Birgit Stadlbauer, TA

Assoziierte Mitarbeiter (Urologische Klinik):

Dr. med. Michael Siebels

Dr. med. Oliver Reich

Karl Rohrmann

Assoziierte Mitarbeiter der KKG (Institut für Molekulare Immunologie der GSF):

Marion von Geldern

Dr. rer. nat. Sybille Regn

Kooperationen

Wissenschaftliche Einrichtungen

- Institut für Molekulare Immunologie der GSF
  Prof. Dr. Dolores J. Schendel
  Dr. Christine Falk
  Dr. Bernhard Frankenberger
  Dr. Horst Lindhofer
  Dr. Josef Mysliwietz
  Dr. Elfriede Nößner

- Institut für Immunologie, Universität München
  Prof. Dr. Gert Riethmüller
  PD Dr. Christoph Klein

- Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin, Berlin-Buch
  Prof. Dr. Thomas Blankenstein
  Prof. Dr. Antonio Pezzutto
  Dr. Christian Becker
  Dr. Gerald Willimsky

- Zellkulturlabor für Klinische Prüfung (ZKP), Berlin
  Dr. Joachim Kopp
  Engelbert Wehnes

- Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung der Technischen Universität München
  Prof. Dr. Bernd Gänsbacher
  Dr. Thomas Brill

- Urologische Klinik, Klinikum rechts der Isar
  PD Dr. Roger Paul
  Dr. H. van Randenborgh
  Dr. Hubert Kübler

- Abteilung Hämatologie-Onkologie, III. Medizinische Klinik, Klinikum rechts der Isar
  Dr. Helga Bernhard

- Mt. Sinai Medical School, New York
  Prof. Dr. Karen Zier

- Institut für Biometrie und Epidemiologie, Klinikum Großhadern
  Prof. Dr. Überla
  Dr. Alexander Crispin

- Abteilung Hämato-Onkologie, Med. Klinik Innenstadt der LMU, München
  Dr. Farshid Dayyani

- Institut für Radiobiologie, Sanitätsakademie der Bundeswehr, München
  Dr. Nils Cordes

- Neurochirurgische Klinik, Klinikum Großhadern, München
  PD Dr. R. Goldbrunner
  Dr. T. Demuth

- Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenkrankheiten, Klinikum Großhadern, München
  PD Dr. Barbara Wollenberg

- Universitätsklinik für Urologie, Graz
  Dr. Richard E. Zigeuner

- Institut für Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene, TU München
  PD Dr. Dirk Busch

- Institut für Pathologie, TU München
  Prof. Falk Fend

- Universitätsklinik Innenstadt der LMU, München

  Prof. Stefan Endres

  PD Dr. Gunther Hartmann

  Philip Schneider

- Institut für Chirurgische Forschung, Klinikum Großhadern, München

  Prof. Georg Enders

- Chirurgische Klinik und Poliklinik, Klinikum Großhadern, München

  Prof. Rudolf Hatz

  Dr. Hauke Winter

  Dr. Natasja van den Engeln

- Developmental Genetics Laboratory. Department of Biochemistry, Biosciences Institute, University College Cork, Cork, Ireland

  Dr. Tom Moore

- The Lautenberg Center for General and Tumor Immunology, The Hebrew University, Hadassah Medical School, Jerusalem, Israel

  Dr. Ofer Mandelboim

  Dr. Gal Markel

Industriepartner

- Chiron GmbH, Ratingen
- Hoffmann-La Roche AG, Grenzach-Wyhlen
- Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch-Gladbach
- Micromet GmbH, Martinsried
- Trion Pharma GmbH, München
- Wilex AG, München

Dissertationen

Susanne Gatz (Dr. med.)

Entwicklung eines molekularbiologischen Verfahrens zum spezifischen Nachweis von HLA-A*0201 positiven Patienten für immuntherapeutische Studien (2001)

Yufeng Huang (Dr. med.)

Monitoring disseminierter Tumorzellen im Knochenmark bei Patienten mit Nierenzell-, Harnblasen- und Prostatakarzinom vor und nach radikaler Tumorchirurgie unter Einsatz der automatischen Bildanalyse (2001)

Miran Javorovic (Dr. rer. nat.)

RNA-pulsed dendritic cells in immunotherapy (in Arbeit)

Ines Kotter (Dr. med.)

Prospektive Studie: Prognostische Bedeutung des immunzytochemischen Nachweises disseminierter Tumorzellen im Knochenmark von Patienten mit Nierenzellkarzinom (in Arbeit)

Alexandra Kuffer (Dr. med.)

Prospektive Studie: Prognostische Bedeutung des immunzytochemischen Nachweises disseminierter Tumorzellen im Knochenmark von Patienten mit Prostatakarzinom (2002)

Rebecca O'Dwyer (Dr. med.)

Untersuchung des Einflusses von Tumorzellen auf die Infiltration von Lymphozyten in solide Tumoren (in Arbeit)

Michael Osthoff (Dr. med.)

Analyse der T-Zellantwort bei Patienten mit hormonrefraktärem Prostatakarzinom vor und nach allogener Tumorzellvakzinierung (in Arbeit)

Karl Rohrmann (Dr. med.)

In-vitro-Analyse der T-Zellantwort von Patienten mit metastasierendem Nierenzellkarzinom unter Behandlung mit Interleukin-2, Interferon-α und 5-Fluorouracil (in Arbeit)

Julia Schleypen (Dr. rer. nat.)

Mechanismen der funktionellen Inaktivierung Tumor-infiltrierender Lymphozyten und dendritischer Zellen am Beispiel des Nierenzellkarzinoms (in Arbeit)

Birte Sievers (Dr. rer. nat.)

Einfluss von CEACAM1-vermittelten Signalen auf die Kreuz-Präsentation von Tumorantigen durch murine dendritische Zellen (in Arbeit)

Publikationen

Hofmann T, Riesenberg R, Buchner A, Zimmermann W, Hofstetter A, Oberneder R. Disseminated tumor cells in bone marrow of patients with transitional cell carcinoma: immunocytochemical detection and correlation with established prognostic indicators. J Urol (in press)

Schleypen J, von Geldern M, Weiß EH, Kotzias N, Rohrmann K, Schendel DJ, Falk CS, Pohla H. Renal cell carcinoma infiltrating natural killer cells express differential repertoires of activating and inhibitory receptors and are inhibited by specific HLA class I allotypes. Int. J. Cancer (in press)

Kammerer R, Stober D, Riedl P, Oehninger C, Schirmbeck R, Reimann J. Noncovalent Association with Stress Protein Facilitates Cross-Priming of CD8+ T Cells to Tumor Cell Antigens by Dendritic Cells. J. Immunol. 168: 108-117 (2002)

Singer BB, Scheffrahn I, Heymann R, Sigmundsson K, Kammerer R, Öbrink B. CEACAM1 expression and signaling in human, mouse and rat leukocytes: Evidence for replacement of the short cytoplasmic domain isoform by GPI-linked proteins in human leukocytes. J. Immunol. 168: 5139-5146 (2002)

Wilkinson RW, Ross EL, Ellison D, Zimmermann W, Mitchell H, Snary D, Mather SJ. Evaluation of a transgenic mouse model for anti-human CEA radioimmunotherapeutics. J. Nucl. Med. 43: 1368-1376 (2002)

Riesenberg R, Buchner A, Pohla H, Lindhofer H. Lysis of prostate carcinoma cells by trifunctional bispecific antibodies (EpCAM x CD3). J. Histochem. Cytochem. 49: 911-917 (2001)

Feicht W, Buchner A, Riesenberg R. Entwicklung eines Inkubationssystems für ein inverses Mikroskop zur Langzeitbeobachtung von Zellkulturen in gekammerten Objektträgern. Biomed. Technik 46: 133-136 (2001)

Huang Y, Liu L, Riesenberg R, Oberneder R, Buchner A, Hofstetter A. Automated microscopic image analysis for detection of tumor cell dissemination in bone marrow before and after radical resection. Chin. J. Clin. Oncology 28 (1): 24-27 (2001)

Becker C, Pohla H, Frankenberger B, Schuler T, Assenmacher M, Schendel DJ, Blankenstein T. Adoptive tumor therapy with T lymphocytes enriched through an IFN-gamma capture assay. Nat Med. Oct;7(10): 1159-62 (2001)

Huang Y, Oberneder R, Riesenberg R, Buchner A, Hofstetter A. Micrometastasis study of immunocytological detection of prostate cancer cells in bone marrow. Chin. J. Clin. Urol. 16 (5): 222-224 (2001)

Chen T, Zimmermamn W, Parker J, Chen I, Maeda A, Bolland S. Biliary glycoprotein (BGPa, CD66a, CEACAM1) mediates inhibitory signals. J. Leukocyte Biol. 70: 335-340 (2001)

Chen T, Bolland S, Chen I, Parker J, Pantelic M, Grunert, F, Zimmermann W. The CGM1a (CEACAM3/CD66d)-mediated phagocytic pathway of Neisseria gonorrhoea expressing opacity (Opa) proteins is also the pathway to cell death. J. Biol. Chem. 276: 17413-17419 (2001)

Henning T, Brischwein M, Baumann W, Ehret R, Freund I, Kammerer R, Lehmann M, Schwinde A, Wolf B. Approach to a multiparametric sensor-chip-based tumor chemosensitivity assay. Anticancer Drugs 12: 21-32 (2001)

Kammerer R, Stober D, Singer BB, Öbrink B, Reimann J. CEACAM1 (Carcinoembryonic Antigen-related cell adhesion molecule 1) on murine dendritic cells is a potent regulator of T cell stimulation. J. Immunol. 166: 6537-6544 (2001)

Snyder S. K, Wessner D H, Wessels JL, Waterhouse RH, Wahl LM, Zimmermann W, Dveksler GS. Pregnancy-specific glycoproteins function as immunomodulators by inducing secretion of IL-10, IL-6 and TGFβ1 by human monocytes. Am. J. Reprod. Immunol., 45: 205-216 (2001)

Veranstaltungen

Seminarreihe des Labors für Tumorimmunologie und der KKG „Immuntherapie urologischer Tumore“ (GSF-LMU) in der Bibliothek des LIFE-Zentrums:

3.6.2002

In vivo-Funktionsstudien an Antigen-präsentierenden Zellen

Prof. Dr. Thomas Brocker
Institut für Immunologie
Ludwig-Maximilians-Universität München

17.6.2002

T-Zell-vermittelte Tumorregression: Untersuchungen zu möglichen Wirkmechanismen

Dr. Hauke Winter
Chirurgische Klinik und Poliklinik,
Klinikum Großhadern
Ludwig-Maximilians-Universität München

8.7.2002

Rolle der Cyclooxygenase 2 (COX2) bei der Tumorentstehung

Prof. Dr. Georg Enders
Institut für Chirurgische Forschung,
Klinikum Großhadern
Ludwig-Maximilians-Universität München

4.11.2002

Immuntherapie des multiplen Myeloms

Dr. Volker Reichardt
Medizinische Klinik II
Abteilung für Hämatologie, Onkologie, Immunologie und Rheumatologie
Universität Tübingen

15.11.2002

Characterization of molecules involved in the progression of human melanoma

Prof. Dr. Judy Johnson
Institut für Immunologie
Ludwig-Maximilians-Universität München

2.12.2002

Dendritic cell-based immunization against renal cell carcinoma: a role for oncofetal antigens?

Prof. Dr. Martin Thurnher
Urologische Klinik
Universität Innsbruck

Abschluss-Symposium der Klinischen Forschergruppe (DFG)

„Zellbasierte Vakzinen für die Immuntherapie urologischer Tumoren“

Wildbad Kreuth, 30.9.-2.10.2002

Tutorials im Rahmen des Kurses Infektionskrankheiten und Immunologie (IKI) der München-Harvard-Allianz

Prof. Wolfgang Zimmermann
12.11. - 4.12.2001
13.5. - 7.6.2002
11.11. - 3.12.2002

Dr. Alexander Buchner
11.11. - 3.12.2002

Praktikum FACS-Analyse im Rahmen des Kurses Infektionskrankheiten und Immunologie (IKI) der München-Harvard-Allianz

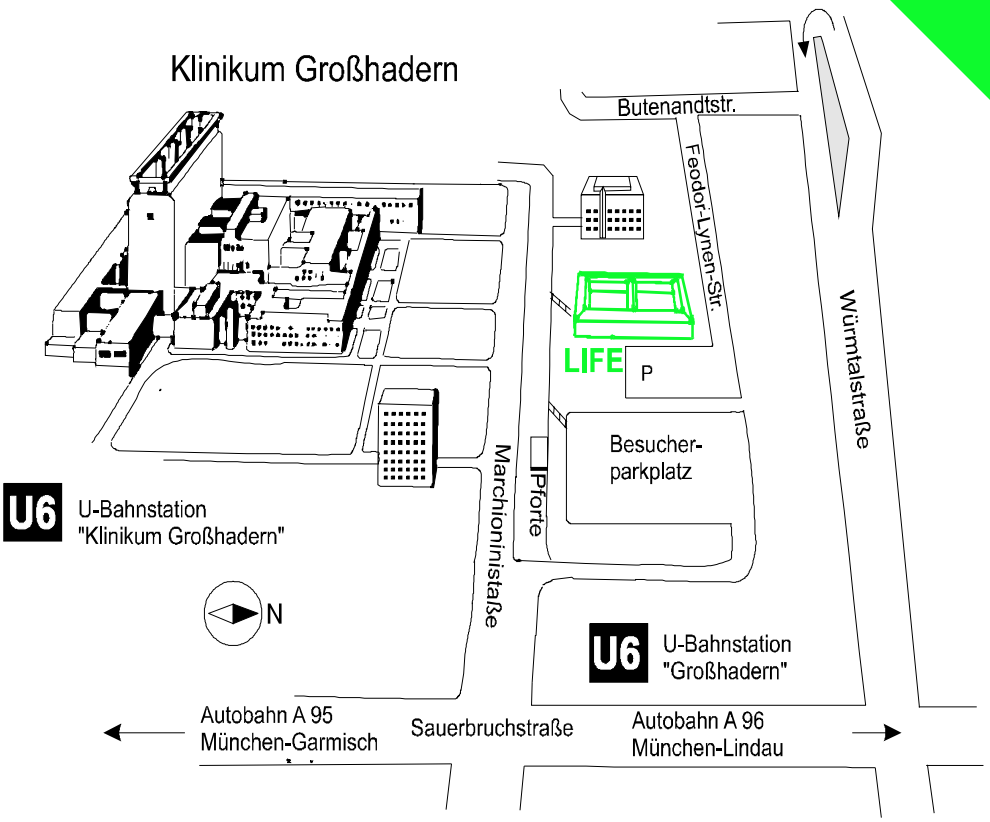
Dr. Alexander Buchner

Sommersemester 2001 - vier Kurse
Wintersemester 2001/2002 - vier Kurse
Sommersemester 2002 - vier Kurse
Wintersemester 2002/2003 - vier Kurse

Praktikum der Immunologie für Biologie-Studenten

Dr. Heike Pohla

Sommersemester 2001
Wintersemester 2001/2002
Sommersemester 2002
Wintersemester 2002/2003



LIFE - Laser- und Immunologie- Forschungseinrichtungen
Urologische Klinik und Poliklinik
Ludwig- Maximilians- Universität München
Marchioninistraße 23
81377 München

Telefon (089) 7095 - 4865
Telefax (089) 7095 – 4864

http://life.med.uni-muenchen.de