



Tätigkeitsbericht LIFE-Zentrum

2011

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	3
Tätigkeitsbericht LIFE-Zentrum 2011	5
1. Personal	5
Laser-Forschungslabor (LFL).....	5
Labor für Tumorimmunologie (LTI)	5
Experimentelle Urologie	5
2. Lehre	6
2.1 Pflichtveranstaltungen.....	6
2.2 Wahlveranstaltungen	6
2.3 Veranstaltungen.....	6
3. Forschungsschwerpunkte.....	7
3.1 Laser-Forschungslabor	7
3.1.1 Optische <i>In-vivo</i> -Pathologie.....	7
3.1.2 Klinische Laserbehandlungen	14
3.1.3 Photodynamische Therapie (PDT)	19
3.1.4 Das Kompetenznetzwerk Endoskopie (T.E.A.M.).....	21
3.1.5 Kooperationsverbünde	24
3.2 Labor für Tumorimmunologie	25
3.2.1 Identifizierung und Validierung von antigenen Zielstrukturen und Prognosemarkern.....	26
3.2.2 Neue immunologische Ansätze für die Tumorthherapie	31
3.2.3 Entwicklung, Optimierung und klinische Testung von Tumorstoffen	32
3.2.4 Weiterentwicklung des Immunmonitorings	37
3.2.5 Rolle von Mitgliedern der CEA-Familie in Gesunden und bei malignen Prozessen	38
3.3 Experimentelle Urologie	39
3.3.1 Projektgruppe Endocannabinoide.....	39
3.3.2 Neue Regulations- und Funktions-Prinzipien prostaticher alpha1-Adrenozeptoren: neue Mediatoren der Prostata-Kontraktion	41
3.3.3 Bedeutung des suburothelialen Myofibroblastennetzwerkes für die Pathogenese der überaktiven Blase.....	49
3.3.4 Adreno-muskarinerg Synergismus und Spontanaktivität des Trigonums	50

3.3.5 Untersuchungen des suburothelialen Myofibroblastennetzwerkes und der glattmuskulären Funktion und Steuerung im menschlichen Harnausflußtrakt bei Kontinenz und Inkontinenz	51
3.3.7 Diagnostische und prognostische Bedeutung von CEACAM1 bei der lymphogenen Metastasierung des Prostatakarzinoms	52
3.3.8 Gefäßwand-residente hämatopoietische Vorläuferzellen und ihre Rolle in der Tumervaskularisierung durch postnatale Vaskulogenese	53
4. Drittmittel	53
5. Ernennungen, Preise und Diplom- und Promotionsarbeiten	54
5.1 Laser-Forschungslabor	54
5.1.1 Ernennungen und Preise	54
5.1.2 Abgeschlossene Habilitationen, Promotionen und Diplomarbeiten	54
5.2 Labor für Tumorummunologie	54
5.2.1 Ernennungen und Preise	54
5.2.2 Abgeschlossene Habilitationen, Promotionen und Diplomarbeiten	55
5.3 Experimentelle Urologie	55
5.3.1 Ernennungen und Preise	55
5.3.2 Abgeschlossene Habilitationen, Promotionen und Diplomarbeiten	55
6. Publikationen (Originalarbeiten)	55
6.1 Laser-Forschungslabor	55
6.2 Labor für Tumorummunologie	56
6.3 Experimentelle Urologie	57

Tätigkeitsbericht LIFE-Zentrum 2011

Geschäftsführung:

Professor Dr. med. Stefan Endres

Professor Dr. med. Christian Stief

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

Telefon: 7095-4895

Telefax: 7095-4864

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

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

1. Personal

Laser-Forschungslabor (LFL)

Wissenschaftliche Mitarbeiter

Planstellen: 3

Drittmittel: 1 + 2x 0,5

Gesamt: 5

Nichtwissenschaftliche Mitarbeiter

Planstellen: 1 + 0,5

Drittmittel: 1 + 2x 0,5

Gesamt: 3,5

Labor für Tumorummunologie (LTI)

Wissenschaftliche Mitarbeiter

Planstellen: 3

Nichtwissenschaftliche Mitarbeiter

Planstellen: 1

Drittmittel: 1

Gesamt: 2

Experimentelle Urologie

Wissenschaftliche Mitarbeiter

Planstellen: 2,5

Drittmittel: 0,5

Gesamt: 3

Nichtwissenschaftliche Mitarbeiter	
Planstellen:	0
Drittmittel:	0
Gesamt:	0

2. Lehre

2.1 Pflichtveranstaltungen

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

2.2 Wahlveranstaltungen

LIFE-Zentrum

LIFE-Seminar mit eingeladenen Rednern

LIFE-Forschungsbesprechung mit Ärzten der Urologischen Klinik

LTI

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

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

LFL

Seminar mit Übungen: Laser in der Urologie; Physik an medizinischen Beispielen; Hauptseminar: Anwendungen physikalischer Methoden in der Medizin; Vorlesung: Laser in der Medizin: Grundlagen und klinische Anwendungen in HNO, Urologie und Gynäkologie

13 Doktoranden in Ausbildung, davon 8 in der Medizin, 3 in der Physik und 2 in der Tiermedizin (LFL)

Experimentelle Urologie

7 Medizindoktoranden

2.3 Veranstaltungen

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

World of Photonics Exhibition – Application Panel 23. Mai 2011

European Conference on Biomedical Optics 22.-26. Mai 2011

Topical Problem in Biophotonics 16.-23. Juni 2011

3. Forschungsschwerpunkte

Die Forschungsschwerpunkte der Forschungseinrichtung sind ausgerichtet auf die Charakterisierung von therapieresistenten Tumorstammpopulationen als *targets* für die Immuntherapie und anderer Therapien solider Tumoren sowie auf die Etablierung neuer prognostischer Marker bei urologischen Tumoren, Entwicklung und klinische Validierung innovativer optischer Verfahren zur Diagnose und Therapie humaner Neoplasien mit einem Schwerpunkt Lasermedizin sowie die Identifizierung von neuen therapeutischen Ansätzen bei urologischen Tumoren und die Entwicklung neuer Strategien zur therapeutischen Beeinflussung urologischer Funktionsstörungen (erektile Dysfunktion, Blasenentleerungsstörungen).

3.1 Laser-Forschungslabor

Das LFL ist eine interdisziplinäre Forschungseinrichtung mit dem Ziel, innovative optische Methoden zur Detektion und Therapie humaner Neoplasien zu entwickeln, klinisch umzusetzen und zu evaluieren. Um diesen Prozess zu optimieren, werden enge Kontakte mit der Fachhochschule München (*University of Applied Sciences*) und dem Fachbereich Physik der naturwissenschaftlichen Fakultät der LMU München gepflegt. Sie ermöglichen in optimaler Weise auf der Basis von Praktikanten-, Bachelor-, Master-, Diplom- und Promotionsarbeiten Labormuster zu entwickeln und diese in Kooperation mit Industriepartnern bis hin zur klinischen Anwendung umzusetzen. Die sich anschließende Evaluierungsphase in der Klinik wird ebenso begleitet. Dies eröffnet die Möglichkeit, in enger Kooperation mit den Ärzten weitere Optimierungsmöglichkeiten zu erkennen und die Weiterentwicklung mit den Kooperationspartnern fortzuführen. Da die Verfahren prinzipiell für viele medizinische Fachbereiche attraktiv sein können, werden Kontakte zu Mitarbeitern aus den unterschiedlichen Fachbereichen des Klinikums geknüpft, um diese Methoden rasch auch interdisziplinär umzusetzen. Im Laser-Forschungslabor werden drei Forschungsgebiete schwerpunktmäßig bearbeitet:

3.1.1 Optische *In-vivo*-Pathologie

Bei diesem Forschungsschwerpunkt, der auch unter dem Namen *Optical Biopsy* bekannt ist, werden derzeit international endoskopgestützte Methoden entwickelt, die es erlauben, eine histopathologische Befundung ohne Gewebeprobeentnahme vorzunehmen. Dazu ist notwendig, prä-maligne und maligne Areale mit hoher Sensitivität und Spezifität vorwiegend in Hohlorganen zu lokalisieren. Als besonders geeignet erweisen sich dabei das multilokuläre Harnblasenkarzinom und Karzinome in der Lunge sowie Tumoren im Gehirn. Auch Präkanzerosen, speziell in den Fachbereichen HNO und Gynäkologie sind eine wichtige Indikation. Durch spezielle Sonden, die über die Arbeitskanäle der Endoskope eingebracht werden, ist es möglich, sowohl die Invasion des Tumors (*staging*) als auch die zelluläre Struktur der Oberfläche (*grading*) optisch auf einem Monitor darzustellen. Im Laser-Forschungslabor werden dazu aktuelle neue Fluoreszenzmarker eingesetzt sowie an einer Optimierung der Endomikroskopie gearbeitet. Ziel ist, alle für die *In-vivo*-Pathologie notwendigen erforderlichen Techniken in ein einziges Endoskop zu integrieren. Folgende Projekte wurden in 2011 in diesem Forschungsschwerpunkt bearbeitet:

EU-Projekt „BladderMap“

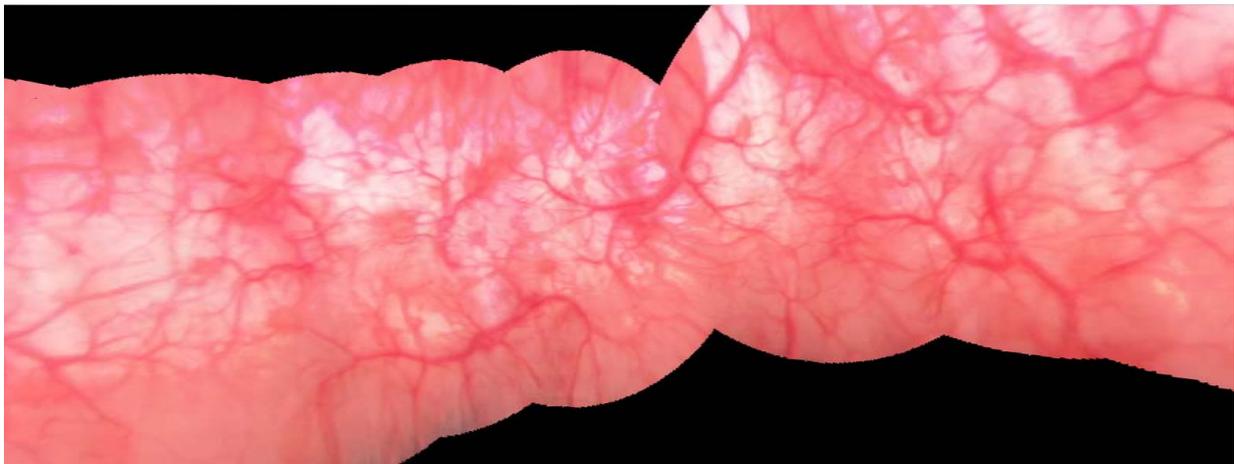
Herbert Stepp

Kooperation: Alexander Karl (Urologie)

Förderung: EU in Photonics4Life

Bei diesem Projekt handelt es sich um eine Machbarkeitsuntersuchung, die mit 10.000 Euro pro Partner gefördert wird. Die Laufzeit ist von Mai 2011 bis Ende April 2012. Weitere Institute aus Deutschland und Belgien, sowie ein Industriepartner (Karl Storz) sind beteiligt.

Ziel ist die Erstellung eines vollflächigen hochaufgelösten Bildes der gesamten Harnblase in Weißlicht und Fluoreszenz. Dazu wird das endoskopische Video in Einzelbilder zerlegt und diese wie bei einer Panoramaaufnahme passend zusammengesetzt. Zusätzlich wird die räumliche Position jedes Bildes gespeichert und über den jeweiligen Gewebeabstand ein 3D-Modell des Organs errechnet und intraoperativ dargestellt. Zukünftig werden Biopsieentnahmestellen in die Blasenwandkarte eingetragen und eine interaktive Navigation verfügbar sein. Im Bild ist das Fusionsbild eines Teilscans über die Blasenwand gezeigt. Eine Methode zur Abstandsmessung wurde zum Patent angemeldet (Miterfinder H. Stepp). Im Januar 2012 wurde ein vollwertiger EU-Antrag gleichen Namens eingereicht. Der Koordinator ist das LFL (H. Stepp).



Im Bild ist das Fusionsbild eines Teilscans über die Blasenwand gezeigt.

Einfluss des Tumorstammzellmarkers ABCG2 auf die PPIX-Photosensibilisierung bei Glioblastomzellen

Herbert Stepp, Wolfgang Zimmermann, Michael Heide

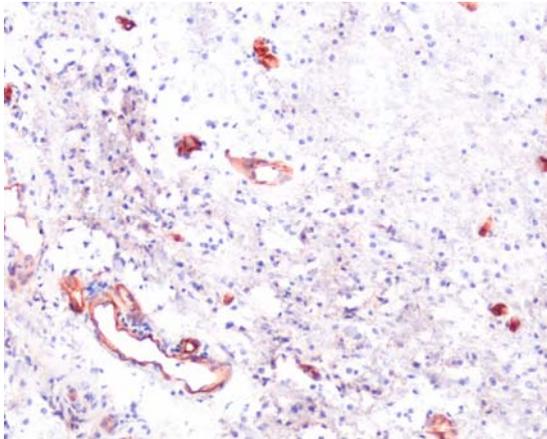
Kooperation: Neurochirurgie und Urologie (geplant)

Förderung: geplant DFG

ABCG2 ist ein Membrantransportprotein, das *Multidrug*-Resistenz vermittelt und mit Stammzeleigenschaften assoziiert ist. Kürzlich wurde bekannt, dass der Photosensitizer Protoporphyrin IX (PPIX) ein Substrat des Proteins ist und damit Tumorstammzellen bei Anwendung von photodynamischer Therapie (PDT)

möglicherweise weniger gut photosensibilisiert werden könnten als der Rest des Tumors. ABCG2 kann allerdings gut und spezifisch mit bereits klinisch eingesetzten Substanzen geblockt werden. Wir versuchen, insbesondere für das Glioblastom, ggf. auch für urologische Tumoren, die Bedeutung dieser Befunde zu untersuchen. Das Ziel ist dabei die Optimierung der PDT. Ein mögliches Szenario wäre, dass ABCG2 tatsächlich in beträchtlichem Umfang in Glioblastomen gefunden wird, in Zelllinien zum Überleben nach PDT führt, aber durch gleichzeitige Gabe von ABCG2-Blockern auch für diese Zellen eine volle PDT-Sensibilität restauriert werden kann. Über Tierversuche wäre eine klinische Studie im Rahmen von postoperativer oder interstitieller Glioblastom-PDT anzustreben.

Als vorbereitende Arbeiten wurden Zelllinien mit unterschiedlicher ABCG2-Expression erfolgreich etabliert, PPIX-Akkumulation und Photosensibilisierung werden in Kürze erfolgen. Parallel werden Glioblastom-Gefrierschnitte immunhistochemisch gefärbt. Bei ausreichender Datenlage wird ein Förderantrag bei der DFG oder der *German Israel Foundation* (GIF) gestellt, ein potenzieller GIF-Partner ist dem LFL bekannt.



Im Bild ist eine immunhistologische Färbung eines Glioblastomschnitts von ABCG2 gezeigt. Die Gefäßendothelien sind ABCG2-positiv (bekannt), aber auch einzelne Zellen im Gewebeverband. Es soll jetzt gezeigt werden, dass dies keine Endothelzellen sind und über CD133-Färbung untersucht werden, ob diese Zellen Tumorstammzellen darstellen.

„FOSCAN-Kinetik“

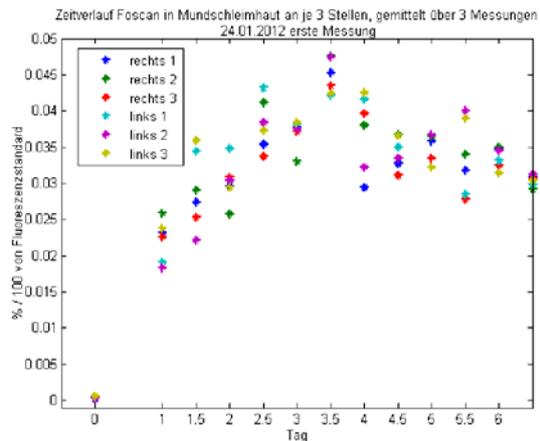
Herbert Stepp, Gesa Kniebühler, Thomas Pongratz

Kooperation: Jörg Schirra (Medizinische Klinik II)

Förderung: Industrie

FOSCAN ist der potenteste bekannte Photosensitizer. Er zeigt leider eine langdauernde Hautphotosensibilisierung. Mit dem Ziel, diese Nebenwirkung zu reduzieren werden *Low-dose-Regime* gesucht. In unserem Fall ist die Zielapplikation das Cholangiokarzinom. Durch Fluoreszenzmessungen an der Mundschleimhaut soll der optimale Bestrahlungszeitpunkt nach Substanzapplikation bei reduzierter Substanzdosis gefunden werden.

Als Normaldosis-Referenz werden Patienten mit Mundhöhlenkarzinomen untersucht. Für die nächste Serie diesbezüglicher Untersuchungen wurde ein Industriebeitrag von zunächst 10.000 Euro eingeworben.



Im Bild der Zeitverlauf der Intensität der FOSCAN-Fluoreszenz an verschiedenen Stellen der Mundschleimhaut über 6 Tage nach Injektion einer reduzierten Dosis.

Verbundprojekt „Neurotax“

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

Kooperation: Friedrich-Wilhelm Kreth (Neurochirurgie)

Förderung: BMBF in MoBiTech

Dieses Verbundprojekt war in 2011 in seinem 3. Jahr und läuft noch bis Ende April 2012. Die Zielsetzung ist die Verbesserung stereotaktischer Eingriffe, v. a. beim malignen Gliom. Dabei sollen erstens die Treffsicherheit der Biopsieentnahme und zweitens die Sicherheit des Eingriffs optimiert werden. Zu beiden Zielen trägt das LFL mit Grundlagenforschung zu optischen Gewebeparametern und der Entwicklung faseroptischer Sonden bei. Die Treffsicherheit bei der Entnahme von vitalem Tumorgewebe (statt Normalgewebe oder Nekrose), soll durch Detektion von 5-Aminolävulinsäure (5-ALA)-induzierter PPIX-Fluoreszenz verbessert werden. Nur in stoffwechselaktiven Tumorzellen wird PPIX synthetisiert. Allerdings ist bei fasergestützter Messung die Fluoreszenz nicht nur proportional zur PPIX-Konzentration, sondern hängt auch von den optischen Gewebeeigenschaften ab. In der Literatur finden sich mehrere Konzepte, diese Abhängigkeit vom Gewebe zu kompensieren, und damit eine Konzentrationsbestimmung mit ausreichender Genauigkeit zu ermöglichen. Diese Ansätze wurden in Laboraufbauten nachgestellt und vergleichend an Phantomen und im Tiermodell getestet.



Das Bild zeigt Schnappschüsse der Fluoreszenzkamera bei einer Fahrt der bildgebenden Sonde durch ein tumortragendes Mäusegehirn. Der Durchmesser der Sonde beträgt 0,7 mm. Nur im Bereich des Tumors ist die starke Rotfluoreszenz des PPIX zu sehen.

Dabei wurden für Gehirngewebe im interessierenden Spektralbereich relevante optische Parameter eingestellt. Die Ergebnisse wurden Anfang 2011 auf der Konferenz *Biomedical Optics* in San Francisco (*Photonics West*) vorgestellt. Es zeigt sich, dass ein Verfahren, das zwei Fasern und einen Wechsel zwischen Fluoreszenzmessung und Remissionsmessung einsetzt, die besten Ergebnisse erzielt. Parallel zur Fasersondenentwicklung wurde ein Verfahren zum Messen optischer Gewebeparameter etabliert, das sich potenziell auch für intraoperative *In-vivo*-Messungen eignet. Dabei wird ein Laserstrahl niedriger Leistung auf das zu vermessende Gewebe fokussiert und der radiale Intensitätsverlauf des nach diffuser Streuung seitlich austretenden Lichts mit einer Kamera erfasst und durch Abgleich mit theoretischen Simulationen des Lichttransports ausgewertet. Der physiologisch relevante Bereich optischer Gewebeparameter soll dadurch weiter eingengt und präzisiert werden. Der Aufbau ist fertig gestellt und Messungen an frischen humanen Gewebeproben werden laufend durchgeführt.

2011 lag der Fokus der Arbeiten am LFL bei der Gefäßwarnung mittels Indocyaningrün (ICG)-Fluoreszenz (Stichpunkt: Sicherheit). Die technische Umsetzung soll zum Patent angemeldet werden. Die bisherigen Untersuchungen zeigen, dass eine Vorwarnung im Bereich bis 2 mm vor Gefäßkontakt möglich sein sollte. Dieses Projekt verspricht, seine Ziele uneingeschränkt zu erreichen. Nach im vorletzten Jahr schon erfolgreich durchgeführten Tierversuchen konnte die bildgebende Sonde (Fa. Storz) bereits am Patienten getestet werden. Der Einsatz war so erfolgreich, dass er als Fallstudie demnächst veröffentlicht wird.

Die Verbundpartner aus der Industrie und der beteiligte Neurochirurg sind an einer späteren Produktumsetzung weiterhin sehr interessiert. Die Fa. MRC-Systems würde dann ihre Stereotaxierahmen mit optischen Biopsiezangen ausrüsten.

Verbundprojekt „FLENDOS“

Katharina Thomsen, Herbert Stepp, Adrian Rühm

Kooperation: Christian Betz (HNO)

Förderung: BMBF in Biophotonik IV

Das Verbundprojekt FLENDOS startete im Oktober 2010 und wird bis September 2012 beendet. Das Ziel des Verbundprojekts FLENDOS ist es, Grundlagen für ein Fluoreszenz-Lebensdauer-Endoskopie-System für die Gewebedifferenzierung im oberen Luft-Speiseweg bereitzustellen. Die Aufgabe des LFL besteht darin, die Übertragbarkeit der im Verbund gewonnenen Grundlagenerkenntnisse in der Fluoreszenzlebensdauerermessung auf spätere klinische Anwendungen zu untersuchen. Die Schwerpunkte liegen dabei auf a) Auswirkung der Gewebeschichtung auf die Messsignale, b) Streuung der Messwerte im Normalgewebe (inner- und interindividuell) und c) Fähigkeit zur Kontrastierung der klinisch relevanten Gewebeeränderungen und im Wesentlichen die Eignung zur Tumorfürhdiagnostik. Für die Evaluierung auf Gewebeebe sollen verschiedene Gewebemodelle (Gefrierschnitt, Lebendgewebemodell) verglichen werden. Abschließend wird das Funktionsmuster Endo-FLI-Cam präklinisch evaluiert. Die Bearbeitung der klinisch relevanten Fragestellungen wird durch den Unterauftrag an die HNO-Klinik am Klinikum Großhadern gewährleistet.

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

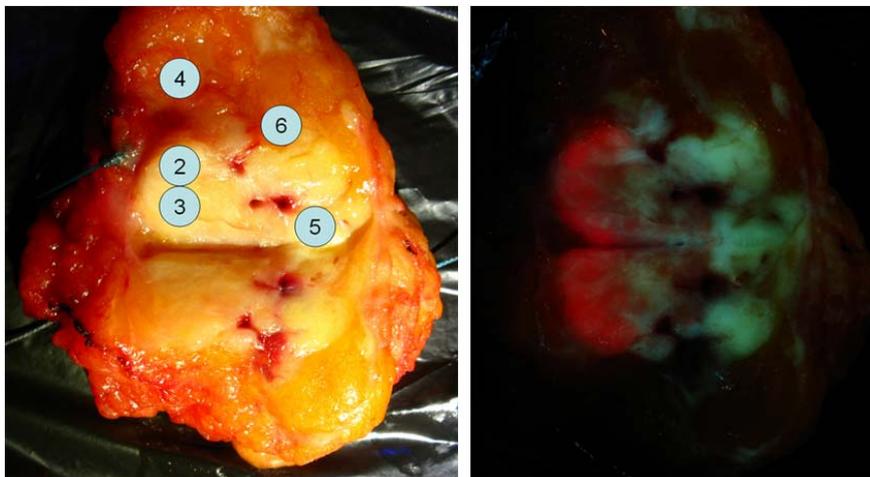
Herbert Stepp, Thomas Pongratz

Kooperation: Stephan Hasmüller (Gynäkologie), Susanna Müller (Pathologie)

Förderung: Industrie

Dieses Vorhaben wurde neu in 2010 gestartet und wird in Kooperation mit dem Pharma-Unternehmen *photonamic* durchgeführt. Es handelt sich um eine klinische Machbarkeitsstudie mit zunächst max. 16 Patientinnen. Es soll untersucht werden, ob nach oraler Gabe von 30 oder 20 mg/kg 5-ALA 3-5 h vor chirurgischer Resektion Mammakarzinomgewebe nachweisbar und selektiv PPIX anreichert. Ziel wäre die intraoperative Erkennung positiver Resektionsränder.

Es werden intraoperativ mit einem Fluoreszenzendoskop die Resektionsränder unter Videodokumentation in Weißlicht und Fluoreszenz abgescant, unmittelbar postoperativ das entnommene Gewebe mittig durch den Tumor eröffnet und von der Schnittfläche Fluoreszenzbilder und von max. 5 ausgewählten Stellen Spektren aufgezeichnet und wenige mm³ große Gewebestanzen entnommen. Das entnommene Gewebe wird zu einem Teil der pathologischen Untersuchung (gefärbte und Gefrierschnitte), zum andern Teil einer chemischen PPIX-Extraktion zugeführt. Bisher konnten 6 Patientinnen eingebracht werden. In den meisten Fällen konnte nur eine geringe Akkumulation von PPIX festgestellt werden. Bei der letzten Patientin allerdings zeigte sich eine sehr deutliche Fluoreszenz (Bild). Nach der Untersuchung von tastbaren Knoten steht nun die Untersuchung nicht-palpabler Tumoren an.



Das Bild zeigt ein Tumorpräparat unmittelbar nach Resektion mit Längsschnitt. Links Weißlichtbild mit Markierung von Biopsieentnahmestellen, rechts das Fluoreszenzbild mit roter PPIX-Fluoreszenz im linken Bereich der Schnittfläche. Histopathologisch fand sich Tumor bei den Proben 2 und 3, die Biopsien 5 und 6 waren Mastopathien ohne Tumorzellnachweis.

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

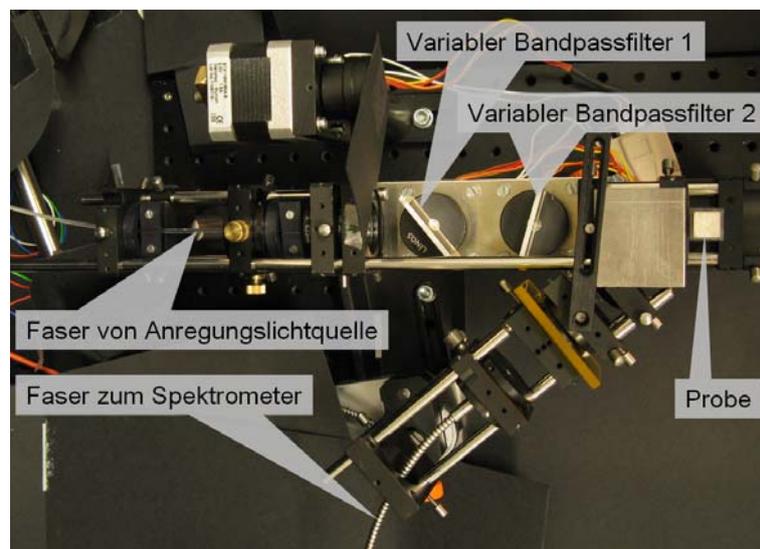
Herbert Stepp, Georg Hennig, Stephan Dittmar; Klinik: Michael Vogeser (Klinische Chemie)

Kooperation: Gary Brittenham (Columbia University, NY)

Förderung: Industrie

Studien zur Prävention von Folgen von Mangelernährung zeigen, dass eine Eisensubstitution signifikant das Immunsystem (z. B. zum Schutz vor Malariainfektion) bei genau den Personen stärkt, die unter Eisenmangel leiden. Eine pauschale Substitution „auf Verdacht“ hingegen schwächt das Immunsystem der nicht unter Eisenmangel Leidenden. Die Detektion der Fluoreszenz von Zink-PPIX aus Erythrozyten ist ein wichtiger Indikator zur Identifizierung der richtigen Zielgruppe, mit den verfügbaren Methoden ist diese allerdings zu invasiv (Blutentnahme). In Kooperation mit Prof. Brittenham und Prof. Vogeser wurde im Rahmen einer Physik-Diplomarbeit die Machbarkeit einer faserbasierten optischen Sonde für nicht-invasive Gewebemessungen untersucht und schließlich im Februar 2011 ein R21-NIH-Antrag gestellt, um einen Prototypen aufzubauen. Dieser Antrag wurde abgelehnt, das Projekt jetzt aber von der Fa. Nestlé mit 150.000 Euro (100.000 für LFL) für zunächst 2 Jahre (ab Dezember 2011) gefördert. Das zugrunde liegende Nachweisverfahren wurde zum Patent angemeldet (Miterfinder: H. Stepp, G. Hennig).

Die Aufgabenstellung ist extrem anspruchsvoll, da die nachzuweisende Menge an Zink-PPIX sehr gering, die konkurrierende Absorption von Hämoglobin sehr hoch ist, spektral sehr stark überlappt und die Gewebeeigenfluoreszenz mindestens zwei Größenordnungen stärker ist.



Das Bild zeigt den von Herrn Hennig realisierten Aufbau für experimentelle Untersuchungen (verdünnte Blutproben und ex vivo Gewebe). Das Gerät ermöglicht die Aufzeichnung sogenannter Anregungs- Emissionsmatrizen der Probenfluoreszenz.

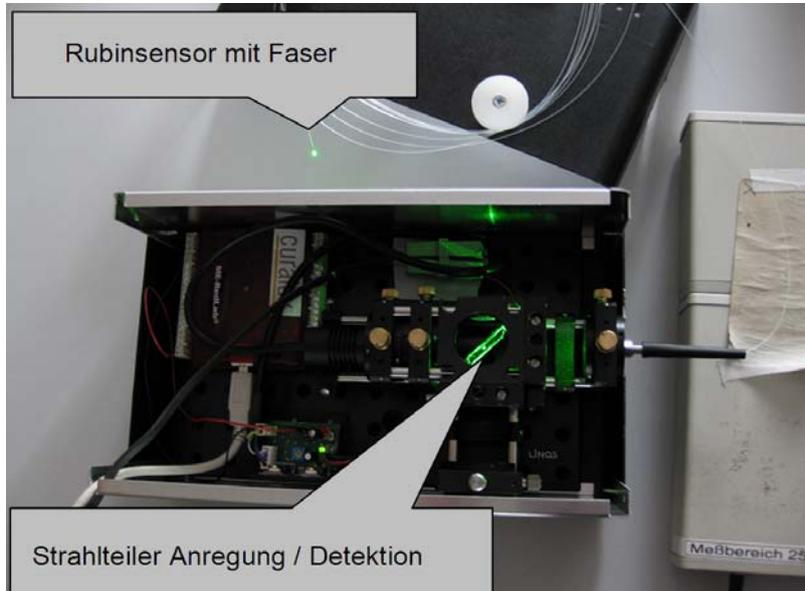
Fiberoptisches Messsystem zur On-line-Ermittlung der Temperatur bei Laser-assistierter endoluminaler Venenbehandlung

Ronald Sroka, Malte Hemmerich, Kathrin Siegrist

Kooperation: Claus-Georg Schmedt (Krankenhaus Schwäbisch-Hall)

Förderung: HoKa Biolitec-Unterauftrag

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



Das Bild zeigt den optischen Aufbau des faseroptischen Temperatursensors auf Basis der Rubinfluoreszenz mit Faserdurchmesser 600 μm und Rubinsensor 1 mm.

3.1.2 Klinische Laserbehandlungen

Als einziges Labor für Lasermedizin in Bayern hat sich die Arbeitsgruppe „Lasermedizin“ im LFL zum Ziel gesetzt, die neuesten Lasersysteme und -verfahren ausgehend von *In-vitro*-Laborversuchen bis hin zu klinischen Studien auf ihre Effizienz hin zu untersuchen. Abhängig von den Laserparametern werden dabei Effekte der Gewebekoagulation und Vaporisation bis hin zur Steinertrümmerung untersucht.

Die Forschungsarbeiten wurden schwerpunktmäßig in Kooperation mit den klinischen Fächern Urologie und HNO durchgeführt. Folgende Projekte wurden in 2011 in diesem Forschungsschwerpunkt bearbeitet:

Lithotripsie

Ronald Sroka

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

Förderung: Industrie

Ziel dieser Projektgruppe ist es, unterschiedlichste Lasersysteme im Hinblick auf ihre destruktive Wirkung auf humane Steine im Vergleich zu standardisierten Kunststeinen zu untersuchen. Im Mittelpunkt stehen dabei die Bestimmung der Fragmentierungs- und Abtrage rate. Da der Rückstoß der Steine infolge der Energieapplikation ein nicht zu vernachlässigender Nebeneffekt während der Behandlung ist, wurde ein neues innovatives Verfahren zur Untersuchung der Repulsion von Kongrementen entwickelt. Mit dem Experiment am mathematischen Pendel wurden die Repulsionseffekte unterschiedlicher Lasersysteme experimentell verglichen. Zusätzlich wurde das horizontale Harnleitermodell als ein weiteres Modell zu Rückstoß-Untersuchungen etabliert. Da seitens der Industrie kostengünstigere Verfahren als die Laser-Lithotripsie entwickelt werden, war es ebenfalls von Interesse, neueste mechanische Lithotripsieverfahren mit dem im Laser-Forschungslabor zur Verfügung stehenden experimentellen Portfolio zu untersuchen. Publikationen sind in Bearbeitung.

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

Ronald Sroka

Kooperation: Christian Betz, Andreas Leunig, Miriam Havel (HNO)

Förderung: Industrie

Ziel des Projektes war es, den Einsatz eines Diodenlasers (DL) mit der Wellenlänge 1470 nm und einer Leistung bis 20 W für klinische Indikationen im Fachbereich HNO zu untersuchen. Auf der Basis von Voruntersuchungen wurden 2 prospektiv randomisierte klinische Studien mit Genehmigung der Ethikkommission mit jeweils 20 Patienten durchgeführt.

In Studie 1, „Vergleich des DL980 versus DL1470 zur Reduktion der Nasenmuschel“, konnte festgestellt werden, dass mit beiden Lasersystemen auch klinisch eine effiziente Reduktion der Nasenmuschel erfolgen kann. Im Vergleich ist jedoch der Energieeintrag bei 1470 nm erheblich geringer als bei 940 nm. Unter klinischen Aspekten existieren erhebliche Unterschiede in der Abheilungsphase sowie im Schmerzempfinden der Patienten. Die entsprechenden Veröffentlichungen erfolgten sowohl auf Konferenzen als auch in Form einer Publikation.

In Studie 2, „Vergleich des CO₂-Lasers versus DL1470 bei der Tonsillotomie“, konnte festgestellt werden, dass beide Lasersysteme auch klinisch eine effiziente Schneidequalität bei Tonsillotomie bewirken. Jedoch ist bei der Faser-assistierten 1470-nm-Laser-Anwendung ein erleichtertes Handling, insbesondere bei Kindern, möglich. Nach Beendigung der Studie wurde die Daten entsprechend des Follow-Up ausgewertet, Veröffentlichungen in Form von Vorträgen erfolgten, Publikationen sind in der Präparationsphase.



Das Bild zeigt eine Aufnahme unmittelbar nach Laserwendung. Links im Bild: CO₂-Laser, 10.600 nm, 12 W, Freistrahll; rechts im Bild: Diodenlaser 1470 nm, 15 W, fasergeführt.

Untersuchungen zur Indikation des 1320-nm-Diodenlasers zur partiellen Nephrektomie

Ronald Sroka

Kooperation: Wael Khoder (Urologie)

Förderung: Industrie

Ziel des Projektes war es, den Einsatz des 1320-nm-Diodenlaser (max. 100 W) für die partielle Nephrektomie zu evaluieren. Insgesamt wurden zunächst 5 Patienten offen chirurgisch und 8 Patienten laparoskopisch zur Etablierung des Verfahrens behandelt. In einem Follow-up von 8 Monaten konnten keinerlei Laser-induzierte Komplikationen festgestellt werden. Eine Publikation zu diesen 13 Fällen wurde in *Lasers in Medical Science* eingereicht und zu Beginn 2011 akzeptiert. Weitere klinische Einsätze stehen unmittelbar bevor. Die Optimierung des OP-Besteckes zur laparoskopischen Behandlung wurde mit einer Gebrauchsmusteranmeldung beim Deutschen Patent- und Markenamt gesichert (Erfinder: Khoder, Sroka). Weitere Laser-Einsätze erfolgen in Zusammenhang mit der Arbeitsgruppe NOTES im Kompetenznetzwerk T.E.A.M. Des Weiteren wurden diese Arbeiten auf Basis entsprechender *Ex-vivo*-Grundlagenuntersuchungen auf weitere Laserenergiequellen im IR-Bereich ausgedehnt.

Untersuchungen zum Schneid- und Versiegelungspotential unterschiedlicher Lasersysteme

Ronald Sroka, Michael Fedorov, Thomas Pongratz, Kathrin Siegrist

Kooperation: Wael Khoder, Katja Zilinberg (Urologie)

Förderung: Industrie

IR-Laserstrahlung im 2 µm-Bereich wird gut von Wasser, der wichtigsten Gewebekomponente, absorbiert und kann gleichzeitig gut mittels Lichtwellenleiter vom Lasergerät zum Gewebe transportiert werden. Somit zeigt diese Strahlung ein hohes Potenzial sowohl für endoskopische als auch für offen chirurgische Interventionen. Es wurden kommerzielle medizinische Lasergeräte, experimentelle IR-Lasersysteme (Dioden-gepumpter cw-Tm:YLF-Laser, cw- und Q-switched Ho:YAG-Laser) in diesem Wellenlängenbereich im *Ex-vivo*-Experiment hinsichtlich ihrer Schneid- und Versiegelungspotentiale untersucht. In den Experimenten zeigte sich eine präzise und reproduzierbare Ablation mit klar umschriebenem Koagulationssaum. Die Ablati-

onstiefe ist abhängig von der applizierten Laserenergie. Die Ablationsgeschwindigkeit ist abhängig von der Laserleistung. Histologisch konnte eine gleichmäßige Ausdehnung der Koagulation in axialer und in radialer Richtung von ca. 1 mm ermittelt werden. Insbesondere cw-Laser mit Emission im 2 µm-Bereich zeigen eine hohe Schneideffizienz mit reproduzierbaren Gewebefeffekten (Ablation, Koagulation) und sind damit ideal geeignet, auch bei Präparationen eingesetzt zu werden. Eine erste Publikation wurde eingereicht und in 2011 akzeptiert. Eine weitere Publikation ist eingereicht.

„BetaMod“ – Wundheilungsmodulation durch lokal platzierte Betastrahler

Ronald Sroka, Kathrin Siegrist

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

Förderung: Bayerische Forschungsstiftung

Wundheilung ist ein komplexer Prozess, der auf der Proliferation von Fibroblasten beruht. Im klinisch ungünstigsten Fall führt dieser Prozess zu Strikturen und Stenosen. Treten sie in röhrenförmigen Organen wie Harnröhre, Gallengang oder Tränen-gang auf, ist eine klinische Intervention unabwendbar. Ziel des BetaMod-Projekts ist, radioaktive Implantate aus Betastrahlern zu entwickeln und ihre Auswirkungen auf den Wundheilungsprozess zu untersuchen. Zusätzlich wurden die Präparate mittels innovativer Konfokal-Sonde unmittelbar während der Explantation untersucht.

Dieses Projekt wurde in verschiedenen Teilprojekten weitergeführt und die zugehörigen Doktorarbeiten angefertigt. Nun ist es das weitere Ziel, die klinische Einführung stringent einzuleiten. Hierfür wurde im Oktober 2011 ein Konsensustreffen unter Mitwirkung von namhaften deutschen Medizinern und Wissenschaftlern auf dem Gebiet der *Low-dose*-Strahlentherapie benigner Erkrankungen einberufen. In diesem Forum wurde vereinbart, dass dieses Verfahren zunächst in der Urologie bei der Behandlung der Anastomosenstriktur nach radikaler Prostatektomie erfolgen soll. Hierfür wurden folgende Schritte festgelegt: Erstellung und Einreichung eines Ethikprotokolls und die Entwicklung klinisch nutzbarer Applikatoren..

BetaMod-Teilprojekt der Urologie

Rezidivierende Anastomosenstrikturen nach radikaler Prostatovesikulektomie, ebenso wie Urethrastrikturen multipler Genese, stellen eine therapeutische Herausforderung dar. Mittels ionisierender Strahlung kann durch Eingriff in die Entzündungs- und Proliferationsphase die Wundheilung moduliert werden. Die therapeutische Wirkung von β -Strahlung ist auf wenige Millimeter Gewebetiefe beschränkt. Ziel dieser Untersuchung war es, durch β -Strahlung induzierte biomodulatorische Prozesse bei benignen Stenosen nachzuweisen, und ggf. deren klinische Einsatzmöglichkeiten zu erkunden.

In einer tierexperimentellen Orientierungsstudie wurde der Einfluss von lokal applizierter β -Strahlung im Sinne einer LDR-Brachytherapie auf die Wundheilung untersucht. Hierzu wurde ein standardisiertes, reproduzierbares Harnröhrenstrikturmodell im Versuchstier etabliert. Für die Durchführung einer LDR-Brachytherapie wurde ein Applikator entwickelt, bestehend aus einer neuartigen ^{32}P -haltigen Folie, die auf den üblichen Urethrakathetern im Bestrahlungsbereich aufgebracht wird. In 1 mm

Gewebetiefe wird innerhalb der einwöchigen Kathetereinlagezeit die entsprechende Dosis (0, 15, 30 Gy) appliziert. Zur Strikturinduktion wurde am Tag 0 bei 18 männlichen Kaninchen (*New Zealand White Rabbits*) mit einem Diodenlaser (Wellenlänge 1470 nm) ein zirkulärer Schaden in der *Pars prostatica urethrae* gesetzt. Am Tag 28 erfolgte die Evaluation des Strikturgrades (Zystourethrographie, Endoskopie). Nach *Urethrotomia interna* erfolgte randomisiert, kontrolliert und verblindet die Einlage des Spezialkatheters für eine Dauer von 7 Tagen. Am Tag 63 erfolgte die erneute Bewertung des Strikturgrades (Zystourethrographie, Endoskopie), Extirpation des Gewebes und die histologische Aufarbeitung.

15 Tiere (83,3%) hatten am Tag 28 eine Striktur mit weniger als 10% des Restlumens der Urethra ausgebildet. Am Tag 63 ergaben sich zwei Gruppen (keine Veränderung bzw. Besserung des ursprünglichen Stenosegrades). Nach Entblindung zeigte sich eine Verbesserung des Strikturgrades um einen Grad bei 2/6 Tieren der Kontrollgruppe und der 30 Gy Gruppe am Tag 63. In der 15-Gy-Gruppe zeigte sich eine Verbesserung des Strikturgrades bei 4/6 Tieren.

Die Induktion der Urethrastriktur und nachfolgende Brachytherapie konnten am Tiermodell erfolgreich etabliert werden. Der Einfluss von β -Strahlung auf die Wundheilung von urethralem Gewebe ist sowohl makroskopisch als auch histologisch auswertbar. Strahlenschäden (Fibrose, Mediaverdickung der mittleren Gefäße) waren bei allen radioaktiv bestrahlten Präparaten erkennbar.

BetaMod-Teilprojekt der Gastroenterologie

In einer randomisierten, kontrollierten und verblindeten Studie wurde die wundheilungsmodulierende Wirkung eines lokal integrierten Betastrahlers (Phosphor-32) im Gallengang untersucht. Bisher existiert keine vergleichbare Studie. Eine LDR-Brachytherapie mit einem geeigneten Strahler kurzer Reichweite könnte eine neuartige Behandlungsstrategie darstellen, um ein Rezidiv der Gallengangsstenose zu verhindern.

Ein definierter Energieeintrag (20 W, 5 s) erfolgte mithilfe einer Hochfrequenz-Sonde im unteren Drittel des Gallenganges im Tiermodell. 14 Tage danach wurde der Stenosegrad radiologisch ermittelt, gefolgt von der randomisierten, kontrollierten und verblindeten Einlage eines ^{32}P -Stents für eine LDR-Brachytherapie mit 30, 15, 0 Gray. Am Tag 35 erfolgte eine erneute Evaluation des Stenosegrades, die Entfernung des Stents, Euthanasie und Extirpation des Gewebes für die histologische Aufbereitung.

Bei Energieeinträgen von weniger als 100 J konnte dieses Stenose-Tiermodell reproduzierbar etabliert werden. Histologisch spiegeln Aspekte wie die Gewebefibrosen, das vermehrte Auftreten von Myofibroblasten und der erhöhte Kollagengehalt in der 30-Gray-Gruppe die schädigende Wirkung radioaktiver Bestrahlung im Gallengang wider. Der Nutzen der Strahlentherapie muss die Nebenwirkungen und die Risiken überwiegen. Der 15-Gray-Stent zeigte im Myofibroblastengehalt, im Gehalt kollagener Fasern im Fibrosegrad sowie in der Bindegewebstiefe im Stenosebereich keinen signifikanten Unterschied zu dem 0-Gray-Stent. Jedoch ist bei der Betrachtung der Mittelwerte tendenziell eine Erhöhung dieser Parameter zu sehen. Somit ist bis zum jetzigen Zeitpunkt der Einsatz eines radioaktiven Stents mit den in dieser Studie gewählten Dosen (15 und 30 Gray) in der Klinik kritisch zu betrachten.

Eine erste Dosisengrenzung der LDR-Brachytherapie zur Reduzierung einer benignen Gallengangsstenose konnte vorgenommen werden. Die technische Durchführung einer LDR-Brachytherapie wurde in der vorliegenden Arbeit erfolgreich durchgeführt. Die Möglichkeit, weitere histologische bzw. immunhistologische Untersuchungen an den zur Verfügung stehendem Material ist gegeben.

3.1.3 Photodynamische Therapie (PDT)

Interstitielle PDT in der Neurochirurgie

Ann Johansson, Wolfgang Beyer, Herbert Stepp

Kooperation: Friedrich-Wilhelm Kreth (Neurochirurgie)

Es wurden Heilversuche zur stereotaktischen PDT mit 5-ALA-induziertem PPIX von inoperablen Gliomrezidiven an 5 Patienten durchgeführt. Zur Bestrahlung wurden 3-6 Lichtleitfasern verwendet, deren Positionierung auf der Basis gemessener optischer Eigenschaften von Gehirngewebe in Kombination mit Computersimulationen der zu erwartenden Lichtverteilung im Gewebe optimiert wurde. Dabei wurden im Rahmen des oben erwähnten Projekts „Neurotax“ erstmalig *in vivo* fluoreszenztechnische Untersuchungen durchgeführt u. a. mit dem Ziel, Korrelationen zwischen zugänglichen Messgrößen und dem Therapieerfolg zu finden. So wurde mit einzelnen Fasern kurzzeitig Licht eingestrahlt und jeweils alle anderen Fasern nacheinander als Detektor für Fluoreszenzlicht eingesetzt. Die Intensität der Fluoreszenz stellt dabei ein Maß für die Anreicherung des Photosensibilisators dar, und der Vergleich der Intensitäten vor und nach PDT ein Maß für das Ausbleichen und damit für den lichtdosimetrischen Erfolg der Therapie. Parallel dazu wurden an Biopsieproben über eine Extraktionsmethode fluorometrisch die Konzentrationen des Sensibilisators bestimmt. Bei 3 Patienten ergab sich eine deutliche *In-vivo*-Fluoreszenz und eine hohe PPIX-Konzentration in der Biopsie. Diese Patienten sind bisher seit 29 bis 36 Monaten rezidivfrei. Bei den beiden anderen Patienten fanden sich fast keine Fluoreszenz, eine nur geringe PPIX-Konzentration und ein Überleben von nur 3 bzw. 9 Monaten. Eine Korrelation mit der Ki67-Expression und dem MGMT-Promotormethylierungsstatus des Tumorgewebes war dagegen nicht zu erkennen. Eine intraoperative Fluoreszenzkontrolle scheint damit eine deutlich bessere Vorhersage des Therapieerfolges zu erlauben.

Photobleaching zur Online-Dosimetrie-Kontrolle für die PDT

Georg Hennig, Herbert Stepp, Ann Johansson

Die zentrale Aufgabe der Lichtdosimetrie bei der PDT ist die Bestimmung der Lichtdosis, die den Photosensibilisator PPIX im Zielvolumen weitgehend ausbleicht, so dass eine weitere Bestrahlung den Therapieeffekt nicht steigert. Es wurde die Frage untersucht, inwieweit diese Dosis bei der interstitiellen PDT durch *Online*-Messung von Fluoreszenz bestimmbar ist, so dass die Bestrahlung nach einer patientenspezifisch ermittelten Dauer beendet werden kann. Solche Messungen sind ohne zusätzliche Sonden im Tumor möglich, wenn mehrere Applikatoren eingesetzt werden, so dass einzelne während der Bestrahlung wiederholt kurzzeitig deaktiviert und als Fluoreszenzdetektor verwendet werden können. Zur Untersuchung dieser Frage wurden die resultierenden Lichtverteilungen im Gewebe, die Ausbleichkinetiken und die Fluoreszenzsignale durch *Ray-tracing*-Verfahren und Diffusionstheorie modelliert. Zur Kontrolle wurde Fluoreszenzphantomen auf der

Basis von Agar mit entwickelt und korrespondierende Messungen durchgeführt. Von Interesse ist das Ausbleichen insbesondere an den Stellen mit Dosisminima, die sich in der Mitte zwischen benachbarten Applikatoren einstellen. Es zeigte sich, dass das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten zu zwei Zeitpunkten eine Aussage über die Bestrahlungsdauer erlaubt, die für ein Ausbleichen an diesen kritischen Stellen erforderlich ist. Bei optimaler Wahl dieser beiden Zeitpunkte erwies sich dieses Kriterium als weitgehend unabhängig von den optischen Eigenschaften des Gewebes und der Bestrahlungsgeometrie. Ein Einsatz dieser Methode in der klinischen Praxis könnte helfen, Situationen zu erkennen, die eine höhere Dosis als im Mittel üblich erfordern, und damit Therapieversager zu vermeiden. Im umgekehrten Fall würde sie es ermöglichen die typischerweise im Stundenbereich liegenden Bestrahlungszeiten bei der PDT im Gehirn ggf. deutlich zu verkürzen.

Optimierung der PDT von Akne

Wolfgang Beyer, Jianan Li, Michael Heide

Förderung: Bayerische Forschungsförderung

Eine Therapieoption für *Akne vulgaris* ist die Bestrahlung der befallenen Hautflächen mit blauem Licht. Die dabei herbeigeführte Zerstörung der *Akne-propionicus*-Bakterien durch einen photodynamischen Effekt hat sich als sehr effizient erwiesen. Das Ziel war, eine Steigerung der Lichtdosis im Gewebe und damit der Effizienz durch Auftragen von Substanzen, die die Transparenz von Gewebe für das Licht temporär erhöhen. Für eine Optimierung der verwendeten Substanzgemische ist eine Quantifizierung dieses Effekts erforderlich. Unter den verschiedenen Messverfahren, die dazu vorgesehen waren, hat sich die spektrale Messung der Licht-Transmission an *Ex-vivo*-Hautproben am aussagekräftigsten erwiesen. Dazu wurde eine spezielle Lichtquellenanordnung entwickelt. Es wurden Experimente an unbehandelter Schweinehaut und an humanen *Ex-vivo*-Hautproben durchgeführt. Die Messungen wurden begleitet von theoretischen Modellen der Lichtverteilung in Gewebe mit kontinuierlich variierenden optischen Eigenschaften, wie sie bei Diffusion der Substanzen in das Gewebe hinein zu erwarten sind. Die experimentellen Ergebnisse zeigten jedoch, dass therapeutisch relevante Dosissteigerungen nur nach Einwirkzeiten von mehreren Stunden erzielt werden können. Ursache ist die geringe Durchlässigkeit des *Stratum corneums*. Für den klinischen Einsatz erforderliche kurze Einwirkzeiten sind lediglich bei medizinisch nicht zulassungsfähigen Substanzen, wie z. B. reinem DMSO, oder einer mechanischen Vorbehandlung des *Stratum corneums* zu erzielen.

Dünne zylindrische Lichtapplikatoren für die interstitielle PDT

Daniel Happe, Thomas Pongratz, Wolfgang Beyer, Ronald Sroka

Förderung: Industrie

Für die Lichtapplikation bei der interstitiellen PDT, z. B. bei Glioblastomen und in der Prostata, werden fasergestützte Zylinderstrahler mit einer Länge von 10 bis 40 mm und einem Durchmesser von maximal 2 mm benötigt. Es soll ein entsprechendes Herstellungsverfahren auf der Basis von transparenten mit Streumedium gefüllten Kunststoffschläuchen entwickelt werden. Die optischen Eigenschaften des in Silikon eingebetteten Streumediums sollen mit am LFL etablierten Methoden bestimmt werden. Für eine homogene Abstrahlung des Lichtes auf der gesamten Länge muss die Konzentration des Streumediums zum distalen hin zunehmen. Das erforderliche

Konzentrationsgefälle soll mittels eines *Ray-tracing*-Programms ermittelt werden. Erste Prototypen wurden gefertigt und hinsichtlich der Lichtverteilung untersucht.

Photonics4 LIFE-Endomikroskopie

Katharina Thomsen, Herbert Stepp, Ronald Sroka

Förderung: Photonics4 LIFE, EU

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

Stapes-Implantatfixierung mittels Laser

Ronald Sroka

Kooperation: Prof. J. Müller (HNO)

Förderung: Industrie

Stapesimplantate werden weitestgehend mittels Crimpen am Amboss fixiert. Das schwer reproduzierbare Crimpen (Abhängigkeit von Druck, Festigkeit, Länge des Implantats) ist dabei Ausgangspunkt für diverse klinische Nebenwirkungen. Aus diesem Grunde wurden Implantate auf Nitinol-Basis entwickelt, welche sich mittels Wärmeeintrag an den Amboss fixieren. Radiofrequenz und CO₂-Laserstrahlung beherbergen dabei wiederum Gefahrenpotential bei der Applikation. Mit Hilfe von Diodenlaser ist die fasergestützte Energieapplikation an das Implantat unkompliziert und reproduzierbar. In einer kleinen klinischen Studie konnte so 10 Patienten erfolgreich mit Nitinol-Implantaten versorgt werden. In Folge dieser Studie sollen nun in weiteren Untersuchungen die optimalen Laser-Parameter und Applikationsmöglichkeiten erforscht werden. Eine Gebrauchsmusteranmeldung für ein *Feedback*-gesteuertes Applikationsbesteck wurde beim Deutschen Patent- und Markenamt eingereicht (Erfinder: Sroka, Müller).

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

Sprecher: Herbert Stepp

Das im November 2008 gegründete Kompetenznetzwerk T.E.A.M. führte seine Aktivitäten auch in 2011 kontinuierlich fort.

In der Arbeitsgruppe „Optische endoskopische Diagnostik“ wurden die Kontakte zu den Firmen *Imalux* (USA) und *Mauna Kea Tech* (Frankreich) weiter intensiviert, so dass zwei Projekte entwickelt werden konnten. Im Rahmen dieser Projekte und im T.E.A.M.-Verbund ist es gelungen, sowohl ein Gerät für endoskoptaugliche optische Kohärenztomographie (OCT-Gerät) neuester Generation mit Verwendungsoptionen für alle T.E.A.M.-Mitglieder anzuschaffen (Auslieferung im März 2012). Der im Dezember 2010 bei der DFG eingereichte Großgeräteantrag zur Beschaffung eines pCLE-Gerätes der Fa. Mauna Kea Tech wurde bewilligt. Das Gerät ist seit Dezember 2011 im Einsatz.

RisPACS
Radiologische Verfahren
Ausgabe 1/2017

Laser-Endomikroskopie für die intraoperative Diagnostik

Trefferquote bei Gewebentnahme erhöht

Bisartig verändertes Gewebe etwa in den Verdauungsorganen zu erkennen, ist nicht immer einfach. Mit den bisherigen Diagnoseserverfahren lässt sich bei der Biopsie nicht optisch nachvollziehen, ob es sich tatsächlich um eine Krebsartig veränderte Stelle handelt hat. Die Trefferquote könnte sich beim Klinikum der Universität München allerdings zukünftig verbessern.

Mit der Anschaffung der konfokalen Laser-Endomikroskopie, im Fachjargon kurz pCLE genannt, lässt sich während der endoskopischen Untersuchung des Gallenganges zumindest das Master eines verdächtigen Bereichs identifizieren. Nach einer ersten Studie an einer anderen Klinik, erholte sich die Trefferquote für die Gewebentnahme mit der pCLE von bislang 75 auf 90 Prozent, erklärt Prof. Dr. Jörg Schira, Gastroenterologe bei der Medizinischen Klinik II am Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität München (LMU). „Gekauft wurde das neue Gerät mit finanzieller Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft von T.E.A.M., einem Netzwerk aus zwölf Kliniken und Instituten vorwiegend am Klinikum der Universität München. „T.E.A.M. leistet wissenschaftliche Finanzierarbeit in der intraoperativen Diagnostik“, betont dessen Sprecher, der Physiker Dr. Herbert Stepp, Laser-Forschungslabor des Klinikums der Ludwig-Maximilians-Universität München. Die Entwicklung der intraoperativen Diagnostik hat Tradition am LMU-Klinikum. Schon in den 1990er Jahren hat das Laser-Forschungslabor, seinerzeit Teil der Urologischen Klinik, ein Fluoreszenz-Verfahren entwickelt, das Tumorgewebe mit hochenergie Laserlicht. Dieses Verfahren ist seit 2006 im Routine-Einsatz, um Harnblasenkrebs und Hirntumoren verlässlicher zu diagnostizieren. Damit sind an der Harnblaseschleimhaut auch Krebsherde sichtbar, die zuvor Augen und medizinisches Gerät verborgen blieben. Die T.E.A.M.-Mannschaft will die Methode jetzt so weit verbessern, dass mit Rechnertechnik die gesamte Harnblase abgetastet werden kann.

Perspektiven kombinierter Techniken

Allerdings erlaubt das Fluoreszenz-Verfahren keine direkten Aussagen über die Art der Gewebeerkrankung der Zellen – ein rot fluoreszierendes Areal kann auch gutartig sein, zum Beispiel eine Entzündung. „Dazu braucht es eine mikroskopische Auflösung, die mit der pCLE möglich ist“, sagt Dr. Stepp. Im Kanal eines Endoskops schiebt der Arzt dabei eine haushaare dicke Sonde bis zum Gewebe vor und setzt sie auf verdächtigen Stellen auf. Dann kann man bis etwa 150 Mikrometer tief unter die Gewebeoberfläche Zellen mikroskopisch darstellen. Das Gerät ist einsetzbar in allen Organen mit einem Hohlraum – also beispielsweise in der Blase, im Rachenraum oder eben im Verdauungstrakt. Die Ausbreitung eines Tumors in das umgebende Bindegewebe kann die pCLE aber nicht bestimmen. Dies erfolgt mit einer Ultraschallsonde oder – mit deutlich besserer Auflösung – durch ein ebenfalls neues Verfahren, die optische Kohärenztomografie (OCT). Auch diese Methode wird mit zwei Leitgeräten am Klinikum klinisch erprobt. Wie sich die OCT und die pCLE entwickeln werden, „ist trotz aller Perspektiven derzeit noch nicht absehbar“, gibt Dr. Stepp zu bedenken. Denn noch ist etwa die pCLE so neu, dass entsprechende Studien fehlen, die das Team um Prof. Schira jetzt etwa für den Einsatz im Gallengang und in der Speiseröhre starten will. In der Speiseröhre geht es um die Erkennung von Krebsvorstufen bei Patienten mit dem „Barrett-Syndrom“ – einer chronisch-entzündlichen Erkrankung. Bei der

„Das zentrale Bild zeigt den Einsatz bei einer Endoskopie der Gallenwege nach Verdacht auf Gallenwegstumoren (Pankreas und Gallenwegstumoren). Foto: PD Dr. Ch. Betz, LMU München“

chronisch-entzündlichen Darmerkrankung „Colitis ulcerosa“ liegt dagegen bereits eine positive Studie des Universitätsklinikums Mainz vor. Nach etwa zehn Jahren haben diese Patienten ein erhöhtes Krebsrisiko, wobei sich die Tumorstadien im entzündeten Gewebe oft nur schwer identifizieren lassen. Bei der Studie zeigte sich, dass pCLE die Trefferquote bei der Gewebentnahme verbessert.

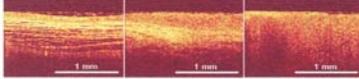
Zukunftsmusik

Ob eines Tages eine intraoperative Diagnose so aussieht wird, das erst die Fluoreszenz-Diagnostik verbindliche Gesundheitskriterien, dann die pCLE ohne eine nachfolgende Gewebentnahme die verdächtigen Zellen mikroskopisch beurteilt und die OCT in einem dritten Schritt die Mikrovaskulatur von Tumorzellen in Biopsieproben erkennt, bleibt einstweilen eine Vision. „Ich auf weiteren“, sagt Prof. Schira, „erzitteren wir weiter Gewebe, und der Pathologe hat bei dessen Beurteilung im Labor das letzte Wort.“ Die Proben, die er bekommt, sollen allerdings dank der pCLE schon jetzt oft besser sein als zuvor.



Prof. Dr. Jörg Schira, Medizinische Klinik II, Klinikum der Universität München. Die Trefferquote für die Gewebentnahme erhöhte sich mit der pCLE von bislang 75 auf 90 Prozent.

Dr. Herbert Stepp, Laser-Forschungslabor, Klinikum der Universität München. „T.E.A.M. leistet wissenschaftliche Finanzierarbeit in der intraoperativen Diagnostik.“



Optische Kohärenztomografie (OCT) Aufnahmen aus der Mundhöhle. Diese Aufnahmetechnik generiert Bilder senkrecht zur Oberfläche, die Darstellung reicht in 1,5 mm in die Tiefe. Von links nach rechts: der Übergang von einer normalen Gewebeschichtung zum inkomplettum Karzinom.

108 RisPACS

Das Bild zeigt den Scan einer in der Zeitschrift „Krankenhaus IT“ veröffentlichte Pressemitteilung von T.E.A.M. anlässlich des Erwerbs des pCLE-Gerätes.

Zur intensiven Betreuung und optimalen Nutzung dieser hochsensiblen Geräte inklusive der Betreuung der Auswertung der klinisch und experimentell erhobenen Daten sollte eine entsprechende Personalstelle am Laser-Forschungslabor eingerichtet werden. Ein entsprechendes Schreiben wurde dem Klinikvorstand vorgelegt.

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

Klinische Untersuchungen mit endoskopisch eingesetzter optischer Kohärenztomographie (OCT)
Herbert Stepp
Kooperation: Christian Betz (HNO), Julia Gallwas (Gynäkologie)
Förderung: Industrie

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

In Weiterführung der im letzten Bericht dargestellten Arbeiten hat insbesondere die Anwendung zur Diagnostik der CIN (Zervixdysplasie) größere Fortschritte erzielt. Mehrere Publikationen sind entstanden (Erstautor J. Gallwas). Ein OCT-Gerät der neuen Generation wird im März 2012 ausgeliefert und wird dann auch Einsatz bei der Bronchoskopie finden.

Konfokale Fluoreszenzendoskopie (pCLE) zur hochaufgelösten intraoperativen Gewebediagnostik

Herbert Stepp

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

Förderung: Großgeräteantrag

Dieses Vorhaben ist Bestandteil des Verbundes T.E.A.M. am Klinikum. Aufbauend auf der LFL-Entwicklung der Fluoreszenzendoskopie, die als *Red-flag*-Technologie mit hoher Sensitivität auf makroskopischer Ebene malignes Gewebe identifiziert, besteht die Erwartung, dass mithilfe von weiteren optischen Technologien mit höherer räumlicher Auflösung, wie der OCT (siehe oben) oder der pCLE, eine sehr weitgehende Gewebecharakterisierung intraoperativ möglich ist. Das LFL war an der Entwicklung von pCLE-Geräten im Verbund Komed und unter Verwendung von Mehrphotonen-Anregung in den Vorhaben *3D-Tissue-Screen* und *Femtoscope* (siehe zurückliegende Berichte) beteiligt. Die industrielle Umsetzung eines Medizinproduktes gelang jedoch zuerst der Fa. Mauna Kea Tech in Frankreich. Ein derartiges Gerät soll nun auf seine klinische Alltagstauglichkeit in vielen medizinischen Indikationen untersucht werden. Vorbereitend ist die Durchführung zahlreicher Experimente vereinbart, um zunächst an Präparaten die optimale Handhabung zu ermitteln. Derzeit werden am Konfokal-Mikroskop die optimale Fluorochrom-Konzentration und Einwirkdauer für verschiedene Gewebe und die relevanten Beurteilungskriterien ermittelt.

Klinisch wird das Gerät in der Medizinischen Klinik II von Prof. Schirra bei Cholangioskopen eingesetzt (zugelassen) und in der HNO von PD Betz beim Larynxkarzinom, hier im Vergleich bzw. in Ergänzung zur OCT. Ein zweites Gerät steht unter Mitverwendung der Laserkonsole für experimentelle Untersuchungen zur Verfügung. Derzeit ist eine urologische Arbeitsgruppe mit der konfokalmikroskopischen Charakterisierung von Hoden aktiv. Im März 2012 beginnen zwei Gastärzte aus China (Nanchang) mit Untersuchungen am pCLE-Gerät und dem Konfokalmikroskop im Bereich Zervixkarzinom und dermatologische Erkrankungen, jeweils auch unter Einsatz des OCT-Gerätes.

Arbeitsgruppe „NOTES“

Herbert Stepp, Ronald Sroka

Kooperation: Darius Dian (Gynäkologie), Christian Betz (HNO), Jörg Schirra (Medizinische Klinik II), Wael Khoder (Urologie)



Das Bild zeigt das distale Ende des Anubiskops mit zwei Arbeitsinstrumenten, die nach Öffnung der Abdeckklappen in einem für Manipulationen günstigen Winkel an die Zielstrukturen manövriert werden können.

Ein von Karl Storz entwickeltes NOTES-System Anubiscope wurde zunächst im LIFE-Zentrum vorgestellt. Nach erfolgter Umgestaltung des Anubiscope-Systems steht seit Dezember 2010 ein System im Klinikum zur *In-vitro*-Testung an einem Dummy-Torso zur Verfügung. Das Gerät wurde von allen T.E.A.M.-Partnern getestet und der Firma ein Bericht über die Praktikabilität abgegeben. Die Anregungen müssen nun in eine Überarbeitung des Gerätes einfließen. Anschließend sollte der Einsatz am Patienten erfolgen können.

3.1.5 Kooperationsverbünde

Deutsch-Russischen Kooperationsverbund Biotechnologie

Michael Fedorov, Ronald Sroka

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

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

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

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

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

Photodynamische Allianz

Michael Fedorov, Ronald Sroka

Anlässlich der Moskauer Wirtschaftstage in Bayern im Oktober 2005 wurde in einer *Round-table*-Konferenz ein gemeinsames Projekt zwischen Moskau und Bayern zu photodynamisch-basierten Diagnose- und Therapieverfahren angebahnt und eine

Kooperationsvereinbarung zwischen dem Laser-Forschungslabor, dem Klinikum der Universität München und der Fa. Niopik, Moskau abgeschlossen. Ziel des Projektes ist die Weiterentwicklung und klinische Etablierung der Photodynamik. Dank der Unterstützung des Bayerischen Staatsministeriums für Wissenschaft, Forschung und Kunst wurde beim Laser-Forschungslabor eine auf 2 Jahre befristete Koordinationsstelle eingerichtet. Firmen, Kliniken und Forschungseinrichtungen aus Bayern und Moskau realisieren zusammen fach- und ortsübergreifende Forschung und Entwicklung.

Auf Basis der bestehenden Kooperation kann man auch weitere Projekte zwischen Bayern und Moskau im Bereich der Gesundheitswirtschaft aufbauen. Unseren Partnern in Moskau wurde eine städtische Finanzierung der Kooperationsarbeit gewährt. Dadurch sind bereits Kliniken, Firmen (Medizintechnik und Pharmaindustrie) und Forschungseinrichtungen miteinander vernetzt. Das Laser-Forschungslabor als bayerischer Kooperationspartner arbeitet sehr eng mit mehreren Firmen und Kliniken zusammen. Im Rahmen dieser Zusammenarbeit können sowohl innovative Produkte (z. B. neue Photosensibilisatoren für die Therapie) aus Moskau in Bayern zugelassen werden als auch Medizintechnik (z. B. therapeutische und diagnostische Lasersysteme) aus Bayern nach Moskau exportiert werden. Die Durchführung der gemeinsamen Veranstaltungen und der bilaterale Austausch von Ärzten und Wissenschaftlern soll die Kooperation untermauern.

Netzwerkarbeiten

Ronald Sroka, Michael Fedorov

Förderung: BMBF-Netzwerk

Die Internationalisierung und Verbreitungen biophotonischer Technologien ist wesentlicher Bestandteil zweier neuer Netzwerke Light4LIFE und NanoBridge, welche einerseits zur Förderung der internationalen wissenschaftlichen Ausbildung, dem Identifizieren internationaler wissenschaftlicher Partnerschaften dienen, als auch unter Mitwirkung von industriellen Partnern den Wirtschaftsstandort Bayern international sichtbar machen. Beide Netzwerke sind mit dem Ziel der Ausweitung der Aktivitäten in Richtung Russland angelegt. Entsprechende *Meetings* und Foren sind für 2012 geplant.

3.2 Labor für Tumorimmunologie

Einführung

In der Tumorimmunologie wird versucht, die körpereigenen Abwehrmechanismen gegen Tumoren zu erforschen und neue Wege zu finden, die Zellen des Immunsystems oder Tumorzellen gezielt therapeutisch zu beeinflussen, um Krebserkrankungen zu bekämpfen. In den letzten Jahren wurde eine Reihe von neuen Immuntherapien erarbeitet und in der Klinik getestet. Hierzu gehören Therapien mit Peptid-, dendritische Zell- und Tumorzellvakzinen, adoptive Zelltherapien, zum Teil mit klonierten oder chimären Antigenrezeptoren, sowie Antikörpertherapien. Einen neuen Aspekt der Tumorimmunologie stellt die immuntherapeutische Wirkung von photodynamischer Therapie (PDT) dar. Sie erlaubt die Tötung von Tumorzellen mit Hilfe von Photosensibilisatoren nach Lichtbestrahlung bei gleichzeitiger Stimulation einer Tumorummunantwort. In den letzten Jahren wurden so genannte Tumor-initiiierende Zellen oder Tumorstammzellen, ursprünglich in Leukämien entdeckt, auch für eine

Reihe von soliden Tumoren nachgewiesen. Sie machen nur einen sehr geringen Bruchteil der Tumormasse aus und zeigen in vielen Fällen eine ausgeprägte Unempfindlichkeit gegenüber Chemo- und Strahlentherapie. Sie werden daher für das Wiederauftreten des Tumors nach zunächst erfolgreich erscheinender Therapie verantwortlich gemacht und stellen aus diesem Grund interessante Zielzellen für immunologische und andere Therapien dar. Allerdings ist gegenwärtig noch völlig offen, ob sich, wegen ihrer großen Ähnlichkeit zu normalen Gewebestammzellen, antigene Unterschiede finden lassen, die einen selektiven immuntherapeutischen Angriff erlauben.

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

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

3.2.1 Identifizierung und Validierung von antigenen Zielstrukturen und Prognosemarkern

Identifizierung von Zielstrukturen in Tumorstammzellen des Magenkarzinoms

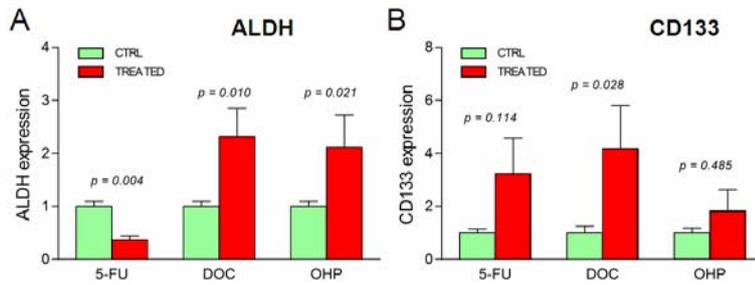
Mira Kronast, Elena Vetter, Verena Passerini, Chiara Bellio, Wolfgang Zimmermann

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

Förderung: Graduiertenförderung der Medizinischen Fakultät, Erasmus-Programm

In diesem Projekt möchten wir Zielstrukturen auf selektionierten Tumorzellen mit Stammzeleigenschaften identifizieren, die idealerweise nicht in normalen Stammzellen exprimiert werden und sich zur Entwicklung einer Immuntherapie eignen. Zur Isolierung solcher Zellen verfolgen wir zwei Strategien: (1) Einmal wollen wir bekannte Tumorstammzellmarker zur Anreicherung von potentiellen Stammzellen des Magenkarzinoms verwenden und diese Zellen funktionell verifizieren. (2) Unser zweiter Ansatz zeichnet sich dadurch aus, dass nicht einzelne Oberflächenmarker, sondern vielmehr Chemo- bzw. Immuntherapien *in vitro* und in einem von uns etablierten autochthonen murinen Magenkarzinommodell (*CEA424-SV40-T-Antigen-Mäuse*, TAG) zur Selektion der Zellen eingesetzt werden. Somit werden wir unvoreingenommen diejenigen Zellen untersuchen können, die einer konventionellen Therapie nicht zugänglich sind. Bisher konnten wir auf humanen und von unserem transgenen Magentumormodell abgeleiteten Magenkarzinomzellen eine Reihe von potentiellen Tumorstammzellmarkern nachweisen (CD44, CD133, ABCG2, Hoechst-

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



Chemoresistente Magenkarzinomzellen zeigen erhöhte Tumorstammzellmarker-Expression. Der Gehalt an Marker-positiven Zellfraktion wurde mittels Durchflusszytometrie und fluoreszenzmarkierten Antikörpern bestimmt und relativ zu unbehandelten Zellen dargestellt. DOC, Docetaxel; 5-FU, 5-Fluoruracil; OHP, Oxaliplatin.

Dieser Befund veranlasste uns ALDEFLUOR-positive und ALDEFLUOR-negative Zellpopulationen durch FACS anreichern und Transkriptomanalysen durchzuführen, um besonders in den vermuteten Stammzellpopulationen aktivierte Signalwege zu identifizieren. Bisher sind diese Untersuchungen für eine der Zelllinien (GC1, isoliert von einem Magenkarzinom gemischten Typs) durchgeführt worden. Zu den signifikant in den ALDEFLUOR^{high}-Zellen 15-20-fach hochregulierten und stark exprimierten Genen gehören das *stemness factor gene* Sox2, sowie mehrere Wachstumsfaktorgene und ein Wachstumsfaktorrezeptorgen. Es soll nun untersucht werden, ob die korrespondierenden Faktoren und Rezeptoren, möglicherweise in einen autokrinen oder parakrinen *loop* für die Aufrechterhaltung der vermuteten Stammzellpopulation wichtig sind. Träfe das zu, würden sich diese Proteine als Ziele für therapeutische Ansätze anbieten. Es gibt bereits pharmakologische Inhibitoren für diese Proteine, die nun auf ihren (selektiven) Einfluss auf das Wachstum und Überleben von ALDEFLUOR^{high}-GC1-Zellen getestet werden. Des Weiteren sollen durch FACS angereicherte ALDEFLUOR^{high}- und ALDEFLUOR^{low}-Zellpopulationen einer weiteren Magenkarzinomzelllinie (GC20, intestinaler Typ) ebenfalls durch Transkriptomanalysen analysiert werden. Von besonderem Interesse werden potentielle *target genes* sein, die in den ALDEFLUOR^{high}-Subpopulationen beider Karzinomlinien überexprimiert sind.

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

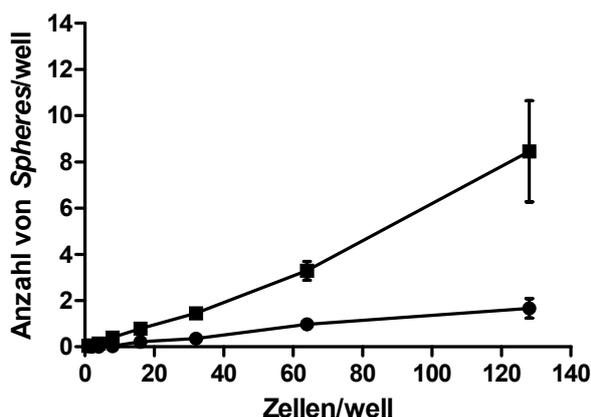
tdRFP) durchgeführt. Es konnten genetisch markierte Nachkommen der Lgr5-exprimierenden Mageneithelstammzellen nicht in Tumoren jedoch in normaler Nachbarschleimhaut von ca. 8 Wochen alten Mäusen (Anhand ihrer Expression von rot fluoreszierendem tdRFP-Protein) nachgewiesen werden. Diese Befunde können u. a. dadurch erklärt werden, dass zum Zeitpunkt der genetischen Markierung (Aktivierung einer Rekombinase-Östrogenrezeptorvariante mittels Tamoxifen, deren Expression durch den *Lgr5*-Promoter gesteuert wird) Lgr5-Expression durch SV40-T-Antigen unterdrückt wird. Diese Hypothese wird gegenwärtig durch Transfektion von SV40-T-Antigen-Expressionskonstrukten in LGR5-exprimierende Zellen (HepG2) untersucht. Da aufgrund geringer Transfektionseffizienz der HepG2-Zellen der Versuchsansatz nicht erfolgreich war, wollen wir nun ganz generell nach Beeinflussung des Wnt-Signalweges durch T-Antigen schauen. Lgr5-Expression wird durch Wnt/ β -Catenin-Signaltransduktion gesteuert. Diese kann durch ein Wnt *signalling* steuerbares Promotor-Luziferasegenkonstrukt analysiert werden. Dazu wird das T-Antigen-Gen in einen geeigneten Expressionsvektor umkloniert. Außerdem versuchen wir nun möglichst früh (in noch ungeborenen oder neugeborenen Mäusen) Cre zu aktivieren, noch bevor möglicherweise die SV40-T-Antigen-Expression erfolgt ist.

Identifizierung von Zielantigenen in Tumorstammzellen des Nierenzellkarzinoms

Heike Pohla, Maximilian Gassenmaier, Alexander Buchner, Dong Chen, Rainer Riesenberg, Heidi Herbig, Birgit Stadlbauer, Wolfgang Zimmermann

Kooperation: Dolores J. Schendel; Elfriede Nössner (Institut für Molekulare Immunologie, Helmholtz Zentrum München)

In den vergangenen Jahren wurden mehrere Tumorzelllinien von Patienten mit klarzelligem Nierenzellkarzinom (RCC) isoliert. Zwei Zelllinien (RCC-26, RCC-53) zeigten sich sowohl *in vitro* als auch *in vivo* im NOD/SCID-Mausmodell sehr unterschiedlich bzgl. ihres Wachstumspotentials (RCC-53 >> RCC-26). Beide Zelllinien wurden auch hinsichtlich der Expression putativer Stammzellmarker, ihrer *Sphere-forming*-Kapazität, ihrer Klonogenität und Differenzierungsfähigkeit untersucht und zeigten gravierende Unterschiede. Auch die Sensitivität der Zelllinien gegenüber den Rezeptortyrosinkinaseinhibitoren (RTKI) Sorafenib, Sunitinib und Pazopanib war sehr unterschiedlich. RCC-53 vermag mehr Holoklone und mehr *Spheres* (siehe Abbildung), charakteristische Eigenschaften von Tumorstammzellen, zu bilden, exprimiert stärker die Marker CD133, CD105, CD34, CD90 und CXCR1 und ist in der Lage, im entsprechenden Differenzierungsmedium Adipozyten zu bilden. Außerdem zeigt RCC-53 eine etwas höhere Resistenz gegenüber den RTKIs.



RCC-53 (■) bildet mehr Spheres als RCC-26 (●). Gezeigt ist die Anzahl von Spheres/well in Abhängigkeit von der Anzahl kultivierter Zellen pro well (96-well-Mikrotiterplatte) nach Inkubation für 4 Tage.

Wir fanden noch einen weiteren Marker, der insbesondere auf *Spheres* exprimiert wird und eine neue mögliche Stammzellpopulation im RCC charakterisiert. In der quantitativen *real time* PCR zeigte sich dieser Marker auch signifikant verstärkt exprimiert auf Metastasengewebe im Vergleich zu Geweben von Primärtumoren. In einem Invasionsassay konnte außerdem gezeigt werden, dass das Einwandern dieser Zellen durch den entsprechenden Liganden stimuliert werden kann. Ebenso wird die *Sphere*-Bildung durch einen spezifischen Antagonisten inhibiert. In zukünftigen Experimenten wollen wir mittels Transkriptomanalysen die wichtigen Signalwege und Zielstrukturen dieser möglichen therapieresistenten RCC-Stammzellen identifizieren.

Identifizierung signifikanter Veränderungen der Zellbiologie im metastasierten Nierenzellkarzinom durch neue biostatistische Verfahren bei der genomweiten Expressionsanalyse

Alexander Buchner

Kooperation: Matthias Maruschke (Urologische Klinik, Universität Rostock)

Förderung: Krebshilfe (beendet)

Ziel dieses Kooperationsprojekts mit der Universität Rostock ist es, die bei maligner Transformation, Progression und Metastasierung im Nierenzellkarzinom auftretenden Veränderungen der Zellbiologie zu identifizieren. Die Kenntnis deregulierter Stoffwechsel- und Signalwege stellt die Basis dar zur Entwicklung neuer, spezifischer systemischer Therapieformen, etwa durch den Einsatz so genannter *small molecule drugs*. Außerdem ermöglichen neu identifizierte Biomarker eine präzisere Risikostratifizierung, was die Optimierung der individuellen Therapie von Patienten mit metastasiertem Nierenzellkarzinom und ein besseres Studiendesign beim Test neuer Therapeutika erlaubt.

In München und Rostock wurden bei Patienten mit Nierenzellkarzinom Gewebeproben von normalem Nierenparenchym (n=14), hochdifferenzierten (G1, n=14) und wenig differenzierten (G3, n=14) Primärtumoren sowie von Metastasen verschiedener Lokalisation (n=32) asserviert und schockgefroren. Die RNA wurde isoliert, mittels Kapillarelektrophorese auf Integrität getestet und amplifiziert. Danach wurde von jeder Gewebeprobe ein Expressionsprofil mit Hilfe von Oligonukleotid-Microarrays (GeneChip HG U133 Plus 2.0, Affymetrix) erstellt. Die Identifikation neuer, deregulierter Signal- und Stoffwechselwege im Nierentumorgewebe dann mit Hilfe der neuen Analyseverfahren GSEA (*gene set enrichment analysis*) begonnen, die eine Datenbank mit mehreren Tausend sog. *gene sets* nutzt. Dabei zeigen sich auch kleinere, aber statistisch signifikante und biologisch relevante Veränderungen funktionell zusammenhängender Gene, die beim Vergleich einzelner Gene nicht entdeckt werden können. Die nachfolgende *leading edge analysis* wiederum identifiziert einzelne Gene, die in den signifikant veränderten *gene sets* gehäuft vorkommen.

In Nierentumor-Metastasen fanden sich u. a. signifikante Verluste bestimmter Zelladhäsionsmoleküle, Zytoskelettproteine (z. B. Fibronectin, Filamin A) und proapoptotischer Gene (z. B. BAX, BAD) sowie eine Hochregulation von Zellmotilitäts-, Proliferations- und Angiogenese-assoziierten Genen. Viele der so identifizierten Veränderungen der Genexpression konnten mit konventionellen Analysemethoden

bisher nicht entdeckt werden, etwa die Aktivierung der Aurora-Kinase (AURKA) in Nierentumor-Metastasen. Diese Daten sind derzeit Gegenstand weiterer Evaluation und Validierung. Neben GSEA wird an den beschriebenen Expressionsdatensätzen derzeit eine weitere relativ neue biostatistische Analysemethode angewandt, das *event ratio scoring*. Dieser Algorithmus reduziert das technisch und biologisch bedingte „Rauschen“ der Expressionsdaten und verringert so die Anzahl falsch positiver Resultate beim Vergleich von Genen zwischen verschiedenen Geweben (z. B. Metastase und Primärtumor). Solche validen Daten über Veränderungen bei der Progression des Nierenzellkarzinoms bilden die Grundlage neuer Therapie- und Risikostratifizierungsansätze.

Analyse der epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) beim Nierenzellkarzinom und die Bedeutung von EMT für die Prognose

Alexander Buchner, Dong Chen

Kooperation: Gerald Assmann (Pathologisches Institut, LMU)

Ein bei verschiedenen Tumorentitäten (z. B. Kolonkarzinom) wichtiger biologischer Prozess ist die epithelial-mesenchymale Transition (EMT). Dabei aktivieren die Tumorzellen im Karzinom Signal- und Stoffwechselwege, die eine Verschiebung des Phänotyps vom Epithel hin zu mesenchymalen Eigenschaften bewirken, was u. a. einhergeht mit erhöhter Mobilität und Invasivität der Tumorzellen. Es sind verschiedene Schlüsselgene bekannt, die EMT auslösen können. Eine gezielte Inhibierung dieser EMT *pathways* stellt einen neuartigen Ansatz der Tumorthherapie dar, mit dem man den Phänotyp der Tumorzellen möglicherweise im Sinne einer *mesenchymal-epithelial transition* wieder in einen weniger aggressiven umwandeln kann.

Zur Bedeutung von EMT beim Nierenzellkarzinom gibt es noch fast keine Daten. Daher wurde in Kooperation mit dem Institut für Pathologie der LMU zunächst ein Kollektiv mit mehr als 300 Patienten mit klarzelligem Nierenzellkarzinom und kompletter *Follow-up*-Information zusammengestellt. Aus diesen Patienten wurde ein *matched pairs*-Kollektiv extrahiert, also jeweils zwei in Bezug auf Alter, Geschlecht und TNMG-Klassifikation identische Patienten mit möglichst unterschiedlicher Prognose; es fanden sich zwanzig entsprechende Patientenpaare. So ein Kollektiv ist ein idealer Ausgangspunkt zur Erforschung neuer prognostisch relevanter Biomarker. Von Gewebeproben dieser Patienten wurde Serienschnitte hergestellt und die Expression verschiedener bei anderen Tumoren etablierter EMT-assoziierter Gene immunhistochemisch analysiert, die Untersuchungen sind noch nicht abgeschlossen.

Parallel dazu wurde aus kryokonservierten Gewebeproben (Nierengewebe, Primärtumor und Metastase von Nierenzellkarzinomen) RNA extrahiert, mittels Kapillarelektrophorese auf Integrität getestet und dann für quantitative RT-PCR (LightCycler-System, Roche) eingesetzt. Verschiedene EMT-assozierte Gene sowie putative Tumorstammzellmarker wurden zwischen normalem Nierengewebe, Primärtumor und Metastase verglichen. Unter anderem zeigte sich eine signifikante Zunahme von CXCR4 im Verlauf der malignen Transformation und Progression. Außerdem wurde der Zusammenhang zwischen der Expression von EMT-Markern und dem tumorspezifischen Überleben untersucht. Dabei zeigte sich ein signifikanter negativer Einfluss der Expression von ZEB1 auf die Prognose. Die Analysen sind noch nicht abgeschlossen, EMT scheint aber beim Nierenzellkarzinom ein relevanter

Prozess zu sein und könnte einen Ansatzpunkt für neue Therapieformen in der Zukunft darstellen.

3.2.2 Neue immunologische Ansätze für die Tumorthherapie

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

Heike Pohla, Heidi Herbig, Birgit Stadlbauer

Förderung: DFG SFB TR36 (Förderung beendet)

Eines der größten Hemmnisse für eine erfolgreiche Tumorummuntherapie ist die Toleranz gegenüber Selbstantigenen, zu denen auch die meisten in Tumoren vorhandenen, nicht individualspezifischen Antigene zählen. Ein neuer Weg, dieses Problem zu umgehen, stellt die Klonierung von T-Zellrezeptoren (TCR) aus seltenen Tumorantigen-spezifischen zytotoxischen T-Zellen und ihre funktionelle Expression mittels retroviralem TCR-Gentransfer in die T-Zellen von Tumorpatienten dar (Geiger et al. 2009). Aus über 40 Nierenzell- und Prostatakarzinomen konnten Tumorinfiltrierende Lymphozyten (TIL) isoliert werden, deren TCR-Repertoire derzeit analysiert wird.

Antitumorimmunpotential von photodynamischer Therapie beim Prostatakarzinom und Glioblastom

Robert Kammerer, Wolfgang Zimmermann, Michael Heide, Patrick Palluch, Alexander Buchner, Konstantin Oboukhovskij, Thomas Pongratz

Förderung: Krebshilfe beendet

Die photodynamische Therapie (PDT) ist eine neuartige Modalität zur Behandlung von Krebs. Dabei werden Photosensibilisatoren oder metabolische Vorstufen, wie 5-ALA, verabreicht, die bevorzugt in Tumorzellen akkumulieren oder metabolisiert werden. Bestrahlung des Tumors mit Licht zerstört den Tumor hauptsächlich durch die Photosensibilisator-vermittelte Bildung von hochreaktivem Singulett-Sauerstoff. Es konnte gezeigt werden, dass PDT in Mäusen systemische Immunreaktionen auslösen kann, die vermutlich für das vollständige Verschwinden von Tumoren verantwortlich sind. Gelegentlich bei Gliompatienten nach PDT beobachtete vollständige Tumorregressionen legen nahe, dass auch beim Menschen durch PDT systemische Anti-Tumorummunreaktionen ausgelöst werden. Wir haben uns zum Ziel gesetzt, die 5-ALA-basierte PDT im Sinne einer maximal wirksamen Anti-Tumorummunantwort zu optimieren. Als Modell verwenden wir humane und murine Prostatakarzinom- sowie humane Glioblastomzelllinien. Bei der Untersuchung der transkriptionellen Veränderungen in den Zellen durch PDT kamen fortgeschrittene bioinformatische Verfahren wie GSEA (*gene set enrichment analysis*) und Interaktionsnetzwerk-Analysen (Cytoscape 2.8) zum Einsatz. Genomweite Transkriptionsanalysen zeigten, dass Tumorzellen nach sublethaler PDT, wie erwartet, sehr effizient so genannte *Early-response*-Transkriptionsfaktor- (*c-fos*, *Jun*), Hitzeschockprotein- (u. a. *HSP70*) und andere Stress-Gene aber auch Zytokin- und Chemokin-Gene hochregulierten. Letztere Gene zählen sogar zu den am stärksten in subkutan wachsenden Mausprostata-tumoren nach PDT induzierten Genen. Aldoketoreduktase-Gene (z. B. *AKR1C1*) zählen ebenfalls zu den stark nach PDT transkriptionell aktivierten Genen. Aldoketoreduktasen stehen im Verdacht, an Entgiftungsprozessen nach oxidativer

Schädigung (wie bei PDT erfolgt) beteiligt zu sein. Wir versuchten daher, durch Hemmung dieser Enzyme durch selektiv wirkende Inhibitoren (Methyl-Jasmonat, Jasmonsäure) das Reparaturvermögen von Tumorzellen zu stören, um so, so hofften wir, uns ein zeitlich größeres Fenster für immuntherapeutische Interventionen nach PDT zu eröffnen. Es zeigt sich allerdings, dass eine Jasmonatkonzentration, die im untersuchten Zeitfenster alleine gerade nicht toxisch für die Prostatakarzinomzelle PC3 ist, die Zellen nicht empfindlicher für PDT werden. Die Ergebnisse des Projekts wurden in PLoS ONE veröffentlicht (Kammerer et al., 2011).

3.2.3 Entwicklung, Optimierung und klinische Testung von Tumorzellen

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

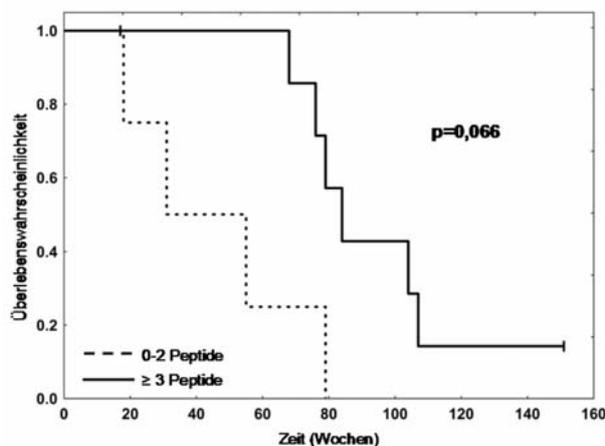
Heike Pohla, Alexander Buchner, Birgit Stadlbauer, Heidi Herbig

Förderung: DFG, BMBF, beendet

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

a) *Klinische Phase-I-Studie mit RCC-26/CD80/IL-2 zur Behandlung von 15 Nierenzellkarzinompatienten: Delayed type hypersensitivity (DTH) Hautreaktionen* wurden in 11 von 12 der immunologisch evaluierbaren Patienten beobachtet, und hier insbesondere in den Patienten mit längerem Überleben. Die Zeit bis zur Progression betrug im Median 5,3 Monate und die Überlebenszeit 15,6 Monate. Damit ist das mediane Überleben vergleichbar mit anderen derzeit eingesetzten Therapien, aufgrund der geringeren Toxizität aber mit einer deutlich besseren Lebensqualität für die Patienten verbunden.

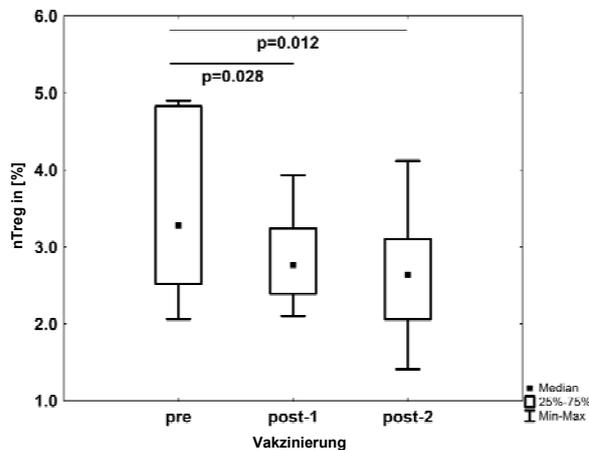
Alle Patienten wiesen eine Immunantwort gegen mindestens eines der getesteten Tumor-assoziierten Peptidantigene auf. In 75% der Patienten konnte eine Vakzine-induzierte Immunantwort nachgewiesen werden, was die hohe Immunogenität dieser Vakzine demonstriert. Insgesamt war ein Trend zu längerem Gesamtüberleben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



Kaplan-Meier-Analyse. Überlebenswahrscheinlichkeit der Patienten mit (---) Immunantwort gegen bis zu zwei Peptide, (—) Immunantwort gegen drei und mehr Peptide.

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

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



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

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

Wir analysierten auch das Zytokinprofil im Serum und in den Haut-infiltrierenden Lymphozyten und konnten gleichermaßen IFN- γ und IL-10 detektieren. Dieses entspricht einem gemischten T_H1/T_H2-*like* Profil. Ähnliche Befunde wurden auch in Melanompatienten nach Immuntherapie beobachtet. Diese Patienten wiesen ein längeres Überleben auf. In den Haut-infiltrierenden Lymphozyten wurden erhöhte Mengen IFN- γ -indizierbarer Chemokine (RANTES, IP-10/CXCL10, MIG) gefunden. IP-10 spielt eine bedeutende Rolle bei der *delayed type hypersensitivity* (DTH-Reaktion) und ist chemotaktisch für T- und NK-Zellen.

Die Komplexität des Zytokinnetzwerks macht es nicht einfach, eine Relation zwischen klinischem Ergebnis, *immune response rate* (IRR) und systemischer Zytokinmenge zu sehen. Es konnte jedoch festgestellt werden, dass die Patienten mit höherer IRR, einer stärkeren DTH-Reaktion und stabiler Erkrankung bei längerem Überleben generell höhere Zytokinkonzentrationen eines gemischten T_H1/T_H2-*like* Profils aufwiesen (Buchner, Pohla *et al. Hum Gene Ther* 2010; Pohla, Buchner *et al.* zur Publikation eingereicht).

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

Nach Vakzinierung konnte in 93% der Patienten eine Immunantwort gegenüber mindestens eines der getesteten Peptidantigene beobachtet werden (PSA, PSMA, PAP, PSCA, PSGR-1, STEAP, PRAME, Survivin, PTH-rP, PCTA-1, NY-ESO1, Her2/neu). Eine Vakzine-induzierte Immunantwort konnte auch hier in 73% der Patienten nachgewiesen werden und auch hier war ein Trend zu längerem

Gesamtüberleben bei den Patienten zu beobachten, die gegen mehr als zwei Peptide reagierten ($p = 0,120$).

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

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

Im Vergleich zu gesunden Spendern wiesen etwa 50% der Patienten eine leicht erhöhte Frequenz an natürlichen Treg (nTreg) auf. Eine signifikante Abnahme der nTreg konnte nicht beobachtet werden. FACS-Analysen zeigte jedoch eine Abnahme der $CD4^+CD25^{high}CD127^{low/-}FoxP3^+CD39^+$ Treg. Eine erhöhte Frequenz von MDSCs im Vergleich zu gesunden Spendern wurde nicht gefunden, ebenso keine Korrelation zum PSA-Wert oder zur *immune response rate*.

Zur Analyse des Zytokinprofils im Serum und in Haut-infiltrierenden Lymphozyten wurden auch hier multiplexe Zytokinassays eingesetzt. Höhere IL-10 Werte im Serum zum Zeitpunkt vor Immunisierung wurden oft bei Patienten mit schnellerer PSA-Progression und kürzerer Überlebenszeit beobachtet. Aber auch in Patienten, die vermehrt $IFN-\gamma$ sezernierten, wurden moderate Mengen an IL-10 gemessen. Diese Patienten zeigten sowohl eine längere Überlebenszeit als auch eine längere Zeit bis zur PSA-Progression. Damit konnten wir dasselbe Phänomen wie bei den Patienten der RCC-Studie beobachten. Patienten, die einen erfolgreichen Verlauf unter Immuntherapie nahmen, wiesen ein gemischtes T_H1/T_H2 -Zytokinprofil und grundsätzlich höhere Zytokinkonzentrationen auf.

Die Haut-infiltrierenden Lymphozyten sezernierten bei einigen Patienten die T_H1 -like Zytokine $IFN-\gamma$ und $TNF-\alpha$ und weniger T_H2 -like Zytokine (IL-4, IL-5, IL-13, and IL-10), bei anderen Patienten zeigte sich genau das gegenteilige Profil. Auch hier waren die Patienten, die entweder ein T_H1 - oder ein gemischtes Profil zeigten, zumeist die PSA-Responder. Bezüglich der Chemokinsekretion der Haut-infiltrierenden Lymphozyten wurde die gleiche Beobachtung wie bei den Patienten der RCC-Studie gemacht. In allen Fällen, in denen uns Biopsiematerial zur Verfügung stand, wurden erhöhte Mengen an IP-10, RANTES und MIG gefunden, was mit der starken Lymphozyteninfiltration korreliert (Brill, Pohla *et al.* 2007, 2009, eine dritte Publikation wird derzeit eingereicht).

Somit zeigten sich beide Vakzinierungen als sicher und ambulant gut durchführbar in diesen Patienten mit fortgeschrittener Erkrankung. Bei fast allen Patienten waren Vakzine-induzierbare T-Zellantworten gegen mindestens eines oder mehrere Tumor-assoziierte Antigene nachweisbar. Damit sind zelluläre Tumorimpfstoffe durchaus als sinnvolle Option für zukünftige Kombinationstherapien zu bewerten.

Individualisierte DC-Vakzine für Patienten mit hormonrefraktärem Prostatakarzinom

Heike Pohla, Birgit Stadlbauer

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

Aus den Immunmonitoringdaten unserer Studien werden wir die besten Tumor-assoziierten Antigene herausuchen, um cDNA herzustellen und *in vitro* transkribierte RNA (*ivt*-RNA) via Elektroporation in dendritische Zellen (DC) einzuschleusen. Diese DC werden für die Generierung Tumor-reaktiver CD8⁺ T-Zellen verwendet. Die DC sollen später als Vakzine verwendet werden. Von T-Zellklonen werden die T-Zellrezeptoren (TCR) charakterisiert, um diese dann für den adoptiven Transfer TCR-transduzierter T-Zellen nutzen zu können. Für diese Projekte muss derzeit ein neuer Antrag geschrieben werden.

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

Heike Pohla, Heidi Herbig, Birgit Stadlbauer

Kooperation: immatics biotechnologies GmbH

IMA901 ist eine auf mehreren Tumor-assoziierten Peptiden basierende therapeutische Tumorstoffvakzine. Die Peptide wurden aufgrund ihrer Überexpression in primärem RCC-Gewebe ausgewählt. Sie besteht aus neun HLA-Klasse-I-bindenden Peptiden und einem HLA-Klasse-II-bindenden Peptid und ist in der Lage, CD8⁺ zytotoxische T-Zellen (CTL) und CD4⁺ T-Helferzellen zu aktivieren. Entwickelt wurde diese Vakzine von der Firma immatics biotechnologies GmbH in Tübingen. IMA901 stellte sich in einer multizentrischen klinischen Phase-I-Studie als eine sehr sichere gut verträgliche und immunogene Multipeptidvakzine heraus (IMA901-101, Kooperation: M. Staehler, Urologische Klinik, LMU). Mittlerweile ist auch eine multizentrische klinische Phase-II-Studie (IMA901-202; Kooperation: R. Oberneder, Urologische Klinik München-Planegg) abgeschlossen.

Diese Phase-II-Studie zeigte, dass niedrig dosiertes Cyclophosphamid die Frequenz der Treg reduzierte und sich ein verlängertes Gesamtüberleben bei den Patienten zeigte, die mit einer stärkeren Immunantwort auf die Vakzine reagierten. In einer Analyse der MDSC wurden die Subpopulationen MDSC4 und MDSC5 als prognostische Marker für das Gesamtüberleben identifiziert. Außerdem ließen sich die Biomarker Apolipoprotein A1 und das CCL17 als prädiktive Marker für sowohl die Immunantwort als auch das Überleben identifizieren. Eine Publikation ist derzeit in Revision (*Nature Medicine*).

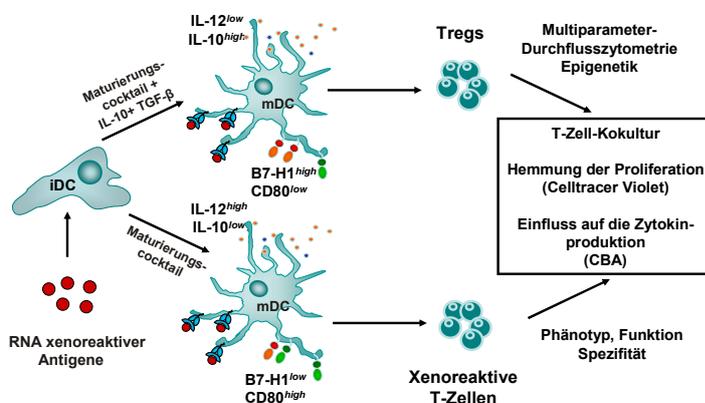
Eine klinische Phase-III-Studie mit einer Kombinationstherapie (Multipeptidvakzine + Sunitinib) hat 2011 begonnen. Auch hier bearbeiten wir wieder die Blutproben für das immunologische *Monitoring* (in Kooperation mit der Urologischen Klinik München-Planegg, der Urologischen Klinik rechts der Isar und der Urologischen Klinik des Klinikums Straubing).

Modulation der Funktion regulatorischer T-Zellen

Heike Pohla, Birgit Stadlbauer, Heidi Herbig, Isabel Römer; Förderung: DFG FOR 535

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

Regulatorische T-Zellen (Treg) spielen in der Immunologie eine zentrale Rolle und gehören derzeit zu den am intensivsten erforschten Zellen des Immunsystems. Sie besitzen suppressive Eigenschaften, die es ihnen ermöglichen, Immunreaktionen zu kontrollieren. So kann eine Depletierung der Zellen oder die Dysfunktion zwar zur Entstehung oder Aufrechterhaltung von Autoimmunerkrankungen oder Allergien führen, aber auch die Reaktivität Tumor-spezifischer T-Zellen fördern. Bei ca. 2/3 unserer Nierenzellkarzinompatienten konnten wir während der Vakzinierung eine zahlenmäßige Reduktion der Treg und gleichzeitig eine erhöhte Frequenz Tumorantigen-spezifischer T-Zellen beobachten. Die zugrunde liegenden Mechanismen versuchen wir derzeit aufzuklären. Treg, nachteilig in der Tumorummunologie, sind beispielsweise in der Transplantationsimmunologie zur Blockade der Gewebeabstoßung durchaus erwünscht. Für die Thematik „*Modulation of xenogeneic responses via regulatory T cells*“ wurde im Rahmen der DFG Transregio-Forschergruppe FOR 535 ein Projekt beantragt und positiv begutachtet. Für die Weiterfinanzierung des Projektes nach 2012 wurde bereits ein Konzeptpapier für die Einrichtung eines Transregio-SFB eingereicht und positiv begutachtet. Derzeit findet gerade die Begutachtung des Hauptantrages statt. Im vergangenen Jahr wurden alle Methoden zur Isolierung, Anreicherung und Expansion humaner und nicht-humaner Primaten nTreg aus Blut und Lymphknoten etabliert. Die Expansion erfolgt auf CD3/CD28-beschichteten Mikrotiterplatten unter Zugabe von IL-2 und Rapamycin. Ebenso wurde die Generierung von zwei verschiedenen DC-Zellpopulationen etabliert, die zur Herstellung von einerseits xenoreaktiven induzierbaren Treg (iTreg) und andererseits von xenoreaktiven Effektor-T-Zellen dienen. Dazu werden unreife DC mit xenospezifischer *ivt*-RNA über Elektroporation beladen. Anschließend lässt man die DC ausreifen in einem *cocktail* aus GM-CSF, IL-4, IL-1 β , IL-6, TNF- α , PGE₂ und zusätzlich IL-10 und TGF- β . Die so generierten tolerogenen DC, die zur Herstellung der xenoreaktiven iTreg dienen, sind dadurch charakterisiert, dass sie kaum IL-12 aber viel IL-10 sezernieren und verstärkt das negativ-kostimulatorische Molekül B7-H1 exprimieren.



Schema zur Herstellung und Testung xenoreaktiver T-Zellen und Tregs.

Die *In-vivo*-Funktion der xenoreaktiven Treg soll zukünftig in zwei Transplantationsmodellen getestet werden: (1) bei der Transplantation von multitransgenen Schwei-

neherzen in Affen und (2) bei der Transplantation von Inselzellen, ebenfalls aus multitransgenen Schweinen, in humanisierte NOD/SCID-Mäuse. Für die Herstellung der humanisierten NOD/SCID-Mäuse wurden CD34⁺-Zellen aus Nabelschnurblut angereichert.

In einem weiteren Projekt werden derzeit Blutproben von Patienten vor und nach Transplantation für das Immunmonitoring und eine Biomarkeridentifikationsstudie auf *Proteomic*-Ebene gesammelt (Kooperation: LAFUGA, LMU München, G. Arnold).

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

3.2.4 Weiterentwicklung des Immunmonitorings

Heike Pohla, Birgit Stadlbauer, Heidi Herbig

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

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

Professionelles Immunmonitoring umfasst die parallele Anwendung der unterschiedlichsten Technologien, die nur zusammen die Bestimmung der Frequenz, des Phänotyps, die Funktion und die *Homing*-Kapazität Vakzine-induzierter Lymphozyten in der Zirkulation oder im Zielgewebe ermöglichen. Nur eine Kombination der Methoden wird auch zu einem validen Set von Surrogatmarkern für erfolgreiche immuntherapeutische Strategien in der Zukunft führen. Folgende Technologien wurden für das Immunmonitoring am LTI etabliert: der ELISPOT zur Quantifizierung Antigen-spezifischer T-Zell-Antworten anhand von Zytokin- bzw. Granzym- oder Perforinproduktion, *cytometric bead arrays* und die Luminex-Technologie für die gleichzeitige Quantifizierung von bis zu 30 verschiedenen Zytokinen und Chemokinen aus Serum und Zellkulturüberständen, der Zytokin-Sezernierungsassay bzw. *Cytokine-capture*-Assay, der eine Anreicherung z. B. CD4⁺ und CD8⁺ Tumorspezifischer T-Zellen auch ohne Kenntnis des Antigens erlaubt, Multiparameter-Immunfluoreszenz am LSRII-FACS-Gerät, für eine kombinierte phänotypische und funktionelle Analyse verschiedener T-Zell-Subpopulationen, MHC/Peptid-Multimer-Bindungsanalysen, die quantitative TCR-Analyse mittels *Real-time*-RT-PCR sowie die Frequenzbestimmung von nTreg und MDSCs. Die AG H. Pohla ist auch hier weiterhin in die Immunmonitoring-Plattform des Helmholtz Zentrums München eingebunden und hat an mehreren internationalen Ringversuchen des *Cancer Immunotherapy Consortiums* (CIC) des *Cancer Research Institutes*, New York und der *Monitoring Working Group* der *Association for Cancer Immunotherapy* zur Standardisierung der Immunmonitoring-Technologien auch 2011 erfolgreich teilgenommen (Einsatz serumfreien Mediums und unterschiedlicher Einfriermedien beim ELISPOT, Panel zur *Gating*-Strategie bei intrazellulären FACS-Analysen, Einsatz Qdot-konjugierter Multimere, Luminex-Technologie).

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

Ist CEACAM20 durch seine Anti-Adhäsionsfunktion an Tumorprogression beteiligt?

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

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

Förderung: Graduiertenförderung der Medizinischen Fakultät

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

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

Diese Befunde legen nahe, dass *CEACAM20* Zell-Zell- oder Zell-Matrix-Interaktionen schwächt. Um dies zu überprüfen, exprimierten wir Glykosylphosphatidylinositol (GPI) verankertes *CEACAM16* (ein weiteres Mitglied der CEA-Familie) durch transiente Transfektion, was zu ausgeprägter Zell-Zelladhäsion führt, und induzierten wenige Stunden später die Expression von *CEACAM20* durch Doxycyclin. In der Tat beobachteten wir, dass die normalerweise durch *CEACAM16*-Expression vermittelte Adhäsion durch *CEACAM20* unterbunden wird. Falls *CEACAM20* diese Eigenschaft auch bei Expression in Tumoren zeigt, könnte *CEACAM20* das Herauslösen von Tumorzellen aus dem Gewebeverband fördern und so zum Invasiven Wachstum von Tumorzellen beitragen. Eine Publikation zu diesem Thema soll zusammen mit J. Shively in Kürze erfolgen.

Das Tektorialprotein CEACAM16 ist an der Erweiterung des Hörspektrums in Säugern beteiligt

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

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

Förderung: Graduiertenförderung der Medizinischen Fakultät

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

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

3.3 Experimentelle Urologie

3.3.1 Projektgruppe Endocannabinoide

Frank Strittmatter, Christian Gratzke

Förderung: DFG

Die klinische Grundlage des vorliegenden Forschungsprojektes basiert auf der

Tatsache, dass Patienten mit Multipler Sklerose (MS), bei denen wegen z. B. einer demyelinisierenden Läsion des Rückenmarks eine Überaktivität der Harnblasenmuskulatur (Detrusorüberaktivität) mit zusätzlicher Dranginkontinenz vorliegt, sehr häufig auf die Standardtherapie mit Antimuskarinika therapierefraktär sind. Anhand von klinischen Studien konnte gezeigt werden, dass durch den Konsum von Cannabinoid-Extrakten es zu einer deutlichen Verbesserung dieser Symptome kommt. Diese Tatsache war Grund von bereits vorheriger Forschungsarbeiten unserer Arbeitsgruppe. So konnten die Lokalisation der wohl bekanntesten Cannabinoid-Rezeptoren CB1 und CB2 im Bereich des unteren Harntraktes nicht nur an Menschen, sondern auch bei Affen und Ratten aufgezeigt werden. Weiterhin wurde neben der Lokalisation auch gezeigt, in wie weit diese Rezeptoren an der Regulation des Tonus der Blasenmuskulatur beteiligt sind. Dies wurde nicht nur durch *In-vitro*-, sondern auch durch *In-vivo*-Versuche durch die Verwendung spezifischer Agonisten und Antagonisten bewiesen. In urodynamischen Untersuchungen an Ratten zeigte sich z. B. eine Erhöhung des Miktionsintervalls, des Blasenschwelledruckes, der Blasenkapazität und des Blasen Volumens durch selektiv peripher wirksame CB2-Agonisten (Gratzke et al., J Urol 181, 1939-1948, 2009). Aufbauend auf diesen Vorarbeiten wurde durch unsere Arbeitsgruppe die Wirkung des selektiv peripher wirksamen CB2-Rezeptor-Antagonist Cannabinor an Ratten in urodynamischen Untersuchungen erforscht. Die intravenöse Applikation von Cannabinor in verschiedenen Dosierungen führte zu ähnlichen Effekten wie die Verwendung des hochpotenten CB1/CB2-Agonisten CP 55,940. Durch diese Arbeit wurde der Beweis zur Wirkung exogen-selektiver Cannabinoide in der Blasenfunktion erbracht (Gratzke et al., Eur Urol 57, 1093-1100, 2010). In wie weit das körpereigene endogene Cannabinoid (Anandamide) an der Regulation der Blasenfunktion beteiligt ist, wurde jedoch bisher in der aktuellen Literatur nicht beschrieben. Deswegen wurde in unserem hier dargestellten Forschungsprojekt die Fettsäureamid-Hydrolase (FAAH), welche für den enzymatischen Abbau des endogenen Anandamids (Arachidonylethanolamid) verantwortlich ist, durch den Inhibitor Oleoylethanolamid (OEA) geblockt. Hierfür wurden über einen Zeitraum von 2 Wochen täglich 11 weiblichen Ratten 0,3 mg/kg OEA und 8 weiblichen Ratten ein Vehikel subkutan appliziert. Drei Tage vor den geplanten urodynamischen Untersuchungen wurde in die Harnblase der Ratten ein Blasenkatheter implantiert. Am Tag 14 erfolgte bei den Ratten eine urodynamische Untersuchung. Sowohl bei der *Baseline*-Untersuchung als auch nach Infusion von PGE₂ in die Harnblase, ein etabliertes Modell zur Provokation einer überaktiven Blase, zeigten sich signifikante Unterschiede in Miktionsparameter. So hatten die mit OEA behandelten Ratten bei der *Baseline*-Untersuchung größere Schwellen- und Miktionsdrücke. Zusätzlich waren die Miktionsintervalle, die Miktionsvolumina und die Blasenkapazität signifikant größer und die Restharnvolumina nach Miktion signifikant kleiner im Vergleich zur Vehikel-Gruppe. Nach intravesikaler Infusion von PGE₂ wurden zwar in beiden Gruppen sowohl der Basaldruck wie auch der Maximaldruck erhöht. Dennoch war der Anstieg des Basaldruckes in der Vehikel-Gruppe größer als in der OEA-Gruppe. Das Miktionsintervall, das Miktionsvolumen und die Blasenkapazität nahmen nach PGE₂-Infusion in die Blase bei beiden Gruppen ab, wenn auch in der Vehikel-Gruppe stärker als in der OEA-Gruppe. Nach Durchführung der *In-vivo*-Versuche wurden die Harnblasen der Ratten für Organbadversuche verwendet. Bei der nerval induzierten Kontraktion der isolierten Gewebestreifen durch elektrische Feldstimulation (EFS) gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Vergleichsgruppen. Wohingegen bei niedrigen Konzentrationen des Parasympathomimetikums

Carbachol (10 nM-100 nM) eine signifikant stärkere Kontraktion bei den Gewebestreifen der OEA-Gruppe im Vergleich zur Vehikel-Gruppe gezeigt werden konnte.

Zusammenfassend zeigen die von uns erhobenen Ergebnisse, dass die chronische Inhibierung von FAAH mit OEA einen positiven Effekt auf urodynamische Parameter der normalen Blasenfunktion und der Überaktiven Blase hat. Dies legt eine Beteiligung des endogenen Cannabinoidsystems bei der Regulation der Blasenfunktion nahe und stellt einen interessanten therapeutischen Ansatz bei Patienten mit z.B. einer überaktiven Blasenfunktion dar. Ob der von uns aufgezeigte Effekt zentral, peripher oder zentral und peripher hervorgerufen wird, konnte bisher noch nicht gezeigt werden. Dies ist jedoch Gegenstand aktueller von uns durchgeführten Untersuchungen, bei denen der akute Effekt der FAAH-Inhibition durch intravenöse und intravesikale Applikation von OEA mit zusätzlicher Blockierung von CB1- und CB2-Rezeptorblockern untersucht wird.

3.3.2 Neue Regulations- und Funktions-Prinzipien prostaticher alpha1-Adrenozeptoren: neue Mediatoren der Prostata-Kontraktion

Martin Hennenberg, Frank Strittmatter, Sebastian Walther, Beata Rutz, Christian Gratzke

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

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

Die beschriebenen Untersuchungen erfolgen an humanem Prostata-Gewebe, welches im Rahmen von radikalen Prostatektomien gewonnen wird. Durch die Verwendung intakter, humaner Gewebe sind die damit erzielten Ergebnisse von besonderer Aussagekraft. In anderen Laboren werden auf Grund mangelnder

Verfügbarkeit solcher Proben Zellkulturen, Tiermodelle, oder Resektionsspäne herangezogen.

Teilprojekt 1: Kopplung prostatischer alpha1-Adrenozeptoren an ERK1/2 und die p38 MAP Kinase

Förderung: Recordati Pharma

In diesem Teilprojekt wurde die Kopplung prostatischer alpha1-Adrenozeptoren an die Mitogen-aktivierten Protein-Kinasen ERK1/2 und p38 untersucht. ERK1/2 und p38 werden durch Phosphorylierungen aktiviert, und sind in verschiedenen Organen und Zelltypen an der Regulation von Wachstum, Proliferation, Zellzyklus und Differenzierung beteiligt.

Isolierte Prostata-Gewebe wurden mit Noradrenalin, bzw. dem alpha1-Agonisten Phenylephrin stimuliert. Über Western-Blot Analysen mit phosphospezifischen Antikörpern wurde anschließend die Aktivität der ERK1/2 bzw. p38 zwischen stimulierten und nicht-stimulierten Proben verglichen. Die adrenerge Stimulation führte zu einer Aktivierung von ERK1/2, die von einer Deaktivierung der p38 begleitet war. Über immunhistochemische Färbungen konnten beide Kinasen in glatten Muskelzellen humaner Prostatagewebe nachgewiesen werden. Für die p38 wurden Doppelfluoreszenzfärbungen angefertigt, welche eine Kolo-kalisation mit *alpha-smooth muscle actin* (Marker für glatte Muskelzellen) sowie alpha1-Adrenozeptoren zeigten. In myographischen Organbad-Untersuchungen wurde durch Hemmung der ERK1/2 durch U0126 bzw. der p38 durch SB202190 deren Rolle für die alpha1-adrenerge Kontraktion überprüft. Beide Inhibitoren waren ohne Effekt auf die Phenylephrin-induzierte Kontraktion des Prostatagewebes.

Durch diese Ergebnisse wurden ERK1/2 und p38 erstmalig als Effektoren des alpha1-Adrenozeptors in der humanen Prostata identifiziert. Obwohl beide Signalwege an den alpha1-Adrenozeptor gekoppelt sind, spielen sie keine Rolle bei der alpha1-adrenergen Kontraktion. Dies zeigt, dass dieser Rezeptor neben der Kontraktion auch über nicht-motorische Funktionen verfügt.

Die Ergebnisse zur ERK1/2 wurden 2011 in *Urologia Internationalis* publiziert. Die Ergebnisse zur p38 wurden 2011 in *Urology* publiziert.

Teilprojekt 2: Akzessorische Interaktionspartner des alpha1-Adrenozeptors in der humanen Prostata

Beta-Arrestine können an G-Protein-gekoppelte Rezeptoren binden, was zu einer Verdrängung der Rezeptor-gekoppelten G-Proteine führt. Dies resultiert in Änderungen der Rezeptor-Signalgebung. Diese umfassen eine Unterbrechung der G-Protein-abhängigen Signaltransduktion und ein gleichzeitiges Einsetzen einer Arrestin-vermittelten Signalgebung. Weitere Folge ist die Rekrutierung zusätzlicher akzessorischer Interaktionspartner, wie zunächst Dynamin und Adaptin, und schließlich von Clathrinen und Caveolin. Konsequenz ist eine Internalisierung G-Protein-gekoppelter Rezeptoren entweder über Clathrin- oder über Caveolin-abhängige Mechanismen.

Über quantitative RT-PCR, Western-Blot-Analysen und immunhistochemische Färbungen wurde in diesem Teilprojekt zunächst die Expression von beta-Arrestin-2 in der humanen Prostata nachgewiesen. Ko-Immunpräzipitation-Versuche zeigten, dass beta-Arrestin-2 tatsächlich an alpha1A-Adrenozeptoren der humanen Prostata

binden kann. Diese Ergebnisse legen nahe, dass beta-Arrestin-2 einen wichtigen Faktor darstellen könnte, der über den Verlauf von Symptomen und Therapie bei BPS-Patienten mitbestimmt. Darüber hinaus führen diese Ergebnisse zu einem neuen Modell des prostatistischen alpha1-Adrenozeptors, der durch beta-Arrestin-2 an- und ausgeschaltet werden kann. Dieses löst das bisherige Modell eines statischen, ausschließlich G-Protein gekoppelten Rezeptors ab.

Diese Ergebnisse zur Expression und alpha1-Adrenozeptor-Interaktion von beta-Arrestin-2 wurden in 2011 im *World Journal of Urology* publiziert.

Nach der Publikation der beta-Arrestin-2-Daten wurden die Untersuchungen zu akzessorischen Bindungspartnern des alpha1A-Adrenozeptors in der humanen Prostata fortgesetzt. Über RT-PCR und Western-Blot-Analysen konnte die Expression von beta2-Adaptin, Dynamin-2, ARF6, Clathrin *light-chain* A (LCA), Clathrin *light-chain* B (LCB), Clathrin *heavy chain* (HC) und Caveolin-1 in Prostata-Proben von jedem untersuchten Patient nachgewiesen werden. Immunohistochemische Färbungen ergaben eine deutliche Immunreaktivität aller genannter Faktoren in stromalen Zellen. Lediglich im Falle der Clathrin LCA überwog die Immunreaktivität in Epithel-Zellen die Färbung stromaler Zellen. Die Expression von Caveolin-1 ist wiederum offenbar streng an Membranen lokalisiert. Über Doppel-Fluoreszenz-Färbungen wurde die Kolo-kalisation von beta2-Adapin, Dynamin-2, ARF6, Clathrin LCA, LCB, HC, sowie Caveolin-1 mit *alpha-smooth-muscle actin* (Marker für glatte Muskelzellen), sowie alpha1A-Adrenozeptoren nachgewiesen. Über Ko-Immunpräzipitationen wurde die Interaktion des alpha1A-Adrenozeptors mit Clathrinen und Caveolin unter Ruhebedingungen (Prostata-Gewebe ohne weitere Stimulation oder Behandlung) untersucht. Diese Untersuchungen zeigten, dass ein Teil des prostatistischen alpha1A-Adrenozeptor-Pools unter solchen Bedingungen offenbar an Clathrin HC und LCB gebunden ist. Aktuell wird über weitere Ko-Immunpräzipitationsexperimente die mögliche Rekrutierung von akzessorischen Proteinen nach Rezeptor-Stimulation untersucht. Erste Anhaltspunkte weisen darauf hin, dass Clathrin LCA erst nach der Stimulation des Rezeptors an den Rezeptor bindet. Diese Versuche werden Anfang 2012 abgeschlossen, ein Manuskript wird verfasst.

Teilprojekt 3: Heterologe Regulation zwischen alpha1- und beta2-Adrenozeptoren in der humanen Prostata

Während alpha1-Adrenozeptoren zu einer Kontraktion der glatten Prostata-Muskulatur führen, löst die Stimulation prostatistischer beta2-Adrenozeptoren eine Relaxation aus. Beta2-Adrenozeptoren können über eine Phosphorylierung am Serin_{345/346} reguliert werden, welche zu einer Desensitisierung des Rezeptors führt. Es wird vermutet, dass diese Phosphorylierung des beta2-Adrenozeptors über eine Aktivierung der G-Protein-gekoppelten Rezeptor-Kinase 2 (GRK2) erfolgt.

Über Western-Blot Analysen mit einem phosphospezifischen Antikörper konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung prostatistischer alpha1-Adrenozeptoren durch Phenylephrin zu einer Transphosphorylierung von beta2-Adrenozeptoren am Serin_{345/346} führt. Dies könnte einen weiteren, neuen Mechanismus darstellen, den prostatistische alpha1-Adrenozeptoren für die Kontraktion verwenden. Die Beteiligung der *second-messenger*-Kinasen PKC und PKA konnte ausgeschlossen werden, da die Phosphorylierung resistent gegen eine pharmakologische Hemmung dieser Kinasen war. Western-Blot-Analysen, immunohistochemische Färbungen, und mRNA-Analysen über RT-PCR zeigten, dass GRK2 in glatten Muskelzellen der humanen Prostata exprimiert wird.

Diese Ergebnisse wurden in 2011 im *British Journal of Urology International* publiziert.

Teilprojekt 4: alpha1-adrenerge Regulation der Transkriptionsfaktoren Elk1 und SRF in der humanen Prostata

Der Transkriptions-Faktor Elk1 ist aus verschiedenen Zelltypen und Organen außerhalb des Urogenitaltraktes als Effektor des ERK1/2-Signalweges, bzw. als Regulator des Zellzyklus bekannt. Der *serum response factor* (SRF) ist dagegen insbesondere in glatten Muskelzellen von Bedeutung, wo er Phänotyp, Differenzierung und Proliferation reguliert. Während Elk1 durch eine Phosphorylierung aktiviert wird, erfordert die Aktivierung von SRF eine Interaktion mit dem Kofaktor Myokardin. Prinzipiell erfordern Prozesse wie Wachstum und Differenzierung, die bei der Prostata-Hyperplasie von Bedeutung sind, Änderungen der Transkriptionsaktivität, was wiederum über Transkriptionsfaktoren erfolgt. Da eine Rolle des alpha1-Adrenozeptors für das Wachstum der Prostata und die hyperplastischen Änderungen postuliert wurde, soll in diesem Teilprojekt die Regulation von der Transkriptionsfaktoren Elk1 und SRF durch alpha1-Adrenozeptoren in der humanen Prostata untersucht werden.

Western-Blot-Analysen mit einem phosphospezifischen Antikörper zeigten, dass die Stimulation von Prostata-Gewebe mit Phenylephrin und Noradrenalin zu einer Phosphorylierung von Elk1 am Serin-383 führt. Folge dieser Phosphorylierung ist üblicherweise die Bindung von Elk1 an eine spezifische DNA-Sequenz in Promoter-Regionen von Zielgenen. Zur Untersuchung dieser DNA-Bindung wurde im Labor der Arbeitsgruppe der *electromobility shift assay* (EMSA) etabliert, bei dem diese DNA-Bindung mit Hilfe von Biotin-markierten DNA-Sonden simuliert und nachgewiesen werden kann. Diese Untersuchungen ergaben, dass die Stimulation von Prostata-Gewebe mit Noradrenalin tatsächlich die Bindung von Elk1 an solche DNA-Sequenzen auslöst. Solche Prozesse erfordern eine nukleäre Lokalisation von Elk1. Immunhistochemische Färbungen bestätigten, dass ein Teil der prostatistischen Elk1-Population in Zellkernen zu finden ist, vermutlich durch den Effekt von endogenen Catecholaminen.

In einem ähnlichen Ansatz konnte über EMSA die Aktivierung von SRF durch Noradrenalin in der humanen Prostata gezeigt werden. Die Expression von SRF und Myokardin wurde über RT-PCR und Western-Blot-Analysen in Prostata-Proben aller untersuchter Patienten nachgewiesen. Über immunhistochemische Färbungen konnte diese Expression stromalen Zellen zugeordnet werden. Doppel-Fluoreszenzfärbungen zeigten eine Kolo-kalisation von SRF und Myokardin, bzw. der beiden einzelnen Proteine mit alpha1A-Adrenozeptoren.

Diese Ergebnisse zeigen erstmalig, dass die Funktion des prostatistischen alpha1-Adrenozeptors neben der Kontraktion auch eine transkriptionelle Regulation umfasst. Die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren ist unbedingte Voraussetzung für Wachstums- und Differenzierungsprozesse. Daher könnten SRF und Elk1 wichtige Bindeglieder darstellen, welche den glattemuskulären Tonus mit dem Wachstum in der humanen Prostata verknüpfen.

Aktuell werden die Effekte des alpha1-Adrenozeptor-Antagonisten Silodosin auf die adrenerge Aktivierung von Elk1 und SRF untersucht. Silodosin wird zur Behandlung von LUTS bei Patienten mit vergrößerter Prostata eingesetzt. Diese Untersuchungen

könnten zu einem verbesserten Verständnis der alpha1-Blocker-Therapie beitragen, und werden von der Firma Recordati durch Sachmittel unterstützt.

Teilprojekt 5: Aktivierung der Akt/Proteinkinase B durch alpha1-Adrenozeptoren in der humanen Prostata

In diesem Teilprojekt wurde die adrenerge Aktivierung der Akt (Synonym Proteinkinase B) in der humanen Prostata untersucht. Akt ist ein weit verbreiteter Mediator von Proliferation, Wachstum, und Differenzierung, und wird durch Phosphorylierungen aktiviert. Für die nicht-maligne Prostata fehlten bislang jedoch einschlägige Untersuchungen zur Expression und Funktion. Über quantitative RT-PCR, Western-Blot Analyse, und immunhistochemische Färbungen konnte nun erstmalig die Expression aller drei Akt-Isoformen in der glatten Muskulatur der humanen Prostata nachgewiesen werden. Durch Western-Blot-Analyse mit einem phosphospezifischen Antikörper konnte eine Noradrenalin- und Phenylephrin-induzierte Akt-Phosphorylierung am Serin-473 beobachtet werden, was eine Aktivierung der Akt reflektiert. Diese Aktivierung über Serin-473-Phosphorylierung konnte über einen ELISA bestätigt werden. Auf die Threonin-308-Phosphorylierung blieb die adrenerge Stimulation jedoch ohne Effekt. Dies legt nahe, dass über die adrenerge Regulation hinaus auch weitere Faktoren von Bedeutung für die Akt-Regulation sind. In myographischen Organbadmessungen wurde schließlich überprüft, ob Akt an der glattmuskulären Kontraktion beteiligt ist bzw. diese moduliert, was aus verschiedenen Typen glatter Muskulatur außerhalb des Urogenitaltraktes bekannt ist. Es wurden zwei verschiedene Akt-Inhibitoren getestet (FPA124, 10-DEBC), die jedoch ohne Effekt auf die Phenylephrin-, Noradrenalin- und EFS-induzierte Kontraktion des Prostatagewebes blieben.

Insgesamt zeigt dies, dass an den nicht-motorischen Funktionen prostatischer alpha1-Adrenozeptoren Akt-vermittelte Mechanismen beteiligt sind. Das Beispiel der fehlenden adrenergen Regulation des Threonin-308 verdeutlicht jedoch, dass Adrenozeptoren nicht der alleinige Regulator dieser Prozesse ist. Dies wiederum könnte den limitierten Effekt von alpha1-Blockern auf das Prostata-Volumen bei BPS-Patienten erklären, obwohl alpha1-Adrenozeptoren zweifellos an der Regulation des Prostata-Wachstums teilnehmen. Vermutlich ist hierbei ein komplexes Zusammenspiel zwischen adrenerger Signalgebung, Wachstumsfaktoren, und Hormonen zu berücksichtigen.

Diese Ergebnisse wurden Anfang 2012 zur Publikation angenommen (*Life Sciences*).

Strittmatter F, Walther S, Roosen A, Rutz B, Schlenker B, Limmer S, Waidelich R, Stief CG, Gratzke C, **Hennenberg M**. Activation of protein kinase B/Akt by alpha1-adrenoceptors in the human prostate. *Life Sciences*, accepted Januar 2012.

Teilprojekt 6: Caldesmon als neuer Effektor prostatischer alpha1-Adrenozeptoren

Caldesmon wurde aus verschiedenen Typen glatter Muskulatur außerhalb der Prostata als wichtiger Mediator und Regulator der Kontraktion beschrieben. Caldesmon unterstützt die Aktin-Polymerisation, also das Vorliegen von Aktin in filamentöser Form, sowie die Anheftung der Filamente an die Zellmembran. Beides sind essentielle Voraussetzungen für die Kontraktion. Untersuchungen zum Vorkommen von Caldesmon und seiner Regulation in der Prostata fehlten bislang jedoch. Über RT-PCR, Western-Blot-Analyse und immunhistochemische Färbungen konnte nun die Expression von Caldesmon in der glatten Muskulatur der humanen

Prostata nachgewiesen werden. Über Doppel-Fluoreszenz-Färbungen wurde die Kolo-kalisation von Caldesmon mit *alpha smooth muscle actin* (Marker für glatte Muskelzellen) bzw. alpha1A-Adrenozeptoren gezeigt. Caldesmon wird unter anderem durch eine Phosphorylierung am Serin-789 aktiviert. Western-Blot-Analysen mit einem phospho-spezifischen Antikörper ergaben, dass es bei der Stimulation von humanem Prostatagewebe mit Noradrenalin oder Phenylephrin zu einer Phosphorylierung von Caldesmon an dieser Stelle kommt. Dies legt nahe, dass Caldesmon einen bislang unbekanntem Effektor des prostatistischen alpha1-Adrenozeptors darstellt, dessen Aktivierung an der adrenergen Kontraktion der glatten Prostata-Muskulatur beteiligt ist.

Diese Ergebnisse wurden 2011 bei *Urology* zur Publikation angenommen.

Walther S, Strittmatter F, Roosen A, Heinzer F, Rutz B, Stief CG, Gratzke C, **Hennenberg M**. Expression and alpha1-adrenoceptor regulation of caldesmon in human prostate smooth muscle. *Urology* 2012;79:745.e5-745.e12 (accepted 2011).

Teilprojekt 7: EPAC-Expression und -Regulation in der humanen Prostata

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

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

Western-Blot-Analysen mit einem phosphospezifischen Antikörper zeigten, dass die Inkubation humaner Prostata-Gewebe mit OME oder pCPT zu einer Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors Elk1 führt. Diese Phosphorylierung von Elk1 führt zu einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors. Die OME- und pCPT-vermittelte Elk1-Aktivierung konnte über EMSA bestätigt werden. Folge der Elk1-Aktivierung ist die Bindung von Elk1 an eine spezifische DNA-Sequenz in Promoter-Regionen von Zielgenen. Im EMSA wird diese DNA-Bindung mit Hilfe von Biotin-markierten DNA-Sonden simuliert und nachgewiesen. Diese Untersuchungen ergaben, dass die Stimulation von Prostata-Gewebe mit OME und pCPT tatsächlich die Bindung von Elk1 an solche DNA-Sequenzen auslöst. Interessanterweise war diese Elk1-Aktivierung von einer OME- bzw. pCPT-induzierten Zunahme des Proliferationsmarkers Ki-67 begleitet.

Eine der Hauptfunktionen von EPAC in der humanen Prostata könnte also in der transkriptionellen Regulation bzw. der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren liegen. Offenbar steht dies mit einer EPAC-vermittelten Regulation der Proliferation bzw. des Zellzyklus. Da zumindest ein geringer Effekt von EPAC-Aktivatoren auf die alpha1-adrenerge Kontraktion nachgewiesen werden konnte, ist insgesamt von einer multiplen EPAC-Funktion in der humanen Prostata auszugehen. Die Untersuchungen werden bis Anfang 2012 fortgesetzt, ein Manuskript wird verfasst.

Teilprojekt 8: Hemmung der adrenergen Prostata-Kontraktion durch die JNK-Inhibitoren SP600125 und BI-78D3

In diesem Teilprojekt wurden die Effekte von Inhibitoren der c-Jun N-terminalen Kinase (JNK), SP600125 und BI-78D3, sowie die adrenerge JNK-Aktivierung im humanen Prostata-Gewebe untersucht. Dem bisherigen Modell entsprechend erfolgt die adrenerge Kontraktion der glatten Prostata-muskulatur durch eine Aktivierung von Ca-abhängigen Signalwegen, sowie der Rho-Kinase und Proteinkinase C (PKC). Die Ergebnisse des Teilprojektes zeigen, dass offenbar auch die Aktivierung der JNK als intrazellulärer Mediator von Bedeutung für die alpha1-adrenerge Kontraktion in der humanen Prostata ist.

Untersuchungen im Organbad zeigten, dass SP600125 zu einer deutlichen, signifikanten Hemmung der Kontraktion durch Noradrenalin, Phenylephrin, oder EFS führt. Um diese Befunde zu bestätigen, wurden Experimente mit einem anderen, strukturell nicht verwandten JNK-Inhibitor durchgeführt. Hierbei wurde eine Hemmung der Noradrenalin- und Phenylephrin-induzierten Kontraktion beobachtet. JNK wird durch eine Phosphorylierung aktiviert, die mit Hilfe von phosphospezifischen Antikörpern untersucht wurde. Dabei wurde eine Aktivierung der JNK nach Stimulation von Prostata-Geweben mit Noradrenalin und Phenylephrin beobachtet. Immunohistochemische Färbungen zeigten die Expression von JNK in stromalen Zellen. Über Doppel-Fluoreszenzfärbungen wurde die Kolokalisation von JNK mit *alpha smooth muscle actin* und dem alpha1A-Adrenozeptor gezeigt.

Die Hemmung der adrenergen Prostata-Kontraktion ist verantwortlich für die therapeutischen Effekte bei der Behandlung von LUTS-Patienten mit alpha1-Blockern. Daher sind neue Strategien zur Hemmung der adrenergen Prostata-Kontraktion von grossem Interesse. Ob sich JNK-Inhibitoren bzw. dieser Signalweg als Angriffspunkt für neue LUTS-Therapien eignen könnte, soll durch weitere *In-vivo*-Untersuchungen in Tiermodellen geklärt werden.

Die bisherigen Ergebnisse wurden Anfang 2012 zur Publikation im *British Journal of Pharmacology* angenommen.

Strittmatter F, Walther S, Gratzke C, Göttinger J, Beckmann C, Roosen A, Schlenker B, Hedlund P, Andersson KE, Stief CG, **Hennenberg M**. Inhibition of adrenergic human prostate smooth muscle contraction by the inhibitors of c-Jun N-terminal kinase, SP600125 and BI-78D3. *Br J Pharmacol*, accepted Januar 2012.

Teilprojekt 9: Motorische Effekte von Thromboxan und Thromboxan-Rezeptor-Antagonisten in der humanen Prostata

Thromboxan führt in verschiedenen Typen glatter Muskulatur außerhalb des unteren Harntraktes zu einer Kontraktion. In diesem Teilprojekt wurden daher erstmalig die motorischen Effekte von Thromboxan und Thromboxan-Rezeptor-Antagonisten in der humanen Prostata untersucht. Die Kontraktion der glatten Prostata-Muskulatur ist wichtiger Angriffspunkt für die medikamentöse Therapie von LUTS bei Patienten mit benigner Prostata-Hyperplasie. Daher sind neue Strategien zur Hemmung der Prostata-Kontraktion von enormem Interesse.

Im Organbad induzierte das stabile Thromboxan-Analogon U46619 eine Kontraktion von humanem Prostata-Gewebe. Untersuchungen mit dem Rho-Kinase-Inhibitor Y-27632 und dem Calmodulin-Inhibitor W7 zeigten, dass Thromboxan über dieselben Signalwege wie der alpha1-Adrenozeptor zur Kontraktion führt. Western-Blot-Analysen und immunohistochemische Färbungen zeigten die Expression des Thromboxan A2-Rezeptors und der Thromboxan-Synthase in Gewebe-Proben von allen untersuchten Patienten. Über einen ELISA konnte endogenes Thromboxan in Form seines stabilen Metaboliten Thromboxan B2 im Prostata-Gewebe nachgewiesen werden. In Folgeuntersuchungen wurden im Organbad die Effekte verschiedener Thromboxan-Rezeptor-Antagonisten untersucht. Interessanterweise hemmte Picotamid nicht nur die U46619-induzierte Kontraktion von humanem Prostata-Gewebe, sondern auch die Phenylephrin- und EFS-induzierte Kontraktion. Seratrodast und L-665,240 waren dagegen ohne Effekt auf die EFS-induzierte Kontraktion.

Mit Picotamid wurde daher erstmalig eine Substanz gefunden, die gleichzeitig in verschiedene kontraktile Systeme der Prostata eingreift. Bisherige Substanzen, wie die alpha1-Blocker (die zur LUTS-Therapie sehr häufig eingesetzt werden) greifen nur in eines der Systeme ein. Picotamid ist prinzipiell bei Patienten anwendbar, und wurde bereits in zahlreichen klinischen Studien als Blutverdünner bzw. im Zusammenhang mit Herzerkrankungen geprüft. Eine Fortsetzung des Projektes (urodynamische Effekte im Tiermodell) ist vorgesehen. Auf der Basis der beschriebenen Ergebnisse wird Anfang 2012 ein DFG-Antrag eingereicht.

Der erste Teil dieser bisherigen Untersuchungen wurde 2011 im *European Journal of Pharmacology* publiziert.

Zusammenfassung

Die Ergebnisse aus den einzelnen Teilprojekten führen zu einem neuen Modell des prostatistischen alpha1-Adrenozeptors. Dieses ersetzt das bisherige Modell eines statischen alpha1-Adrenozeptors, der ausschließlich eine Kontraktion vermittelt. Vielmehr handelt es sich um einen dynamischen Rezeptor, bei dem die Kontraktion nur eine von mehreren Funktionen darstellt und die Kopplung an G-Proteine lediglich eine von mehreren Möglichkeiten ist. Insgesamt zeigt dies, dass die Regulation und Funktion prostatistischer alpha1-Adrenozeptoren trotz ihrer enormen Bedeutung für die Therapie von Miktionsbeschwerden bislang nur äußerst unzureichend verstanden ist.

Im Einzelnen kann das Wissen über prostatiche alpha1-Adrenozeptoren um folgende Punkte erweitert werden:

1. Neben ihrer Rolle für die glattmuskuläre Kontraktion üben prostatiche alpha1-Adrenozeptoren auch nicht-motorische Funktionen aus.
2. Die nicht-motorischen Rezeptorfunktionen umfassen eine Regulation der MAP-Kinasen und Akt, und eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors Elk1.
3. Außer G-Proteine existieren weitere akzessorische Interaktionspartner, die an prostatiche alpha1-Adrenozeptoren binden können, zum Beispiel beta-Arrestin-2.
4. Die alpha1-adrenerge Kontraktion der glatten Prostata-Muskulatur erfolgt nicht nur über die bislang bekannten Mechanismen (Ca^{2+} , PKC, Rho-Kinase), sondern auch durch eine Aktivierung der JNK.
5. Die alpha1- und beta2-adrenergen Systeme in der Prostata agieren nicht getrennt voneinander, sondern regulieren sich gegenseitig durch Aktivierung von GRK2.
6. Caldesmon ist ein weiterer Effektor prostaticher alpha1-Adrenozeptoren, und könnte an der alpha1-adrenergen Kontraktion der glatten Prostata-Muskulatur beteiligt sein.

3.3.3 Bedeutung des suburothelialen Myofibroblastennetzwerkes für die Pathogenese der überaktiven Blase

Alexander Roosen

Förderung: DFG

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

junctions offenbar dadurch nicht beeinflusst. Dies würde gut zur bekannten Wirkdauer der BoNT/A-Injektionen von nicht mehr als zehn Monaten passen. Es ist bereits gezeigt worden, dass BoNT/A die Anzahl der sensorischen P2X₃- und TRPV1-Rezeptoren auf suburothelialen Nervenendigungen senkt; diese Rezeptoren scheinen somit das strukturelle Surrogat für Veränderungen durch BoNT/A im Suburothel zu sein.

3.3.4 Adreno-muskarinerger Synergismus und Spontanaktivität des Trigonums

Alexander Roosen

Förderung: DFG

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

Durch die vorgelegten Arbeiten konnte die Blasenbasis als Ort ausgeprägter spontaner Aktivität beschrieben werden. Deutliche spontane $[Ca^{2+}]_i$ -Transienten und Kontraktionen wurden in trigonalen isolierten Zellen und Streifenpräparaten beobachtet. Die Spontanaktivität war signifikant höher als im Detrusor. Kalziumionenfreie Nährlösung und Verapamil beendeten die Spontanaktivität sowohl der isolierten Zelle als auch der intakten Präparation. Der Cl⁻-Kanal-Blocker Niflumsäure konnte

sowohl $[Ca^{2+}]_i$ -Transienten der isolierten Zelle als auch die spontanen Kontraktionen der Muskelpräparation mindern. Im Trigonum fand sich eine fünfmal höhere Cx43-Immunreaktivität als im Detrusor. Folgerichtig hatte der *Gap-junction*-Blocker 18- β -glycyrrhetinische Säure einen inhibierenden Effekt auf spontane Kontraktionen im Trigonum, nicht jedoch im Blasendach.

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

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

Alexander Roosen

Förderung: DFG

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

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

- 1) Ein ausgeprägter adreno-muskarinerg Synergismus existiert auch im menschlichen Harnausflußtrakt. Es könnten sich Unterschiede bei Patienten mit Harninkontinenz zeigen.
- 2) Eine prominente Spontanaktivität und elektrische Kopplung kennzeichnet auch die menschliche Ausflussregion. Beeinträchtigungen könnten ebenfalls ursächlich für Harninkontinenz sein.
- 3) Bei Patienten mit primärer Stressinkontinenz liegen Funktionseinschränkungen auf muskulärer Ebene in der Harnröhre vor, so z. B. Änderungen der neuromuskulären Kopplung durch relative Denervierung oder verminderte Rezeptorendichte.

4) Das suburotheliale Myofibroblastennetzwerk kontrahiert aktiv und unabhängig vom darunter liegenden Detrusor entweder spontan oder nach Aktivierung durch Agonisten (ADP, UTP). Kontraktile Eigenschaften dieses Netzwerkes könnten bei Patienten mit Speicher- oder Entleerungssymptomen beeinträchtigt sein.

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

Derya Tilki

Förderung: Else-Kröner-Fresenius-Stiftung

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

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

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

3.3.7 Diagnostische und prognostische Bedeutung von CEACAM1 bei der lymphogenen Metastasierung des Prostatakarzinoms

Derya Tilki

Förderung: DFG

Das Adenokarzinom der Prostata metastasiert häufig lymphogen. Frühe, nicht erkannte Tumorzell dissemination in die Lymphknoten und damit verbundene Metastasierung machen eine kurative Therapie oft aussichtslos. Unsere publizierten

Ergebnisse lassen vermuten, dass das Adhäsionsmolekül CEACAM1 hierbei eine entscheidende Rolle spielt. Ziel dieses Projektes ist, die Bedeutung von CEACAM1 bei der lymphogenen Ausbreitung des Prostatakarzinoms zu untersuchen. Hierzu werden Expressionsanalysen an Prostatakarzinomgewebe sowie an dazugehörigem Lymphknotengewebe mit und ohne Metastasierung durchgeführt.

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

Derya Tilki

Förderung: DFG

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

4. Drittmittel

#	Drittmittelgeber (Aktenzeichen)	Empfänger	Laufzeit	T€
Laser- Forschungslabor				
1	BMBF (13N10172)	Stepp, Johansson	09-11	255
2	TMWAF – Landesförderung Thüringen	Sroka	09-12	59
3	BMBF (13N10172)	Stepp, Betz	09-12	148
4	Firma Photonamic	Stepp	10-12	10
5	Firma Electro Medical Systems S.A.	Sroka	11-12	10
6	EU-Exzellenznetzwerk (Photonics4Life)	Sroka	11-12	12
7	EU-Exzellenznetzwerk (Photonics4Life)	Stepp, Karl	11-12	10
8	BMBF (FK2: 0313451C)	Fedorov	11-13	287
9	DFG (INST 409/88-1 FUGG)	Stepp, Betz, Danecker, et al.	11	50
10	Firma Dornier	Sroka	11-12	5
11	Firma BioLitec	Sroka	11-12	15
12	Firma Kurz	Sroka	11-12	5
<i>Summe</i>				856

Labor für Tumorimmunologie				
1	„Molekulare und systembiologische Medizin“ der LMU München (25/2009)	Zimmermann	10-11	16
2	Erasmus Stipendium	Passerini, Zimmermann	10-11	
3	Erasmus Stipendium	Bellio, Zimmermann	11	
4	„Molekulare und systembiologische Medizin“ der LMU München (19/2010)	Zimmermann, Tölge	11-12	16
5	DFG Transregio FOR 535, Projekt X	Pohla	10-12	202
Summe				234
Experimentelle Urologie				
1	Recordati Pharma	Gratzke	11-12	20
2	DFG (TI 690/2-1)	Tilki	10-13	315
<i>Summe</i>				335
Gesamt				1.425

5. Ernennungen, Preise und Diplom- und Promotionsarbeiten

5.1 Laser-Forschungslabor

5.1.1 Ernennungen und Preise

Dr. hum. biol. Ronald Sroka:

- *Executive Committee Member* der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V. (AWMF)
- *Steering Committee Member*. Messe München International – *World of Photonics*
- Varian-Posterpreis der Deutschen Gesellschaft für Medizinphysik für die Darstellung der Untersuchungen im BetaMod-Projekt

5.1.2 Abgeschlossene Habilitationen, Promotionen und Diplomarbeiten

Dr. med. vet. Henrike Otto

Dr. med. vet. Ricarda Becker

Dipl.-Phys. Stefan Dittmar

5.2 Labor für Tumorimmunologie

5.2.1 Ernennungen und Preise

Dr. med. Alexander Buchner:

- Horst-Georg-Lühl-Preis 2011 für besonderes Engagement in der Lehre

5.2.2 Abgeschlossene Habilitationen, Promotionen und Diplomarbeiten

Diplomarbeiten

Chiara Bellio
Verena Paserini

5.3 Experimentelle Urologie

5.3.1 Ernennungen und Preise

PD Dr. med. Christian Gratzke:

- Wolfgang-Mauermayer-Preis 2011 (Deutsche Gesellschaft für Urologie)

5.3.2 Abgeschlossene Habilitationen, Promotionen und Diplomarbeiten

Im Berichtszeitraum wurden keine experimentellen Doktorarbeiten abgeschlossen.

6. Publikationen (Originalarbeiten)

6.1 Laser-Forschungslabor

1. Antipov OL, Zakharov NG, **Fedorov M**, Shakhova NM, Prodanets NN, Snopova LB, Sharkov VV, **Sroka R**: Cutting effects induced by 2 μ m laser radiation of cw Tm:YLF and cw and Q-switched Ho:YAG lasers on *ex-vivo* tissue. ***Medical Laser Applications*** 26 (2), 67-75 (2011). **IF not listed**
2. Bader MJ, Gratzke C, **Hecht V**, Schlenker B, Seitz M, Reich O, Stief CG, **Sroka R**: Impact of collateral damage to endourologic tools during laser lithotripsy - in vitro comparison of three different clinical laser systems. ***J Endourol.*** 25(4), 667-72 (2011). **IF 1.754**
3. Gallwas JK, Turk L, **Stepp H**, Müller S, Ochsenkühn R, Friese K, Dannecker C: Optical coherence tomography for the diagnosis of cervical intraepithelial neoplasias. ***Lasers Surg Med*** 43(3), 206-212 (2011). **IF 2.603**
4. Hartmannsberger D, Mack B, Eggert C, Denzel S, **Stepp H**, Betz CS, Gires O: Transketolase-like protein 1 confers resistance to serum withdrawal in vitro. ***Cancer Lett***, 300(1), 20-29 (2011). **IF 3.741**
5. Havel M, **Sroka R**, Leunig A, Patel P, Betz C: A double-blind, randomized, intra-individual controlled feasibility trial comparing the use of 1470nm and 940nm diode laser for the treatment of hyperplastic inferior nasal turbinates. ***Lasers Surg Med*** 43(9), 881-886 (2011). **IF 2.603**
6. **Hennig G, Stepp H, Johansson A**: Photobleaching-based method to individualize irradiation time during interstitial 5-aminolevulinic acid photodynamic therapy. ***Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*** 8, 275-281 (2011). **IF 2.302**

7. Kammerer R, Buchner A, Palluch P, Pongratz T, Oboukhovskij K, Beyer W, Johansson A, Stepp H, Baumgartner R, Zimmermann W: Induction of immune mediators in glioma and prostate cancer cells by non-lethal photodynamic therapy. *PloS ONE*, 6(6):e21834.1- e21834.14 (2011). **IF 4.411**
8. Khoder WY*, **Sroka R***, Hennig G, Seitz M, Siegert S, Zillinberg K, Gratzke C, Stief CG, Becker AJ: The 1,318-nm diode laser supported partial nephrectomy in laparoscopic and open surgery: preliminary results of a prospective feasibility study. *Lasers Med Sci*. 26(5), 689-697 (2011) (* shared first authors). **IF 2.547**
9. Khoder WY, **Sroka R**: Concept of a fiber guidance instrument for laser-assisted laparoscopic partial nephrectomy. *Medical Laser Applications* 26(4), 176-182 (2011). **IF not listed**
10. Khoder WY*, **Sroka R***, Kellhammer N, Haseke N, Stief CG, Becker AJ: Laser-Assisted Laparoscopic Partial nephrectomy without ischemia: procedure and challenges. *J Endourol Part B, Videourology* 25(4) (2011) (* shared first authors). **IF 1.754**

6.2 Labor für Tumorimmunologie

1. Westermann J, Flörcken A, Willimsky G, van Lessen A, Kopp J, Takvorian A, Jöhrens K, Lukowsky A, Schönemann C, Sawitzki B, **Pohla H**, Frank R, Dörken B, Schendel DJ, Blankenstein T, Pezzutto A. Allogeneic gene-modified tumor cells (RCC-26/IL-7/CD80) as a vaccine in patients with metastatic renal cell cancer – a clinical phase I study. *Gene Ther*, 18(4): 354-63 (2011). **IF 4.745**
2. Figel AM, Brech D, Prinz PU, Lettenmeyer UK, Hosse J, Turqueti-Neves A, Mysliwicz J, Anz D, Rieth N, Muenchmeier N, **Buchner A**, Porubsky S, Siegert S, Segerer S, Nelson PJ, Noessner E. Human renal cell carcinoma induces a dendritic cell subset that uses T cell crosstalk for tumor-permissive milieu alterations. *Am J Pathol*, 179 (1):436-51 (2011). **IF 5.673**
3. Kammerer R, Buchner A, Palluch P, Pongratz T, Oboukhovskij K, Beyer W, Johansson A, Stepp H, Baumgartner R, Zimmermann W. Induction of immune mediators in glioma and prostate cancer cells by non-lethal photodynamic therapy. *PloS ONE*, 6(6):e21834 (2011). **IF 4.411**
4. Burgermeister E, Friedrich T, Hitkova I, Gruner I, Einwächter H, **Zimmermann W**, Schaefer C, Röcken C, Perren A, Schmid RM, Seger R, Ebert MPA. The ras inhibitors caveolin-1 and docking protein-1 activate PPARgamma through spatial relocalization at helix-7 of its ligand-binding domain. Compartmentalization of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma by the scaffold protein caveolin-1 in human gastric cancer. *Mol Cell Biol*, 31(16):3497-510 (2011). **IF 6.057**
5. van den Engel NK, Rüttinger D, Rusan M, Kammerer R, **Zimmermann W**, Hatz R and Winter H. Chemotherapeutic induction of lymphopenia followed by reconstitution with splenocytes and active-specific tumor cell vaccination (LRAST) enhances the therapeutic efficacy against subcutaneous tumors in a mouse model of gastric cancer. *J Transl Med*, 9:140 (2011). **IF 3.508**

6. Retz M, Roter J, Nawroth R, **Buchner A**, Stöckle M, Gschwend J, Lehmann J. Long term follow-up of bladder cancer patients with disseminated tumor cells in bone marrow. *Eur Urol*, 60:231-8 (2011). Epub 2010 Dec 22 **IF 8.843**
7. **Buchner A**, Kendlbacher M, Nuhn P, Tüllmann C, Haseke N, Stief CG, Stähler M. Outcome assessment of patients with metastatic renal cell carcinoma under systemic therapy using artificial neural networks. *Clin Genitourin Cancer*. 2011 Nov 4. [Epub ahead of print]. **IF 1.638**
8. Schichor C, Albrecht V, Korte B, **Buchner A**, **Riesenberg R**, Mysliwietz J, Paron I, Motaln H, Tursek TL, Jürchott K, Selbig J, Tonn J-C. Mesenchymal stem cells and glioma cells form a structural as well as a functional syncytium *in vitro*. *Exp Neurol*, 2011 Dec 29. [Epub ahead of print]. **IF 4.436**

6.3 Experimentelle Urologie

1. Strittmatter F, Buchner A, Karl A, Sommer ML, Straub J, Tilki D, **Hennenberg M**, Knuechel R, Stief CG, Zaak D, Tritschler S. Individual learning curve reduces the clinical value of urinary cytology. *Clin Genitourin Cancer* 2011; 9(1):22-26. **IF 1.638**
2. Strittmatter F, Gratzke C, Walther S, Göttinger J, Beckmann C, Roosen A, Schlenker B, Reich O, Stief CG, **Hennenberg M**. Alpha1-Adrenoceptor signaling in the human prostate involves regulation of p38 mitogen-activated protein kinase. *Urology* 2011; 78(4):969e7-969e13. **IF 2.334**
3. Trebicka J, Racz I, Siegmund SV, Cara E, Granzow M, Schierwagen R, Klein S, Wojtalla A, **Hennenberg M**, Huss S, Fischer HP, Heller J, Zimmer A, Sauerbruch T. Role of cannabinoid receptors in alcoholic hepatic injury: steatosis and fibrogenesis are increased in CB2 receptor deficient mice and decreased in CB1 receptor knockouts. *Liver Int* 2011; 31(6):860-870. **IF 3.840**
4. **Hennenberg M**, Schlenker B, Roosen A, Strittmatter F, Walther S, Stief C, Gratzke C. Beta-arrestin-2 is expressed in human prostate smooth muscle and a binding-partner of α 1-adrenoceptors. *World J Urol* 2011; 29(2):157-163. **IF 2.438**
5. Bauer RM, Strittmatter F, Gratzke C, Göttinger J, Schlenker B, Reich O, Stief CG, Hedlund P, Andersson KE, **Hennenberg M**. Coupling of alpha1-adrenoceptors to ERK1/2 in the human prostate. *Urol Int* 2011; 86(4):427-433. **IF 0.924**
6. Strittmatter F, Gratzke C, Weinhold P, Steib CJ, Hartmann AC, Schlenker B, Andersson KE, Hedlund P, Stief CG, **Hennenberg M**. Thromboxane A2 induces contraction of human prostate smooth muscle by Rho kinase- and calmodulin-dependent mechanisms. *Eur J Pharmacol* 2011; 650(2-3):655-655. **IF 2.737**
7. **Hennenberg M**, Strittmatter F, Walther S, Hedlund P, Andersson KE, Stief CG, Gratzke C. Alpha1-adrenoceptor activation induces phosphorylation of beta2-adrenoceptors in human prostate. *BJU Int* 2011; 108(6):922-908. **IF 3.190**

8. **Hennenberg M**, Trebicka J, Kohistani Z, Stark C, Nischalke HD, Krämer B, Körner C, Fischer HP, Heller J, Sauerbruch T. Hepatic and HSC-specific sorafenib effects in rats with established secondary biliary cirrhosis. **Lab Invest** 2011; 91(2):241-251. **IF 4.405**
9. Ganzer R, Neuhaus J, **Gratzke C**, Blana A, Wieland WF, Stolzenburg JU. Anatomical description of the periprostatic nerves in the male rhesus monkey (*Macaca mulatta*). **World J Urol** 2011; 29(3):375-80. **IF 2.438**
10. **Gratzke C**, Streng T, Stief CG, Alroy I, Limberg BJ, Downs TR, Rosenbaum JS, Hedlund P, Andersson KE. Cannabinor, a selective cannabinoid-2 receptor agonist, improves bladder emptying in rats with partial urethral obstruction. **J Urol** 2011; 185(2):731-6. **IF 3.862**