



Tätigkeitsbericht LIFE-Zentrum

2010

Tätigkeitsbericht LIFE-Zentrum 2010

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: 4

Drittmittel: 1 + 2x ½

Gesamt: 5 + 2x ½

Nichtwissenschaftliche Mitarbeiter

Planstellen: 1 + ½

Drittmittel: 1 + 3x ½

Gesamt: 2 + 4x ½

Labor für Tumorummunologie (LTI)

Wissenschaftliche Mitarbeiter

Planstellen: 3

Nichtwissenschaftliche Mitarbeiter

Planstellen: 1

Drittmittel: 1

Gesamt: 2

Experimentelle Urologie

Wissenschaftliche Mitarbeiter

Planstellen: 2

Drittmittel: 2x 1/2

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

Tumorimmunologiepraktikum für Mediziner und Biologen; Beteiligung an Vorlesung und Praktikum „Grundlagen der Immunologie“ des Immunologischen Instituts; 7 Medizindoktoranden, 2 Biologinnen in Ausbildung (LTI); 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); LIFE-Seminar mit eingeladenen Rednern; LIFE-Forschungsbesprechung mit Ärzten der Urologischen Klinik.

2.3 Veranstaltungen

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

Deutsch-Russisches Onkologie Symposium, München (25.-36. Juni 2010)

14. Deutsche Physikerinnentagung, München (04.-07. November 2010)

3. Forschungsschwerpunkte

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

3.1 Laser-Forschungslabor (LFL)

Das LFL ist eine interdisziplinäre Forschungseinrichtung mit dem Ziel, innovative optische Methoden zur Detektion und Therapie humaner Neoplasien zu entwickeln, klinisch umzusetzen und zu evaluieren. Um diesen Prozess zu optimieren, werden

enge Kontakte mit der Fachhochschule München (*University of Applied Sciences*) und dem Fachbereich Physik der naturwissenschaftlichen Fakultät der LMU München gepflegt. Sie ermöglichen in optimaler Weise auf der Basis von Praktikanten-, 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 2010 in diesem Forschungsschwerpunkt bearbeitet:

Verbundprojekt „Neurotax“

*Herbert Stepp, Wolfgang Beyer, Gesa Palte, Ann Johansson, Bettina Günther;
Klinik: Friedrich-Wilhelm Kreth (Neurochirurgie); Förderung: BMBF in MoBiTech*

Dieses Verbundprojekt war in 2010 in seinem 2. Jahr (von 3). Die Zielsetzung ist die Verbesserung stereotaktischer Eingriffe bei v.a. malignes 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-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 getestet. 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. Dies wird nun weiter untersucht, nach Möglichkeit durch eigene theoretische Arbeiten weiter verbessert und schließlich Eingang in einen Prototypen finden.

Ein erster Demonstrator wurde bereits aufgebaut und in die Entwicklungen der Projektpartner integriert. Auf dem Meilensteintreffen der Forscherverbünde im Juli 2010 konnte er Frau Ministerin Schavan erfolgreich vorgeführt werden.

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 für erste Messungen fertig gestellt.

Dieses Projekt verspricht, seine Ziele uneingeschränkt zu erreichen. In Tierversuchen konnten die bildgebenden Sonden (Fa. Storz) und die quantitativen Fasersonden (LFL) bereits mit viel versprechenden Ergebnissen getestet werden. Im dritten Projektjahr wird nun der Fokus auf die Detektion von Blutgefäßen gelegt, um das zweite Ziel der Verbesserung der Sicherheit stereotaktischer Eingriffe ebenfalls zu erreichen. Die Verbundpartner aus der Industrie sind an einer späteren Produktumsetzung sehr interessiert. Die Fa. MRC-Systems würde dann ihre Stereotaxierahmen mit optischen Biopsiezangen ausrüsten.

Verbundprojekt „FLENDOS“

Katharina Thomsen, Herbert Stepp; Klinik: Martin Patschieder (HNO), 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 Gewebeveränderungen und im Wesentlichen die Eignung zur Tumorfrühdiagnostik. 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; Klinik: 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. 12 Patientinnen. Es soll untersucht werden, ob nach oraler Gabe von 30 oder 20 mg/kg KG 5-ALA 3-5 Std. vor chirurgischer Resektion Mammakarzinomgewebe mit nachweisbarer und selektiver PpIX-Anreicherung reagiert. 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 Gewebestanden entnommen. Das entnommene Gewebe wird zu einem Teil der pathologischen Untersuchung (gefärbte und Gefrierschnitte), zum andern Teil einer chemischen PpIX-Extraktion zugeführt. Bisher konnten 3 Patientinnen eingebracht werden. Leider konnten nur eine äußerst geringe Akkumulation von PpIX festgestellt werden. Nach der Untersuchung von tastbaren Knoten steht die Untersuchung nicht-palpabler Tumoren an.

Fiberoptisches Hämatofluorometer: Fluoreszenznachweis von Zink-PpIX als Indikator eines Eisenmangels

Herbert Stepp, Georg Hennig, Stephan Dittmar; Klinik: Michael Vogeser (Klinische Chemie); Kooperation: Gary Brittenham (Columbia Univ., NY); Förderung: NIH beantragt

Studien zur Prävention von Folgen von Mangelernährung zeigen, dass eine Eisensubstitution signifikant das Immunsystem stärkt (z. B. zum Schutz vor Malariainfektion) bei genau den Personen, 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 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. Die Aufgabenstellung ist extrem anspruchsvoll, da die nachzuweisenden Mengen an Zink-PpIX sehr gering, die konkurrierende Absorption von Hämoglobin sehr hoch ist und spektral sehr stark überlappt und die Gewebeeigenfluoreszenz mindestens zwei Größenordnungen höher ist.

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

Ronald Sroka, Malte Hemmerich, Kathrin Siegrist; Klinik: Claus-Georg Schmedt (Krankenhaus Schäbisch-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) sind in diesem Projekt Grundlagenuntersuchungen für ein Feedback-System durchzuführen. In einem ersten Schritt ist ein faserbasiertes Temperaturmesssystem zu entwickeln, 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. Ein erstes System wurde auf der Basis der temperaturabhängigen Fluoreszenz von Rubinkristallen entwickelt und steht zur Testung im Rinder-Fuß-Modell an.

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 2010 in diesem Forschungsschwerpunkt bearbeitet:

Lithotripsie

*Ronald Sroka; Klinik: 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 Abtragate. Da der Rückstoß der Steine infolge der Energieapplikation einen nicht vernachlässigenden Nebeneffekt während der Behandlung ist, wurde ein neues innovatives Verfahren zur Untersuchung der Repulsion von Kongrementen entwickelt. Mit diesem Experiment (Pendelversuch) wurden die Effekte unterschiedlicher Lasersysteme experimentell verglichen. Zusätzlich wurde ein weiteres Modell zu Rückstoß-Untersuchungen, das horizontale Harnleitermodell 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. Nach Beendigung der Auswertephase der durchgeführten Untersuchungen sollen in 2011 mehrere Publikationen erfolgen.

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

Ronald Sroka; Klinik: Christian Betz (HNO), Andreas Leunig (HNO), Miriam Havel (HNO); Förderung: Industrie

Ziel des Projektes war es, den Einsatz eines Diodenlasers mit der Wellenlänge 1470 nm und einer Leistung bis 20 W für klinische Indikationen im Fachbereich HNO

zu untersuchen. 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. Nach Beendigung der Auswertung sind für 2011 entsprechende Publikationen geplant.

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. In die Studie konnten in 2010 sämtliche Patienten eingebracht. Die Auswertung der Daten und des Follow-up werden in 2011 erfolgen.

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

Ronald Sroka, Klinik: Wael Khoder (Urologie); Förderung: Industrie

Ziel des Projektes war es, den Einsatz des 1320-nm-Diodenlaser (max. 100 W) für die partielle Nephrektomie. Insgesamt wurden zunächst 5 Patienten offen chirurgisch und 8 Patienten für den laparoskopischen Zugang 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. Eine Optimierung des OP-Besteckes zur laparoskopischen Behandlung soll in 2011 erfolgen. Der Laser-Einsatz steht in Zusammenhang mit der Arbeitsgruppe NOTES im Kompetenznetzwerk T.E.A.M.

Untersuchungen zur Schneid- und Versiegelungspotential unterschiedlicher Lasersysteme

Ronald Sroka, Michael Fedorov, Thomas Pongratz, Kathrin Siegrist; Klinik: Wael Khoder (Urologie), Katja Zilinberg (Urologie); Förderung: Industrie

IR-Laserstrahlung im 2µm-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-Lasersystemen (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 Ablationstiefe 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. 1mm ermittelt werden. Insbesondere cw-Laser mit Emission im 2 µm-Bereich zeigen eine hohe Schneideffizienz mit reproduzierbare Gewebefeffekte (Ablation,

Koagulation) und sind damit ideal geeignet auch bei Präparationen eingesetzt zu werden. Eine erste Publikation auf der Basis wurde eingereicht und in 2011 akzeptiert.

„BetaMod“ – Wundheilungsmodulation durch lokal platzierte Betastrahler

Ronald Sroka, Kathrin Siegrist; LMU.; Walter Assmann (Physik); Klinik: Jörg Schirra (Medizinische Klinik II), Markus Bader (Urologie); Förderung: Bayerische Forschungstiftung

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.

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

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 Urethrastraktur 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) sind 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 (20W, 5sec) erfolgte mithilfe einer 10F-Hochfrequenz-Sonde im unteren Drittel des Gallenganges vom Tiermodell. 14 Tage danach erfolgt die radiologische Evaluation des Stenosegrades und die randomisierte, kontrollierte und verblindete Einlage eines 32Phosphor-Stents für eine LDR-Brachytherapie mit 30, 15, 0 Gray. Am Tag 35 erfolgt 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 Tier-Stenose-Modell 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 zeigt im Myofibroblastengehalt, im Gehalt kollagener Fasern im Fibrosegrad sowie in der Bindegewebsdicke 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

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

Es wurde eine Phase-I/II-Studie zur stereotaktischen PDT mit 5-ALA-induziertem PPIX von inoperablen Gliomrezidiven an 12 Patienten durchgeführt. Zur Bestrahlung

wurden 3-6 Lichtleitfasern verwendet, deren Positionierung auf der Basis gemessener optischer Eigenschaften von Gehirngewebe in Kombination mit Computersimulationen der zu erwartenden Lichtverteilung im Gewebe optimiert wurde. Als primäres Erfolgskriterium der Studie wurde ein Überleben von mehr als 3 Monaten und eine Zunahme des Tumolvolumens von weniger als 25% in dieser Zeit definiert. Dieses Ziel erreichten 8 Patienten. Damit verfehlte das Ergebnis jedoch mit $p=0,06$ knapp das vorgesehene Signifikanzniveau von 0,05. Immerhin erreichten 4 Patienten ein Überleben von mehr als 3 Jahren. Die Bestrahlungen werden in der Zwischenzeit in Form von Heilversuchen unter lichtdosimetrischer Betreuung durch das LFL fortgesetzt.

Dabei wurden im Rahmen des oben erwähnten Projekts „Neurotax“ erstmalig in vivo fluoreszenztechnische Untersuchungen durchgeführt u. a. mit dem Ziel, Korrelationen zwischen zugänglichen Messgrößen und dem Therapieerfolg zu finden. So wurde mit einzelnen Fasern kurzzeitig Licht eingestrahlt und jeweils alle anderen Fasern nacheinander als Detektor für Fluoreszenzlicht eingesetzt. Die Intensität der Fluoreszenz stellt dabei ein Maß für die Anreicherung des Photosensibilisators dar, und der Vergleich der Intensitäten vor und nach PDT ein Maß für das Ausbleichen und damit für den lichtdosimetrischen Erfolg der Therapie. Parallel dazu wurden an Biopsieproben über eine Extraktionsmethode fluorometrisch die Konzentrationen des Sensibilisators bestimmt. Die vorläufigen Ergebnisse legen eine Korrelation zwischen Tumorregression, beurteilt über FET-PET bzw. MRI, und der Fluoreszenzintensität nahe. Die bisherige Fallzahl von 5 lässt jedoch noch keine abschließende Beurteilung zu.

Photobleaching zur Online-Dosimetriekontrolle 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 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, falls möglich.

Optimierung der PDT von Akne

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

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

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

Sprecher: Herbert Stepp

Das im November 2008 gegründete Kompetenznetzwerk T.E.A.M. führte seine Aktivitäten auch in 2010 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 geplant, sowohl ein endoskop-taugliches OCT-Gerät neuester Generation, mit Verwendungsoptionen für alle T.E.A.M.-Mitglieder anzuschaffen. Ferner wurde im Dezember 2010 ein Großgeräteantrag zur Beschaffung des CFE-Gerätes der Fa. Mauna Kea Tech bei der DFG eingereicht. 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.

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

Klinische Untersuchungen mit endoskopisch eingesetzter optischer Kohärenztomographie (OCT)

*Herbert Stepp; Klinik: 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. Eine in Erstellung befindliche Doktorarbeit (cand. Dr. med. R. Gaschler) zeigte mit statistischen Methoden, dass charakteristische Besonderheiten in den Tiefenprofilen der OCT-Bilder zu identifizieren sind, die eine Diskriminierung der CIN-Grade mit hoher Sensitivität und Spezifität erlauben. Derzeit wird an einer Antragstellung (Wilhelm-Sander-Stiftung) zur prospektiven Untersuchung eines größeren Patientenkollektivs gearbeitet.

In Bälde sind OCT-Geräte zweiter Generation von der Fa. *Imalux* verfügbar. T.E.A.M. beabsichtigt den Kauf eines derartigen Gerätes, mit dem dann auch Untersuchungen mit Bronchoskopen möglich sein werden.

Konfokale Fluoreszenzendoskopie (CFE) zur hochaufgelösten intraoperativen Gewebediagnostik

*Herbert Stepp; Klinik: Christian Betz (HNO), Christian Dannecker (Gynäkologie), Joerg Schirra (Medizinische Klinik II), Wael Khoder (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 CFE, eine sehr weitgehende Gewebecharakterisierung intraoperativ möglich ist. Das LFL war an der Entwicklung von CFE-Geräten im Verbund Kommed 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.

Im Dezember 2010 wurde ein Großgeräteantrag zur Beschaffung des CFE-Gerätes der Fa. *Mauna Kea Tech* eingereicht.

Arbeitsgruppe „NOTES“

Herbert Stepp, Ronald Sroka; Klinik: Darius Dian (Gynäkologie), Christian Betz (HNO), Joerg Schirra (Medizinische Klinik II), Wael Khoder (Urologie)

Der Kontakt zur Firma *Karl Storz* wurde ausgebaut. Ein von *Karl Storz* entwickeltes NOTES-System *Anubiscope* wurde zunächst im LIFE-Zentrum vorgestellt. Auf der

Basis dieser Vorstellung konnte ein erstes Anwendertreffen in Straßburg im Institut IRCAD geplant werden. Bei diesem Treffen wurde das Anubiscope-System im Tierversuch erstmals erprobt. In der anschließenden Besprechungen wurden gerätetechnische Änderungswünsche erörtert. Nach erfolgter Umgestaltung des Anubiscope-Systems steht seit Dez. 2010 ein System im Klinikum zur In-vitro-Testung an einem Dummy-Torso zur Verfügung. Es ist beabsichtigt, bis Frühjahr 2011 allen T.E.A.M.-Partnern ausreichend Möglichkeit zur Testung der Praktikabilität gegeben zu haben.

Arbeitsgruppe „Funktionelle Implantate“

Ronald Sroka; LMU: Walter Assmann (Physik); Klinik: Joerg Schirra (Medizinische Klinik II), Markus Bader (Urologie)

Im Forschungsverbund „BetaMod“ wurden die tierexperimentellen Studien zur Low-dose-Beta-Bestrahlung von induzierten Stenosen in Gallengang und Urethra erfolgreich beendet. Es konnte gezeigt werden, dass durch Einlage eines Spezialkatheters mit ³²P-Beschichtung als Beta-Strahlen-Emitter der Wundheilungsprozess nach klinisch-operativem Eingriff verändert wird. Nach Abschluss der Auswertungen in beiden Projekten, ist eine klinische Studie, zunächst in der Urologie zu Behandlung der Anastomosen-Stenose nach radikaler Prostatektomie, geplant. Die entsprechenden Vorbereitungen auf technischer, sicherheits-relevanter und klinischer Seite werden sind im Gange.

3.1.5 Kooperationsverbünde

Deutsch-Russischen Kooperationsverbund Biotechnologie

Michael Fedorov, Ronald Sroka

Mit einer Förderung in Höhe von 1,1Mio. 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, der 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 Pharma-Industrie) 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.

3.2 Labor für Tumormunologie

Einführung

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

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

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

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

3.2.1 Identifizierung und Validierung von antigenen Zielstrukturen und Prognosemarkern

Identifizierung von Zielstrukturen in Tumorstammzellen des Magenkarzinoms

*Elena Vetter, Verena Passerini, Chiara Bellio, Wolfgang Zimmermann;
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, Hoechstfarbstoff ausschleusende *side populations*) und erste vergleichende Expressionsprofile der angereicherten potentiellen Stammzellen erstellen. Als viel versprechend zeigte sich der funktionelle Nachweis des Stammzellmarkers Aldehyddehydrogenase 1A1 (ALDH1A1) durch den ALDEFLUOR-Assay. Mittels dieses Nachweissystems gelang es anderen Gruppen, Tumorstammzellen für bereits eine

Reihe von Karzinomen anzureichern. Für einen Teil der von uns untersuchten Magenkarzinomzelllinien konnten wir ALDEFLUOR⁺-Subpopulationen nachweisen. Assays für die funktionelle Überprüfung der Marker-positiven Zellen durch Kultivierung unter sog. Stammzellbedingungen, die selektives Wachstum von Stammzellen als so genannte *spheres* ermöglichen und Wachstum in immundefizienten NOD/SCID-Mäusen, wurden etabliert. Gegenwärtig werden von 2 unterschiedlichen humanen Magenkarzinomzelllinien ALDEFLUOR-positiv und ALDEFLUOR-negativ Zellpopulationen auf ihr Tumorbildungsvermögen in NOD/SCID-Mäusen untersucht.

Zur Identifizierung von Tumorstammzellen in unserem transgenen Magenkarzinommodell, das pylorusnah mit 100%iger Penetranz neuroendokrine Tumoren entwickelt, verwendeten wir einen genetischen Ansatz. Nach Verpaarung mit Lgr5-EGFP-Ires-CreERT2 (Lgr5-EGFP)-Mäusen (Barker et al. Nature, 449, 1003 [2007]), in deren Stammzellen der Magenschleimhaut der Pylorusregion EGFP exprimiert wird, konnten in Tumoren doppelt transgener Mäuse (Lgr5-RGFP x TAg) allerdings keine der adulten Stammzelle ähnelnden Tumorstammzellen (mit EGFP-Expression) beobachtet werden, was deren Isolierung mittels Durchflusszytometrie ermöglicht hätte. Um zu beweisen, dass die Tumorzellen in der Tat nicht von den normalen Gewebestammzellen abstammen (entgegen der weit verbreiteten Annahme), wurden so genannte Tracing-Experimente nach Einkreuzung eines Reporterstamms (ROSA-tdRFP) durchgeführt. Es konnten genetisch markierte Nachkommen der Lgr5-exprimierenden Magenepithelstammzellen nicht in Tumoren jedoch in normaler Nachbarschleimhaut von ca. 8 Wochen alten Mäusen (Anhand ihrer Expression von rot fluoreszierendem tdRFP-Protein) nachgewiesen werden. 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. 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, Alexander Buchner, Rainer Riesenberger, Heidi Herbig, Birgit Stadlbauer, Wolfgang Zimmermann

Kürzlich wurde ein mesenchymaler Marker (CD105) für die Anreicherung von Tumorstammzellen aus Nierenzellkarzinomen (RCC) beschrieben. Wir haben diesen und andere Marker untersucht, um eine möglicherweise Tumor-initiiierende Zellpopulation weiter eingrenzen zu können. Zunächst wurden RCC-Zelllinien (RCC-26, RCC-53) untersucht, die sich erheblich in ihrem *In-vivo*-Tumorbildungspotential unterscheiden (RCC-53 >> RCC-26). Erste Untersuchungen zeigten, dass die stark tumorbildende Zelllinie RCC-53 einen großen Anteil an ALDEFLUOR⁺-Zellen und somit wahrscheinlich vermehrt Tumorstammzellen besitzt. Beide Zelllinien enthalten eine kleine Population CD105⁺ Zellen, RCC-53 des Weiteren auch eine sehr kleine Population CD133/2⁺ Zellen. Die Zelllinien exprimieren CD24, CD29, CD44, CD73, CD146 und den Transkriptionsfaktor Nestin. Funktionelle Tests der angereicherten Zellpopulationen (*Sphere-formation*- und Migrationsassays, Wachstum in

immundefizienten Mäusen), Microarrayanalysen ALDEFLUOR-positiver und -negativer Zellen sowie der Nachweis solcher Zellen in RCC-Primärtumoren werden sich anschließen. Außerdem werden wir die Wirkung der derzeit in der Therapie eingesetzten Kinaseinhibitoren (Sorafenib, Sunitinib, Pazopanib) sowie von Temsirolimus auf diese Zellen untersuchen.

Identifizierung von Zielantigenen und Prognosemarker im klarzelligen Nierenzellkarzinom durch genomweite Expressionsanalysen

Alexander Buchner, Rainer Riesenberg; Förderung: Krebshilfe (beendet)

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

Analysen zur prognostischen Bedeutung und dem möglichen Wirkmechanismus der als immunsuppressiv angesehenen Indolamin-3,2-Dioxygenase (IDO) in Tumorzellen von Lymphknotenmetastasen des RCC deuten auf eine Interaktion mit Immunzellen hin. Interferon- γ -Ausschüttung durch möglicherweise im Rahmen einer Antitumorimmunantwort stimulierte Lymphozyten könnte verantwortlich für die IDO-Expression sein (IDO wird durch Interferon γ und bestimmte Zytokine induziert) und den günstigeren Krankheitsverlauf von RCC-Patienten mit IDO-positiven Tumorzellen im Lymphknoten erklären. Dieser Mechanismus wird durch Befunde unterstützt, die zeigen, dass auch weitere, durch attackierende zytotoxische Lymphozyten (CTL) in RCC-Tumorzelllinien hochregulierbare Proteine in Lymphknoten in IDO-positiven Tumorzellen gefunden werden. Die Kandidatengene, die ähnlich wie IDO durch CTL in RCC-Zellen induziert werden, wurden durch Kokultivierung von 2 verschiedenen RCC-Zelllinien mit allogenen T-Zellen *in vitro* und nachfolgender Transkriptomanalyse der Tumorzellen identifiziert.

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

Alexander Buchner

Eine möglichst präzise individuelle Prognosebeurteilung von onkologischen Patienten ist Voraussetzung für eine individuell angepasste Therapie und für die Stratifizierung von Patienten für Therapiestudien. Artifizielle neuronale Netzwerke (ANN) sind analog zu biologischen Netzwerken aus untereinander vernetzten (Software-)Neuronen aufgebaut und können nach einer Trainingsphase komplexe, nichtlineare Zusammenhänge in Datensätzen erkennen. In der onkologischen Forschung kommen ANN in letzter Zeit zunehmend zum Einsatz. An zwei unizentrischen Follow-up-Datenbanken von Nierentumor-Patienten (gemischtes Kollektiv nach Tumornephrektomie bzw. Patienten mit fortgeschrittenem RCC und systemischer Therapie) und einer multizentrischen Follow-up-Datenbank mit ca. 2500 Blasen-tumor-Patienten nach Zystektomie wurden neuronale Netzwerke entwickelt, die Tumorrezidiv- und Tumor-spezifisches Überleben bei den meisten Patienten mit hoher Genauigkeit vorhersagen können. In einer weiteren Studie an den Zystektomie-Patienten wurden Netzwerke entwickelt, die einen fortgeschrittenen Tumorbefund (organüberschreitendes Wachstum und/oder positiver Lymphknotenstatus) auf Grund der in der zuvor durchgeführten transurethralen Resektion (TUR-B) erhobenen Befunde mit guter Genauigkeit vorhersagen können. Für alle Szenarien wurden zusätzlich Regressionsmodelle auf Grundlage der gleichen Input- und Ziel-Variablen entwickelt. Dabei zeigte sich, dass neuronale Netzwerke den Regressionsmodellen immer überlegen waren, da sie eine höhere Vorhersagegenauigkeit aufwiesen. Neuronale Netzwerke sind ein viel versprechender Ansatz für die gezielte Identifikation von High-risk- und Low-risk-Patienten und somit für die Optimierung der individuellen Beratung und Therapiewahl, außerdem ermöglichen sie eine gezielte Auswahl von Patienten mit vergleichbarem Risikoprofil für neue Therapiestudien. Durch Einbeziehung neuer molekularer Marker in die Tumordatensätze wird sich die Leistung der neuronalen Netzwerke zukünftig mit Sicherheit noch weiter erhöhen lassen.

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

Eines der größten Hemmnisse für eine erfolgreiche Tumormimmuntherapie 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-Gen-transfer in die T-Zellen von Tumorpatienten dar (Geiger et al. 2009). Aus über 40 Nierenzell- und Prostatakarzinomen konnten Tumorf infiltrierende Lymphozyten (TIL) isoliert und deren TCR-Repertoire analysiert werden. Für die Analyse Prostatakarzinom-spezifischer TCR wurde ein weiteres Drittmittelprojekt eingereicht (Leitung: H. Pohla gemeinsam mit B. Gänsbacher, TU und D. J. Schendel, Helmholtz Zentrum München; *Prostate Cancer Research Program des US Department of Defense; ein Vortrag wurde positiv begutachtet*).

Antitumorimmunpotential von photodynamischer Therapie beim Prostatakarzinom und Glioblastom

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

Die photodynamische Therapie (PDT) ist eine neuartige Modalität zur Behandlung von Krebs. Dabei werden Photosensibilisatoren oder metabolische Vorstufen, wie 5-ALA, verabreicht, die bevorzugt in Tumorzellen akkumulieren oder metabolisiert werden. Bestrahlung des Tumors mit Licht zerstört den Tumor hauptsächlich durch die Photosensibilisator-vermittelte Bildung von hochreaktivem Singulett-Sauerstoff. Es konnte gezeigt werden, dass PDT in Mäusen systemische Immunreaktionen auslösen kann, die vermutlich für das vollständige Verschwinden von Tumoren verantwortlich sind. Gelegentlich bei Gliompatienten nach PDT beobachtete vollständige Tumorregressionen legen nahe, dass auch beim Menschen durch PDT systemische Anti-Tumorimmunreaktionen ausgelöst werden. Wir haben uns zum Ziel gesetzt, die 5-ALA-basierte PDT im Sinne einer maximal wirksamen Anti-Tumorimmunantwort zu optimieren. Als Modell verwenden wir humane und murine Prostatakarzinom- sowie humane Glioblastomzelllinien. 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. Gegenwärtig versuchen wir daher, durch Hemmung dieser Enzyme durch selektiv wirkende Inhibitoren (Methyl-Jasmonat, Jasmonsäure) das Reparaturvermögen von Tumorzellen zu stören, um so, so hoffen wir, uns ein zeitlich größeres Fenster für immuntherapeutische Interventionen nach PDT zu eröffnen. Ein Manuskript zur Publikation dieser Ergebnisse wurde eingereicht und findet sich in Revision (PLoS ONE).

3.2.3 Entwicklung, Optimierung und klinische Testung von Tumorzellvakzinen

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

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

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

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

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

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

Somit zeigten sich beide Vakzinierungen als sicher und ambulant gut durchführbar in diesen Patienten mit fortgeschrittener Erkrankung. Bei fast allen Patienten waren Vakzine-induzierbare T-Zellantworten gegen mindestens eines oder mehrere Tumor-assoziierte Antigene nachweisbar. Damit sind zelluläre Tumorimpfstoffe durchaus als sinnvolle Option für zukünftige Kombinationstherapien zu bewerten. Weiterführende umfangreiche Immunmonitoring-Analysen werden derzeit durchgeführt und ebenfalls für Publikationen vorbereitet (Charakterisierung der regulatorischen T-Zellen in den Tumorpatienten, Analyse der Hautbiopsien, Zytokinmuster im Serum).

Individualisierte DC-Vakzine für Patienten mit hormonrefraktärem Prostatakarzinom

Heike Pohla, Birgit Stadlbauer (Kooperation: D.J. Schendel, HGMU)

Aus den Immunmonitoringdaten unserer Studien werden wir die besten Tumor-assoziierten Antigene heraussuchen, 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 TCR charakterisiert, um diese dann für den adoptiven Transfer TCR-transduzierter T-Zellen nutzen zu können. Für diese Projekte werden derzeit Anträge geschrieben.

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

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

IMA901 ist eine auf mehreren Tumor-assoziierten Peptiden basierende therapeutische Tumorstoffe. 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). Mittlerweile

ist auch eine multizentrische klinische Phase-II-Studie (IMA901-202 bzw. IMA901-203; Kooperation: R. Oberneder, Urologische Klinik München-Planegg) abgeschlossen und die Studien befinden sich derzeit in der Auswertung durch die Tübinger Firma. Eine klinische Phase-III-Studie mit einer Kombinationstherapie (Multipeptidvakzine + Sunitinib) beginnt im Januar 2011.

Modulation der Funktion regulatorischer T-Zellen

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

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. Tregs, in der Tumorummunologie eher unerwünscht, sind beispielsweise in der Transplantationsimmunologie zur Blockade der Gewebeabstoßung durchaus erwünscht. Für die Thematik „Modulation of xenogeneic responses via regulatory T cells“ wurde im Rahmen der DFG Transregio-Forschergruppe FOR 535 ein neues Projekt beantragt und positiv begutachtet (Kooperation: D.J. Schendel, HGMU, Herzchirurgie, Genzentrum). Für die Weiterfinanzierung des Projektes nach 2012 wurde bereits ein Konzeptpapier für die Einrichtung eines Transregio-SFB eingereicht und positiv begutachtet. Im Rahmen des Projektes sollen zunächst xenoreaktive Treg im Schweineherz-in-Affe-Transplantationsmodell hergestellt und für einen adoptiven Transfer vorbereitet werden. Im vergangenen Jahr wurden alle Methoden zur Isolierung und Anreicherung humaner und nicht-humaner Primaten Treg aus Blut und Lymphknoten etabliert. Ebenso die Generierung von DC-Zellpopulationen, die zur Herstellung von einerseits induzierbaren Treg (iTreg) und andererseits von Effektor-T-Zellen dienen. Außerdem werden derzeit Blutproben von Patienten vor und nach Transplantation für das Immunmonitoring und eine Biomarkeridentifikationsstudie auf Proteomic-Ebene gesammelt (Kooperation: LAFUGA, Genzentrum, G. Arnold). Ein wichtiger Punkt ist die Analyse der Stabilität der Suppressorfunktion der Treg. 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

Professionelles Immunmonitoring umfasst die parallele Anwendung der unterschiedlichsten Technologien, die nur zusammen die Bestimmung der Frequenz, des Phänotyps, die Funktion und die *Homing*-Kapazität Vakzine-induzierter Lymphozyten in der Zirkulation oder im Zielgewebe ermöglichen. Nur eine Kombination der Methoden wird auch zu einem validen Set von Surrogatmarkern für erfolgreiche immuntherapeutische Strategien in der Zukunft führen. Folgende Technologien wurden für das Immunmonitoring am LTI etabliert: der ELISPOT zur Quantifizierung Antigen-spezifischer T-Zell-Antworten anhand von Zytokin- bzw. Granzym- oder Perforinproduktion, *cytometric bead arrays* für die gleichzeitige Quantifizierung von

bis zu 30 verschiedenen Zytokinen und Chemokinen aus Serum und Zellkulturüberständen, der Zytokin-Sezernierungsassay bzw. *Cytokine-capture*-Assay, der eine Anreicherung z. B. CD4⁺ und CD8⁺ Tumor-spezifischer T-Zellen auch ohne Kenntnis des Antigens erlaubt, Multiparameter-Immunfluoreszenz am LSRII-FACS-Gerät, für eine kombinierte phänotypische und funktionelle Analyse verschiedener T-Zell-Subpopulationen, MHC/Peptid-Multimer-Bindungsanalysen sowie die quantitative TCR-Analyse mittels Real-time-RT-PCR. Die AG H. Pohla ist hier auch weiterhin in die Immunmonitoring-Plattform des Helmholtz Zentrums München eingebunden (<http://www.helmholtz-muenchen.de/immunmonitoring/startseite/index.html>) und hat an mehreren internationalen Ringversuchen des Cancer Immunotherapy Consortiums (CIC) des Cancer Research Institutes, New York (Janetzki et al., 2008) und der Monitoring Working Group der Association for Cancer Immunotherapy (Mander et al. 2009, Britten et al. 2009) zur Standardisierung der Immunmonitoring-Technologien auch 2010 erfolgreich teilgenommen (Einsatz serumfreien Mediums und unterschiedlicher Einfriermedien beim ELISPOT, Panel zur Gating-Strategie bei intrazellulären FACS-Analysen, Einsatz Qdot-konjugierter Multimere).

3.3 Experimentelle Urologie

3.3.1 Projektgruppe Endocannabinoide

Frank Strittmatter, Christian Gratzke

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 Blasenschwellendruckes, der Blasenkapazität und des Blasenvolumens 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 KG OEA und 8 weiblichen Ratten ein Vehikel subkutan appliziert. Drei Tage vor den geplanten urodynamischen Untersuchungen wurde in die Harnblase der Ratten ein Blasenkateter 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 nahm 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 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 prostatischer alpha1-Adrenozeptoren

Martin Hennenberg, Frank Strittmatter, Beata Rutz, Mira Perutka, Ricarda Bauer, Christian Gratzke

Bei Patienten mit benignem Prostata-Syndrom (BPS) kommt es häufig zu Miktionsbeschwerden, die zum einen durch das Wachstum der Prostata, und zum anderen durch einen erhöhten glattmuskulären Tonus in der Prostata bedingt sind. Der glattmuskuläre Tonus in der Prostata wird in erheblichem Ausmaß durch die alpha1-adrenerge Kontraktion reguliert. Dementsprechend sind Prostata-Wachstum und prostatistische 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. Daher ist die Funktion und Regulation prostaticher alpha1-Adrenozeptoren 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.

Verschiedene Anhaltspunkte legen nahe, dass die Regulation und Funktion prostaticher alpha1-Adrenozeptoren über das zur Zeit bekannte Maß hinausgehen dürfte, und sogar am Prostata-Wachstum beteiligt sein könnten. Während die Expression prostaticher alpha1-Adrenozeptoren und die Verteilung der verschiedenen Subtypen bereits Gegenstand zahlreicher Untersuchungen war, sind posttranslationale Regulation und intrazelluläre Signalgebung der prostatichen alpha1-Adrenozeptoren nur unzureichend verstanden. Dem gegenüber steht der überaus häufige Gebrauch von alpha1-Adrenozeptor Antagonisten zur Therapie von Miktionsbeschwerden. In verschiedenen Teilprojekten sollen daher neue Regulations- und Funktions-Prinzipien prostaticher alpha1-Adrenozeptoren identifiziert werden.

Die beschriebenen Untersuchungen erfolgten an humanem Prostata-Gewebe, welches im Rahmen von radikalen Prostatektomien gewonnen wurde. Die hohe Anzahl der am Klinikum durchgeführten Prostatektomien gewährleistet den Umfang der bisherigen und zukünftigen experimentellen Untersuchungen. Durch die Verwendung intakter, humaner Gewebe sind die dabei erzielten Ergebnisse von besonderer Aussagekraft. In anderen Laboren werden auf Grund mangelnder Verfügbarkeit solcher Proben in den meisten Fällen Zellkulturen, Tiermodelle, oder in begrenztem Umfang auch Resektionsspäne herangezogen.

Teilprojekt 1: Kopplung prostaticher alpha1-Adrenozeptoren an MAP Kinasen und deren Bedeutung für die Kontraktion

In diesem Teilprojekt wurde die mögliche Kopplung prostaticher alpha1-Adrenozeptoren an MAP-Kinasesignalwege untersucht. Hierzu wurden isolierte Prostata-Gewebe mit Noradrenalin, bzw. dem alpha1-Agonisten Phenylephrin untersucht. Anschließend wurde über Western-Blot Analyse mit phosphospezifischen Antikörpern der Einfluss der Stimulation auf die Aktivitäten der MAP Kinasen ERK1/2, p38 und JNK untersucht. Alle drei Kinasen sind in verschiedenen Organen und Zelltypen an der Regulation von Wachstum, Proliferation, Zellzyklus und Differenzierung beteiligt. Ihre Aktivierung erfolgt über Phosphorylierung.

Die adrenerge Stimulation führte zu einer Aktivierung von ERK1/2 und der JNK, sowie gleichzeitig zu einer Deaktivierung der p38. Über immunhistochemische Färbungen konnten alle drei Kinasen in glatten Muskelzellen humaner Prostatagewebe nachgewiesen werden. 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 das Phenylephrin-induzierte Prostatagewebe. Dies zeigt, dass die alpha1-adrenerge Regulation der ERK1/2 und p38 im Zusammenhang mit nicht-motorischen Funktionen der prostatichen alpha1-Adrenozeptoren steht.

Der JNK-Inhibitor SP600125 dagegen hemmte in myographischen Organbad-Untersuchungen die Phenylephrin-, Noradrenalin-, und electric field- (EFS-) induzierte Prostatakontraktion. Dies lässt sich nur durch eine Beteiligung der JNK-Aktivierung an der adrenergen Prostatakontraktion erklären. Bislang wurde angenommen, dass die alpha1-adrenerge Kontraktion der glatten Prostatamuskulatur durch eine intrazelluläre Aktivierung von Calcium-abhängigen Mechanismen, sowie der Protein Kinase C und der Rho-Kinase erfolgt. Die hier gewonnenen Daten ergänzen dieses bisherige Modell nun mit einem JNK-abhängigen Mechanismus. Ob sich dieser Signalweg als Angriffspunkt für neue LUTS-Therapien eignen könnte, soll durch weitere in vivo Untersuchungen in Tiermodellen geklärt werden.

Die Ergebnisse zur ERK1/2-Aktivierung wurden in 2010 zur Publikation angenommen (Bauer et al., Urol Int). Ein Manuskript zur p38-Regulation (revised version) befindet sich zurzeit in Begutachtung (Urology). Ein Manuskript zur Rolle der JNK wurde verfasst, jedoch werden derzeit noch Immunofluoreszenz-Doppelfärbungen durchgeführt. Diese Arbeit wird 2011 eingereicht (J Urol).

Teilprojekt 2: Interaktion prostatischer alpha1-Adrenozeptoren mit beta-Arrestin-2

Beta-Arrestine können an G-Protein-gekoppelte Rezeptoren binden, was zu einer Verdrängung der Rezeptor-gekoppelten G-Proteine führt. Dies zieht erhebliche Änderungen der Rezeptor-Signalgebung nach sich. Diese umfassen eine Unterbrechung der G-Protein-vermittelten Signaltransduktion, und ein gleichzeitiges Einsetzen einer Arrestin-abhängigen Signalgebung.

Über quantitative RT-PCR, Western-blot-Analysen und immunhistochemische Färbungen wurde in diesem Teilprojekt erstmalig 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 darstellt, der über den Verlauf von Symptomen und Therapie bei BPS-Patienten mitbestimmt. Darüber hinaus führen diese Ergebnisse zu einem neuen Modell des prostatischen 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 wurden in 2010 zur Publikation angenommen (Hennenberg et al., WJUI). Darüber hinaus sind Untersuchungen zur Interaktion prostatischer alpha1-Adrenozeptoren mit weiteren akzessorischen Proteinen vorgesehen.

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

Während alpha1-Adrenozeptoren zu einer Kontraktion der glatten Prostatamuskulatur führen, löst die Stimulation prostatischer beta2-Adrenozeptoren eine Relaxation aus. Über Western-Blot Analysen mit einem phosphospezifischen Antikörper konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung prostatischer alpha1-Adrenozeptoren durch Phenylephrin zu einer Transphosphorylierung von beta2-Adrenozeptoren am Serin-345/Serin-346 führt. Die Phosphorylierung des beta2-Adrenozeptors an diesen Positionen führt zu einer Desensibilisierung des Rezeptors, was wiederum eine Kontraktion begünstigen würde. Dies könnte einen weiteren,

neuen Mechanismus darstellen, den prostatiche alpha1-Adrenozeptoren für die Kontraktion verwenden. Es wird vermutet, dass diese Phosphorylierung des beta2-Adrenozeptors über eine Aktivierung der G-Protein-gekoppelten Rezeptor-Kinase 2 (GRK2) erfolgt. Die Beteiligung der *second-messenger*-Kinasen PKC und PKA konnte ausgeschlossen werden, da die Phosphorylierung des Rezeptors resistent gegen eine pharmakologische Hemmung dieser Kinasen war. Western-Blot-Analysen und immunhistochemische Färbungen zeigten, dass GRK2 in glatten Muskelzellen der humanen Prostata exprimiert wird.

Diese Ergebnisse wurden in 2010 zur Publikation angenommen (Hennenberg et al., BJU). Weitere Untersuchungen sollen klären, ob die Kommunikation zwischen verschiedenen Rezeptor-Typen in der Prostata auf G-Protein-gekoppelte Rezeptoren beschränkt ist, oder auch zwischen Rezeptor-Tyrosinkinasen (Wachstumsfaktor-Rezeptoren) und Adrenozeptoren erfolgt.

Teilprojekt 4: alpha1-adrenerge Regulation des Transkriptions-Faktors Elk1 in der humanen Prostata

Der Transkriptions-Faktor Elk1 ist aus verschiedenen Zelltypen und Organen außerhalb des Urogenitaltraktes als Effektor des ERK1/2-Signalweges bekannt. Da in Teilprojekt 1 eine Aktivierung von ERK1/2 durch prostatiche alpha1-Adrenozeptoren beobachtet wurde, die im Zusammenhang mit nicht-motorischen Rezeptor-Funktionen steht, wurde nun in Teilprojekt 4 die alpha1-adrenerge Aktivierung von Elk1 untersucht. Dies soll zu einem besseren Verständnis der nicht-motorischen alpha1-Adrenozeptor-Funktionen beitragen.

Western-Blot Analysen mit einem phospho-spezifischen 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 verschiedenen Promoter-Regionen. Untersuchungen über „electromobility shift assays“ (EMSA) 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 des prostaticen Elk1-pools in Zellkernen zu finden ist.

Diese Ergebnisse zeigen erstmalig, dass die Funktionen prostaticher alpha1-Adrenozeptoren neben der Kontraktion auch eine transkriptionelle Regulation umfassen. Da die Aktivierung von Transkriptions-Faktoren unbedingte Voraussetzung von Wachstums- und Differenzierungs-Prozessen ist, könnte dieser Mechanismus eine Verbindung zwischen der alpha1-adrenergen Funktion und dem Wachstum der Prostata bei der benignen Prostata-Hyperplasie darstellen.

Die Ergebnisse aus diesem Teilprojekt wurden in einem Manuskript zusammengefasst, welches in 2011 eingereicht wird (BJU).

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

In einem weiteren Teilprojekte wurde die adrenerge Aktivierung der Akt (syn. Protein Kinase B) in der humanen Prostata untersucht. Ähnlich wie MAP Kinasen handelt es sich bei Akt um einen weit verbreiteten Mediator von Proliferation, Wachstum, und Differenzierung, welcher durch eine Phosphorylierung aktiviert wird. Für die nicht-

maligne Prostata fehlten bislang jedoch einschlägige Untersuchungen. 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 phospho-spezifischen Antikörper konnte Noradrenalin- und Phenylephrin-induzierte Phosphorylierung der Akt 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 electric field stimulation- (EFS-) induzierte Kontraktion des Prostatagewebes blieben.

Insgesamt zeigt dies, dass sich die nicht-motorischen Funktionen prostatischer alpha1-Adrenozeptoren nicht auf eine Regulation der drei MAP Kinasen und deren Effektoren beschränken, sondern offensichtlich auch weitere Signalwege einschließen. Das Beispiel der fehlenden adrenergen Regulation des Threonin-308 verdeutlicht jedoch, dass Adrenozeptoren nicht der alleinige Regulator dieser Prozesse ist. Vermutlich ist hierbei ein komplexes Zusammenspiel zwischen adrenerger Signalgebung, Wachstums-Faktoren, und Hormonen zu berücksichtigen.

Die Ergebnisse aus diesem Teilprojekt werden zurzeit in einem Manuskript zusammengefasst, welches in 2011 eingereicht wird.

Teilprojekt 6: Caldesmon als neuer Effektor prostatischer alpha1-Adrenozeptoren

Caldesmon wurde aus verschiedenen Typen glatter Muskulatur außerhalb des unteren Harntraktes 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 ist essentielle Voraussetzung für die Kontraktion. Untersuchungen zum Vorkommen von Caldesmon und seiner Regulation in der Prostata fehlen 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. 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 prostatischen alpha1-Adrenozeptors darstellt, dessen Aktivierung an der adrenergen Kontraktion der glatten Prostata-Muskulatur beteiligt ist.

Um dieses Projekt mit einem Manuskript abschließen zu können, wurden Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen begonnen, die zurzeit noch fortgesetzt werden. Diese sollen eine Ko-Lokalisation von Caldesmon mit alpha1-Adrenozeptoren und *alpha-smooth muscle actin* (einem Marker für glatte Muskelzellen) belegen.

Anschließend werden die Ergebnisse in einem Manuskript zusammengefasst, und in 2011 eingereicht.

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 prostatistische alpha1-Adrenozeptoren um folgende Punkte erweitert werden:

1. Neben ihrer Rolle für die glattmuskuläre Kontraktion üben prostatistische 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 prostatistische 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 prostatistischer 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-Netzwerkes (MF-Netzwerkes) 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-muskarinerges 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-muskarinerges Synergie genannt. Dass dieser Effekt postsynaptisch, also an der Myozytenmembran, lokalisiert ist, konnte dadurch bewiesen werden, dass adrenerge Stimulation nicht nur elektrisch evozierte Kontraktionen, sondern auch Spannung, die durch muskarinergische Aktivierung hervorgerufen wird, potenziert. Z. B. verstärkten 10 μ M Phenylephrin die Kontraktion, die durch 1 μ M 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 muskarinergische Komponente der kombinierten Intervention zeigt deutlich, dass die adreno-muskarinergische 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 Verschußdruck im Falle unwillkürlicher Detrusorkontraktionen zur Folge haben und dadurch Inkontinenz vermeiden helfen.

Durch die vorgelegten Arbeiten konnte die Blasenbasis als Ort ausgeprägter spontaner Aktivität beschrieben werden. Deutliche spontane $[Ca^{2+}]_i$ -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 Trigonums 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 Rezeptordichte)? Oder ist die neuromuskuläre Einheit intakt und der Defekt auf einer höheren – spinalen – Ebene zu suchen? Wir haben als erste bedeutende synergistische Effekte in der neuromuskulären Aktivierung und eine starke Spontanaktivität der Blasenaußflußregion im Tiermodell beschrieben. Diese Mechanismen könnten relevant für die Kontinenz auch beim Menschen sein.

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

- 1) Ein ausgeprägter adreno-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 Rezeptordichte.

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 Tumorzeldisseminations 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 Tumorzellwachstum und Metastasierung ist die Vaskularisierung durch Angiogenese und postnatale Vaskulogenese. Neben Endothelzellen und endothelialen Vorläuferzellen (EPC), spielen auch akzessorische hämatopoietische 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 hämatopoietischen 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	k€
Laser- Forschungslabor				
1	BMBF (13N10172)	Stepp, Johansson	09-11	255
2	Bayer. Forschungsstiftung (AZ-712-06)	Sroka	09-10	180
3	HoKa – Thüringen	Sroka	09-12	50
4	Firma Karl Storz	Baumgartner, Stepp	10	30
5	Firma Medac	Baumgartner	09-10	33
6	Bayer. Forschungsstiftung (AZ-785-07)	Beyer, Baumgartner	08-10	132
7	Wissenschaftsministerium (Kap. 1528)	Baumgartner, Sroka	10	150
<i>Summe</i>				830
Labor für Tumorummunologie				
1	DAAD-Postdoc-Stipendium (A/07/73021/Ref. 414)	Tölge	08-10	24
2	„Molekulare und systembiologische Medizin“ der LMU München (25/2009)	Zimmermann	10-11	16

3	„Molekulare und systembiologische Medizin“ der LMU München (19/2010)	Zimmermann, Tölge	11-12	16
4	DFG Transregio FOR 535, Projekt X	Pohla	10-12	201
Summe				257
Experimentelle Urologie				
6	Else-Kröner-Fresenius-Stiftung	Tilki	08-10	151
9	DFG (DFG RO 3589/2-1)	Roosen	09-10	55
27	FöFoLe	Hennenberg	10	44
2	DFG (TI 690/2-1)	Tilki	10-13	315
Summe				565
Gesamt				1.652

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 of European Laser Association (ELA)
- Seit Oktober 2010 Leiter des Laser-Forschungslabors
- Berufung zur Mitwirkung am Strategieprozess Agenda Photonik 2020 des BMBF

Dr. hum. biol. Herbert Stepp:

- Seit 2009 Council Member of Head & Neck Optical Diagnostic Society (HNODS)

5.1.2 Abgeschlossene Habilitationen, Promotionen und Diplomarbeiten

Dr. med. dent. Alexander Ackermann

Dr. med. Eva Wilmanns

Dr. med. Julia Malsy Mink

Dr. med. Michaela Hilburger

Dr. rer. biol. hum. Tobias Beck

Dipl.-Phys. Georg Hennig

Bachelor Daniel Steigenhöfer

Bachelor Kristina Nehls

5.2 Labor für Tumormunologie

5.2.1 Ernennungen und Preise

Dr. med. Alexander Buchner:

- “Best Poster Presentation” in der Sitzung “Penis Cancer” beim 25. Kongress der EAU (European Association of Urology) 2010 in Barcelona

cand. med. Rosemarie Krupar:

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

5.2.2 Abgeschlossene Habilitationen, Promotionen und Diplomarbeiten

Im Berichtszeitraum wurden keine experimentellen Doktor- und Diplomarbeiten abgeschlossen.

5.3 Experimentelle Urologie

5.3.1 Ernennungen und Preise

PD Dr. med. Derya Tilki:

- Science Around Thirty-Preis 2010 (Deutsche Gesellschaft für Urologie)
- Habilitationspreis der LMU 2010
- C.E. Alken-Preis 2010

PD Dr. med. Christian Gratzke:

- Maximilian-Nitze-Preis 2010 (Deutsche Gesellschaft für Urologie)

5.3.2 Abgeschlossene Habilitationen, Promotionen und Diplomarbeiten

PD Dr. med. Christian Gratzke

PD Dr. med. Alexander Roosen

PD Dr. med. Derya Tilki

Im Berichtszeitraum wurden keine experimentellen Doktorarbeiten abgeschlossen.

6. Publikationen (Originalarbeiten)

6.1 Laser-Forschungslabor

1. Andersson-Engels S, **Stepp H**: Therapeutic laser application and tissue interactions: bringing light into clinical practice. *J Biophotonics* 3(5-6), 259-260 (2010). **IF 1,558**
2. Bader MJ, Gratzke C, Walther S, Schlenker B, Tilki D, Hocaoglu Y, **Sroka R**, Stief CG, Reich O: The PolyScope: a modular design, semidisposable flexible ureterorenoscope system. *J Endourol* 24(7), 1061-1066 (2010). **IF 1,754**
3. Bader MJ, Gratzke C, Walther S, Weidlich P, Stähler M, Seitz M, **Sroka R**, Reich O, Stief CG, Schlenker B: Efficacy of retrograde ureteropyeloscopic holmium laser lithotripsy for intrarenal calculi >2 cm. *Urol Res* 38(5), 397-402 (2010). **IF 1,465**

4. Bader MJ, Tilki D, Gratzke C, **Sroka R**, Stief CG, Reich O: Ho:YAG-laser: treatment of vesicourethral strictures after radical prostatectomy. *World J Urol* 28(2), 169-172 (2010). **IF 2,629**
5. **Johansson A**, Kreth FW, Stummer W, **Stepp H**: Interstitial Photodynamic Therapy of Brain Tumors. *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics* 16(4), 841-853 (2010). **IF 3,064**
6. **Johansson A**, **Palte G**, Schnell O, Tonn JC, Herms J, **Stepp H**: 5-Aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX levels in tissue of human malignant brain tumors. *Photochem Photobiol* 86(6), 1373-1378 (2010). **IF 2,253**
7. Karl A, **Stepp H**, Willmann E, Buchner A, Hocaoglu Y, Stief C, Tritschler S: Optical coherence tomography for bladder cancer - ready as a surrogate for optical biopsy? Results of a prospective mono-centre study. *Eur J Med Res* 15(3), 131-134 (2010). **IF 1,130**
8. Müller-Lisse UL, Bader M, Bauer M, Engelram E, Hocaoglu Y, **Püls M**, Meissner OA, Babaryka G, **Sroka R**, Stief CG, Reiser MF, Müller-Lisse UG: Optical coherence tomography of the upper urinary tract: Review of initial experience ex vivo and in vivo. *Medical Laser Application* 25(1), 44-52 (2010). **IF not listed**
9. Schmedt CG, **Sroka R**, Sadeghi M, Steckmeier BM, Hupp T: Neue Entwicklungen der endovenösen Lasertherapie. *Gefäßchirurgie* 15(2), 125-132 (2010). **IF not listed**
10. Schmedt CG, Blagova R, Karimi-Poor N, Burgmeier C, Steckmeier S, **Beck T**, **Hecht V**, **Meier R**, Sadeghi-Azandaryani M, Steckmeier B, **Sroka R**: Update of endovenous laser therapy and the latest application studies. *Medical Laser Application* 25(1), 34-43 (2010). **IF not listed**
11. **Sroka R**, **Weick K**, Sadeghi-Azandaryani M, Steckmeier B, Schmedt CG: Endovenous laser therapy - application studies and latest investigations. *J Biophotonics* 3(5-6), 269-276 (2010). **IF 1,558**
12. **Stepp H**, **Sroka R**: Possibilities of lasers within NOTES. *Minim Invasive Ther Allied Technol* 19(5), 274-280 (2010). **IF 1.330**
13. **Thomsen K**, **Meier R**, **Stepp H**, **Sroka R**: Development of a confocal and two-photon endomicroscope - Preliminary results of qualitative evaluation. *Medical Laser Application* 25(3), 166-172 (2010). **IF not listed**
14. 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**
15. Upile T, Jerjes WK, Sterenborg HJ, Wong BJ, El Naggat AK, Ilgner JF, Sandison A, Witjes MJ, Biel MA, van Veen R, Hamdoon Z, Gillenwater A, Mosse CA, Robinson DJ, Betz CS, **Stepp H**, Bolotine L, McKenzie G, Barr H, Chen Z, Berg K, D'Cruz AK, Sudhoff H, Stone N, Kendall C, Fisher S, MacRobert AJ, Leunig A, Olivo M, Richards-Kortum R, Soo KC, Bagnato V, Choo-Smith LP, Svanberg K, Tan IB, Wilson BC, Wolfsen H, Bigio I, Yodh AG, Hopper C: At the frontiers of surgery: review. *Head Neck Oncol* 3 (2011). accepted. **IF not listed**

6.2 Labor für Tumorimmunologie

1. **Buchner A, Pohla H**, Willimsky G, Frankenberger B, Frank R, Baur-Melnyk A, Siebels M, Stief CG, Hofstetter A, Kopp J, Pezzutto A, Blankenstein T, Oberneder R, Schendel DJ. Phase I Trial of an Allogeneic Gene-modified Tumor Cell Vaccine (RCC-26/CD80/IL-2) in Patients with Metastatic Renal Cell Carcinoma. *Hum Gene Ther* 21(3): 285-297 (2010). **IF 4.104**
2. **Buchner A, Castro M, Hennig A, Popp T**, Assmann G, Stief CG, **Zimmermann W**. Downregulation of HNF-1B in renal cell carcinoma is associated with tumor progression and poor prognosis. *Urology* 76:507-11 (2010). **IF 2.365**
3. 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 carcinoma: a clinical phase I study. *Gene Ther* 2010 [Epub]. **IF 4.745**
4. Tilki D, Singer BB, Shariat SF, Behrend A, Fernando M, Irmak S, **Buchner A**, Hooper AT, Stief CG, Reich O, Ergün S. CEACAM1: A novel urinary marker for bladder cancer detection. *Eur Urol*, 57, 648-654 (2010). **IF 7.667**
5. **Kammerer R** and **Zimmermann W**. Coevolution of activating and inhibitory receptors within mammalian carcinoembryonic antigen (CEA) families. *BMC Biol*, 8:12 (2010). **IF 4.734**
6. Bourquin C, von der Borch P, Zoglmeier C, Anz D, Sandholzer N, Wurzenberger C, Denzel A, **Kammerer R, Zimmermann W**, Endres S. Efficient eradication of subcutaneous but not of autochthonous gastric tumors by adoptive T cell transfer in a SV40 T antigen mouse model. *J Immunol*, 185, 2580-2588 (2010). **IF 6.000**
7. Muenzner-Voigt P, Bachmann V, **Zimmermann W**, Hentschel J, Hauck CR. Human-restricted bacterial pathogens block shedding of epithelial cells by stimulating integrin activation. *Science*, 329, 1197-201 (2010). **IF 29.747**
8. Mander A, Gouttefangeas S, Ottensmeier C, Welters MJ, Low L, van der Burgh SH, Britten CM and the ELISPOT proficiency panel: Thor Straten P, Kämpgen E, Mackensen A, Veelken H, Riemann D, Giannopoulos K, Schultz E, **Pohla H**, Walter S, Schmitt M, Beyer M, Paulie S, Maier R, Paschen A, Speiser D. Serum is not required for ex vivo IFN- γ ELISPOT: a collaborative study of different protocols from the European CIMT Immunoguiding Program. *Cancer Immunol Immunother* 59, 619-627 (2010). **IF 3.804**

6.3 Experimentelle Urologie

1. Kilic N, **Tilki D**, Ergün B, **Seitz M, Stief CG, Reich O**, Ergün S. Epithelial versus endothelial CEACAM1 expression and angiogenesis in epididymal adenomatoid tumor. *Anticancer Res.* 2010;30(7): 2651-7
2. Ergün S, **Tilki D**, Klein D. Vascular wall as a reservoir for different types of stem and progenitor cells. *Antioxid Redox Signal.* 2010; [Epub ahead of print]

3. Andersson KE, **Gratzke C**, Hedlund P. The role of the transient receptor potential (TRP) superfamily of cation-selective channels in the management of the overactive bladder. **BJU Int.** 2010;**106(8): 1114-27**
4. **Gozzi C, Roosen A, Bastian PJ, Karl A, Stief C, Tritschler S.** Volar onlay urethroplasty for reconstruction of female urethra in recurrent stricture disease. **BJU Int.** 2010; [Epub ahead of print]
5. **Schlenker B**, Matiasek K, Saur D, **Gratzke C, Bauer RM**, Herouy Y, Arndt C, Blesch A, Hartung R, **Stief CG**, Weidner N, May F. Effects of cavernous nerve reconstruction on expression of nitric oxide synthase isoforms in rats. **BJU Int.** 2010; [Epub ahead of print]
6. **Schlenker B, Tilki D, Seitz M, Bader MJ, Reich O**, Schneede P, Hungerhuber E, **Stief CG, Gratzke C.** Organ-preserving neodymium-yttrium-aluminium-garnet laser therapy for penile carcinoma: a long-term follow-up. **BJU Int.** 2010; [Epub ahead of print]
7. Shariat SF, Svatek RS, **Tilki D**, Skinner E, Karakiewicz PI, Capitanio U, Bastian PJ, Volkmer BG, Kassouf W, Novara G, Fritsche HM, Izawa JI, Ficarra V, Lerner SP, Sagalowsky AI, Schoenberg MP, Kamat AM, Dinney CP, Lotan Y, Marberger MJ, Fradet Y. International validation of the prognostic value of lymphovascular invasion in patients treated with radical cystectomy. **BJU Int.** 2010;**105(10): 1402-12**
8. Sonpavde G, Khan MM, Svatek RS, Lee R, Novara G, **Tilki D**, Lerner SP, Amiel GE, Skinner E, Karakiewicz PI, **Bastian PJ**, Kassouf W, Fritsche HM, Izawa JI, Ficarra V, Dinney CP, Lotan Y, Fradet Y, Shariat SF. Prognostic risk stratification of pathological stage T2N0 bladder cancer after radical cystectomy. **BJU Int.** 2010; [Epub ahead of print]
9. **Tritschler S, Karl A, Sommer ML, Straub J, Strittmatter F, Tilki D, Hocaoglu Y, Stief C, Zaak D.** Influence of clinical information on the interpretation of urinary cytology in bladder cancer: how suggestible is a cytologist? **BJU Int.** 2010; [Epub ahead of print]
10. **Schlenker B, Gratzke C, Seitz M, von Walter P, Tilki D, Reich O, Zaak D, Stief CG, Bader MJ.** Minimizing complications during retropubic radical prostatectomy - Is ureteral stenting necessary? **Eur J Med Res.** 2010;**15(3): 121-3**
11. **Schlenker B, Seitz M, Bader MJ, Ganzer R, Tilki D, Bayrle F, Reich O, Staehler M, Bachmann A, Stief CG, Gratzke C.** Comparison of guideline recommendations with daily practice in patients with renal cell carcinoma. **Eur J Med Res.** 2010;**15(6): 253-7**
12. **Staehler M, Haseke N, Roosen A, Stadler T, Bader M, Siebels M, Karl A, Stief CG.** Sorafenib after Combination Therapy with Gemcitabine plus Doxorubicine in Patients with Sarcomatoid Renal Cell Carcinoma: A Prospective Evaluation. **Eur J Med Res.** 2010;**15(7): 287-91**
13. Fritsche HM, Burger M, Svatek RS, Jeldres C, Karakiewicz PI, Novara G, Skinner E, Denzinger S, Fradet Y, Isbarn H, **Bastian PJ**, Volkmer BG, Montorsi F, Kassouf W, **Tilki D**, Otto W, Capitanio U, Izawa JI, Ficarra V, Lerner S, Sagalowsky AI, Schoenberg M, Kamat A, Dinney CP, Lotan Y, Shariat SF. Characteristics and outcomes of patients with clinical t1 grade 3 urothelial

- carcinoma treated with radical cystectomy: results from an international cohort. **Eur Urol. 2010;57(2): 300-9 [PDF]**
14. **Gratzke C**, Christ GJ, **Stief CG**, Andersson KE, Hedlund P. Localization and function of cannabinoid receptors in the corpus cavernosum: basis for modulation of nitric oxide synthase nerve activity. **Eur Urol. 2010;57(2): 342-8 [PDF]**
 15. **Gratzke C**, Streng T, **Stief CG**, Downs TR, Alroy I, Rosenbaum JS, Andersson KE, Hedlund P. Effects of Cannabinor, a Novel Selective Cannabinoid 2 Receptor Agonist, on Bladder Function in Normal Rats. **Eur Urol. 2010;57: 1093-1100 [PDF]**
 16. **Gratzke C**, **Weinhold P**, **Reich O**, **Seitz M**, **Schlenker B**, **Stief CG**, Andersson KE, Hedlund P. Transient Receptor Potential A1 and Cannabinoid Receptor Activity in Human Normal and Hyperplastic Prostate: Relation to Nerves and Interstitial Cells. **Eur Urol. 2010;57(5): 902-10 [PDF]**
 17. **Reich O**, **Schlenker B**, **Gratzke C**, **Tilki D**, Riecken M, **Stief C**, **Seitz M**, Bachmann A. Plasma Vaporisation of the Prostate: Initial Clinical Results. **Eur Urol. 2010;57: 693-98 [PDF]**
 18. **Tilki D**, **Reich O**, Karakiewicz PI, Novara G, Kassouf W, Ergün S, Fradet Y, Ficarra V, Sonpavde G, **Stief CG**, Skinner E, Svatek RS, Lotan Y, Sagalowsky AI, Shariat SF. Validation of the AJCC TNM Substaging of pT2 Bladder Cancer: Deep Muscle Invasion Is Associated with Significantly Worse Outcome. **Eur Urol. 2010;58: 112-7 [PDF]**
 19. **Tilki D**, Singer BB, Shariat SF, Behrend A, Fernando M, Irmak S, **Buchner A**, Hooper AT, **Stief CG**, **Reich O**, Ergün S. CEACAM1: A Novel Urinary Marker for Bladder Cancer Detection. **Eur Urol. 2010;57: 648-54 [PDF]**
 20. Steib CJ, **Hennenberg M**, Beitinger F, Hartmann AC, Bystron M, De Toni EN, Gerbes AL. Amiloride reduces portal hypertension in rat liver cirrhosis. **Gut. 2010;59(6): 827-36**
 21. Steib CJ, Bilzer M, op den Winkel M, Pfeiler S, Hartmann AC, **Hennenberg M**, Göke B, Gerbes AL. Treatment with the leukotriene inhibitor montelukast for 10 days attenuates portal hypertension in rat liver cirrhosis. **Hepatology. 2010;51(6): 2086-96**
 22. Klein D, Hohn HP, Kleff V, **Tilki D**, Ergün S. Vascular wall-resident stem cells. **Histol Histopathol. 2010;25(5): 681-9.**
 23. **Bader MJ**, **Gratzke C**, **Walther S**, **Schlenker B**, **Tilki D**, **Hocaoglu Y**, Sroka R, **Stief CG**, **Reich O**. The PolyScope: a modular design, semidisposable flexible ureterorenoscope system. **J Endourol. 2010;24(7): 1061-6**
 24. Tan G, Srivastava A, Grover S, Peters D, Dorsey P, Scott A, Jhaveri J, **Tilki D**, Te A, Tewari A. Optimizing vesicourethral anastomosis healing after robot-assisted laparoscopic radical prostatectomy: lessons learned from three techniques in 1900 patients. **J Endourol. 2010;24(12): 1975-83**
 25. **Gratzke C**, Angulo J, Chitale K, Dai YT, Kim NN, Paick JS, Simonsen U, Uckert S, Wespes E, Andersson KE, Lue TF, **Stief CG**. Anatomy, physiology, and pathophysiology of erectile dysfunction. **J Sex Med. 2010;7(1 Pt 2): 445-75**

26. **Füllhase C**, Soler R, **Gratzke C**, Brodsky M, Christ GJ, Andersson KE. Spinal effects of the fesoterodine metabolite 5-hydroxymethyl tolterodine and/or doxazosin in rats with or without partial urethral obstruction. **J Urol.** **2010;184(2): 783-9**
27. **Gratzke C** Editorial comment. **J Urol.** **2010;183(1): 132**
28. **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.** **2010; [Epub ahead of print]**
29. **Gratzke C**, Strong TD, Gebska MA, Champion HC, **Stief CG**, Burnett AL, Bivalacqua TJ. Activated RhoA/Rho kinase impairs erectile function after cavernous nerve injury in rats. **J Urol.** **2010;184(5): 2197-204**
30. Novara G, Svatek RS, Karakiewicz PI, Skinner E, Ficarra V, Fradet Y, Lotan Y, Isbarn H, Capitanio U, Bastian PJ, Kassouf W, Fritsche HM, Izawa JI, **Tilki D**, Dinney CP, Lerner SP, Schoenberg M, Volkmer BG, Sagalowsky AI, Shariat SF. Soft tissue surgical margin status is a powerful predictor of outcomes after radical cystectomy: a multicenter study of more than 4,400 patients. **J Urol.** **2010;183(6): 2165-70**
31. Sonpavde G, Khan MM, Lerner SP, Svatek RS, Novara G, Karakiewicz PI, Skinner E, **Tilki D**, Kassouf W, Fradet Y, Dinney CP, Fritsche HM, Izawa JI, **Bastian PJ**, Ficarra V, Schoenberg M, Sagalowsky AI, Lotan Y, Shariat SF. Disease-Free Survival at 2 or 3 Years Correlates With 5-Year Overall Survival of Patients Undergoing Radical Cystectomy for Muscle Invasive Bladder Cancer. **J Urol.** **2010; [Epub ahead of print]**
32. **Tilki D**, **Reich O**, Svatek RS, Karakiewicz PI, Kassouf W, Novara G, Ficarra V, Chade DC, Fritsche HM, Gerwens N, Izawa JI, Lerner SP, Schoenberg M, **Stief CG**, Skinner E, Lotan Y, Sagalowsky AI, Shariat SF. Characteristics and outcomes of patients with clinical carcinoma in situ only treated with radical cystectomy: an international study of 243 patients. **J Urol.** **2010;183(5): 1757-63**
33. **Tilki D**, Svatek RS, Karakiewicz PI, Novara G, **Seitz M**, Sonpavde G, Gupta A, Kassouf W, Fradet Y, Ficarra V, Skinner E, Lotan Y, Sagalowsky AI, **Stief CG**, **Reich O**, Shariat SF. pT3 Substaging is a prognostic indicator for lymph node negative urothelial carcinoma of the bladder. **J Urol.** **2010;184(2): 470-4**
34. **Tilki D**, Svatek RS, Karakiewicz PI, Isbarn H, **Reich O**, Kassouf W, Fradet Y, Novara G, Fritsche HM, **Bastian PJ**, Izawa JI, **Stief CG**, Ficarra V, Lerner SP, Schoenberg M, Dinney CP, Skinner E, Lotan Y, Sagalowsky AI, Shariat SF. Characteristics and outcomes of patients with pT4 urothelial carcinoma at radical cystectomy: a retrospective international study of 583 patients. **J Urol.** **2010;183(1): 87-93**
35. **Tilki D**, Svatek RS, Novara G, **Seitz M**, Godoy G, Karakiewicz PI, Kassouf W, Fradet Y, Fritsche HM, Sonpavde G, Izawa JI, Ficarra V, Lerner SP, Schoenberg M, **Stief CG**, Dinney CP, Skinner E, Lotan Y, Sagalowsky AI, Reich O, Shariat. SFStage pT0 at radical cystectomy confers improved survival: an international study of 4,430 patients. **J Urol.** **2010;184(3): 888-94**

36. **Weinhold P, Gratzke C, Streng T, Stief C, Andersson KE, Hedlund P.** TRPA1 receptor induced relaxation of the human urethra involves TRPV1 and cannabinoid receptor mediated signals, and cyclooxygenase activation. **J Urol.** 2010;183(5): 2070-6
37. **Steib CJ, Hartmann AC, v Hesler C, Benesic A, Hennenberg M, Bilzer M, Gerbes AL.** Intraperitoneal LPS amplifies portal hypertension in rat liver fibrosis. **Lab Invest.** 2010;90(7): 1024-32
38. **Shariat SF, Tilki D.** Bladder cancer: Nomogram aids clinical decision making after radical cystectomy. **Nat Rev Urol.** 2010;7(4): 182-4
39. **Jäger T, Becker M, Eisenhardt A, Tilki D, Tötsch M, Schmid KW, Romics I, Rübber H, Ergün S, Szarvas T.** The prognostic value of cadherin switch in bladder cancer. **Oncol Rep.** 2010;23(4): 1125-32
40. **Seitz M, Strittmatter F, Roosen A, Tilki D, Gratzke C.** Current status of ultrasound imaging in prostate cancer. **Panminerva Med.** 2010;52(3): 189-94
41. **Bauer RM, Gratzke C, Roosen A, Hocaoglu Y, Mayer ME, Buchner A, Stief CG, May F.** Patient-Reported Side Effects of Intradetrusor Botulinum Toxin Type A for Idiopathic Overactive Bladder Syndrome. **Urol Int.** 2010; [Epub ahead of print]
42. **Staehler M, Haseke N, Stadler T, Nuhn P, Roosen A, Stief CG, Wilkowski R.** Feasibility and effects of high-dose hypofractionated radiation therapy and simultaneous multi-kinase inhibition with sunitinib in progressive metastatic renal cell cancer. **Urol Oncol.** 2010; [Epub ahead of print]
43. **Bader MJ, Gratzke C, Walther S, Weidlich P, Staehler M, Seitz M, Sroka R, Reich O, Stief CG, Schlenker B.** Efficacy of retrograde ureteropyeloscopic holmium laser lithotripsy for intrarenal calculi >2 cm. **Urol Res.** 2010; [Epub ahead of print]
44. **Bastian PJ, Nuhn P, Stadler TC, Roosen A, Stief CG.** [Prostatic inflammation and prostate cancer] **Urologe A.** 2010;49(5): 636-8
45. **Karl A, Tritschler S, Zaak D, Tilki D, Stief C, Burger M.** [Diagnostic procedure for bladder cancer. Standards and current developments]. **Urologe A.** 2010;49(10): 1303-11; quiz 1312
46. **May M, Fritsche HM, Brookman-May S, Burger M, Bolenz C, Trojan L, Herrmann E, Michel MS, Wülfing C, Tiemann A, Müller SC, Ellinger J, Buchner A, Stief CG, Tilki D, Wieland WF, Gilfrich C, Höfner T, Hohenfellner M, Haferkamp A, Roigas J, Zacharias M, Gunia S, Bastian PJ.** [Patients with bladder cancer in clinical stage T2 : survival benefit of downstaging in comparison to patients with confirmed muscle invasion in cystectomy specimens]. **Urologe A.** 2010;49(12): 1508-15
47. **Reich O, Seitz M, Gratzke C, Schlenker B, Walther S, Stief C** [Benign prostatic hyperplasia (BPH) : Surgical therapy options] **Urologe A.** 2010;49(1): 113-26
48. **Seitz M, Bader M, Strittmatter F, Gratzke C, Tilki D, Roosen A, Schlenker B, Reich O, Stief C.** [Diagnostic work-up for lymph node metastases of urological tumors] **Urologe A.** 2010;49(3): 356-63

49. **Bauer RM, Mayer ME, May F, Gratzke C, Buchner A, Soljanik I, Bastian PJ, Stief CG, Gozzi C.** Complications of the AdVance transobturator male sling in the treatment of male stress urinary incontinence. **Urology. 2010;75(6): 1494-8**
50. **Tritschler S, Sommer ML, Straub J, Hocaoglu Y, Tilki D, Strittmatter F, Zaak D, Stief C, Karl A.** Urinary Cytology in Era of Fluorescence Endoscopy: Redefining the Role of an Established Method With a New Reference Standard. **Urology. 2010; [Epub ahead of print]**
51. **Bader MJ, Tilki D, Gratzke C, Sroka R, Stief CG, Reich O.** Ho:YAG-laser: treatment of vesicourethral strictures after radical prostatectomy. **World J Urol. 2010;28(2): 169-72**
52. **Stahler MD, Kruse J, Haseke N, Stadler T, Roosen A, Karl A, Stief CG, Jauch KW, Bruns CJ.** Liver resection for metastatic disease prolongs survival in renal cell carcinoma: 12-year results from a retrospective comparative analysis. **World J Urol. 2010; [Epub ahead of print]**