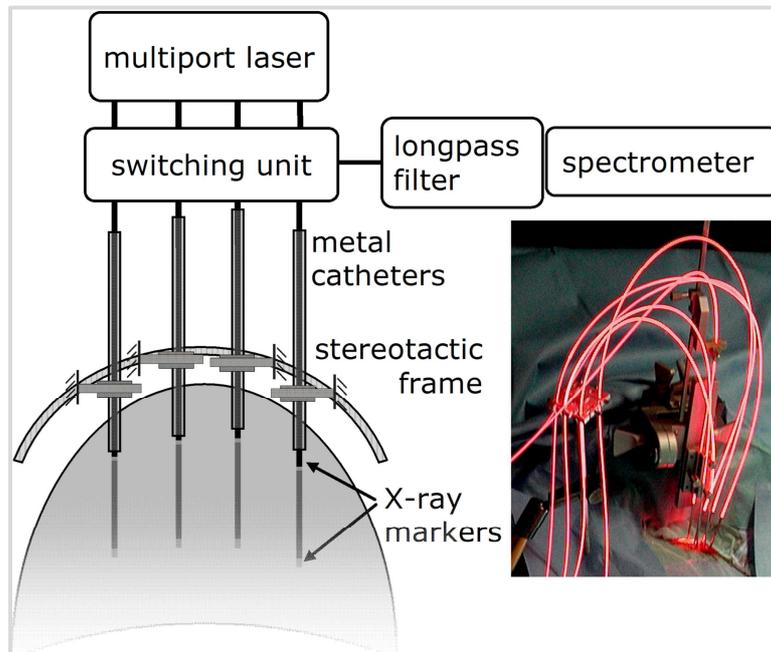




Tätigkeitsbericht LIFE-Zentrum

2013

Highlights

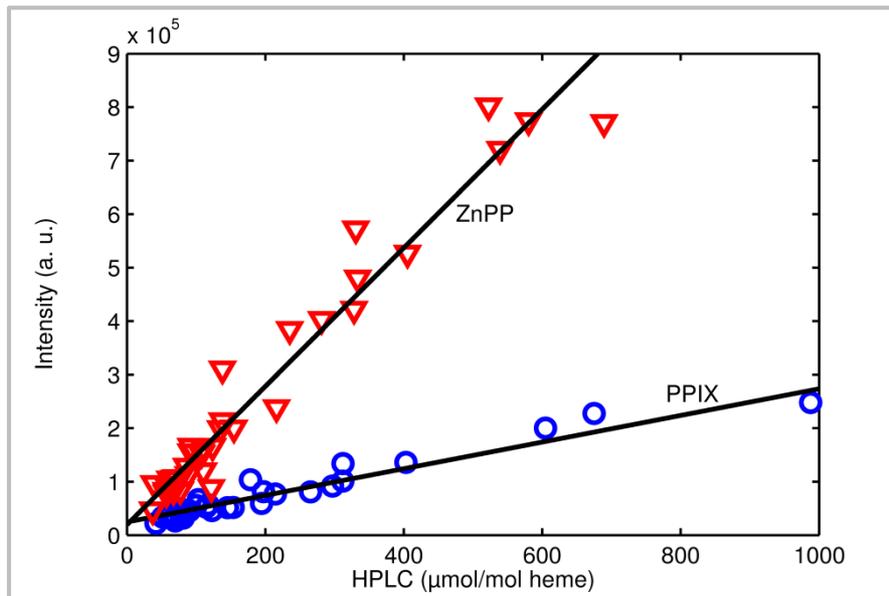


Protoporphyrin-IX-Fluoreszenz und Photobleaching während der interstitiellen PDT maligner Gliome ermöglichen prognostische Aussagen über das Behandlungsergebnis

Die interstitielle Photodynamische Therapie (iPDT) nicht resezierbarer wiederkehrender Glioblastome mit 5-Aminolävulinsäure (5-ALA) induziertem Protoporphyrin IX (PPIX) erscheint erfolversprechend. Das Ausmaß und der Einfluss der inter- und intra-tumoralen Unterschiede in der PPIX-Anreicherung wurden untersucht. Erstmals wurde im Rahmen einer klinischen Studie die PPIX-Konzentration anhand von Biopsieproben bestimmt und mit in-situ-Fluoreszenzmessungen sowie mit dem klinischen Ergebnis nach PDT korreliert.

Patienten mit hoher Anfangsfluoreszenz, entsprechend einer hohen PPIX-Konzentration im Gewebe und komplettem Ausbleichen zeigten ein verlängertes Überleben im Vergleich zu Patienten mit geringer Anfangsfluoreszenz. Mit der in-situ-Fluoreszenzmessung und dem Nachweis des kompletten Ausbleichens des Photosensibilisators scheint ein erster prognostischer Hinweis für den Erfolg der iPDT-Maßnahme möglich. Mit rezidivfreien Überlebenszeiten der Patienten mit hohen PPIX-Konzentrationen von 29, 30 und 36 Monaten liegt das Überleben der iPDT-behandelten Patienten weit über dem *best care* behandelten Patienten.

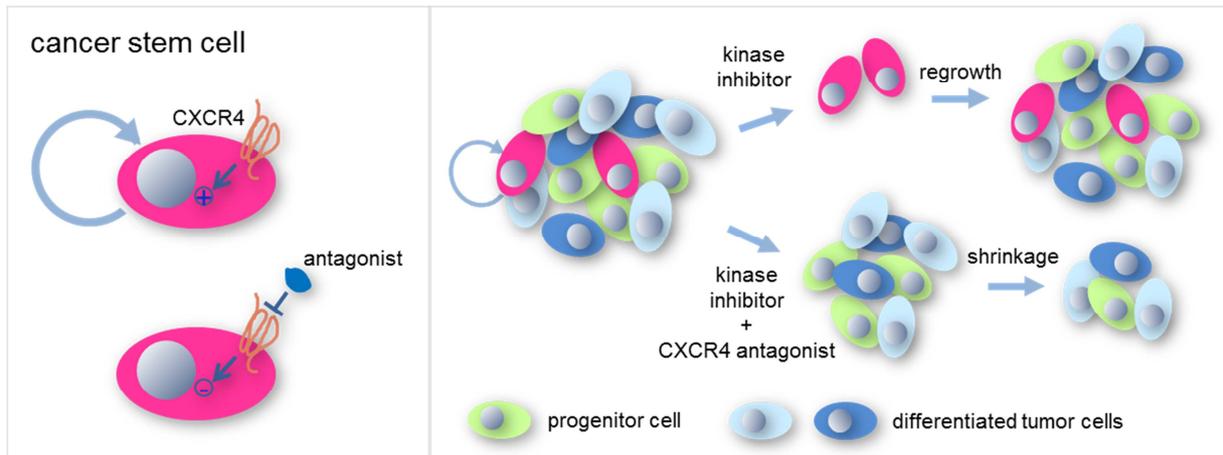
Johansson *et al.* Protoporphyrin IX fluorescence and photobleaching during interstitial photodynamic therapy of malignant gliomas for early treatment prognosis. *Lasers Surg Med* 45:225–234 (2013).



2-Wellenlängen-Anregung für den quantitativen Fluoreszenznachweis von ZnPP und PPIX zum Nachweis von Eisenmangel in Vollblut

Die Quantifizierung von Zn-Protoporphyrin (ZnPP) und Protoporphyrin IX (PPIX), sei es einzeln oder gemeinsam ist für die Diagnostik von Eisenmangel-Erkrankungen, Eisen-unterdrückter Erythropoese, Bleiexposition und Porphyrinen sinnvoll. Es wurde eine Methode für die simultane Quantifizierung von ZnPP und PPIX in nicht-gereinigtem Erythrozyten entwickelt. Vergleichsuntersuchungen mit kommerziellen Systemen (z.B.: HPLC) und anhand von gewaschenen Erythrozyten belegen, dass mit Hilfe der 2-Wellenlängen-Anregung die störende Untergrundfluoreszenz effektiv unterdrückt werden kann, und somit aufwändige Präparationsschritte entfallen können. Auf dieser Basis ist nun eine fluoreszenzgestützte In-vivo-Diagnostik ohne Blutentnahme der mit ZnPP und PPIX assoziierten Krankheiten denkbar.

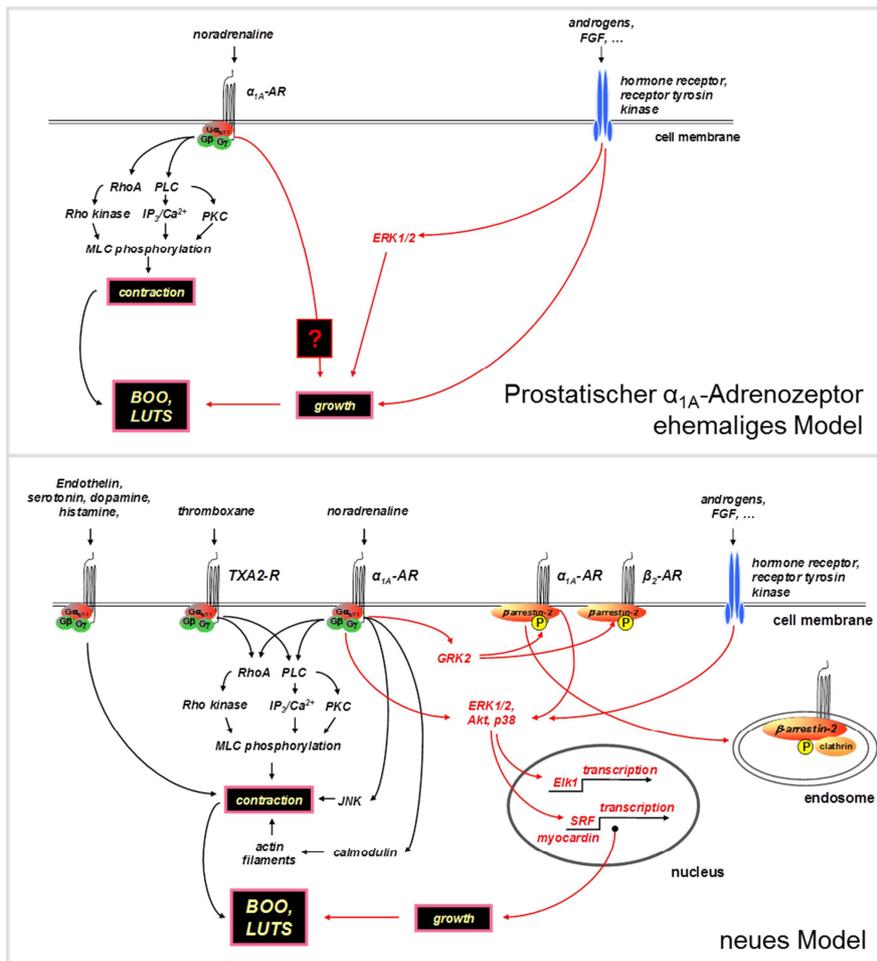
Hennig *et al.* Dual-wavelength excitation for fluorescence-based quantification of zinc protoporphyrin IX and protoporphyrin IX in whole blood. *J Biophotonics* 1–11 (2013)/DOI 10.1002/jbio.201200228.



Möglicher Schwachpunkt bei Nierentumoren entdeckt

Tumorstammzellen umfassen häufig nur einen kleinen Anteil aller Zellen in einem Tumor, spielen jedoch eine entscheidende Rolle bei der Ausbildung von Tumorheterogenität, Wachstum und Metastasierung. Da sie besonders unempfindlich gegenüber gängigen Tumormedikamenten sind, sind sie zudem wahrscheinlich wichtig für die Ausbildung von Tumorresistenz und das Wiederwachstum von Tumoren nach Therapie. Uns gelang es, in Nierenzellkarzinomzellen einen Oberflächenrezeptor, nämlich den Chemokinrezeptor 4 (CXCR4) zu identifizieren, der bevorzugt von Tumorstammzellen gebildet wird. Wir konnten zeigen, dass CXCR4-exprimierende Zellen eine Behandlung mit häufig bei diesem Tumor verwendeten Medikamenten besser überstehen. Da die Nierenzellkarzinomstammzellen diesen Rezeptor aber selbst für ihr Überleben benötigen, könnte in Zukunft eine zusätzliche Gabe von CXCR4-Hemmstoffen die Wirksamkeit von Tumorthérapien bei Nierenzellkarzinompatienten verbessern.

Gassenmaier *et al.* CXCR4 chemokine receptor 4 is essential for maintenance of renal cell carcinoma-initiating cells and predicts metastasis. *Stem Cells* 31:1467–1476 (2013).



Prostatische α_1 -Adrenozeptoren: neue Konzepte zur Funktion, Regulation und intrazellulären Signalgebung

Prostatische α_1 -Adrenozeptoren sind bei Patienten mit einer benignen Prostata-Obstruktion (BPO) entscheidend an der Pathophysiologie und Therapie von Symptomen des unteren Harntraktes (*lower urinary tract symptoms*, LUTS) beteiligt. Da die α_1 -Adrenozeptor-vermittelte Kontraktion der glatten Prostatamuskulatur wesentlich zur Blausauslass-Störung (*bladder outlet obstruction*, BOO) beiträgt, stellen α_1 -Adrenozeptor-Antagonisten den Goldstandard der medikamentösen Therapie dar. Dementsprechend ziehen die Expression und Funktion des prostatischen α_1 -Adrenozeptors seit Jahrzehnten große Aufmerksamkeit auf sich. Auf der Basis eigener Studien konnte die Arbeitsgruppe „Experimentelle Urologie“ 2013 ein neues Modell des prostatischen α_1 -Adrenozeptors entwerfen, das den vorherigen Modellen gegenübersteht und diese ergänzt. Neue Konzepte zur Funktion des prostatischen α_1 -Adrenozeptors schließen nun neue intrazelluläre Mediatoren der Kontraktion, sowie nicht-kontraktile Signalwege und eine posttranslationale Rezeptor-Regulation mit ein. Die Konfiguration des α_1 -Adrenozeptors mit verschiedenen möglichen Bindungspartnern könnte seine Funktion bestimmen, was einen dynamischen Rezeptor mit hoher funktioneller Plastizität zulässt. Verschiedene intrazelluläre Effektoren wie MAPK, Akt oder Transkriptionsfaktoren werden vermutlich kooperativ von α_1 -Adrenozeptoren, Wachstumsfaktoren und Hormonen reguliert. Entgegen den bisherigen Vermutungen ist der prostatische α_1 -Adrenozeptor kein isolierter, statischer Rezeptor, welcher ausschließlich die Kontraktion vermittelt und an G-Proteine gekoppelt ist. Vielmehr handelt es sich um einen dynamischen Rezeptor, der innerhalb eines komplexen Netzwerkes von Mediatoren mit anderen Rezeptoren interagieren kann.

Hennenberg *et al.* Prostatic α_1 -adrenoceptors: New concepts of function, regulation, and intracellular signaling. *NeuroUrol Urodyn* 2013 [Epub ahead of print].

Inhaltsverzeichnis

Highlights	3
Tätigkeitsbericht LIFE-Zentrum 2013.....	10
1. Personal	10
Laser-Forschungslabor (LFL).....	10
Labor für Tumormunologie (LTI)	10
Experimentelle Urologie	10
2. Lehre.....	11
2.1 Pflichtveranstaltungen.....	11
2.2 Wahlveranstaltungen	11
2.3 Veranstaltungen.....	11
3. Forschungsschwerpunkte.....	12
3.1 Laser-Forschungslabor	12
3.1.1 Optische <i>In-vivo</i> -Pathologie.....	12
Einfluss des Tumorstammzellmarkers ABCG2 auf die PPIX-Photosensibilisierung bei Glioblastomzellen.....	13
Verbundprojekt „Neurotax“.....	14
Verbundprojekt „FLENDOS“	15
Faseroptisches Fluoreszenzspektrometer: Nachweis von Zink-Protoporphyrin IX als Indikator von Eisenmangel	17
3.1.2 Klinische Laserbehandlungen	19
Lithotripsie	19
Untersuchungen zur Indikation des 1940-nm-Tm-Faser-Lasers in der Pulmologie	20
Untersuchungen zur Raucherentwicklung bei Laseranwendungen in der Laparoskopie	20
„BetaMod“ – Wundheilungsmodulation durch lokal platzierte Betastrahler	20
3.1.3 Photodynamische Therapie (PDT)	21
Interstitielle PDT in der Neurochirurgie	21
PDT mit Chlorin e6.....	22
Dünne zylindrische Lichtapplikatoren für die interstitielle PDT.....	23
<i>Daniel Haffa, Sebastian Fiedler, Thomas Pongratz, Wolfgang Beyer, Ronald Sroka</i>	23
3.1.4 Das Kompetenznetzwerk Endoskopie (T.E.A.M.).....	23
Klinische Untersuchungen mit endoskopisch eingesetzter optischer Kohärenztomographie (OCT).....	24
Konfokale Fluoreszenzendoskopie (pCLE) zur hochaufgelösten intraoperativen Gewebediagnostik.....	24
3.1.5 Kooperationsverbände	26

Deutsch-Russischer Kooperationsverbund Biotechnologie	26
Light4LIFE - Netzwerk	27
NanoBridge - Netzwerk.....	27
3.2 Labor für Tumorummunologie	28
Einführung	28
3.2.1 Identifizierung und Validierung von Zielstrukturen und Prognosemarkern	29
Identifizierung von Tumorstammzellen des Magenkarzinoms	29
Charakterisierung und medikamentöse Beeinflussung von Tumorstammzellen im Nierenzellkarzinom.....	32
Prognostische Bedeutung von EMT (epithelial-mesenchymale Transition)- assoziierten Genen beim Nierenzellkarzinom.....	35
Identifikation neuer Prognosemarker beim Nierenzellkarzinom mittels Expressionsprofilen und neuer Filterstrategien.....	37
3.2.2 Entwicklung, Optimierung und klinische Testung von Tumorstammzellen	39
Allogene genetisch modifizierte Tumorstammzellen zur Therapie von Patienten mit metastasiertem Nierenzellkarzinom (RCC) und von Patienten mit hormonrefraktärem Prostatakarzinom.....	39
Individualisierte DC-Vakzine für Patienten mit hormonrefraktärem Prostatakarzinom.....	41
Einsatz einer Multipeptidvakzine zur Behandlung von Patienten mit metastasiertem Nierenzellkarzinom.....	41
Einsatz einer mRNA-Vakzine zur Behandlung von Patienten mit metastasiertem hormonrefraktärem Prostatakarzinom	42
3.2.3 Untersuchungen zur T-Zellantwort nach PDT bei Glioblastomen.....	43
3.2.4 Modulation der Funktion regulatorischer T-Zellen	45
3.2.5 Weiterentwicklung des Immunmonitorings	48
3.3 Experimentelle Urologie	49
3.3.1 Projektgruppe Endocannabinoide.....	49
3.3.2 Projektgruppe „glattmuskuläre Kontraktilität und Wachstum im unteren Harntrakt“	56
Projekt 1: Effekte von Thromboxan-Rezeptor-Antagonisten auf die Kontraktion der humanen Prostata	60
Projekt 2: Akzessorische Interaktionspartner des α_1 -Adrenozeptors in der humanen Prostata.....	63
Projekt 3: EPAC-Expression und -Regulation in der humanen Prostata.....	65
Projekt 4: FAK-vermittelte Kontraktion und Effekte von FAK-Inhibitoren in der humanen Prostata.....	66
Projekt 5: Effekte von Picotamid auf die Kontraktion von humanem Blasengewebe	68
Projekt 6: Effekte von Rac-Inhibitoren in der humanen Prostata	69

Projekt 7: Effekte der Magnolien-Inhaltsstoffe, Honokiol und Magnolol in der humanen Prostata.....	71
Projekt 8: TMEM16A-vermittelte Regulation in der humanen Prostata.....	73
Projekt 9: Antworten von Stromazellen der Prostata auf Wachstumsfaktoren: qualitative und quantitative Unterschiede bei Kombination mehrerer Wachstumsfaktoren	73
4. Drittmittel.....	76
5. Ernennungen, Preise und Diplom- und Promotionsarbeiten	77
5.1 Laser-Forschungslabor	77
5.1.1 Ernennungen und Preise.....	77
5.1.2 Abgeschlossene Habilitationen, Promotionen und Diplomarbeiten	77
5.2 Labor für Tumorummunologie	77
5.2.1 Ernennungen und Preise.....	77
5.2.2 Abgeschlossene Habilitationen, Promotionen und Diplomarbeiten	77
5.3 Experimentelle Urologie	77
5.3.1 Ernennungen und Preise.....	77
5.3.2 Abgeschlossene Habilitationen, Promotionen und Diplomarbeiten	78
6. Publikationen (Originalarbeiten)	78
6.1 Laser-Forschungslabor	78
6.2 Labor für Tumorummunologie	79
6.3 Experimentelle Urologie	80
7. Patente.....	82
7.1 Laser-Forschungslabor	82

Tätigkeitsbericht LIFE-Zentrum 2013

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

Sekretariat: Kornelia Eberle (Telefon: 7095-4865)

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

1. Personal

Laser-Forschungslabor (LFL)

Wissenschaftliche Mitarbeiter

Planstellen: 3

Drittmittel: 2

Nichtwissenschaftliche Mitarbeiter

Planstellen: 1,5

Drittmittel: 0

Labor für Tumorummunologie (LTI)

Wissenschaftliche Mitarbeiter

Planstellen: 3

Drittmittel: 1

Nichtwissenschaftliche Mitarbeiter

Planstellen: 1

Drittmittel: 0

Experimentelle Urologie

Wissenschaftliche Mitarbeiter

Planstellen: 1

Drittmittel: 2

Gastwissenschaftler: 1

Nichtwissenschaftliche Mitarbeiter
Planstellen: 0
Drittmittel: 0

2. Lehre

2.1 Pflichtveranstaltungen

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

2.2 Wahlveranstaltungen

LIFE-Zentrum

LIFE-Seminar mit eingeladenen Rednern; LIFE-SommerSeminar für Doktoranden

LTI

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

10 Medizindoktoranden, eine Biologiedoktorandin (Dr. rer. nat.)

LFL

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

Physik-Hauptseminar: Anwendungen physikalischer Methoden in der Medizin;

Physik-Vorlesung mit Übungen: BioPhotonik

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

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

Schulexkursionen: Schüler entdecken Laser in der Medizin (n = 2)

13 Doktoranden in Ausbildung, davon 5 Dr. biol. hum, 4 Dr. med., 3 Dr. med. dent.,
1 Dr. rer. nat., sowie Diplomanden, Masteranden, Bacheloranden, und Praktikanten

Experimentelle Urologie

6 Medizindoktoranden

2.3 Veranstaltungen

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

SPIE-Photonics West - Biomedical Optics, San Francisco, USA, 02.–07. Februar
2013

European Conference on Biomedical Optics, Munich, Germany, 12.–16. Mai 2013

World of Photonics - Application Panel, Munich, Germany, 12.–16. Mai 2013

IV International Symposium on Topical Problems of Biophotonics, Nizhny Novgorod, Russia, 20.–27. Juli 2014

3. Forschungsschwerpunkte

Die Forschungsschwerpunkte der Forschungseinrichtung sind ausgerichtet auf die Charakterisierung von therapieresistenten Stammzellen solider Tumoren als *targets* für die Immuntherapie und anderer Therapien sowie auf die Etablierung neuer prognostischer Marker bei urologischen Tumoren, Entwicklung und klinische Validierung innovativer optischer Verfahren zur Diagnose und Therapie humaner Neoplasien mit einem Schwerpunkt Lasermedizin sowie die Identifizierung von neuen therapeutischen Ansätzen bei urologischen Tumoren. Des Weiteren steht die Entwicklung neuer Strategien zur therapeutischen Beeinflussung urologischer Funktionsstörungen (erektile Dysfunktion, Blasenentleerungsstörungen) im Fokus unserer Forschung. Das LIFE-Zentrum versteht sich als interdisziplinäre und fachübergreifende Forschungs- und Entwicklungseinheit. Auf der Basis neuer Erkenntnisse in der Medizin, Biologie und Physik werden die biologischen und physikalischen Aspekte medizinischer Fragestellungen erarbeitet, und in Kooperation mit dem medizinischen Partnern u. a. aus dem Netzwerk TEAM in klinikrelevante Techniken, Diagnose- und Behandlungsstrategien überführt.

3.1 Laser-Forschungslabor

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

3.1.1 Optische *In-vivo*-Pathologie

Bei diesem Forschungsschwerpunkt, der auch unter dem Namen *Optical Biopsy* bekannt ist, werden derzeit international endoskopgestützte Methoden entwickelt, die es erlauben sollen, eine histopathologische Befundung ohne Gewebeprobeentnahme

vorzunehmen. Dazu ist es notwendig, prämaligne und maligne Areale mit hoher Sensitivität und Spezifität vorwiegend in Hohlorganen zu lokalisieren. Als besonders wichtige klinische Indikationen erweisen sich dabei das multilokuläre Harnblasenkarzinom und Karzinome in der Lunge sowie Tumoren im Gehirn. Auch Präkanzerosen, speziell in den Fachbereichen HNO und Gynäkologie werden in diesem Zusammenhang untersucht. Durch spezielle Sonden, die über die Arbeitskanäle der Endoskope eingebracht werden, ist es möglich, sowohl die Invasion des Tumors (*staging*) als auch die zelluläre Struktur der oberflächlichen Gewebeschichten (*grading*) optisch auf einem Monitor darzustellen. Im Laser-Forschungslabor werden dazu aktuelle neue Fluoreszenzmarker eingesetzt sowie an einer Optimierung der Endomikroskopie gearbeitet. Ziel ist, alle für die *In-vivo*-Pathologie notwendigen erforderlichen Techniken in ein einziges Endoskop zu integrieren. Folgende Projekte wurden in 2012 in diesem Forschungsschwerpunkt bearbeitet:

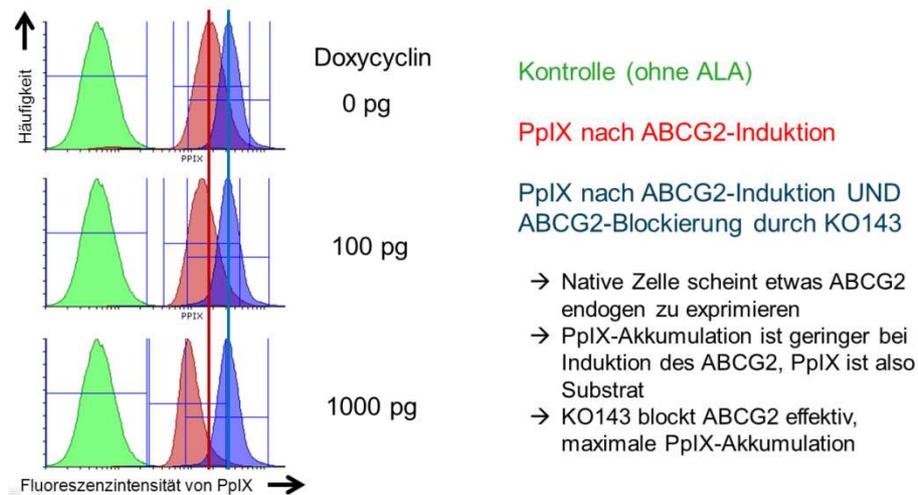
Einfluss des Tumorstammzellmarkers ABCG2 auf die PPIX-Photosensibilisierung bei Glioblastomzellen

Herbert Stepp, Wolfgang Zimmermann, Michael Heide, Patricia Müller (2014)

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

Förderung: FöFoLe; geplant DFG-Antrag

ABCG2 ist ein Membrantransportprotein, das *Multidrug*-Resistenz vermittelt und vermehrt in Tumorstammzellen gefunden wird. Der am KUM vielfach in Forschung und Klinik eingesetzte *Photosensitizer* Protoporphyrin IX (PPIX) soll laut Literatur ein Substrat dieses Proteins sein. Damit wären Tumorstammzellen bei Anwendung von photodynamischer Therapie (PDT) möglicherweise weniger gut photosensibilisiert als der Rest des Tumors. ABCG2 kann allerdings gut und spezifisch mit bereits klinisch eingesetzten Substanzen geblockt werden. Um dies zu verifizieren, haben wir eine Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Dr. Wittig am ILM in Ulm begonnen. Dr. Wittig konnte eine transfizierte Glioblastomzelllinie etablieren, deren ABCG2-Expression sich durch Gabe von Doxycyclin anschalten lässt (siehe Abbildung). Wir fanden, dass mit zunehmender Expression von ABCG2 der PpIX-Gehalt in den Glioblastomzellen abnimmt. Dieser Effekt kann durch Blockierung mit einem spezifischen ABCG2-Inhibitor KO143 verhindert werden. Diese Ergebnisse zeigen, dass PpIX tatsächlich von ABCG2 aus der Zelle ausgeschleust wird. Da die Empfindlichkeit der Zellen gegenüber einer PDT vom Gehalt an PpIX abhängt, könnte die Gabe einer Substanz wie KO143, die die Aktivität des ABCG2 blockt, die Effektivität einer PDT erhöhen und zwar für alle Zellen, insbesondere auch für Tumorstammzellen, wenn diese eine vermehrte ABCG2-Expression aufweisen. Weiterführende Experimente sollen zeigen, ob die Effizienz der PDT in der Tat durch ABCG2-Induktion verringert und durch ABCG2-Hemmung wieder gesteigert werden kann. Des Weiteren soll untersucht werden, ob Glioblastomstammzellen aufgrund von erhöhter ABCG2-Expression resistenter gegenüber PDT sind. Dies hätte wichtige Implikationen für eine bereits in Patienten durchgeführte PDT des Glioblastoms. Bei ausreichender Datenlage wird ein Förderantrag bei der DFG gestellt.



ABCG2 reduziert die Akkumulation von PPIX nach 5-Aminolävulinsäure-Gabe. U-251-Zellen (früher U-373 genannt) wurden stabil mit einem Doxycyclin-induzierbaren ABCG2-Expressionsvektor (Tet-on-System) transfiziert und mit 100 bzw. 1000 ng/ml Doxycyclin sowie mit 50 µg/ml 5-Aminolävulinsäure inkubiert. Die PpIX-Akkumulation wurde mit Hilfe von Durchflusszytometrie bestimmt. Grün ist jeweils die Verteilung des PpIX-Signals ohne Inkubation mit 5-ALA dargestellt (Eignenfluoreszenz-Kontrolle). In rot ist der PpIX-Gehalt nach Inkubation mit 5-ALA dargestellt und zwar oben ohne Induktion von ABCG2, in der Mitte mit geringer, unten mit starker Induktion der ABCG2-Expression durch Doxycyclin. Der PpIX-Gehalt nimmt mit zunehmender ABCG2-Expression ab. Die blauen PpIX-Signale ergeben sich nach zusätzlicher Inkubation mit dem ABCG2-selektiven Inhibitor KO143. Es zeigt sich ein jeweils höherer, von der ABCG2-Induktion unabhängiger PpIX-Gehalt. Bereits ohne Induktion des transfizierten ABCG2-Plasmids bewirkt die KO143-Gabe eine gesteigerte PpIX-Akkumulation, was auf eine endogene ABCG2-Expression hinweist.

Verbundprojekt „Neurotax“

Adrian Rühm, Herbert Stepp, Gesa Kniebühler, Wolfgang Beyer, Ann Johansson, Sebastian Fiedler

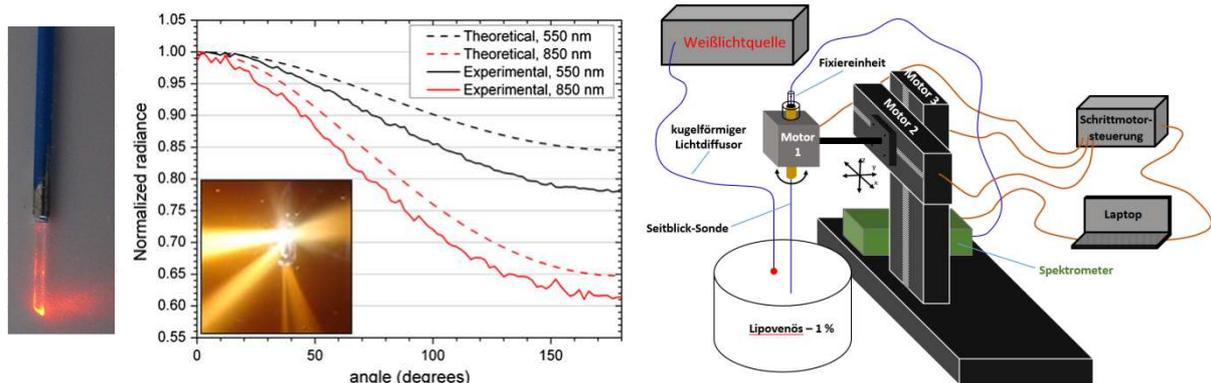
Kooperation: Friedrich-Wilhelm Kreth (Neurochirurgie)

Förderung: BMBF in MoBiTech

Dieses Verbundprojekt, welches von Januar 2009 bis April 2012 lief, wird weiterentwickelt. Zielsetzung war die Verbesserung stereotaktischer Eingriffe, v.a. beim malignen Gliom. Dabei sollte erstens die Treffsicherheit der Biopsieentnahme und zweitens die Sicherheit des Eingriffs optimiert werden. Es konnte untermauert werden, dass die Treffsicherheit durch fasergestützte Detektion von 5-ALA-induzierter PPIX-Fluoreszenz verbessert werden kann, wofür sich ein Verfahren als besonders geeignet erwies, welches zwei Fasern verwendet und Fluoreszenz- und Remissionsmessung kombiniert. Im Hinblick auf die Patientensicherheit wurde einerseits ein Konzept für eine Gefäßwarnung auf Basis von ICG-Fluoreszenz erarbeitet und als Patent und Gebrauchsmuster angemeldet, andererseits die zur Vermeidung einer thermischen Gewebeschädigung einzuhaltenden Leistungsgrenzen anhand von Simulationsrechnungen ermittelt und publiziert. Nach erfolgreichen Tierversuchen konnte eine bildgebende Sonde (Fa. Storz) am Patienten getestet und das Ergebnis publiziert werden.¹

¹ Rühm A, Göbel W, Sroka R, Stepp H. ICG-assisted blood vessel detection during stereotactic neurosurgery: Simulation study on excitation power limitations due to thermal effects in human brain tissue. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 2014 Mar 31. pii: S1572-1000(14)00043-X. [Epub ahead of print]

Die industriellen Verbundpartner und der beteiligte Neurochirurg sind an einer späteren Produktumsetzung weiterhin sehr interessiert. Ein Nachfolge-Antrag mit dem Ziel der technischen Etablierung einer fluoreszenzgestützten Biopsieentnahme ist als Skizze vom Projektträger DLR (Internationales Büro) bereits akzeptiert worden. Zusätzlich ist in Kooperation mit dem Partner ILM (Ulm) ein DFG-Antrag in Vorbereitung, in dessen Rahmen weitergehende Konzepte zur interstitiellen Messung optischer Gewebeparameter erarbeitet werden sollen. Hierzu wurden bereits vorbereitende Arbeiten zur Herstellung und Charakterisierung von Seitblick-Sonden für eine richtungsabhängige Lichtdetektion durchgeführt.



Validierung der richtungsabhängigen Messung der Raumbestrahlungsstärke mittels Seitblick-Sonden. Im linken Teil der Abbildung ist eine an ihrer Endfläche verspiegelte Seitblick-Sonde zu sehen, welche axial eingestrahktes Licht um 90° umlenkt. Durch Umkehrung des Strahlengangs ergibt sich entsprechend die Möglichkeit einer richtungsabhängigen Lichtdetektion. Im mittleren Teil der Abbildung ist die Richtungsabhängigkeit des in dieser Weise detektierten Lichts als Funktion des Sonden-Drehwinkels dargestellt, wie sie sich mit Hilfe der rechts dargestellten Anordnung mit zwei in ein Medium mit gewebeähnlichen optischen Eigenschaften eingetauchten Seitblick-Sonden (Sender/Empfänger) ermitteln lässt.

Verbundprojekt „FLENDOS“

Adrian Rühm, Peter Sterflinger, Jens Brehm, Herbert Stepp

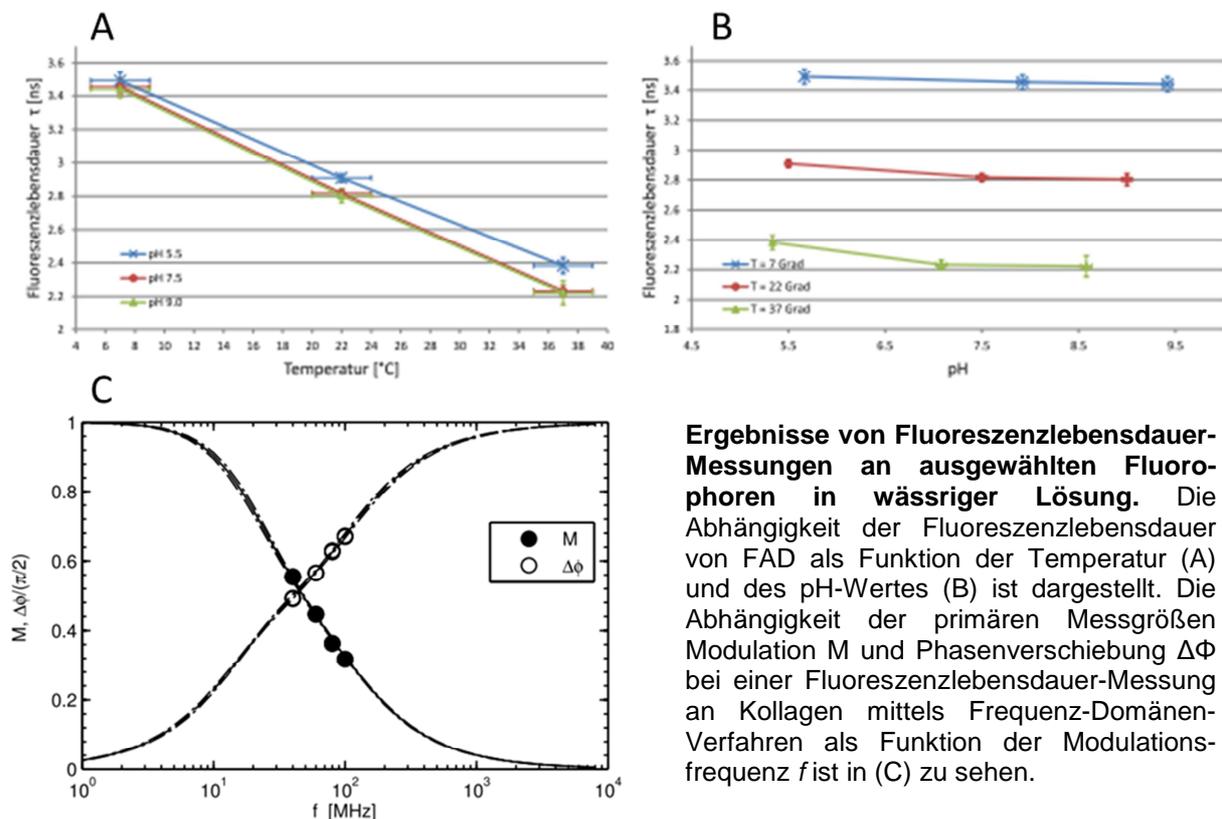
Kooperation: Christian Betz (HNO)

Förderung: BMBF in Biophotonik IV

Das Verbundprojekt FLENDOS startete im Oktober 2010 und endete nach Verlängerung im März 2013. Ziel des Verbundprojekts war es, Grundlagen für ein Fluoreszenzlebensdauer-Endoskopie-System für die Gewebedifferenzierung im oberen Luft-Speiseweg bereitzustellen. Die Aufgabe des LFL bestand darin, die Übertragbarkeit der im Verbund gewonnenen Grundlagenerkenntnisse in der Fluoreszenzlebensdauer-Messung auf spätere klinische Anwendungen zu untersuchen. Hierzu wurden humane Gewebeproben nach Tumor-Resektionen im sichtbaren Spektralbereich mit verschiedenen Fluoreszenzlebensdauer-Messsystemen untersucht. Hierbei ergaben sich statistisch signifikante Unterschiede in den Fluoreszenzlebensdauern von Tumor und Normalgewebe, sowohl intra- wie interindividuell. Dabei wurden sowohl Messergebnisse an einem geeigneten Lebendgewebemodell als auch an Gefrierschnitten berücksichtigt. Ergebnisse des Projekts wurden im Mai 2013 auf der HNODS-Tagung im Rahmen der ECBO

präsentiert, sowie im Juni 2013 auf dem Workshop "FLIM 2013" in Saarbrücken. Entsprechende Publikationen sind in Vorbereitung.

In 2013 wurden zur Ursachenklärung der beobachteten Unterschiede sowie zur Erarbeitung von Ansätzen für eine In-vivo-Diagnostik einzelne relevante Fluorophore (Flavine, NADH, Kollagen, Elastin) in wässriger Lösung in Reinform als Funktion von Temperatur und pH-Wert untersucht. Dabei ergab sich im Bereich 7°C bis 37°C eine deutliche Temperaturabhängigkeit der Fluoreszenzlebensdauer im Fall der Flavine FAD, FMN und Riboflavin, jedoch ansonsten keine weitere signifikante Abhängigkeit von Temperatur oder pH-Wert. Insofern liegt die Vermutung nahe, dass die an Gewebeproben beobachteten Fluoreszenzlebensdauer-Unterschiede vor allem auf morphologische Unterschiede zwischen Tumor- und Normalgewebe zurückzuführen sind, da davon ausgegangen werden kann, dass die untersuchten Tumorproben einen höheren Volumenanteil an Epithelgewebe aufweisen als Normalgewebe. Dieser Aspekt soll durch Korrelation von Fluoreszenzlebensdauer-Messungen mit OCT-Befunden künftig genauer untersucht werden.



Des Weiteren wurde in 2013 die vorhandene Fluoreszenzlebensdauer-Messapparatur sukzessive verbessert, so dass nun auch Messungen bei verschiedenen Modulationsfrequenzen möglich sind. Dies ermöglicht es zum einen, den Bereich der experimentell ermittelbaren Fluoreszenzlebensdauern zu erweitern, und zum anderen, auch im Falle von Proben mit mehrkomponentigen Fluoreszenz-Abklingverhalten die zugrundeliegenden Fluoreszenzlebensdauern explizit zu bestimmen. Durch diese vollständigere Charakterisierung entspricht die erhaltene Information im Idealfall derjenigen, die mit in der Zeitdomäne arbeitenden Fluoreszenzlebensdauer-Messverfahren erhalten werden kann, ermöglicht dabei

aber weiterhin zusätzlich eine unmittelbar bildgebende Darstellung der Verteilung der Fluoreszenzlebensdauer im Gewebe, welche für die klinische Diagnostik unerlässlich ist.

Die verbesserte Methodik soll künftig im Rahmen eines Nachfolgeprojekts anhand weiterer Gewebeuntersuchungen getestet werden. Die Bearbeitung der klinisch relevanten Fragestellungen soll dabei wie bisher durch Zusammenarbeit mit der HNO-Klinik am Klinikum Großhadern gewährleistet werden. Im Mittelpunkt dieser Bestrebungen werden nach wie vor die Fähigkeit zur Kontrastierung klinisch relevanter Gewebeveränderungen und die Eignung zur Tumorfrühdagnostik stehen. Nach Abschluss des Verbundprojekts steht nunmehr auch ein geeignetes Kameramodell zur Verfügung, mit dem sich die präklinische Evaluierung eines endoskopischen Funktionsmusters (Endo-FLI-Cam) realisieren lassen sollte.

Faseroptisches Fluoreszenzspektrometer: Nachweis von Zink-Protoporphyrin IX als Indikator von Eisenmangel

Herbert Stepp, Christian Homann, Georg Hennig, Michael Großmann; Klinik: Michael Vogeser (Klinische Chemie), Ilknur Erdogan, Uwe Hasbargen (Gynäkologische Klinik)

Kooperation: Gary Brittenham (Columbia University, NY)

Förderung: Industrie

Studien zur Prävention von Folgen von Mangelernährung zeigen, dass eine Eisensubstitution signifikant das Immunsystem (z. B. zum Schutz vor Malariainfektion) bei genau den Personen stärkt, die unter Eisenmangel leiden. Eine pauschale Substitution „auf Verdacht“ hingegen schwächt das Immunsystem der nicht unter Eisenmangel Leidenden. Die Detektion der Fluoreszenz von Zink-Protoporphyrin IX (ZnPP) aus Erythrozyten ist ein wichtiger Indikator zur Identifizierung der richtigen Zielgruppe. Mit den verfügbaren Methoden ist diese allerdings nur invasiv möglich (Blutentnahme). In Kooperation mit Prof. Brittenham und Prof. Vogeser wurden die 2009 begonnenen Untersuchungen zur Erfassung der ZnPP-Fluoreszenz aus Gewebe fortgesetzt und die Fa. Nestlé als Sponsor gewonnen. Die Firmenunterstützung ist sehr substanziell und umfasste im Jahr 2013 eine zusätzliche Postdoktorandenstelle. Ende 2013 wurde eine Verlängerung des Projekts vereinbart, die für das Jahr 2014 zwei Postdoktorandenstellen umfasst. Die im Jahr 2013 begonnene klinische Studie soll weitergeführt werden und eine vereinfachte Gerätegeneration entwickelt werden.

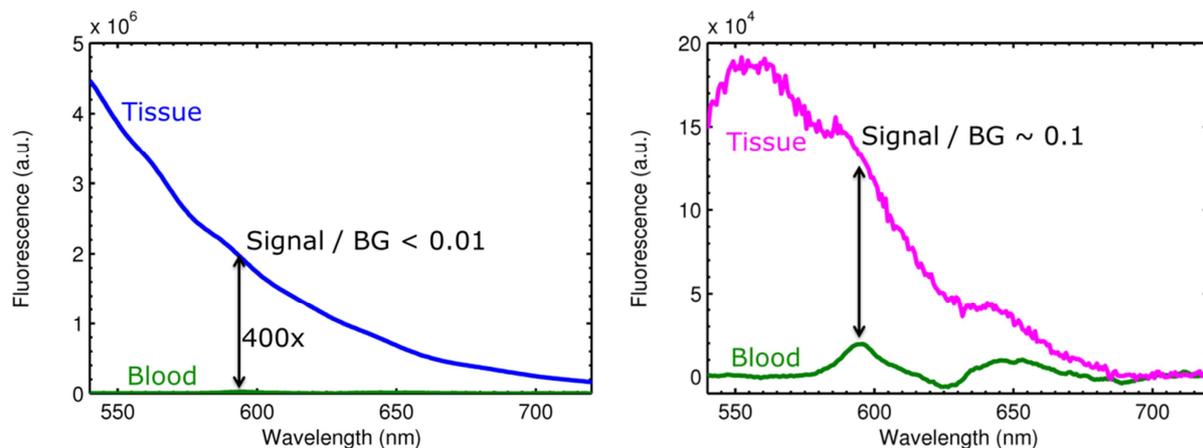
In Vorversuchen wurde gezeigt, dass das Verhältnis ZnPP/Häm bzw. Protoporphyrin IX (PPIX)/Häm fluoreszenzspektroskopisch an verdünnten Blutproben nachgewiesen werden kann². Außerdem wurde das Vollblut verdünnt und mit Streumittel versehen, um in den Bereich der Erythrozytenkonzentration zu gelangen, der in gut durchblutetem Gewebe erwartet werden kann (1 bis 4%). Ein Problem stellte die Lichtquelle dar, die Licht hoher Intensität bei geringer Bandbreite und

² Hennig G, Gruber C, Vogeser M, Stepp H, Dittmar S, Sroka R, Brittenham GM. Dual-wavelength excitation for fluorescence-based quantification of zinc protoporphyrin IX and protoporphyrin IX in whole blood. *J Biophot* (2013, published online ahead of print), doi: 10.1002/jbio.201200228.

einstellbarer zentraler Wellenlänge liefern muss. Es wurde eine Filtereinheit, die dazu in der Lage ist, aus durchstimmbaren Bandpassfiltern³ entwickelt und auch als Gebrauchsmuster angemeldet. Ein weiteres Problem stellen die optischen Eigenschaften von Gewebe dar, die zu einer unbekanntenen Beeinflussung des Fluoreszenzsignals führen können. Diese Einflüsse wurden mittels einer selbst entwickelten Computersimulationsmethode² untersucht.

Es wurde ein Prototyp entwickelt und im Rahmen einer klinischen Studie evaluiert. Diese wurde in der Gynäkologischen Klinik der LMU in Großhadern durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass der Autofluoreszenzuntergrund bei Gewebemessungen mittels Zwei-Wellenlängen-Anregung^{3, 4} im Mittel um 92% reduziert werden kann. Die quantitative Auswertung der ZnPP-Fluoreszenz erschien vielversprechend.

Aufbauend auf den Erkenntnissen dieser klinischen Studie wurde ein verbessertes Gerät entwickelt. Insbesondere flossen in das Design des optischen Aufbaus auch Erkenntnisse ein, die anhand der Computersimulationen gewonnen wurden. Mit der Erprobung dieses weiterentwickelten Gerätes wurde bereits Ende 2013 begonnen. Der erfolgreiche Abschluss der klinischen Studie mit dem weiterentwickelten Gerät ist für Mitte 2014 geplant.



Gewebefluoreszenz im Vergleich zum ZnPP-Fluoreszenzsignal. Gezeigt ist ein exemplarisches Fluoreszenzspektrum, wie es an der Unterlippe gemessen werden kann (links, blaue Kurve). Im Vergleich dazu ist die Fluoreszenz von ZnPP in Blut gezeigt (links, grüne Kurve). Der Beitrag von ZnPP-Fluoreszenz zum gesamten Gewebeautofluoreszenzsignal liegt damit bei unter 1%. Nach Subtraktion zweier Spektren nach Zwei-Wellenlängen-Anregung^{4,5} erhöht sich der Beitrag von ZnPP-Fluoreszenz (rechts, grüne Kurve) zum Gewebeautofluoreszenzsignal (rechts, rosa Kurve) auf ca. 10%.

³ Hennig G, Brittenham GM, Sroka R, Kniebühler G, Vogeser M, Stepp H. Bandwidth-variable tunable optical filter unit for illumination and spectral imaging systems using thin-film optical band-pass filters. *Rev Sci Instrum* 84(4), 043113 (2013).

⁴ Hennig G, Gruber C, Vogeser M, Stepp H, Dittmar S, Sroka R, Brittenham GM. Dual-wavelength excitation for fluorescence-based quantification of zinc protoporphyrin IX and protoporphyrin IX in whole blood. *J Biophot* (2013, published online ahead of print), doi: 10.1002/jbio.201200228.

⁵ Hennig G, Vogeser M, Holdt LM, Homann C, Großmann M, Stepp H, Gruber C, Erdogan I, Hasmüller S, Hasbargen U, Brittenham GM. Dual-wavelength excitation to reduce background fluorescence for fluorescence spectroscopic quantitation of erythrocyte zinc protoporphyrin-IX and protoporphyrin-IX from whole blood and oral mucosa. *Proc SPIE* (accepted)



Faseroptische Fluoreszenzspektrometer. Abgebildet sind zwei Geräte zur Evaluierung in klinischen Studien. Das untere Gerät wurde in der ersten Phase der klinischen Studie im Jahr 2013 eingesetzt. Das obere Gerät ist ein weiterentwickeltes Gerät, dessen Evaluierung Ende 2013 begonnen wurde.

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 2013 in diesem Forschungsschwerpunkt bearbeitet:

Lithotripsie

Ronald Sroka, Thomas Pongratz, Praktikanten

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, sowie Rückstoßuntersuchungen, und allgemeine Handhabungen der Systeme. Als neue Variante der Laser-Lithotripsie stehen Laser-Lithotripsieverfahren mit Variationsmöglichkeit der Pulsdauer zur Verfügung. Der Einfluss des Parameters Pulsdauer wurde mit dem im Laser-Forschungslabor zur Verfügung stehenden experimentellen Portfolio untersucht.

Es konnte gezeigt werden, dass mit langen Pulsdauern die Nebenwirkungsrate gesenkt werden kann. Hinsichtlich der Fragmentierung konnte keine signifikante Abhängigkeit von der Pulsdauer ermittelt werden. Die Ergebnisse der Untersuchungen wurden auf der Photonics West 2014 präsentiert, eine Publikation ist in Vorbereitung.

Untersuchungen zur Indikation des 1940-nm-Tm-Faser-Lasers in der Pulmologie

Ronald Sroka

Kooperation: Wolfgang Gesierich

Förderung: Industrie

Der chirurgische Einsatz des Thulium (Tm)-Faser-Lasers wurde in einer klinischen Machbarkeits-Studie zur Behandlung von pulmonalen Stenosen sowie Stent-Einwachsungen untersucht.

Aufgrund der hohen Absorption durch das Gewebewasser wurde das Gewebe mit geringer Leistung behandelt. Bei im Vergleich zur Nd:YAG-Behandlung geringen Nebenwirkung wurde stenotisches Gewebe entfernt. Große Vorteile konnten bei der Behandlung eingewachsener Stents ermittelt werden. Eine komplette Bergung der Stent wurde erstmalig möglich. Die Ergebnisse wurden publiziert.⁶

Untersuchungen zur Rauchentwicklung bei Laseranwendungen in der Laparoskopie

Ronald Sroka, Sebastian Fiedler, Georg Hennig

Kooperation: Wael Khoder (Urologie)

Der chirurgische Einsatz von Lasern während der Laparoskopie birgt das Problem der schlechten Sicht auf den Behandlungssitus während der Behandlung. Im Rahmen einer experimentellen Studie wurde an Leberkäse als Gewebemodell die Abhängigkeit der Rauchgenerierung von der verwendeten Wellenlänge untersucht. Die Ergebnisse belegen, dass das zeitliche Auftreten von Rauch bei Applikation von Laserlicht der Wellenlänge 1350nm und 1470nm gegenüber 980nm signifikant verkürzt ist und gleichzeitig die Intensität des gemessenen Rauchsignals erhöht ist. Diese Ergebnisse wurden auf der BiOS2014 vorgetragen, eine Publikation ist eingereicht.

„BetaMod“ – Wundheilungsmodulation durch lokal platzierte Betastrahler

Ronald Sroka, Kathrin Siegrist

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

Förderung: Bayerische Forschungsförderung

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

⁶ Gesierich W, Reichenberger F, Fertl A, Haeussinger K, Sroka R. Endobronchial therapy with a thulium fiber laser (1940 nm). *J Thorac Cardiovasc Surg* 2014 Jan 15. pii: S0022-5223(14)00014-2. [Epub ahead of print]

Präparate mittels innovativer Konfokal-Sonden unmittelbar während der Explantation untersucht.

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

2012 wurden beide Ansätze von den fortführenden Wissenschaftlern und Klinikern weiter verfolgt. Zudem sind Publikationen zum BetaMod-Teilprojekt Urologie und Gastroenterologie in Vorbereitung, sowie die Aufarbeitung des Teilprojektes HNO des BetaMod-Vorläufers BioMatRad im Rahmen einer Promotionsarbeit initiiert worden. Publikationen werden für 2014 erwartet.

3.1.3 Photodynamische Therapie (PDT)

Interstitielle PDT in der Neurochirurgie

Wolfgang Beyer, Herbert Stepp, Adrian Rühm

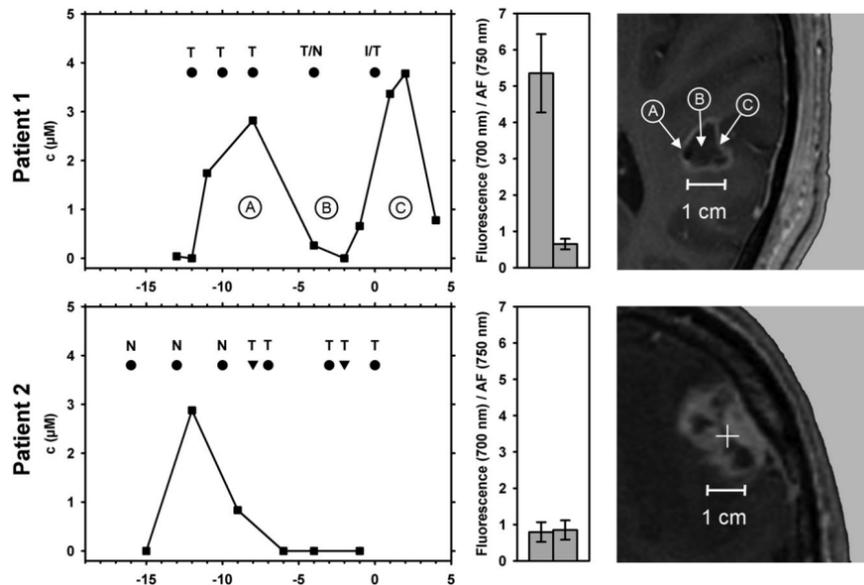
Kooperation: Friedrich-Wilhelm Kreth (Neurochirurgie)

Es wurden Heilversuche zur stereotaktischen PDT mit 5-ALA-induziertem PPIX von inoperablen Gliomrezidiven durchgeführt. Zur Bestrahlung wurden Lichtleitfasern verwendet, deren Positionierung gemäß der zu erwartenden Lichtverteilung im Gewebe optimiert wurde. Dabei wurden *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. Eine Publikation über die an den ersten 5 Patienten gewonnenen Ergebnisse erschien 2013.⁷ Bei 3 Patienten ergab sich in Tumor-Arealen eine deutliche *In-vivo*-Fluoreszenz und eine hohe PPIX-Konzentration in der Biopsie. Bei den beiden anderen Patienten hingegen wurde fast keine Fluoreszenz beobachtet, dementsprechend lag nur eine geringe PPIX-Konzentration im Gewebe vor. Beide Patienten verstarben 3 bzw. 9 Monate nach der PDT. Eine Korrelation mit der Ki67-Expression und dem MGMT-Promotor-

⁷ Johansson A, Faber F, Kniebühler G, Stepp H, Sroka R, Egensperger R, Beyer W, Kreth FW. Protoporphyrin IX fluorescence and photobleaching during interstitial photodynamic therapy of malignant gliomas for early treatment prognosis. *Lasers Surg Med* 45(4), 225-234 (2013).

Methylierungsstatus des Tumorgewebes war dagegen nicht zu erkennen. Eine intraoperative Fluoreszenzkontrolle scheint damit eine deutlich bessere Vorhersage des Therapieerfolges zu erlauben. Die Vorbereitungen für die Planung einer klinischen Studie werden weitergeführt.



PPIX-Konzentration im Vergleich mit Pathologie-Befunden bei stereotaktischer Biopsie an Glioblastomen. Im linken Teil sind für zwei Patienten die anhand von Gewebeproben ermittelten PPIX-Konzentrationen als Funktion der Entnahmetiefe entlang eines Biopsie-Kanals dargestellt. Pathologische Befunde von aus demselben Biopsie-Kanal entnommenen Gewebeproben sind an den entsprechenden Stellen vermerkt (T = Tumor, N = Nekrose, I = infiltrierender Tumor). Bei Patient 1, bei dem alle Tumor-Areale eine hohe PPIX-Konzentration aufwiesen, schlug die Photodynamische Therapie gut an. Patient 2, bei dem im Tumorbereich größtenteils keine PPIX-Akkumulation festzustellen war, verstarb bereits 3 Monate nach der PDT.

PDT mit Chlorin e6

Herbert Stepp, Michael Heide, Sara Abdel Hamid

Kooperation mit der German University of Cairo (GUC)

Kooperation mit dem Institut für Anorganische Chemie II der Uni Ulm

Förderung: DAAD

Von September 2012 bis Oktober 2013 war die ägyptische Pharmaziestudentin Frau Abdel Hamid als DAAD-Stipendiatin am LFL. Sie bearbeitete hier den ersten Teil Ihrer Dissertation. Betreuer ist Prof. Abdel Kader, Direktor der GUC. Es besteht seit einiger Zeit ein informeller Austausch zwischen der GUC und dem LFL, die Kontakte, die Herr Dr. Baumgartner eingeleitet hatte, werden nun von Herrn Dr. Stepp fortgeführt. Frau Abdel Hamid untersucht auf *In-vitro*-Ebene die Eignung pflanzlich basierter Photosensitizer für die PDT. Wir konnten eine Kooperation mit der Firma Apocare etablieren, die den Photosensitizer Chlorin e6 (Fotolon) in klinischen Zulassungsstudien untersucht. Die Untersuchungen finden im Vergleich zu 5-ALA basierter PDT statt. Es wird neben den üblichen Phototoxizitätsparametern auch die Kopplung an Carriersystemen und die Abhängigkeit der Expression von Transportproteinen in der Zellmembran (ABCG2) untersucht. Es wurde dazu eine

Zusammenarbeit mit dem Ulmer Institut für Anorganische Chemie II (Prof. Mika Linden) etabliert. Frau Abdel Hamid konnte erfolgreich mesoporöse Si-Nanopartikel mit Photosensitizer beladen und mit Antikörpern gegen HER2/neu funktionalisieren.

Die bisherigen Ergebnisse deuten darauf hin, dass mit Chlorin e6 ein Photosensibilisator zur Verfügung steht, der ein deutlich anderes Wirkungsprofil zeigt als 5-ALA induziertes PpIX, z. B. was den Zelltodmechanismus betrifft, aber auch Ausbleicheigenschaften und Zellspezifität. Die Untersuchungen werden derzeit in Kairo weitergeführt und zur Publikation vorbereitet. Ein Anschlussaufenthalt von Frau Abdel Hamid am LIFE-Zentrum ist beantragt.

Dünne zylindrische Lichtapplikatoren für die interstitielle PDT

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

Förderung: Industrie

Für die Lichtapplikation bei der interstitiellen PDT, z. B. bei Glioblastomen und in der Prostata, werden fasergestützte Zylinderstrahler mit einer Länge von 10 bis 40 mm und einem Durchmesser von maximal 2 mm benötigt. Es wurde ein entsprechendes Herstellungsverfahren auf der Basis von transparenten mit Streumedium gefüllten Kunststoffschläuchen mit Außendurchmesser 1mm entwickelt. Hierfür wurden die optischen Eigenschaften des in Silikon eingebetteten Streumediums ermittelt. Mit Hilfe von Simulationsprogrammen wurden die Konzentrationen für spezifische Applikatorgeometrien ermittelt, sodass eine homogene Abstrahlung des Lichtes auf der gesamten Länge erzeugt wird. Es konnten in reproduzierbarer Weise zylindrische Lichtapplikatoren erstellt und ein einfaches Herstellungsverfahren erarbeitet werden. Zusätzlich zu dem Herstellungsverfahren wurde in 2013 ein Messverfahren zur Bewertung der erzeugten Lichtwellenleiter entwickelt.

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 2013 kontinuierlich fort.

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

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

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

Klinische Untersuchungen mit endoskopisch eingesetzter optischer Kohärenztomographie (OCT)

Herbert Stepp

Kooperation: Christian Betz (HNO), Julia Gallwas (Gynäkologie), Matthias Trottmann, Sabine Kölle (Urologie), Klaus Hallfeldt, Roland Ladurner (Viszeral- und Endokrine Chirurgie)

Förderung: Industrie

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

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

In der Frauenklinik wurden Untersuchungen des Zervixkarzinoms fortgeführt. Auch hier gelingt eine gute intraoperative Einschätzung der CIN-Grade. Hierzu wurden bereits mehrere medizinische Promotionsarbeiten vergeben und abgeschlossen.

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

Neu in 2013 ergab sich eine Kooperation mit der Chirurgischen Klinik (Prof. Hallfeldt, Dr. Ladurner), um die Eignung der OCT zur Differenzierung von Geweben bei der Schilddrüsenchirurgie (Schilddrüse, Nebenschilddrüse, Lymphknoten) zu evaluieren. Diese Untersuchungen wurden bereits publiziert⁸ und werden fortgeführt. Sie sollen durch fluoreszenzendoskopische Verfahren ergänzt werden.

Konfokale Fluoreszenzendoskopie (pCLE) zur hochaufgelösten intraoperativen Gewebediagnostik

Herbert Stepp

Kooperation: Christian Betz, Veronika Volgger, Anna Englhard (HNO), Julia Gallwas, Christian Dannecker (Gynäkologie), Matthias Trottmann, Sabine Kölle (Urologie), Jürgen Behr, Wolfgang Gesierich, Frank Reichenberger (Pneumologie, Bronchoskopie)

⁸ Ladurner R, Hallfeldt KK, Al Arabi N, **Stepp H**, Mueller S, and Gallwas JK. Optical coherence tomography as a method to identify parathyroid glands. *Lasers Surg Med* 45(10), 654-659 (2013).

Förderung: Großgeräteantrag

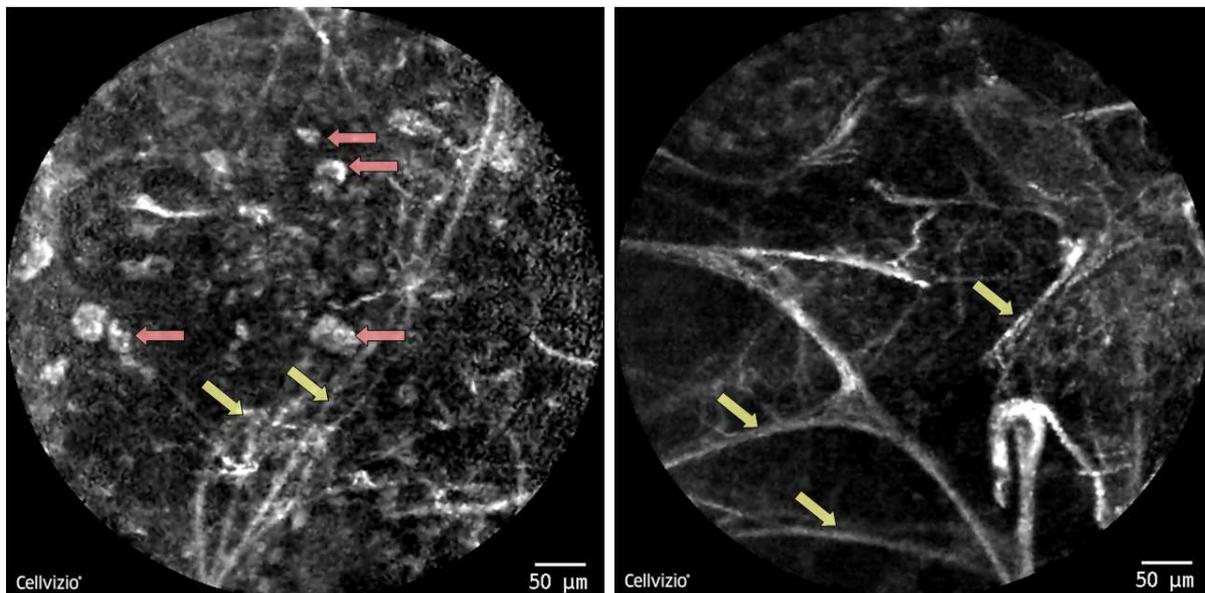
Dieses Vorhaben ist Bestandteil des Verbundes T.E.A.M. am Klinikum. Aufbauend auf der LFL-Entwicklung der Fluoreszenzendoskopie, die als *Red-flag-Technologie* mit hoher Sensitivität auf makroskopischer Ebene malignes Gewebe identifiziert, besteht die Erwartung, dass mithilfe von weiteren optischen Technologien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

2013 fanden mehrere Evaluationen im Labor und in klinischen Einsätzen statt:

Dr. Trottmann et al. untersuchten die Leistungsfähigkeit der pCLE zur Darstellung von Hoden und Eileitern. Es gelang, Samen tragende Hodenkanälchen darzustellen. Die Untersuchungen erfolgten im Vergleich mit der Konfokalmikroskopie an verschiedenen Präparaten, zumeist Rinderhoden. Die Ergebnisse sind zur Publikation eingereicht.

PD Dr. Betz untersuchte die pCLE zur Darstellung der Mundschleimhaut. Es wurde eine klinische Studie zur Darstellung von frühmalignen Läsionen in der Mundhöhle durchgeführt. Erste Ergebnisse sind veröffentlicht.⁹

Die Pulmologische Klinik Gauting führte erste Untersuchungen der pCLE bei obstruktiven Lungenerkrankungen durch. Der erste Eindruck lässt erwarten, dass sich die pCLE sehr gut eignen könnte, die Qualität von Gewebeproben deutlich zu verbessern, indem eine zielgerichtete Entnahme möglich wird (siehe Abbildung).



Links: Konfokalendoskopische Aufnahme eines veränderten Lungenbläschens. Die netzförmig aufgespannten elastischen Fasern (gelbe Pfeile) sind knotig und vielfach unterbrochen. Zwischen die Fasern sind Entzündungszellen eingewandert (rote Pfeile).

Rechts: Konfokalendoskopische Aufnahme eines weitgehend normalen Lungenbläschens: nur das Netzwerk der elastischen Fasern ist sichtbar.

⁹ Volgger V, **Stepp H**, Ihrler S, Kraft M, Leunig A, Patel PM, Susarla M, Jackson K, and Betz CS. Evaluation of optical coherence tomography to discriminate lesions of the upper aerodigestive tract. *Head Neck* 35(11), 1558-1566 (2013).

3.1.5 Kooperationsverbände

Deutsch-Russischer Kooperationsverbund Biotechnologie

Michael Fedorov, Ronald Sroka

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

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

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

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

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

In 2013 wurde das Netzwerk durch Kooperation mit Forschungseinrichtungen und *Spin-off*-Unternehmen in den russischen Städten Tomsk, Uljanovsk, Sankt Petersburg und Lipezk weiter ausgebaut. Ferner wurden auf Basis des Netzwerkes Konferenzen und Seminare in Sankt Petersburg, Voronezh und Moskau durchgeführt und vor Ort betreut. Das BMBF organisiert thematische Delegationsreisen nach Russland. Für den Themenbereich klinische Biotechnologie nahm Herr Fedorov an einer solchen Reise teil. Schließlich wurden Forschungsaufenthalte junger russischer Wissenschaftler der TU Lipezk (RUS) an der Universität Ulm organisiert.

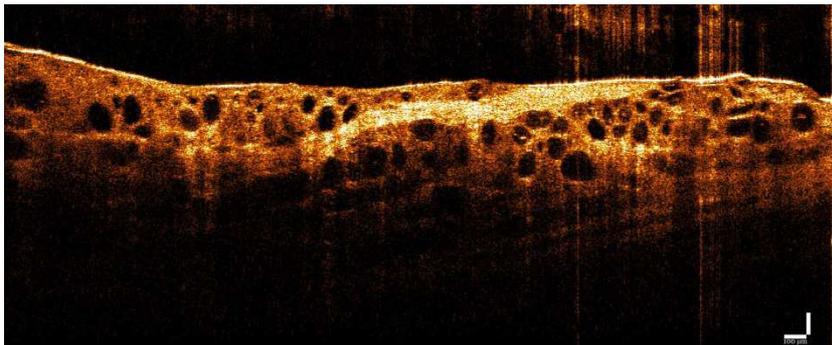
Light4LIFE - Netzwerk

Ronald Sroka, Michael Fedorov, Julia Kuznetsova

Förderung: BMBF Land of Ideas

Die Internationalisierung und Verbreitungen biophotonischer Technologien ist wesentlicher Bestandteil des neuen Netzwerkes Light4LIFE, welches einerseits der Förderung der internationalen wissenschaftlichen Ausbildung sowie der Identifizierung internationaler wissenschaftlicher Partnerschaften dienen soll, als auch unter Mitwirkung von industriellen Partnern den Wirtschaftsstandort Bayern international sichtbar machen soll. Ziel von Light4LIFE ist die Installation von technischer und wissenschaftlicher Zusammenarbeit auf dem Gebiet der Optischen Kohärenztomographie und deren Anwendung in der Klinik. Hierfür wurde 2013 eine Delegationsreise nach Moskau, Tomsk und Jekaterinburg durchgeführt. Hierbei konnte ein vertiefter Einblick in den Wissenschaftsstandort Russland auf diesem Themengebiet gewonnen werden. Entsprechende Industriekontakte wurden initiiert.

In 2013 wurde eine Gastwissenschaftlerin für Untersuchungen mittels optischer Kohärenztomographie gewonnen. Die Experimente zielen auf die Anwendung der OCT an unterschiedlichen Geweben ab, sowie auf die experimentelle Ermittlung der lateralen und axialen Auflösung mit dem Ziel einen Vergleichsstandard zu entwickeln. Für 2014 ist die Präsentation der Ergebnisse auf einem Internationalen Kongress geplant.



OCT-Aufnahme von tumorösem Schilddrüsengewebe.

NanoBridge - Netzwerk

Ronald Sroka, Michael Fedorov

Förderung: BMBF Land of Ideas

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

Ziel von NanoBridge ist die Installation von technischer und wissenschaftlicher Zusammenarbeit auf dem Gebiet der angewandten Nano-Technologien. Hierfür wurde 2013 eine Delegationsreise nach Moskau durchgeführt, mit dem Zweck, auf der Gesundheitsmesse 2013 in Moskau deutsche Arbeiten auf diesem Gebiet zu vorzustellen.

3.2 Labor für Tumorimmunologie

Einführung

In der Tumorimmunologie wird versucht, die körpereigenen Abwehrmechanismen gegen Tumoren zu erforschen und neue Wege zu finden, die Zellen des Immunsystems oder Tumorzellen gezielt therapeutisch zu beeinflussen, um Krebserkrankungen zu bekämpfen. In den letzten Jahren wurde eine Reihe von neuen Immuntherapien erarbeitet und in der Klinik getestet. Hierzu gehören Therapien mit Peptid-, dendritische Zell- und Tumorzellvakzinen, adoptive Zelltherapien, zum Teil mit klonierten oder chimären Antigenrezeptoren, sowie Antikörpertherapien. Besondere Aufmerksamkeit erregen derzeit mit der Dämpfung von Immunantworten interferierende therapeutische Antikörper (*immune checkpoint blockade antibodies*), mit deren Hilfe Langzeitstabilisierung von ansonsten rasch progredienten Tumorerkrankungen erzielt werden konnten.

In den letzten Jahren wurden so genannte Tumor-initiiierende Zellen oder Tumorstammzellen in Leukämien und einer Reihe solider Tumore nachgewiesen. Sie machen nur einen sehr geringen Bruchteil der Tumormasse aus und zeigen in vielen Fällen eine ausgeprägte Unempfindlichkeit gegenüber Chemo- und Strahlentherapie. Sie werden daher für das Wiederauftreten des Tumors nach zunächst erfolgreich erscheinender Therapie verantwortlich gemacht und stellen aus diesem Grund interessante Zielzellen für immunologische und andere Therapien dar. Allerdings ist gegenwärtig noch völlig offen, ob sich, wegen ihrer großen Ähnlichkeit zu normalen Gewebestammzellen, antigene oder sonstige Unterschiede finden lassen, die einen selektiven (immun)therapeutischen Angriff erlauben.

Auftretenden Resistenzen bei Verwendung neuer Wirkstoffe (z.B. Kinaseinhibitoren, sog. *small molecule drugs*), die gezielt aufgrund der Kenntnis molekularer Vorgänge bei der Krebsentstehung entwickelt wurden, zeigen, dass Krebs wahrscheinlich nur erfolgreich mit Kombinationstherapien bekämpft werden kann. Daher wird auch der Immuntherapie und weiteren „*rational design*“-Therapien ein wichtiger Stellenwert zukommen, da die Resistenzmechanismen für immuntherapeutische und Therapieansätze *mit small molecule drugs* sehr verschieden sein dürften und so eine Kreuzresistenz von Tumoren vermieden werden kann.

Die Forschungsaktivitäten im Labor für Tumorimmunologie betreffen hauptsächlich urologische Tumoren, insbesondere Nieren- und Prostata Tumoren, aber seit kurzem auch Magenkarzinome und Glioblastome. 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 Zielstrukturen und Prognosemarkern

Identifizierung von Tumorstammzellen des Magenkarzinoms

Mira Kronast, Johannes Meyer, Elena Vetter, Wolfgang Zimmermann

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

Förderung: Graduiertenförderung der Medizinischen Fakultät

In diesem Projekt charakterisieren wir Tumorzellen mit Stammzeleigenschaften. Zielstrukturen und Signalwege sollen identifiziert werden, die idealerweise nicht in normalen Stammzellen exprimiert bzw. verwendet werden und sich zur Entwicklung von Therapien eignen. Zur Isolierung solcher Zellen verfolgen wir zwei Strategien:

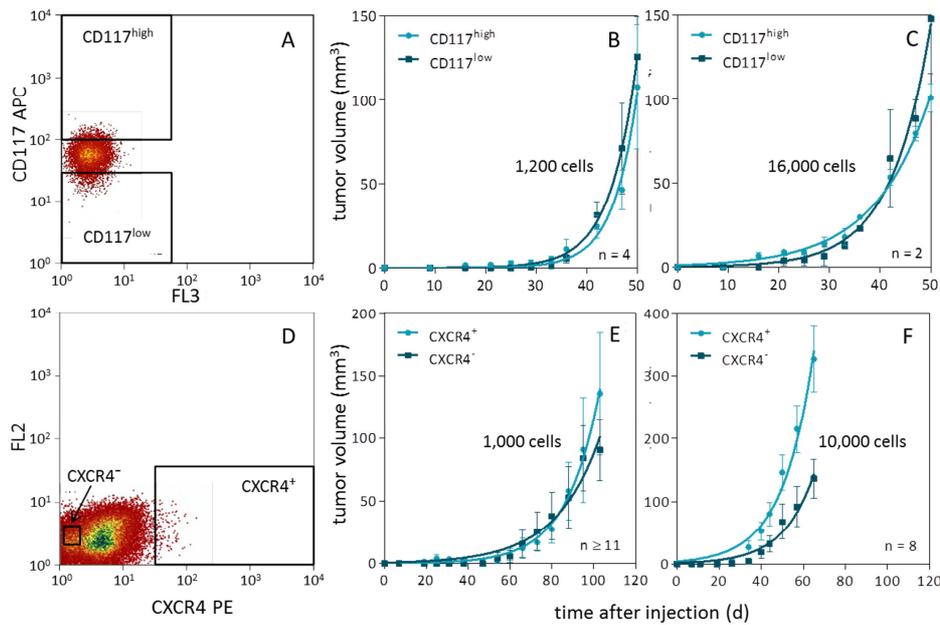
(1) Einmal wollen wir bekannte Tumorstammzellmarker zur Anreicherung von potentiellen Stammzellen des Magenkarzinoms verwenden und diese Zellen funktionell charakterisieren. (2) Unser zweiter Ansatz zeichnet sich dadurch aus, dass nicht einzelne Oberflächenmarker, sondern vielmehr Chemotherapie zur Selektion der Zellen eingesetzt wird. Somit werden wir unvoreingenommen diejenigen Zellen untersuchen können, die einer konventionellen Therapie nicht zugänglich sind.

Als erfolgversprechendster Marker für die humane Magenkarzinomzelllinie GC1 zeigte sich ALDH1A1 (siehe LIFE-Bericht 2012), für die von unserem transgenen Magenkarzinommodell¹⁰ (CEA424-SV40-T-Antigen-Mäuse, TAg) abgeleiteten Magenkarzinomzellen (mGC3, mGC8) CXCR4, ein Marker mit dessen Hilfe wir kürzlich auch in Nierenkarzinomzellen Tumorstammzellen anreichern konnten.¹¹ Belegen konnten wir die bevorzugte Expression von CXCR4 in mGC-Tumorstammzellen durch eine Reihe von sich ergänzenden Experimenten. Durch fluoreszenzbasierte Zellsortierung isolierte CXCR4-exprimierende Tumorzellen wiesen im Vergleich zu CXCR4-negativen Zellen ein erhöhtes Tumorbildungsvermögen auf, nicht aber Zellen, die CD117/c-KIT, ein für Tumor-initiiierende Zellen in anderen Tumoren beschriebener Marker überexprimierten. Interessanterweise war diese bevorzugte Tumorbildung CXCR4-positiver Zellen nicht beobachtbar, wenn nur eine sehr geringe Anzahl von Zellen injiziert wurde. Dies könnte ein Hinweis auf die Plastizität von Tumorstammzellen sein, die sich aufgrund der langen Latenzzeit aus differenzierten Tochterzellen durch Rückdifferenzierung bilden können (siehe nächste Abbildung).

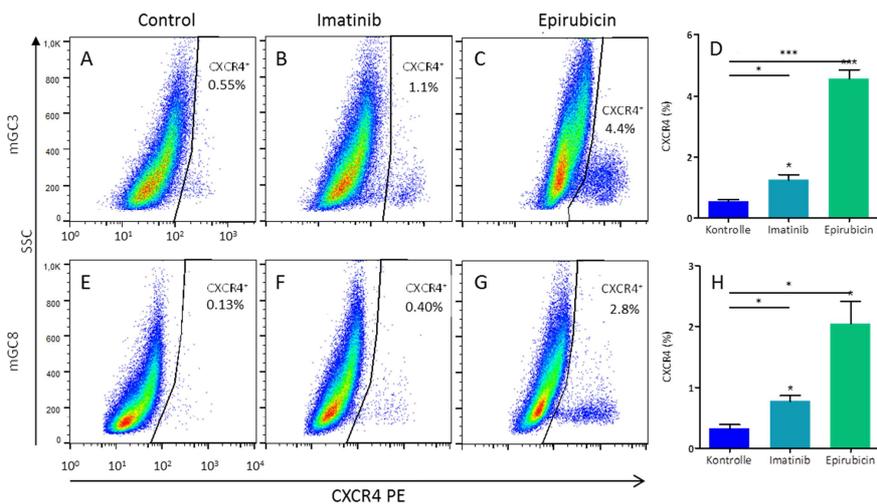
Weiterhin konnten wir zeigen, dass in den Magenkarzinomzelllinien mGC3 und mGC8 CXCR4-exprimierende Subpopulationen durch Behandlung mit dem Chemotherapeutikum Epirubicin und dem Rezeptortyrosinkinase-Inhibitor Imatinib angereichert werden, also vermutlich resistenter gegenüber (Chemo)therapeutika-Behandlung sind und selektiv überleben oder bevorzugt proliferieren (siehe übernächste Abbildung).

¹⁰ Ihler F, **Vetter E**, Pan J, Kammerer R, Debey-Pascher S, Schultze JL, **Zimmermann W**, Enders G. Expression of a neuroendocrine gene signature in gastric tumor cells from CEA424-SV40 large T antigen-transgenic mice depends on SV40 large T antigen. *PLoS ONE* 7(1), e29846 (2012).

¹¹ **Gassenmaier M**, **Chen D**, **Buchner A**, Henkel L, Schiemann M, Mack B, Schendel DJ, **Zimmermann W**, **Pohla H**. CXC chemokine receptor 4 is essential for maintenance of renal cell carcinoma-initiating cells and predicts metastasis. *Stem Cells* 31, 1467–1476 (2013).

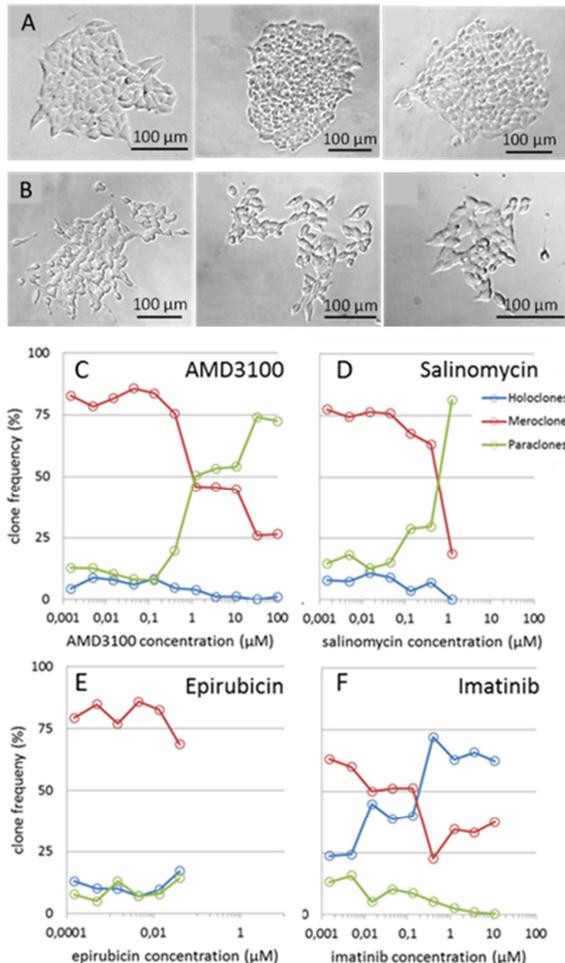


Unterschiedliches Tumorbildungspotential von CD117 und CXCR4 hoch und niedrig exprimierenden Magenkarzinomzellen in syngenem Mäusen. mGC8-Zellen wurden mit Anti-CD117-APC (A) oder Anti-CXCR4-PE-Antikörper (D) markiert und hoch und niedrig exprimierende Zellen wurden entsprechend der angegebenen Fenster durch Zellsortierung isoliert. Syngenem C57BL/6-Mäusen wurde subkutan entweder eine niedrige (1000/1200) oder hohe Dosis (16,000/10,000) von separierten CD117 hoch bzw. niedrig exprimierenden Zellen (B, C) oder CXCR4⁺ oder CXCR4⁻-Zellen injiziert (E, F). Tumorwachstum wurde zu den angegebenen Zeitpunkten mittels Schublehre bestimmt. Mittelwerte und Standardfehler sind angegeben. Das Tumolvolumen am Ende des Experiments nach Injektion von 10,000 CXCR4⁺-Zellen ist signifikant größer im Vergleich zur Tumorgröße bei Verwendung von CXCR4⁻-Zellen ($p = 0.037$). $n =$ Zahl der Injektionsstellen. Kronast, unveröffentlicht.



Anreicherung von CXCR4-positiven mGC3 und mGC8-Zellen nach Behandlung mit Imatinib und Epirubicin. mGC3 (A-D) und mGC8-Zellen (E-H) wurden mit oder ohne IC₅₀-Dosen Imatinib (20 μ M) bzw. Epirubicin (100 nM) für 3 Tage kultiviert. Der Anteil überlebender CXCR4 hoch exprimierender Zellen wurde nach Inkubation mit PE-konjugierten Anti-CXCR4-Antikörpern mit Hilfe von Durchflusszytometrie bestimmt. Mittelwerte und Standardfehler sind angegeben. *, $p < 0.05$; ***, $p < 0.001$; $n = 3$. SSC, seitliche Streuung. Kronast, unveröffentlicht.

Dies konnte unabhängig mit Hilfe des Koloniebildungstests gezeigt werden. Bei diesem Test werden die Zellen in einer so geringen Zelldichte ausgesät, so dass die Nachkommen dieser Zelle eine isolierte Kolonie bilden. Aus der Literatur ist bekannt, dass Tumorstammzellen und differenzierte Tochterzellen Kolonien unterschiedlicher Morphologie bilden können. Sogenannte Holoklone (kompakte Kolonien mit glatten Rändern) stammen vermutlich von Tumorstammzellen ab, während Paraklone (lockere Kolonien) von weiter ausdifferenzierten Tochterzellen gebildet werden. Meroklone weisen eine dazwischenliegende Morphologie auf (siehe nächste Abbildung).



Morphologie und Häufigkeit von Holo- und Paraklonen in mGC8-Zellen mit und ohne Inhibitoren-Behandlung. mGC8-Zellen wurden in Zweischritten in absteigender Zelldichte von 4000 bis 32 Zellen pro Vertiefung in einer 96-well-Platte ausgesät. Nach 20 Tagen, wurden Klone mit kompakter Morphologie (Holoklone, A) oder mit einer lockeren Anordnung beobachtet (B). Mischformen (B, rechtes Bild), wurden als Meroklone gewertet. Der Maßstab entspricht 100 µm. Ein Teil der Zellen wurde mit AMD3100, einem CXCR4-Antagonisten (C), dem Tumorstammzell-Inhibitor Salinomycin (D), dem Anthracyclin Epirubicin (E) sowie dem Tyrosinkinaseinhibitor Imatinib in absteigenden Konzentrationen für 14-16 Tage inkubiert und dann die Häufigkeit der Kolonien mit unterschiedlichen Klon-Morphologien unter dem Mikroskop (Objektiv 10x) bestimmt. Bei den höchsten Konzentrationen mit Koloniebildung wurden mindestens 30 Kolonien analysiert, bei den übrigen Konzentrationen, zwischen 75 und 200. Man beachte die Zunahme der Häufigkeit von Paraklonen (grüne Linien) mit zunehmender AMD3100- und Salinomycin-Konzentration, bei Imatinib beobachtet man dagegen eine Häufigkeitszunahme von Holoklonen mit zunehmender Wirkstoffkonzentration. Dies lässt auf eine unterschiedliche Spezifität der Inhibitoren gegenüber Tumorstammzellen und differenzierteren Tochterzellen schließen. Kronast und Zimmermann, unveröffentlicht.

In Gegenwart steigender Konzentrationen Imatinib und, im geringeren Ausmaß, Epirubicin nahm der Anteil von Holoklonen zu, der von Paraklonen ab. Interessanterweise bildeten sich weniger Holoklone aber vermehrt Paraklone in Gegenwart des CXCR4-Antagonisten AMD3100. Dies legt nahe, dass CXCR4 in der Tat einen Tumorstammzellmarker für mGC-Zellen darstellt und CXCR4-Signaltransduktion für die Aufrechterhaltung des Stammzellcharakters wichtig ist. Behandlung mit Salinomycin, einem bekannten selektiven Tumorstammzellinhibitor¹²,

¹² Gupta PB, Onder TT, Jiang G, Tao K, Kuperwasser C, Weinberg RA, Lander ES. Identification of selective inhibitors of cancer stem cells by high-throughput screening. *Cell* 138, 645-59 (2009).

zeigt auch in mGC8-Zellen eine selektive Abreicherung von Holoklonen und somit eine bevorzugte Hemmung von Tumorstammzellen.

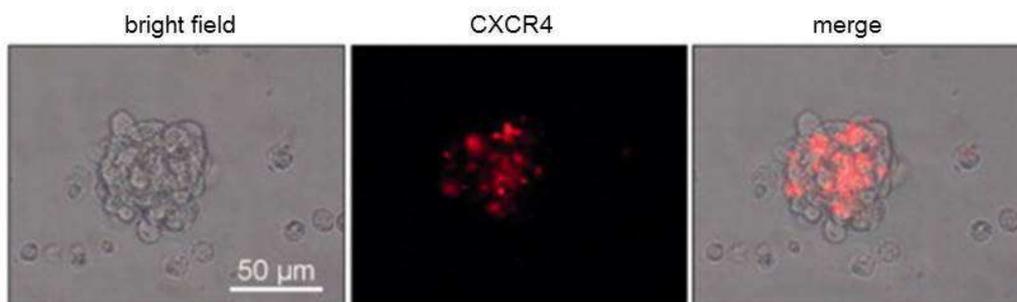
Zusammengenommen eröffnen diese Befunde neue Perspektiven in der Entwicklung neuartiger Tumortherapien u.a. durch zielgerichtete Inhibierung des Chemokinrezeptors CXCR4. Die nächsten Schritte umfassen den Nachweis von CXCR4-positiven Zellen in Primärtumoren von CEA424-SV40-T-Antigen-Mäusen und deren Bedeutung bei der Entwicklung von Therapieresistenz.

Charakterisierung und medikamentöse Beeinflussung von Tumorstammzellen im Nierenzellkarzinom

Heike Pohla, Maximilian Gassenmaier, Alexander Buchner, Dong Chen, Quynh-Trang Ngo, Rainer Riesenberger, Birgit Stadlbauer, Wolfgang Zimmermann

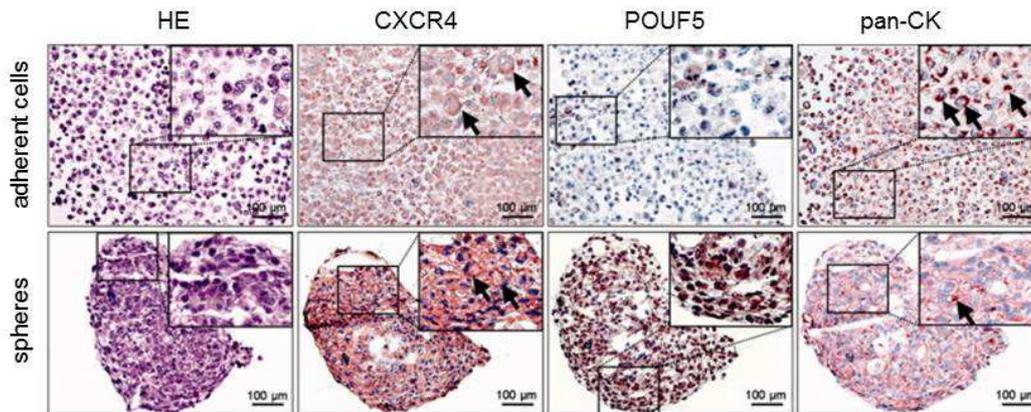
Kooperation: Dolores J. Schendel; Elfriede Nössner (Institut für Molekulare Immunologie, Helmholtz Zentrum München); Brigitte Mack (Molekulare Onkologie, Klinik für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Ludwig-Maximilians-Universität, München); Lynette Henkel, Matthias Schiemann (Institut für Medizinische Mikrobiologie,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

In den vergangenen Jahren wurden mehrere Tumorzelllinien von Patienten mit klarzelligem Nierenzellkarzinom (RCC) isoliert. Zwei Zelllinien (RCC-26, RCC-53) zeigten sich sowohl *in vitro* als auch *in vivo* im NOD/SCID-Mausmodell sehr unterschiedlich bzgl. ihres Wachstumspotentials. RCC-26 war nicht in der Lage *in vivo* Tumore zu induzieren. Beide Zelllinien wurden auch hinsichtlich der Expression putativer Stammzellmarker, ihrer *Sphere-forming*-Kapazität, ihrer Klonogenität und Differenzierungsfähigkeit untersucht. Dabei zeigten sich gravierende Unterschiede. Als ein unterscheidendes Merkmal kristallisierte sich insbesondere die Expression des Chemokinrezeptors CXCR4 heraus, der verstärkt in RCC-53 exprimiert wurde.



Immunfluoreszenz eines CXCR4-exprimierenden RCC-Spheres. Aus Gassenmaier et al., 2013.

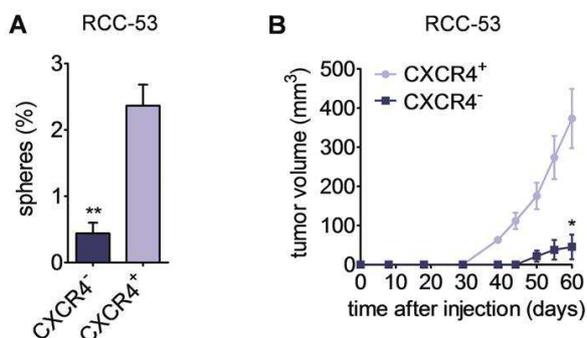
Es zeigte sich, dass CXCR4-positive Zellen in *Spheres* relativ zu adhären wachsenden Zellen angereichert werden und diese Zellen vermehrt Gene exprimieren, die typischerweise in gering differenzierten Stammzellen überexprimiert werden (sog. *stemness genes*).



Immunohistologische Färbung von CXCR4⁺ Zellen, die in Spheres angereichert sind und dort vermehrt *stemness* Moleküle wie z. B. POU5F1 exprimieren. HE, Hämalaun-Eosin; pan-CK, Pan-Cytokeratin. Die Pfeile zeigen stark gefärbte Zellen. Man beachte die Färbung von CXCR4 an der Zelloberfläche und im Zytoplasma sowie die Kernfärbung von POUF5. Aus Gassenmaier et al., 2013.

Neben POUF5 konnte auch eine erhöhte Expression weiterer *stemness*-Gene wie z.B. NANOG, und SOX2 beobachtet werden.

Des Weiteren zeigte sich, dass CXCR4-exprimierende Zellen bevorzugt Tumoren in immundefizienten Mäusen zu bilden, was wiederum typisch für Tumorstammzellen oder Tumor-initiiierende Zellen ist (wie der Name nahelegt).

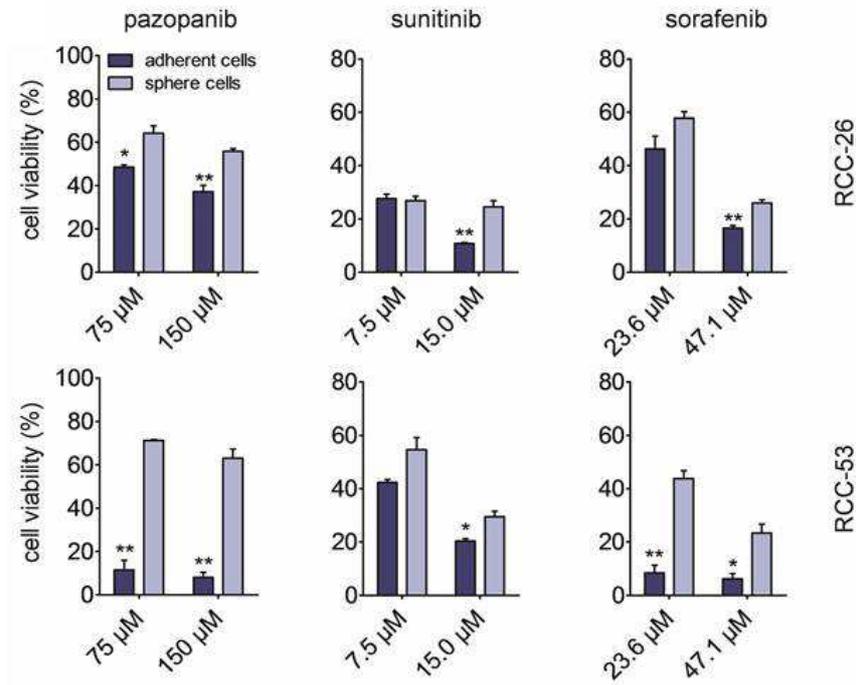


CXCR4-exprimierende Subpopulationen zeigen rascheres Tumorwachstum. Mittels FACS wurden hoch und niedrig CXCR4-exprimierende Zellpopulationen aus RCC-53 gewonnen und ihre *Sphere*-Bildung (A) und ihr Tumorbildungs-vermögen nach subkutaner Injektion in immundefizienten NOD/SCID-Mäusen bestimmt (B). Aus Gassenmaier et al., 2013.

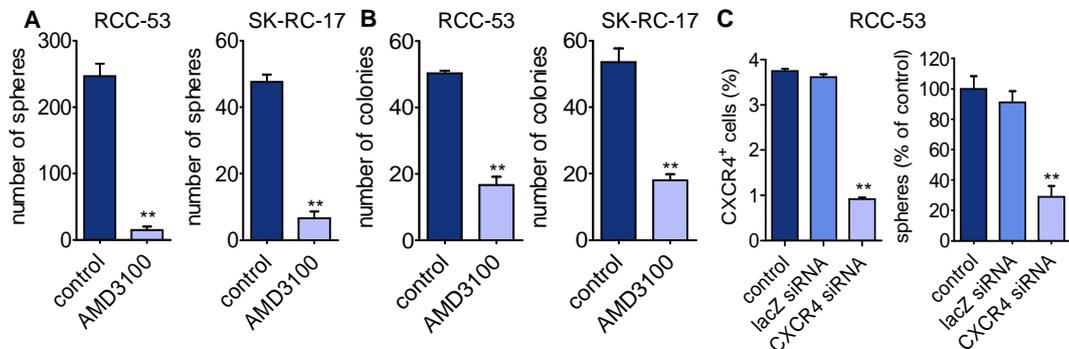
Da Tumorstammzellen im Verdacht stehen, aufgrund ihrer höheren Toleranz gegenüber schädigenden Behandlungen (wie Chemo- und Strahlentherapie), verantwortlich für Therapieresistenz von Tumoren zu sein, untersuchten wir die Empfindlichkeit von RCC-Zellpopulationen mit einem erhöhten Gehalt CXCR4-positiver Zellen (*Sphere*-Zellen) auf ihre Empfindlichkeit gegenüber Tyrosinkinaseinhibitoren (TKI), die aktuell als First- und Second-Line-Therapeutika beim RCC eingesetzt werden. Es zeigte sich, dass *Spheres* in der Tat eine höhere Resistenz im Vergleich zur Elternzelllinie aufweisen.

Bindung des CXCR4-Liganden (CXCL12) an seinen Rezeptor aktiviert eine Reihe von Signalwegen, die Überlebenssignale, Migration und Wachstum auslösen. Durch Vorbehandlung mit einem antagonistisch wirkenden CXCR4-Inhibitor (AMD3100)

oder mit CXCR4-siRNA konnte die *Sphere*- und Kolonie-Bildungskapazität der Zellen deutlich gesenkt werden. Die Daten wurden in *Stem Cells* publiziert¹³.



Sphere-Zellen sind resistenter gegenüber Pazopanib, Sunitinib und Sorafenib. Aus Gassenmaier et al., 2013.

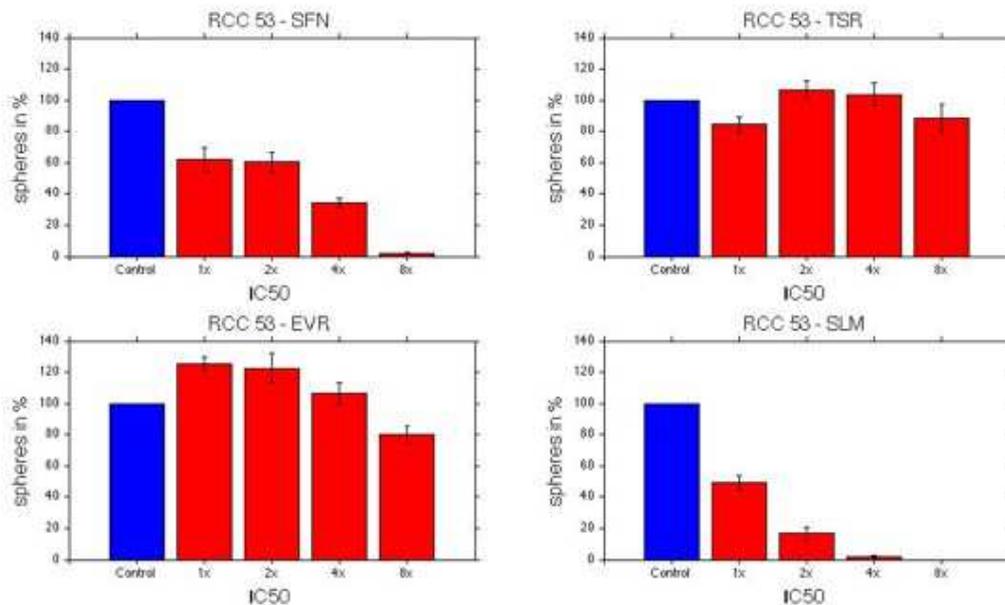


Abnahme der Sphere (A)- und Kolonie-Bildungskapazität (B) der Zelllinien RCC-53 und SK-RC-17 durch den CXCR4-Antagonisten AMD3100 und durch CXCR4-siRNA (C). lacZ-siRNA dient hier als Kontrolle. Aus Gassenmaier et al., 2013.

In einer weiteren Analyse testeten wir verschiedene Substanzen auf ihre Fähigkeit, Tumorstammzellen beim RCC zu inhibieren. Dazu zählten zum einen die mTOR-Inhibitoren Temsirolimus und Everolimus, die ebenfalls zur Behandlung des metastasierten RCC eingesetzt werden, zum anderen Salinomycin, ein Polyether-

¹³ Gassenmaier M, Chen D, Buchner A, Henkel L, Schiemann M, Mack B, Schendel DJ, Zimmermann W, Pohla H. CXC chemokine receptor 4 is essential for maintenance of renal cell carcinoma-initiating cells and predicts metastasis. *Stem Cells* 31, 1467-76 (2013).

Antibiotikum, das von *Streptomyces albus* gebildet wird sowie Sulforaphan, ein sekundärer Pflanzenstoff und Antioxidans, das im Brokkoli vorkommt.



Einfluss von Sulforaphan (SFN), Temsirolimus (TSR), Everolimus (EVR) und Salinomycin (SLM) auf die *Sphere*-Bildung. Angegeben sind steigende Konzentrationen ausgehend von der IC₅₀ Konzentration (SFN: 2,4 µM; TSR: 4,0 µM; EVR: 0,3 µM; SLM: 0,04 µM). Ngo und Pohla, unveröffentlicht.

Wie aus der Abbildung zu ersehen ist, blockieren Sulforaphan und Salinomycin bereits in geringer Konzentration die *Sphere*-Bildung, während Temsirolimus kaum blockiert und Everolimus in niedriger Konzentration sogar erst zu einer gesteigerten *Sphere*-Bildung führt, obwohl in allen Fällen IC₅₀-Konzentrationen (oder ein Vielfaches davon) eingesetzt wurden, bei denen adhärent wachsende Zellen für alle Medikamente gleichstark gehemmt werden. Derzeit wird auch die Wirkung der Substanzen auf die Koloniebildung, die CXCR4 Expression und *in vivo* im NOD/SCID-Mausmodell überprüft.

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

Alexander Buchner, Dong Chen

Kooperation: Matthias Maruschke (Urologische Klinik, Universität Rostock)

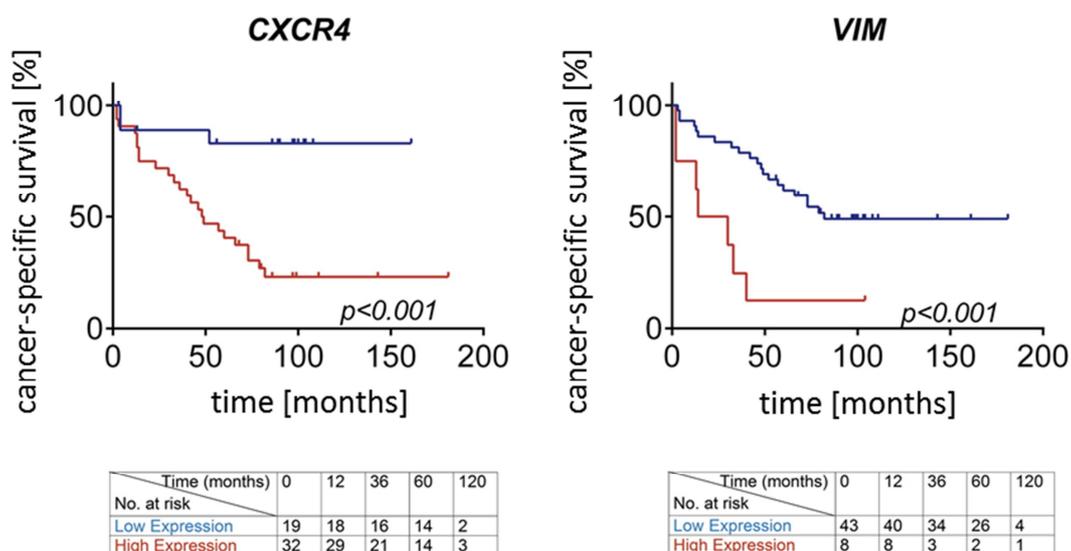
Die epithelial-mesenchymale Transition (EMT) ist ein zentraler zellbiologischer Prozess bei verschiedenen Tumorentitäten (z. B. Kolon- und Mammakarzinom). Dabei führen diverse Stimuli (z. B. Hypoxie) und Signale (z. B. über Rezeptor-Tyrosinkinasen) zu einer Aktivierung von Signal- und Stoffwechselwegen im Tumor, die eine Verschiebung des zellulären Phänotyps vom Epithel hin zu mesenchymalen Eigenschaften bewirken, was u. a. einhergeht mit erhöhter Mobilität und Invasivität der Tumorzellen. Eine gezielte Inhibierung dieser EMT *pathways* stellt einen neuartigen Ansatz der Tumorthherapie dar, mit dem man den Phänotyp der Tumorzellen möglicherweise im Sinne einer *mesenchymal-epithelial transition* (MET)

wieder in einen weniger aggressiven umwandeln kann. Außerdem zeigen Studien bei mehreren Tumorentitäten, dass EMT im Tumor mit der Prognose der Patienten korreliert.

Zur Bedeutung von EMT beim Nierenzellkarzinom gibt es erst wenige Daten. Um zu erforschen, ob EMT bei diesem Tumor in relevantem Ausmaß stattfindet und ob die Expression der beteiligten Gene mit der Prognose korreliert, wurde zunächst ein *gene set* mit 46 EMT-assoziierten Genen zusammengestellt. Von 28 Primärtumoren und 14 normalen Proben aus Nierengewebe lagen Expressionsprofile vor (GeneChip HG U133 Plus 2.0, Affymetrix). An diesen Microarray-Daten wurde das EMT *gene set* mittels GSEA (*gene set enrichment analysis*) untersucht; dabei zeigte sich eine signifikant erhöhte Aktivität EMT-assoziiierter Gene im Nierentumorgewebe gegenüber dem normalen Nierenparenchym.

Im nächsten Schritt wurde die Expression von zwölf ausgewählten EMT-assoziierten Genen mittels quantitativer RT-PCR an weiteren kryokonservierten Gewebeproben von 82 Patienten mit klarzelligem Nierenzellkarzinom und bekanntem Krankheitsverlauf analysiert (19 x normales Nierenparenchym, 55 x Primärtumor, 38 x Metastase). Neben dem Vergleich von Normalgewebe, Primärtumor und Metastase wurde der Zusammenhang zwischen Genexpression und tumorspezifischem Überleben untersucht.

In der univariaten Analyse korrelierte ein besseres Überleben der Patienten signifikant mit einer erniedrigten Expression von CXCR4, Vimentin, Fibronectin und TWIST1. In der multivariaten Analyse waren CXCR4 und Vimentin unabhängige prognostische Faktoren. Die Inhibition des Tumorstammzellmarkers CXCR4 könnte eine Therapieoption für die Zukunft darstellen. Es konnte gezeigt werden, dass die Expression von CXCR4 im Verlauf der malignen Progression auf RNA- und Proteinebene signifikant zunimmt. Einige EMT-assoziierte Gene sind gegenüber dem Normalgewebe im Primärtumor deutlich erhöht, was für EMT beim Nierenzellkarzinom spricht. Interessanterweise sprechen einige Expressionsbefunde in den Metastasen dafür, dass hier im Vergleich zum Primärtumor ein Stück weit eine gegenteilige Entwicklung (*mesenchymal-epithelial transition* = MET) vorliegen könnte.



Tumorspezifisches Überleben in Abhängigkeit von der CXCR4- und Vimentin-mRNA-Expression im Primärtumorgewebe der Validierungsgruppe (Kaplan-Meier-Plots).

Zusammenfassend finden sich starke Belege für eine Rolle von EMT in der Biologie des klarzelligigen Nierenzellkarzinoms, was ein Ansatzpunkt für zukünftige neue Therapiestrategien sein kann. Die Ergebnisse dieses Forschungsprojekts wurden kürzlich in *The Journal of Urology* publiziert.¹⁴

Identifikation neuer Prognosemarker beim Nierenzellkarzinom mittels Expressionsprofilen und neuer Filterstrategien

Alexander Buchner, Dong Chen

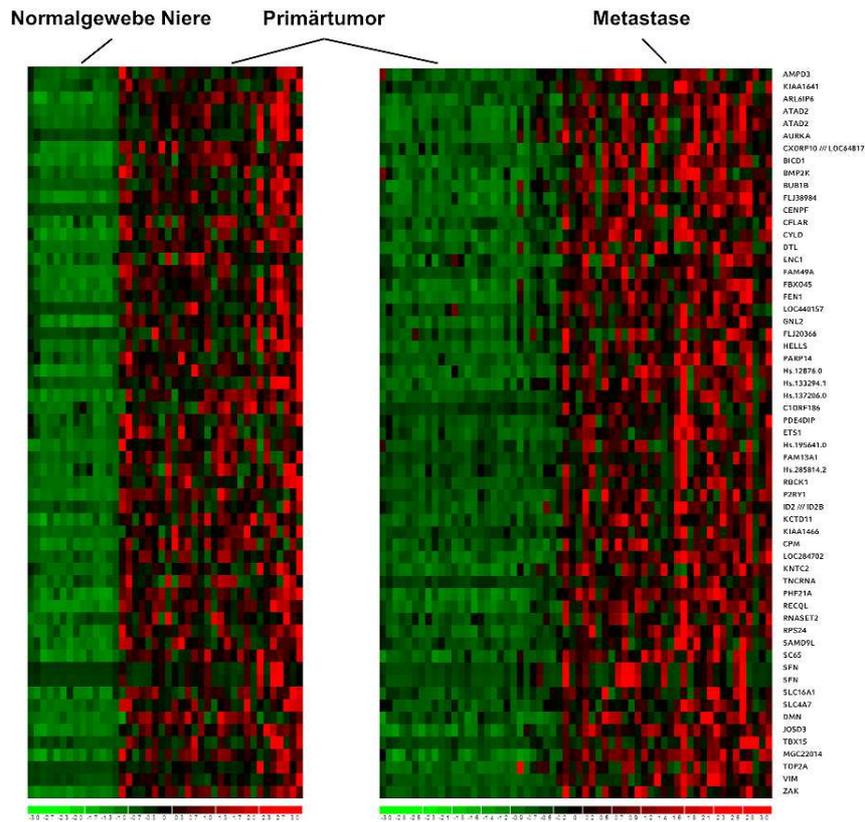
Kooperation: Matthias Maruschke (Urologische Klinik, Universität Rostock)

Patienten mit Nierenzellkarzinom zeigen oft auch bei ähnlicher TNMG-Klassifikation einen sehr unterschiedlichen Krankheitsverlauf. Um eine möglichst optimale, dem individuellen Risikoprofil angepasste Follow-up- und Therapieplanung zu ermöglichen, ist die Identifikation neuer unabhängiger Prognosefaktoren wichtig. In diesem Projekt wurde ausgehend von Expressionsprofilen (normales Nierengewebe, Primärtumor und Metastasen) eine neuartige Filterstrategie angewandt, um Prognosefaktoren zu identifizieren. Die Hypothese bei dieser Strategie ist, dass Gene, deren Expression im Verlauf der Tumorprogression (Normalgewebe → Primärtumor → Metastase) zunimmt, besonders wichtig für die Tumorbilogie und dadurch potentiell prognostisch relevant sind.

Aus Gewebeproben von Patienten mit klarzelligem Nierenzellkarzinom (14x normales Nierenparenchym, 28x Primärtumor und 32x Metastase) wurden mit Hilfe von Microarrays Expressionsprofile erstellt (Affymetrix GeneChip HG U133 Plus 2.0, ca. 54.000 Transkripte). Die Expression aller Gene wurde verglichen zwischen Normalgewebe und Primärtumor sowie zwischen Primärtumor und Metastasen, Normalgewebe und Primärtumor sowie zwischen Primärtumor und Metastasen. Filterkriterien waren jeweils eine Zunahme der Expression um mindestens Faktor 2 sowie ein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$). Alle Gene, die diese Kriterien erfüllten, wurden uni- und multivariat auf ihre Relevanz für das tumorspezifische Überleben getestet; dabei blieben 15 Transkripte übrig. undefinierte und schwach exprimierte Transkripte wurden von der weiteren Analyse ausgeschlossen.

Die verbliebenen acht Gene mit prognostischem Potential wurden mittels quantitativer RT-PCR an einer Gruppe von 52 Primärtumoren validiert. Dadurch konnten vier Gene als neue unabhängige Prognosefaktoren beim Nierenzellkarzinom identifiziert werden: TOP2A (*topoisomerase II alpha*), TET3 (*tet methylcytosine dioxygenase 3*), ATAD2 (*ATPase family, AAA domain containing 2*) und HELLS (*helicase, lymphoid-specific*). Diese Faktoren können helfen bei der individuellen Risikostratifizierung der Patienten und sind außerdem Ansatzpunkte zur Entwicklung neuer Therapieformen.

¹⁴ **Chen D, Gassenmaier M, Maruschke M, Riesenberger R, Pohla H, Stief CG, Zimmermann W, Buchner A.** Expression and prognostic significance of a comprehensive epithelial- mesenchymal transition gene set in renal cell carcinoma. *J Urol* 191, 479-86 (2014).



Selektion von Kandidatengenen mit prognostischem Potential für Nierenzellkarzinompatienten aufgrund ihrer Überexpression in Primärtumoren und Metastasen. Heat maps mit Genen, deren Expression zwischen Normalgewebe und Primärtumor sowie zwischen Primärtumor und Metastase um Faktor ≥ 2 zunimmt, außerdem jeweils $p < 0,05$. Farbcode für jeden Vergleich: grün = niedrige Expression, rot = hohe Expression. Chen und Buchner, unveröffentlicht.

Multivarianzanalyse (Cox-Regressionsmodelle). Der mRNA-Gehalt der vier neu identifizierten Gene ist jeweils gegenüber der TNMG-Klassifikation ein unabhängiger Prädiktor für das tumorspezifische Überleben beim Nierenzellkarzinom (high/low: Expression über/unter dem Median des mRNA-Gehalts). Chen und Buchner, unveröffentlicht.

Genexpression	Hazard ratio	95%-Konfidenzintervall	p-Wert
ATAD2 high vs. low	3,8	1,3 – 11,2	0,014
HELLS high vs. low	3,6	1,4 – 9,2	0,007
TET3 high vs. low	2,9	1,1 – 7,3	0,031
TOP2A high vs. low	4,4	1,6 – 11,8	0,004

Eine Publikation zu diesem Thema ist derzeit in Vorbereitung und wird in Kürze eingereicht.

3.2.2 Entwicklung, Optimierung und klinische Testung von Tumorzellvakzinen

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

Heike Pohla, Alexander Buchner, Birgit Stadlbauer

Förderung: DFG, BMBF, beendet

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

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

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

Die am häufigsten erkannten Antigene waren: ILGF-BP3, MMP7, Ceruloplasmin, *transcriptional intermediary factor 1*, Adipophilin, und RGS-5. Einige Patienten reagierten sogar auf Peptide von Antigenen, die nicht von der Vakzine exprimiert werden, was auf *epitope spreading* hindeutet. Des Weiteren konnte eine signifikante Abnahme der Frequenz regulatorischer T-Zellen (Treg) nach Vakzinierung festgestellt werden ($p = 0,012$).

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

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

Die Komplexität des Zytokinnetzwerks macht es nicht einfach, eine Relation zwischen klinischem Ergebnis, *immune response rate* (IRR) und systemischer Zytokinmenge zu sehen. Es konnte jedoch festgestellt werden, dass die Patienten mit höherer IRR, einer stärkeren DTH-Reaktion und stabiler Erkrankung bei längerem

Überleben generell höhere Zytokinkonzentrationen eines gemischten T_H1/T_H2-like Profils aufwiesen^{15,16}.

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

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

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

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

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

Zur Analyse des Zytokinprofils im Serum und in Haut-infiltrierenden Lymphozyten wurden auch hier multiplexe Zytokinassays eingesetzt. Höhere IL-10 Werte im Serum zum Zeitpunkt vor Immunisierung wurden oft bei Patienten mit schnellerer PSA-Progression und kürzerer Überlebenszeit beobachtet. Aber auch in Patienten, die vermehrt IFN- γ sezernierten, wurden moderate Mengen an IL-10 gemessen. Diese

¹⁵ Buchner A, Pohla H, Willimsky G, Frankenberger B, Frank R, Baur-Melnyk A, Siebels M, Stief CG, Hofstetter A, Kopp J, Pezzutto A, Blankenstein T, Oberneder R, Schendel DJ. Phase 1 trial of allogeneic gene-modified tumor cell vaccine RCC-26/CD80/IL-2 in patients with metastatic renal cell carcinoma. *Hum Gene Ther* 21(3):285-97 (2010).

¹⁶ Pohla H, Buchner A, Stadlbauer B, Frankenberger B, Stevanovic S, Walter S, Frank R, Schwachula T, Olek S, Kopp J, Willimsky G, Stief CG, Hofstetter A, Pezzutto A, Blankenstein T, Oberneder R, Schendel DJ. High immune response rates and decreased frequencies of regulatory T cells in metastatic renal cell carcinoma patients after tumor cell vaccination. *Mol Med*. 18:1499-508 (2013).

Patienten zeigten sowohl eine längere Überlebenszeit als auch eine längere Zeit bis zur PSA-Progression. Damit konnten wir dasselbe Phänomen wie bei den Patienten der RCC-Studie beobachten. Patienten, die einen erfolgreichen Verlauf unter Immuntherapie nahmen, wiesen ein gemischtes T_H1/T_H2-Zytokinprofil und grundsätzlich höhere Zytokinkonzentrationen auf.

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

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

Individualisierte DC-Vakzine für Patienten mit hormonrefraktärem Prostatakarzinom

Heike Pohla, Birgit Stadlbauer

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

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

Einsatz einer Multipeptidvakzine zur Behandlung von Patienten mit metastasiertem Nierenzellkarzinom

Heike Pohla, Birgit Stadlbauer

Kooperation: immatics biotechnologies GmbH, Tübingen

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 (www.immatics.com). IMA901 stellte sich in einer multizentrischen klinischen Phase-I-Studie als eine sehr sichere gut verträgliche und immunogene Multi-peptidvakzine heraus (IMA901-101, Kooperation: M. Staehler, Urologische Klinik, LMU), so dass eine multizentrische klinische Phase-II-Studie (IMA901-202; Kooperation: R. Oberneder, Urologische Klinik München-Planegg) ebenfalls durchgeführt wurde.

Diese Phase-II-Studie zeigte, dass niedrig dosiertes Cyclophosphamid die Frequenz der Treg reduzierte und sich ein verlängertes Gesamtüberleben bei den Patienten zeigte, die mit einer stärkeren Immunantwort auf die Vakzine reagierten. In einer Analyse der MDSC wurden die Subpopulationen MDSC4 und MDSC5 als prognostische Marker für das Gesamtüberleben identifiziert. Außerdem ließen sich die Biomarker Apolipoprotein A1 und das CCL17 als prädiktive Marker für sowohl die Immunantwort als auch das Überleben identifizieren¹⁷.

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

Einsatz einer mRNA-Vakzine zur Behandlung von Patienten mit metastasiertem hormonrefraktärem Prostatakarzinom

Heike Pohla, Birgit Stadlbauer

Kooperation: CureVac GmbH, Tübingen, ABF Pharmaceutical Services GmbH, Wien

Hierbei handelt es sich um eine randomisierte, Placebo-kontrollierte Phase I/II Doppelblindstudie mit einer sog. RNAActive® Vakzine, entwickelt von der Firma CureVac GMBH (www.curevac.com). Es werden Patienten mit metastasiertem hormonrefraktärem Prostatakarzinom behandelt, die keine oder nur minimal klinische Symptome aufweisen.

Die Vakzine ist eine modifizierte mRNA, spezifisch für Prostatakarzinom-spezifische Antigene, die eine verbesserte Stabilität aufweist, translatierbar ist, um eine gute Antigenexpression *in vivo* zu gewährleisten und gleichzeitig eine erhöhte

¹⁷ Walter S, Weinschenk T, Stenzl A, Zdrojowy R, Pluzanska A, Szczylik C, Staehler M, Brugger W, Dietrich P-Y, Hilf N, Schoor O, Fritsche J, Mahr A, Mendrzyk R, Maurer D, Vass V, Trautwein C, Lewandrowski P, Flohr C, **Pohla H**, Stanczak JJ, Bronte V, Mandruzzato S, Biedermann T, Pawelec G, Derhovanessian E, Yamagishi H, Tsuneharu M, Hongo F, Takaha N, Hirakawa K, Tanaka H, Stevanovic S, Rammensee H-G, Frisch J, Mayer-Mokler A, Kirner A, Reinhard C, Singh-Jasuja H. Prolonged survival of patients with advanced renal cancer responding to multi-peptide vaccine IMA901 after single-dose cyclophosphamide. *Nat Med*, 18(8):1254-1261 (2012).

immunstimulatorische Kapazität bewirkt durch Bindung an *Toll-like*-Rezeptoren (TLR7, TLR8) auf den Antigen-präsentierenden Zellen (APC) im Patienten.

Auch hier bearbeiten wir wieder die Blutproben für das immunologische *Monitoring* (in Kooperation mit der Urologischen Klinik München-Planegg und der Urologischen Klinik rechts der Isar).

3.2.3 Untersuchungen zur T-Zellantwort nach PDT bei Glioblastomen

Heike Pohla, Gabriele Strauß, Birgit Stadlbauer, Herbert Stepp, Adrian Rühm, Wolfgang Zimmermann

Kooperation: Simone Kreth (Klinik für Anästhesiologie, Klinikum der LMU München), Friedrich-Wilhelm Kreth (Klinik für Neurochirurgie, Klinikum der LMU München)

Das *Glioblastoma multiforme* ist der häufigste maligne Tumor des zentralen Nervensystems. Die Prognose für die Gesamtpopulation ist trotz aggressiver multimodaler Behandlungsstrategien noch immer sehr schlecht. Hohe zelluläre Proliferationsraten, frühzeitige diffuse Invasion einzelner Gliomzellen in das umgebende gesunde Hirngewebe sowie eine ausgeprägte Strahlen- und Chemotherapieresistenz sind wesentliche Ursachen für die sehr kurze Überlebenszeit von nur 15 Monaten. Ein neuartiger Therapieansatz ist die stereotaktische interstitielle photodynamische Therapie (iPDT), siehe Berichtsteil des Laser-Forschungslabors). Aktuelle klinische Nachuntersuchungen haben im ersten Patientenkollektiv überraschend hohes Langzeitüberleben gezeigt. Lokale photodynamische Reaktionen, die zu Apoptose oder Nekrose der Tumorzellen führen können diese günstigen therapeutischen Effekte nicht schlüssig erklären. Erste Hinweise ergaben, dass neben lokalen zytotoxischen Reaktionen auch durch zelluläre PDT-Folgeprodukte ausgelöste und gegen die Glioblastomzellen gerichtete Immunreaktionen die beobachteten Langzeiteffekte einer PDT erklären könnten. Genomweite Transkriptionsanalysen zeigten, dass Tumorzellen nach sublethaler PDT, wie erwartet, sehr effizient so genannte *Early-response*-Transkriptionsfaktor-(*c-fos*, *Jun*), Hitzeschockproteingene (u. a. *HSP70*) und andere Stress-Gene aber auch Zytokin- und Chemokin-Gene hochregulierten¹⁸. Dieses wird durch Beobachtungen gestützt, dass sich Lysate von Zellen, die einer PDT-Behandlung unterzogen worden waren, signifikant potenter in der Auslösung einer Anti-Tumorimmunantwort erwiesen, als solche die mit UV-Licht, Gamma-Strahlung behandelt worden sind.¹⁹ Außerdem wiesen T-Zell-defiziente Mäuse eine deutlich geringere Therapieantwort nach PDT auf im Vergleich zu immunkompetenten Tieren. Etminan et al.²⁰ konnten in Gliomzell/Immunzell-Kokulturen zeigen, dass PDT-

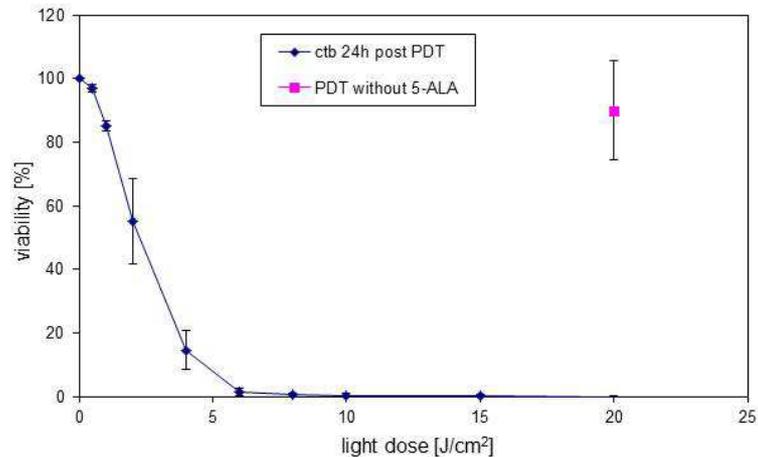
¹⁸ Kammerer R, Buchner A, Palluch P, Pongratz T, Oboukhovskij K, Beyer W, Johansson A, Stepp H, Baumgartner R, Zimmermann W. Induction of immune mediators in glioma and prostate cancer cells by non-lethal photodynamic therapy. *PLoS One* 6(6):e21834 (2011).

¹⁹ Korbelik M, Sun J. Photodynamic therapy-generated vaccine for cancer therapy. *Cancer Immunol Immunother* 55(8):900-9 (2006).

²⁰ Etminan N, Peters C, Lakbir D, Bünemann E, Börger V, Sabel MC, Hänggi D, Steiger HJ, Stummer W, Sorg RV. Heat-shock protein 70-dependent dendritic cell activation by 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic treatment of human glioblastoma spheroids in vitro. *Br J Cancer* 2011 105(7):961-9 (2011).

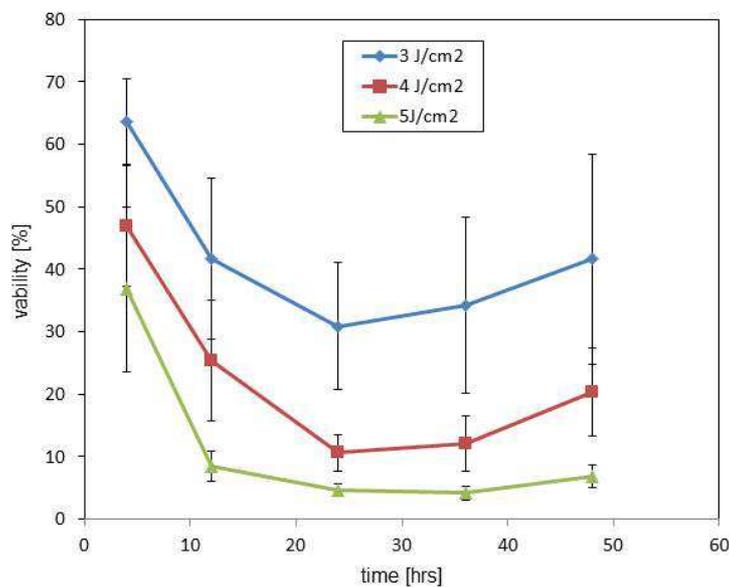
Behandlung von Gliomzellen die Reifung und Migration von dendritischen Zellen fördert; diese wiederum sind bekannte Induktoren einer T-Zellantwort²¹.

Der Einfluss PDT-behandelter Gliomzellen auf die T-Zellantwort ist bislang nicht untersucht. Zunächst wurde die Glioblastomzelllinie U87 mit dem Photosensibilisator 5-ALA inkubiert, mit Laserlicht unterschiedlicher Stärke bestrahlt und anschließend die Vitalität der Tumorzelllinie bestimmt (siehe Abbildung).



Vitalität der Glioblastomzelllinie U87 in Abhängigkeit von der Strahlendosis. Strauß und Pohla, unveröffentlicht.

Im Bereich zwischen 3-5 J/cm² wurde dann eine Zeitkinetik durchgeführt (siehe nächste Abbildung).

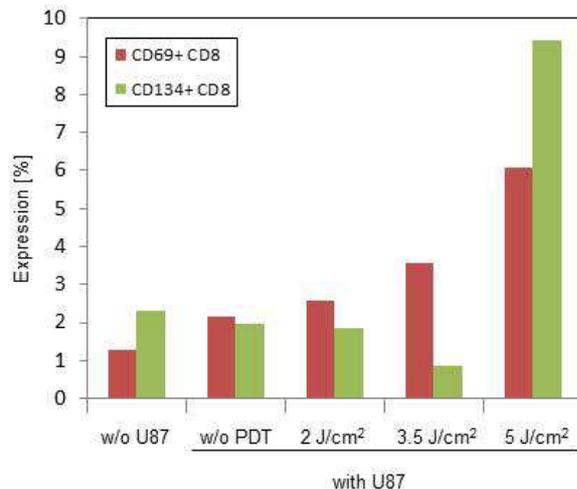


Vitalität der Glioblastomzelllinie U87 zu verschiedenen Zeiten nach Bestrahlung. Strauß und Pohla, unveröffentlicht.

Für die Cokulturen mit PBMC verschiedener gesunder und kranker Patienten wird dann eine sublethale und lethale Strahlendosis ausgewählt, um zu sehen, welchen Einfluss die so bestrahlten Tumorzellen auf die PBMC haben. Die nächste Abbildung

²¹ Jalili A et al. J. Effective photoimmunotherapy of murine colon carcinoma induced by the combination of photodynamic therapy and dendritic cells. *Clin Cancer Res* 10(13):4498-508 (2004).

zeigt beispielsweise die Expression von CD69 (früher Aktivierungsmarker) und CD134 (sekundäres kostimulatorisches Molekül, exprimiert nach Aktivierung von T-Zellen) auf CD8-positiven zytotoxischen T-Zellen nach Kokultur mit bestrahlten und unbestrahlten Glioblastomzellen. Insgesamt zeigt sich bei den verschiedenen Spendern ein sehr heterogenes Muster, und um daraus Schlüsse zu ziehen, sind noch umfangreiche Analysen notwendig.



Expression von CD69 und CD134 nach Cokultur von PBMC mit unbestrahlten und bestrahlten U87-Zellen. Strauß und Pohla, unveröffentlicht.

3.2.4 Modulation der Funktion regulatorischer T-Zellen

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

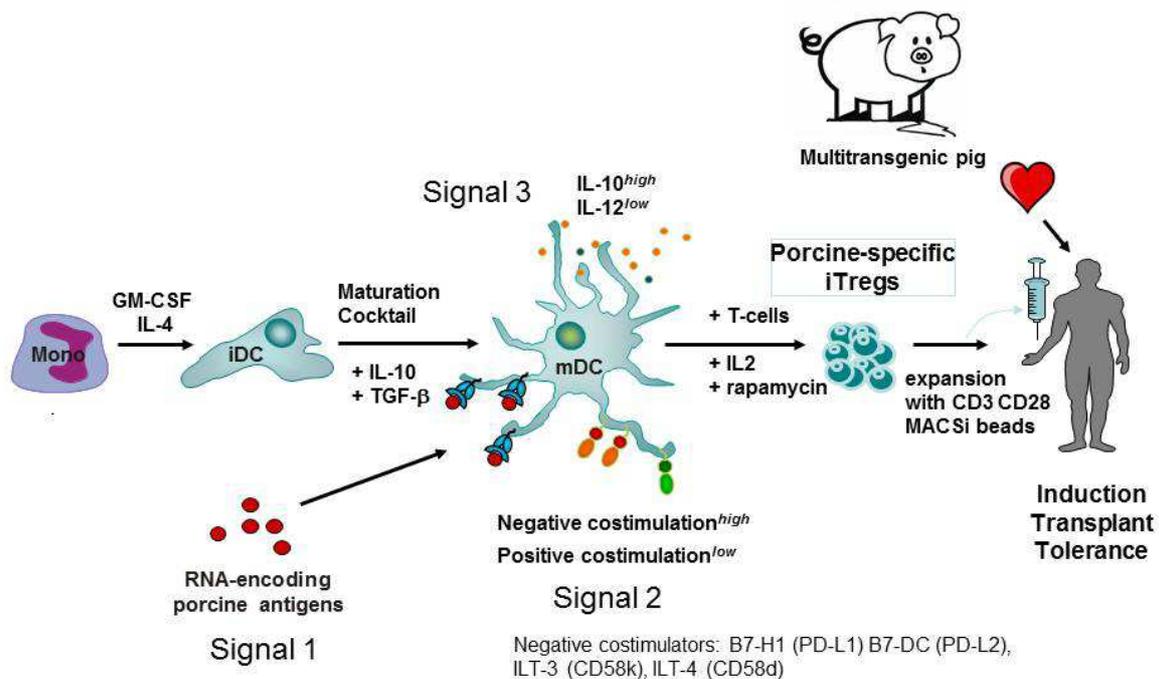
Kooperation: Dolores J. Schendel (Institut für Molekulare Immunologie, Helmholtz Zentrum München); Bruno Reichart, Paolo Brenner, Jan Michael Abicht und Tanja Mair (Walter-Brendel-Zentrum München)

Regulatorische T-Zellen (Treg) spielen in der Immunologie eine zentrale Rolle und gehören derzeit zu den am intensivsten erforschten Zellen des Immunsystems. Sie besitzen suppressive Eigenschaften, die es ihnen ermöglichen, Immunreaktionen zu kontrollieren. So kann eine Depletierung der Zellen oder die Dysfunktion zwar zur Entstehung oder Aufrechterhaltung von Autoimmunerkrankungen oder Allergien führen, aber auch die Reaktivität Tumor-spezifischer T-Zellen fördern. Bei ca. 2/3 unserer Nierenzellkarzinompatienten konnten wir während der Vakzinierung eine zahlenmäßige Reduktion der Treg und gleichzeitig eine erhöhte Frequenz Tumorantigen-spezifischer T-Zellen beobachten. Die zugrunde liegenden Mechanismen versuchen wir derzeit aufzuklären. Treg, nachteilig in der Tumorummunologie, sind beispielsweise in der Transplantationsimmunologie zur Blockade der Gewebeabstoßung durchaus erwünscht.

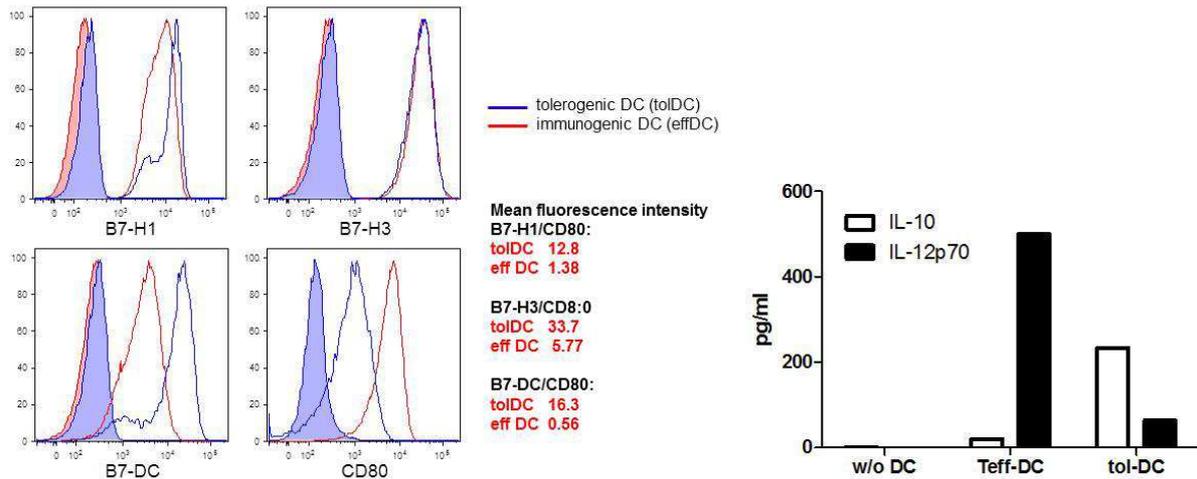
In Deutschland warten derzeit etwa 12.000 Patienten auf ein Spenderorgan. Nur 4.700 Transplantationen können pro Jahr durchgeführt werden. 20% der Patienten sterben auf der Warteliste. Eine Alternative, an der derzeit intensiv geforscht wird, ist die Xenotransplantation, wobei hier das Schwein in Frage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

Im vergangenen Jahr wurden Methoden zur Isolierung, Anreicherung und Expansion humaner und nicht-humaner Primaten nTreg aus Blut und Lymphknoten etabliert. Die Expansion erfolgt auf CD3/CD28-beschichteten Mikrotiterplatten oder MACSiBeads (Miltenyi) unter Zugabe von hohen Dosen IL-2 und 1 nM Rapamycin. Ebenso wurde die Generierung von zwei verschiedenen DC-Zellpopulationen aus dem Blut humaner und nicht-humaner Primaten etabliert. Zum einen sog. tolerogene DC (tolDC), die zur Herstellung xenoreaktiver Treg dienen, zum anderen normale DC zur Herstellung xenoreaktiver Effektor-T-Zellen. Hierzu werden zunächst unreife DC (iDC) aus Monozyten unter Zugabe von GM-CSF und IL-4 generiert, die man dann unter Zugabe eines komplexen Maturierungscocktails reifen lässt (siehe Abbildung). Für tolDC werden IL-10 und TGF- β (+ GM-CSF, IL-4, IL-1 β , TNF- α , PGE₂, IL-6) zugegeben, für Effektor-DC (effDC) GM-CSF, IL-4, IL-1 β , TNF- α , PGE₂, IFN- γ und Resiquimod (R848, *Toll-like-Rezeptor-7/8*-Agonist). Anschließend werden die DC mit xenospezifischer *ivt* (*in vitro transcribed*)-RNA über Elektroporation beladen. Für die Herstellung der *ivt*-RNA wird zuvor aus Schweinegewebe mRNA isoliert. Anschließend wird doppelsträngige cDNA synthetisiert, amplifiziert und wieder enzymatisch in RNA umgeschrieben und per Elektroporation in die tolDC eingebracht. Die tolDC, die zur Herstellung der xenoreaktiven iTreg dienen, sind dadurch charakterisiert, dass sie kaum IL-12 aber viel IL-10 sezernieren und verstärkt negativ-kostimulatorische Moleküle wie z. B. B7-H1 und B7-DC exprimieren (siehe Abbildungen). Für den adoptiven Transfer werden die xenoreaktiven Treg dann expandiert.

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



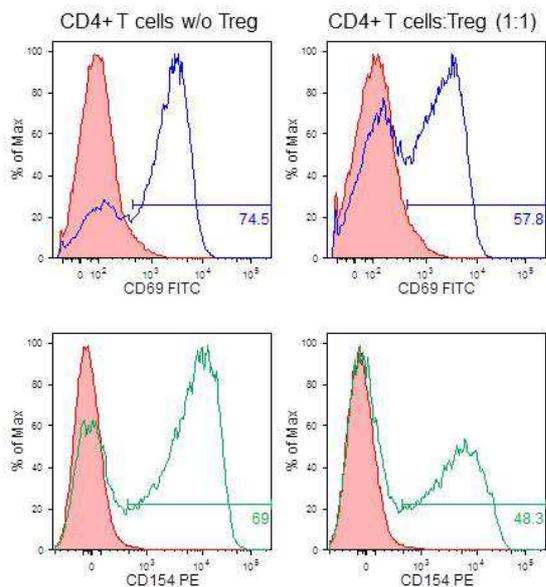
Schema zur Herstellung xenoreaktiver Treg für den adoptiven Transfer.



Vergleich von tolerogenen DC (tolDC) zu immunogenen DC (effDC) in Bezug auf das Verhältnis negativ kostimulatorischer Moleküle B7-H1, B7-H3 und B7-DC zu dem positiv kostimulatorischen Molekül CD80. Gemessen wurde hier die Expression mittels Durchflusszytometrie. Li und Pohla, unveröffentlicht (links).

Bestimmung der Zytokinsekretion von IL-10 und IL-12 mittels ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) in tolDC und effDC. Li und Pohla, unveröffentlicht (rechts).

Um die Funktion der Treg zu überprüfen, wurde ein neuer durchflusszytometrischer Assay etabliert. Hierbei wird die Expression des Aktivierungsmarker CD69 und die Expression von CD154 (= CD40-L) in stimulierten T-Zellen nach Inkubation mit Treg (siehe Abbildung) bestimmt.



Treg-Funktionsassay. CD4⁺ T-Zellen wurden stimuliert in Abwesenheit oder Anwesenheit von Treg. Die Expression von CD69 (Aktivierungsmarker) und CD154 (kostimulatorisches Molekül auf aktivierten T-Zellen) wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Es zeigt sich deutlich eine Inhibition der Expression durch Treg. Li und Pohla, unveröffentlicht.

Ferner werden derzeit Blutproben von Pavianen vor und nach Xenotransplantation für ein Immunmonitoring gesammelt. Ein wichtiger Punkt für die weitere Forschung ist die Analyse der Stabilität der Treg-Suppressorfunktion. Die Erkenntnisse hieraus sollen dann sowohl dem Tumor- als auch dem Transplantationsprojekt zugutekommen.

3.2.5 Weiterentwicklung des Immunmonitorings

Heike Pohla, Birgit Stadlbauer

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

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

Professionelles Immunmonitoring umfasst die parallele Anwendung der unterschiedlichsten Technologien, die nur zusammen die Bestimmung der Frequenz, des Phänotyps, die Funktion und die *Homing*-Kapazität Vakzine-induzierter Lymphozyten in der Zirkulation oder im Zielgewebe ermöglichen. Nur eine Kombination der Methoden wird auch zu einem validen Set von Surrogatmarkern für erfolgreiche immuntherapeutische Strategien in der Zukunft führen. Folgende Technologien wurden für das Immunmonitoring am LTI etabliert: der ELISPOT zur Quantifizierung Antigen-spezifischer T-Zell-Antworten anhand von Zytokin- bzw. Granzym- oder Perforinproduktion, *cytometric bead arrays* und die Luminex-Technologie für die gleichzeitige Quantifizierung von bis zu 30 verschiedenen Zytokinen und Chemokinen aus Serum und Zellkulturüberständen, der Zytokin-Sezernierungsassay bzw. *Cytokine-capture*-Assay, der eine Anreicherung z. B. CD4⁺ 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, die quantitative TCR-Analyse mittels *Real-time*-RT-PCR sowie die Frequenzbestimmung von nTreg und MDSCs.

Die AG H. Pohla ist auch hier weiterhin in die Immunmonitoring-Plattform des Helmholtz-Zentrums München eingebunden und hat an mehreren internationalen Ringversuchen des *Cancer Immunotherapy Consortiums* (CIC) des *Cancer Research Institutes*, New York und der *Monitoring Working Group* der *Association for Cancer Immunotherapy* zur Standardisierung der Immunmonitoring-Technologien erfolgreich teilgenommen (Einsatz serumfreien Mediums und unterschiedlicher Einfriermedien beim ELISPOT, Panel zur *Gating*-Strategie bei intrazellulären FACS-Analysen, Einsatz Qdot-konjugierter Multimere, Luminex-Technologie). 2013 wurde außerdem im Rahmen einer internationalen Kooperation (CIC) eine Panelanalyse zur standardisierten Auswertung von ELISPOTs durchgeführt. Alle Teilnehmer werteten exakt das identische Set an Bilddateien aus, die entsprechend der verwendeten Reader von den ELISPOTs gemacht wurden. Neun verschiedene Spenderproben mit verschiedenen Antigenen auch zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurden in Triplikaten getestet. Es wurden bewusst Bilddateien gewählt, um Punkte wie Artefakte, Hintergrundfärbung und -reaktivität, zu hohe Zellzahl in den *wells* etc. adressieren zu können. Überraschenderweise zeigte sich eine hohe Variabilität in den Bewertungen. Interessant war außerdem, dass nicht die ELISPOT erfahrenen Teilnehmer, die eine SOP (*standard operating procedure*) für ELISPOTs haben, die besten Resultate hatten. Es ist jetzt ein *webinar* geplant, um die Ergebnisse zu diskutieren und um einen Konsens für standardisierte Auswertestrategien zu finden.

3.3 Experimentelle Urologie

3.3.1 Projektgruppe Endocannabinoide

Frank Strittmatter, Andrea Schreiber, Martin Hennenberg, Christian Gratzke

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

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

Das endogene Cannabinoid-System besteht aus seinen Rezeptoren, seinen endogenen Liganden und Enzymen für die Regulation von Biosynthese und Abbau der endogenen Cannabinoide [7, 8]. Entscheidende Schlüsselenzyme sind u. a. die Fettsäureamid-Hydrolase (FAAH) und die Monoacylglycerase (MAGL), welche für den Abbau der endogenen Cannabinoide verantwortlich sind. Es existieren zwei verschiedene endogene Cannabinoide; dies sind Anandamid (Arachidonyl-ethanolamid), welches durch FAAH abgebaut wird, und 2-Arachidonoylglycerol

(2-AG), welches durch MAGL abgebaut wird [9]. Es ist bekannt, dass die FAAH sowohl zentral als auch peripher an einer Vielfalt von physiologischen Prozessen beteiligt ist. Beispielsweise kann es durch eine Inhibierung der FAAH durch spezifische FAAH-Inhibitoren über eine resultierende Akkumulation endogener Cannabinoide zu einer reduzierten Schmerzwahrnehmung kommen [9]. Weiterhin konnte durch die FAAH-Inhibierung eine Stress-induzierte Schmerzwahrnehmung und eine Hyperreflexie nach inflammatorischen und neuropathischen Verletzungen reduziert werden [10, 11]. Dies sind pathophysiologische Prozesse, welche in ihrer Pathogenese mit der Pathogenese der OAB verwandt sind [12].

Inwieweit eine Inhibierung der FAAH die Miktion beeinflusst, wurde von unserer Arbeitsgruppe sowohl in vivo an Ratten als auch in vitro an humanem Blasengewebe bzw. an Ratten- und Mäuse-Blasengewebe untersucht [13]. Unsere Arbeitsgruppe konnte über RT-PCR und Western-Blot-Analysen zeigen, dass sowohl FAAH-mRNA als auch das FAAH-Protein im Urothel der Harnblase von Mäusen, Ratten und Menschen nachweisbar ist. Immunhistochemische Untersuchungen zeigten eine deutliche Kolokalisation von FAAH und CB2-Rezeptoren im Urothel (Abb. 3.3.1). Füllhase und Hennenberg zeigten 2013 mittels Western-Blot und Immunhistochemie das Vorkommen der CB-Rezeptoren sowie FAAH-Enzyms im spinalen Miktionszentrum einem miktionsrelevanten Abschnitt des Rückenmarks (Abb. 3.3.2) [4].

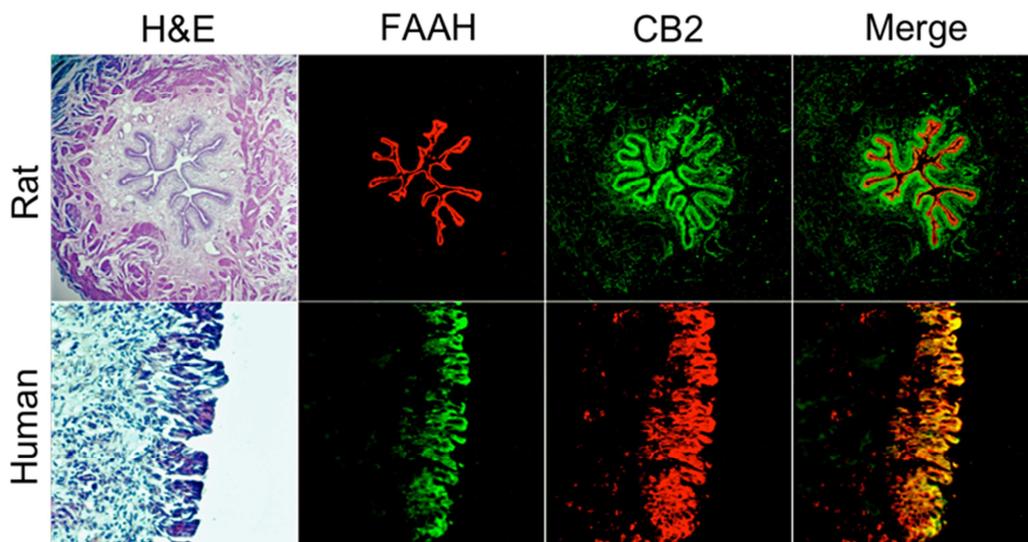


Abb. 3.3.1: Kolokalisation von Fettsäureamid-Hydrolase (FAAH) und Cannabinoidrezeptor CB2 in Blasenurothel. Gezeigt ist exemplarisch eine histologische und immunhistochemische Untersuchung einer Rattenblase und Blase eines Menschen mit deutlicher Kolokalisation von FAAH und dem CB2-Rezeptor.

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

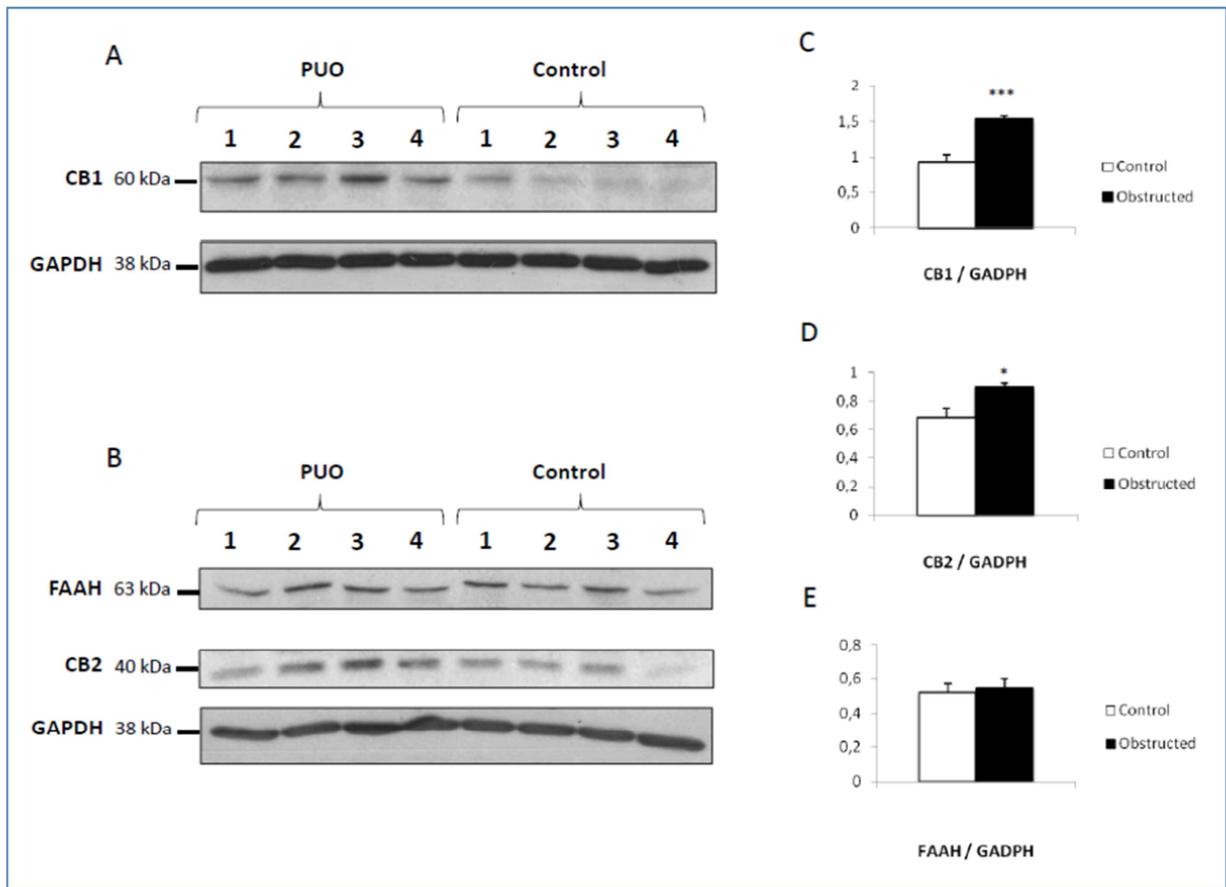


Abb. 3.3.2: Nachweis der Expression von CB-Rezeptoren und FAAH im spinalen Miktionszentrum. (A, B) *Western-blot*-Banden für FAAH, CB1, CB2, und GAPDH im sakralen Rückenmark von normalen und obstruierten Ratten (PUO). Signalquantifizierung (in Relation zu GAPDH) für CB1 (C), CB2 (D), und FAAH (E) in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

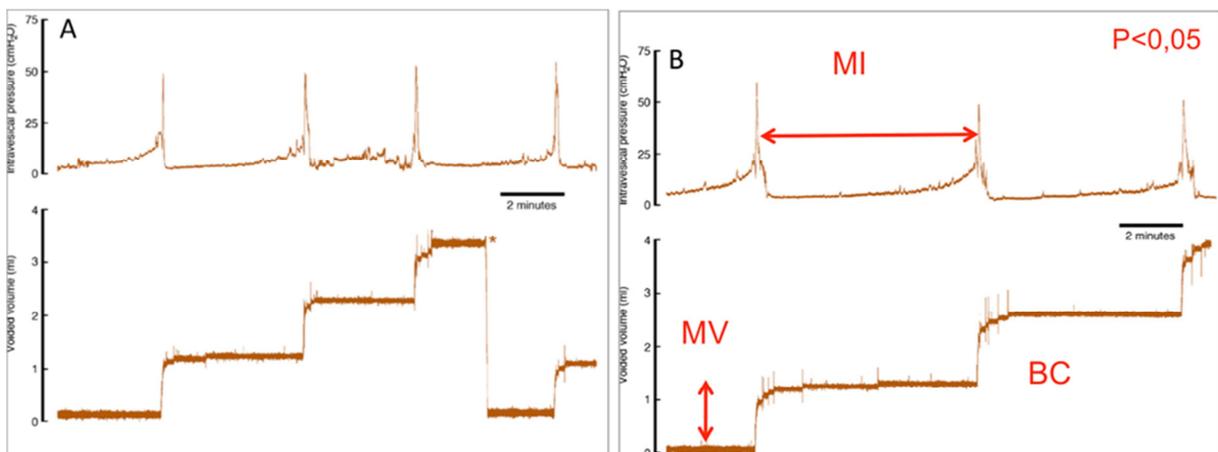


Abb. 3.3.3: Einfluss des FAAH-Inhibitors OEtA auf das Miktionsverhalten der Ratte. Gezeigt ist exemplarisch die signifikante Veränderung von Miktionsintervall (MI), Miktionsvolumen (MV) und des Schwellendrucks vor (A) und nach (B) intravenöser und intravesikaler Applikation des FAAH-Inhibitors während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

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

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

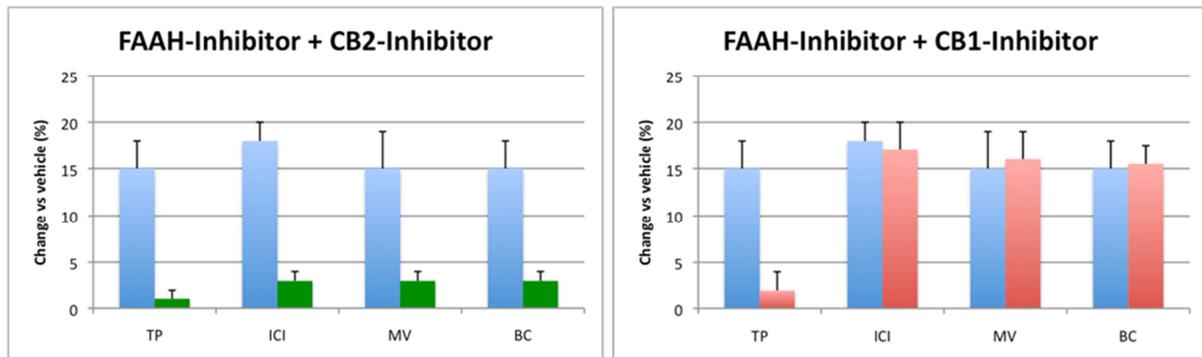


Abb. 3.3.4: Einfluss von CB-Rezeptor-Blockade auf die Veränderung urodynamischer Parameter durch FAAH-Inhibition. Gezeigt ist in der linken Abbildung die Aufhebung aller signifikanten Veränderungen durch CB2-Rezeptor-Blockade, welche durch die Inhibition der FAAH erzielt werden. Dagegen wird durch die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

2013 wurde von unserer Arbeitsgruppe die Wirkung von OEtA auf die urodynamischen Parameter erstmalig nicht im akuten Tierversuch, sondern nach chronischer Verabreichung getestet. Dabei wurden weibliche Ratten 2 Wochen lang mit täglichen, subkutanen Injektionen des FAAH-Inhibitors behandelt. Ähnlich wie im akut-Versuch wurden auch hier signifikante Verbesserungen verschiedener urodynamischer Parameter beobachtet. Diese Ergebnisse wurden 2013 in der Fachzeitschrift „*Neurourology and Urodynamics*“ veröffentlicht [14].

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

Durch chirurgisches teilweises Einengen der Harnröhre (partielle urethrale Obstruktion, PUO) (Abbildung 3.3.5) kann in Ratten eine Blasenüberaktivität induziert werden (Abbildung 3.3.6), welche als Modell der menschlichen Blasenüberaktivität bei gutartiger Prostatavergrößerung (benigne Prostatahyperplasie, BPH) dient. Füllhase et al. konnten zeigen, dass der Effekt von FAAH-Inhibitoren bei Tieren mit obstruktionsbedingter Blasenüberaktivität deutlich ausgeprägter ist als bei nicht-obstruierten Tieren mit normaler Miktion (Tabelle 1). Diese Ergebnisse wurden 2013 im „*Journal of Urology*“ publiziert [4].

Insgesamt zeigt dies, dass FAAH in der Blase und zentralnervösen Miktionszentren exprimiert wird. In der Blase von Mensch, Ratte und Maus zeigt sich eine deutliche Kolo-kalisation mit CB2-Rezeptoren. Sowohl durch intravenöse, intravesikale, als auch intrathekale Applikation des FAAH-Inhibitors OEtA lassen sich signifikant urodynamische Parameter beeinflussen, die sensorische afferente Parameter im Miktionszyklus darstellen. Die Effekte des FAAH-Inhibitors sind hierbei deutlich ausgeprägter wenn eine obstruktionsbedingte Blasenüberaktivität vorliegt. Dies legt

zum einen eine Hochregulierung (und somit vermehrte Bedeutung) des Endocannabinoidsystems bei pathologischer Blasenfunktion nahe, und impliziert andererseits somit auch eine höhere Effizienz von FAAH-Inhibition bei eben diesen Krankheitsszenarien (BPH), was therapeutisch als Vorteil zu sehen wäre (geringerer Effekt bei Gesunden und stärker ausgeprägter Effekt bei Erkrankten).

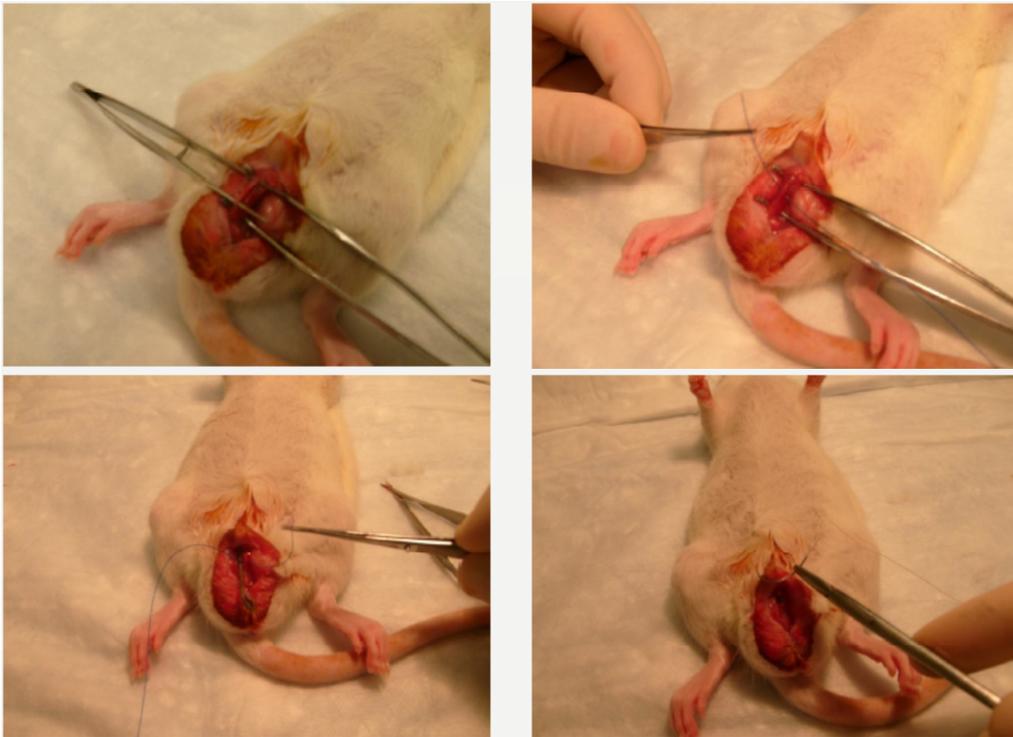


Abb. 3.3.5: Chirurgisches partielles Einengen der Harnröhre (PUO). Wichtige Schritte des Operationsverlaufs sind von links oben nach rechts unten gezeigt: Darstellung der Harnröhre auf den Schwellkörpern über perinealen Schnitt, Unterfahrung der isolierten Harnröhre mittels nicht-resorbierbarem Faden,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

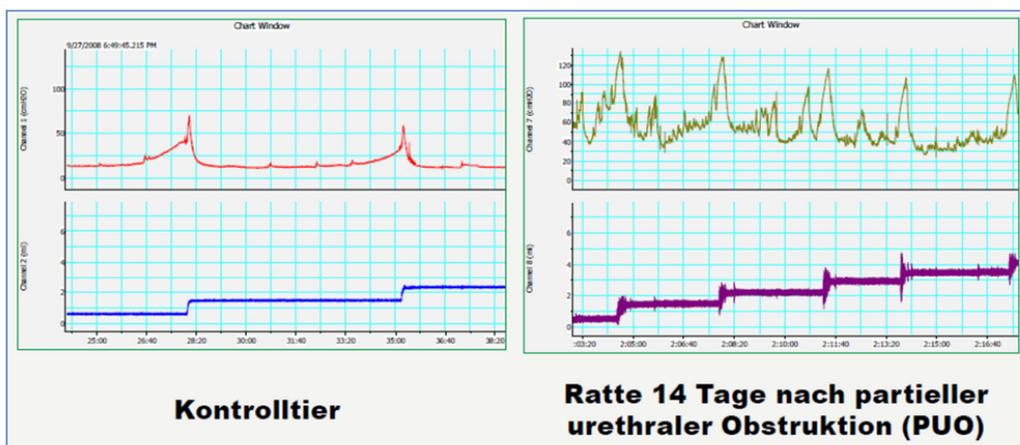


Abb. 3.3.6: Messung der Blasenaktivität in einem Rattenmodell für Blasenüberaktivität. Das Modell der menschlichen Blasenüberaktivität bei gutartiger Prostatavergrößerung (benigne Prostatahyperplasie, BPH) wird durch partielle Ligatur der Harnröhre der Ratte generiert. Repräsentative 15-minütige urodynamische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

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

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

Die Bedeutung sowohl von CB1- als auch CB2-Rezeptoren im peripheren bzw. zentralen Nervensystem für die Miktionskontrolle konnte von unserer Arbeitsgruppe 2013 an *knockout*-Mäusen nachvollzogen werden. Hierbei erfolgte eine urodynamische Charakterisierung von CB1- und CB2-Rezeptor ko-Mäusen. Diese Ergebnisse wurden in den Fachzeitschriften „*BJU International*“ sowie „*Neurourology and Urodynamics*“ veröffentlicht [15, 16].

Neben der FAAH, welche Anandamid abbaut, ist auch die 2-AG-Degradation durch MAGL wesentlicher Bestandteil des Endocannabinoid-Systems. Im Zusammenhang mit dem unteren Harntrakt wurde MAGL bislang jedoch noch nicht in Betracht gezogen. In einer Pilotstudie untersuchte die Arbeitsgruppe daher die Expression von MAGL in der Prostata und Blase des Menschen. Hierzu wurden nicht-maligne Gewebeproben verwendet, die im Rahmen von radikalen, Tumor-bedingten Prostatektomien bzw. Zystektomien gewonnen wurden. Über Western-Blot Analysen konnte die Expression von MAGL in Prostata- und Trigonum-Geweben gezeigt werden. Mit Hilfe verschiedener Marker wurde über doppelte Immunfluoreszenz-Färbungen das Vorkommen von MAGL in glatten Muskelzellen bzw. im Urothel lokalisiert (Abb. 3.3.7.). Interessanterweise zeigte sich im Blasengewebe jedoch keine Kolokalisation von FAAH und MAGL. Insgesamt legt dies nahe, dass eine Berücksichtigung von MAGL bei Cannabinoid-basierten Therapien zu besseren urodynamischen Effekten führen könnte, als die alleinige Hemmung von FAAH. Diese Untersuchungen werden fortgesetzt; die bisherigen Ergebnisse werden 2014 auf der Jahrestagung der „*American Urological Association*“ (AUA) vorgestellt.

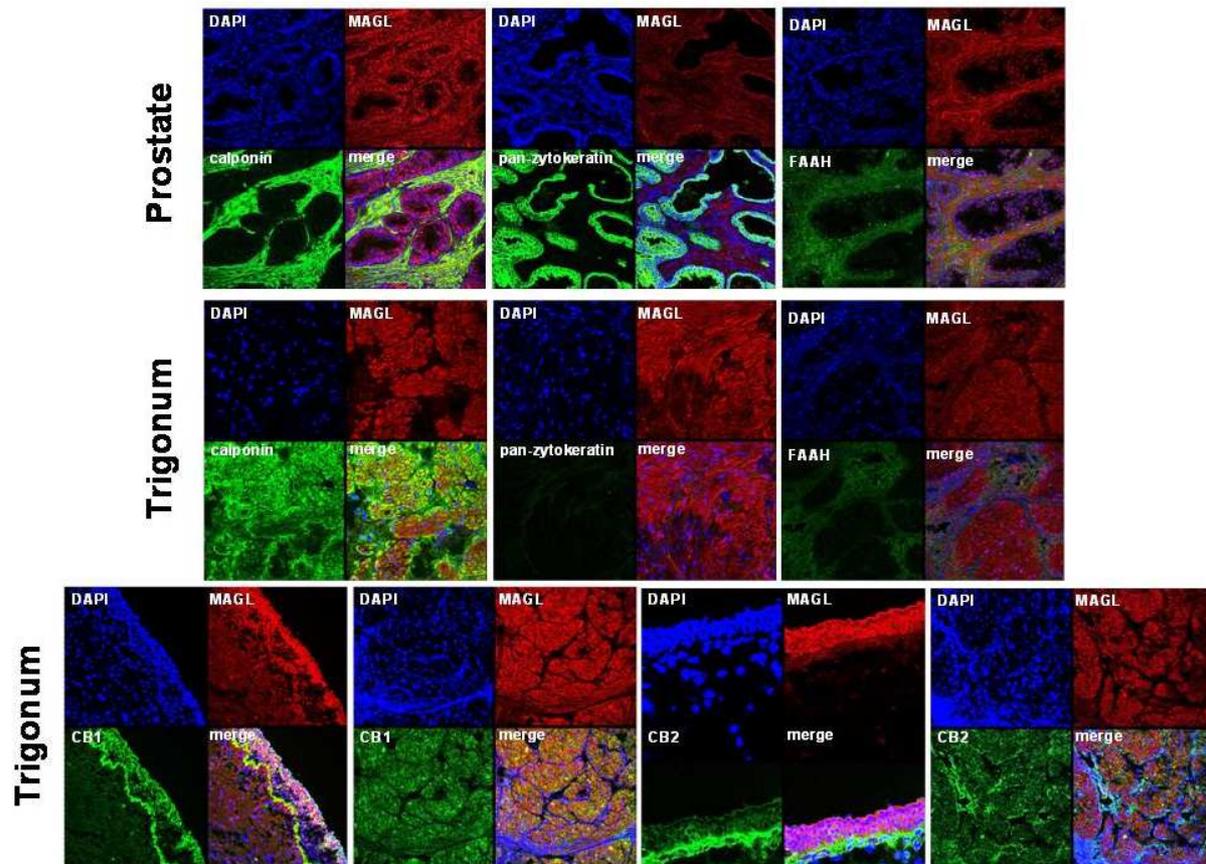


Abb. 3.3.7: Expression von MAGL in der Prostata und Blase des Menschen. Gewebeproben aus radikaler Prostatektomie bzw. Zystektomie wurden mit verschiedenen Antikörpern Fluoreszenzgefärbt. Dies zeigt die Expression von MAGL in glatten Muskelzellen der Prostata und des Trigonums, und eine starke Expression im Urothel.

Literatur

1. Freeman, R.M., et al., The effect of cannabis on urge incontinence in patients with multiple sclerosis: a multicentre, randomised placebo-controlled trial (CAMS-LUTS). *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct*, 2006. 17(6): p. 636-41.
2. Brady, C.M., et al., An open-label pilot study of cannabis-based extracts for bladder dysfunction in advanced multiple sclerosis. *Mult Scler*, 2004. 10(4): p. 425-33.
3. Gratzke, C., et al., Distribution and function of cannabinoid receptors 1 and 2 in the rat, monkey and human bladder. *J Urol*, 2009. 181(4): p. 1939-48.
4. Fullhase, C., et al., Spinal Cord FAAH in Normal Micturition Control and Bladder Overactivity in Awake Rats. *J Urol*, 2013. 189(6): p. 2364-70.
5. Gratzke, C., et al., Effects of cannabior, a novel selective cannabinoid 2 receptor agonist, on bladder function in normal rats. *Eur Urol*, 2010. 57(6): p. 1093-100.
6. Gratzke, C., et al., Cannabior, a selective cannabinoid-2 receptor agonist, improves bladder emptying in rats with partial urethral obstruction. *J Urol*, 2011. 185(2): p. 731-6.
7. Pertwee, R.G., et al., International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXIX. Cannabinoid receptors and their ligands: beyond CB and CB. *Pharmacol Rev*, 2010. 62(4): p. 588-631.
8. Russo, R., et al., The fatty acid amide hydrolase inhibitor URB597 (cyclohexylcarbamic acid 3'-carbamoylbiphenyl-3-yl ester) reduces neuropathic pain after oral administration in mice. *J Pharmacol Exp Ther*, 2007. 322(1): p. 236-42.

9. Cravatt, B.F., et al., Supersensitivity to anandamide and enhanced endogenous cannabinoid signaling in mice lacking fatty acid amide hydrolase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. 98(16): p. 9371-6.
10. Cravatt, B.F., et al., Functional disassociation of the central and peripheral fatty acid amide signaling systems. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. 101(29): p. 10821-6.
11. Daniels, L.K., Rapid in-office and in-vivo desensitization of an injection phobia utilizing hypnosis. *Am J Clin Hypn*, 1976. 18(3): p. 200-3.
12. Andersson, K.E. and A.J. Wein, Pharmacology of the lower urinary tract: basis for current and future treatments of urinary incontinence. *Pharmacol Rev*, 2004. 56(4): p. 581-631.
13. Strittmatter, F., et al., Expression of fatty acid amide hydrolase (FAAH) in human, mouse, and rat urinary bladder and effects of FAAH inhibition on bladder function in awake rats. *Eur Urol*, 2012. 61(1): p. 98-106.
14. Gandaglia, G., et al., The fatty acid amide hydrolase inhibitor oleoyl ethyl amide counteracts bladder overactivity in female rats. *Neurourol Urodyn*, 2013 [Epub ahead of print].
15. Campeau, L., et al., Characterization of bladder function in a cannabinoid receptor type 2 knockout mouse in vivo and in vitro. *Neurourol Urodyn*, 2013 [Epub ahead of print].
16. Füllhase, C., et al., Bladder function in a cannabinoid receptor type 1 knockout mouse. *BJU Int*, 2014 [Epub ahead of print].

3.3.2 Projektgruppe „glattmuskuläre Kontraktilität und Wachstum im unteren Harntrakt“

Martin Hennenberg, Thomas Kunit, Beata Rutz, Anna Ciotkowska, Frank Strittmatter, Andrea Schreiber, Christian Gratzke

Bei Patienten mit benignem Prostata-Syndrom (BPS) führen Wachstum und Vergrößerung der Prostata, sowie ein erhöhter glattmuskulärer Tonus in der Prostata zu einer urethralen Obstruktion und dadurch zu Miktionsbeschwerden [1]. Der klassische Begriff „benigne Prostatahyperplasie“ (BPH) beschreibt dagegen lediglich eine histologische Veränderung der Prostata, welche zwar sehr häufig, aber nicht zwingend mit einer Vergrößerung bzw. Volumenzunahme (*benign prostate enlargement*, BPE) der Prostata einhergeht, und bei vielen Patienten mit Symptomen des unteren Harntraktes (*lower urinary tract symptoms*, LUTS) verknüpft ist. Diese obstruktiven Symptome auf Grund einer Blasenauslass-Obstruktion (*bladder outlet obstruction*, BOO) bei BPS sind von irritativen Symptomen der Überaktiven Blase (*overactive bladder*, OAB) zu unterscheiden.

Der glattmuskuläre Tonus in der Prostata wird in erheblichem Ausmaß durch die α_1 -adrenerge Kontraktion reguliert, während am Wachstum der Prostata Dihydrotestosteron (DHT) und verschiedene Wachstumsfaktoren beteiligt sind. Prostata-Wachstum und prostatistische α_1 -Adrenozeptoren sind daher die wichtigsten Angriffspunkte für die pharmakologische LUTS-Therapie bei Patienten mit BPH. Durch die Behandlung mit α_1 -Blockern kommt es zu einer Erschlaffung der glatten Prostata-Muskulatur, und dadurch zu einer Verbesserung von Harnfluss und Symptomen. Aufgrund der hohen Inzidenz von LUTS und der Bedeutung des α_1 -Adrenozeptors für die LUTS-Therapie sind Funktion und Regulation des prostatistischen α_1 -Adrenozeptors von größtem Interesse.

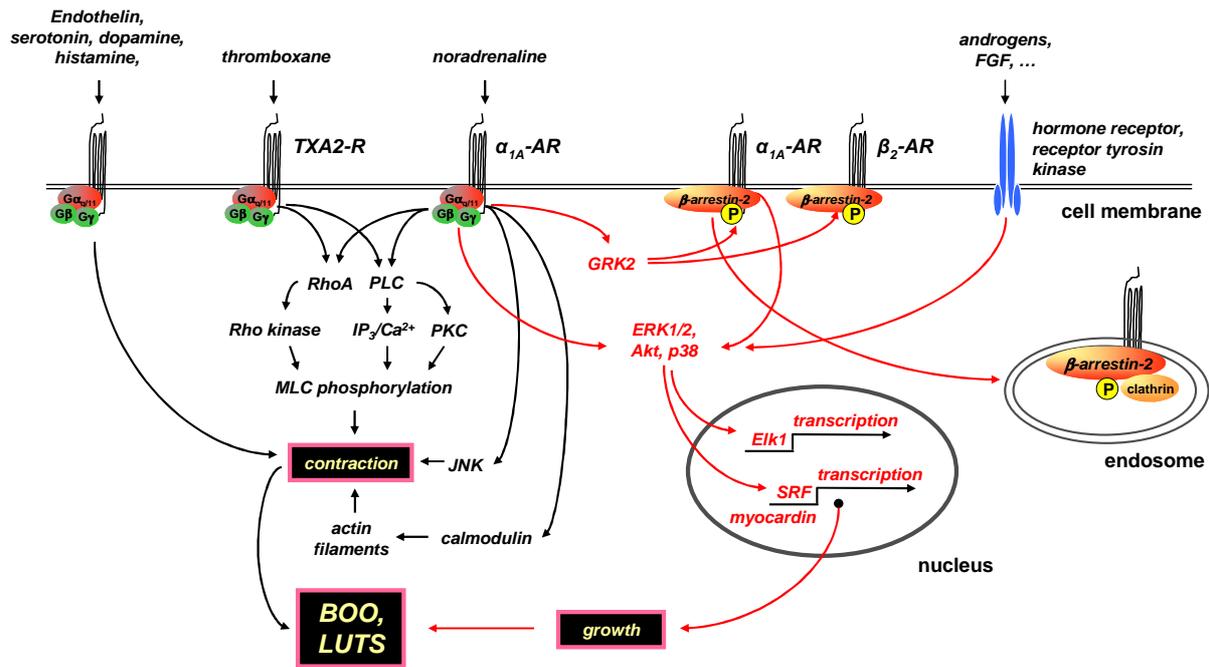
Obwohl die Behandlung obstruktiver Symptome mit α_1 -Blockern überaus weit verbreitet ist, sind die Erfolge dieser Therapie oft limitiert und keinesfalls immer zufriedenstellend [1]. Die subjektiv vom Patienten empfundene Symptomatik, an

Hand von standardisierten Fragebögen ermittelt (*international prostate symptom score*, IPSS) wird durch α_1 -Blocker um 30-50 % verbessert. Jedoch wird auch durch Placebos eine Verbesserung des IPSS von 10-34 % erzielt. Der Harnstrahl (*maximum flow rate*, Q_{\max}) wird durch α_1 -Blocker um 15-40 % verbessert, jedoch bereits um bis zu 27 % durch Placebos. Die urodynamischen Wirkungen von α_1 -Blockern lassen sich also in klinischen Studien nur schwer von Placebos unterscheiden. Eine vollständige Verbesserung der subjektiven und objektiven Symptomatik wird keinesfalls erreicht. Zudem können α_1 -Blocker zu verschiedenen unerwünschten Nebenwirkungen führen. Diese veranlassen eine beträchtliche Zahl von Patienten, die Therapie bereits früh abzubrechen. Zudem sprechen auf die zur Verfügung stehenden medikamentösen Therapien ausschließlich Patienten mit milden bis moderaten LUTS an, wodurch es zu einer großen Zahl invasiver Eingriffe (ablative Optionen, z. B. transurethrale Resektion der Prostata, TURP) kommt.

Vor diesem Hintergrund, zusammen mit der demographischen Bevölkerungsentwicklung wären bessere medikamentöse Optionen der LUTS-Therapie sehr wünschenswert. Daher sind 1) die physiologischen Grundlagen, und 2) die pharmakologische Beeinflussung der glattmuskulären Kontraktilität in der Prostata bzw. im unteren Harntrakt von großem Interesse. Neue Strategien, die in experimentellen Modellen die Kontraktion der glatten Prostata-Muskulatur hemmen, können im Idealfall die Grundlage für zukünftige Therapien darstellen.

Die Projektgruppe befasst sich daher mit neuen (Regulations-)Mechanismen der glattmuskulären Kontraktion und des Wachstums im unteren Harntrakt. Verschiedene Teilprojekte vor dem Berichtszeitraum [2-9] zeigten bereits, dass die bisherigen Modelle des prostatistischen α_1 -Adrenozeptors nicht ausreichen, um dessen tatsächliche Regulation und Funktion zu beschreiben. Während die Expression und Subtyp-Verteilung des prostatistischen α_1 -Adrenozeptors in der Vergangenheit Gegenstand zahlreicher Studien war, sind seine posttranslationale Regulation und intrazelluläre Signalgebung noch unzureichend verstanden. Weiterhin konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass neben α_1 -Adrenozeptoren auch nicht-adrenerge Mediatoren entscheidend an der Regulation des glattmuskulären Prostata-Tonus beteiligt sind, was die limitierten Effekte von α_1 -Blockern (max. 50 %ige Verbesserung der Symptome) erklären kann [10,11]. Obwohl der erhöhte α_1 -adrenerge Tonus oft gemeinsam mit dem hyperplastischen Prostata-Wachstum auftritt und zu Miktionsbeschwerden führt, sind mögliche Zusammenhänge zwischen beiden Faktoren nahezu unbekannt. Ergebnisse aus vorherigen Projekten der Arbeitsgruppe unterstützen die Vermutung, dass zwischen beiden Faktoren Zusammenhänge bestehen könnten.

Die bisherigen Ergebnisse der Projektgruppe wurden in einem Übersichtsartikel zusammengefasst, welcher 2013 publiziert wurde [1]. Hier wurden die Ergebnisse verschiedener Projekte zusammengeführt, um auf dieser Basis ein neues Modell des prostatistischen α_1 -Adrenozeptors zu beschreiben, welches weit über die vorherigen Vorstellungen hinausgeht [1].

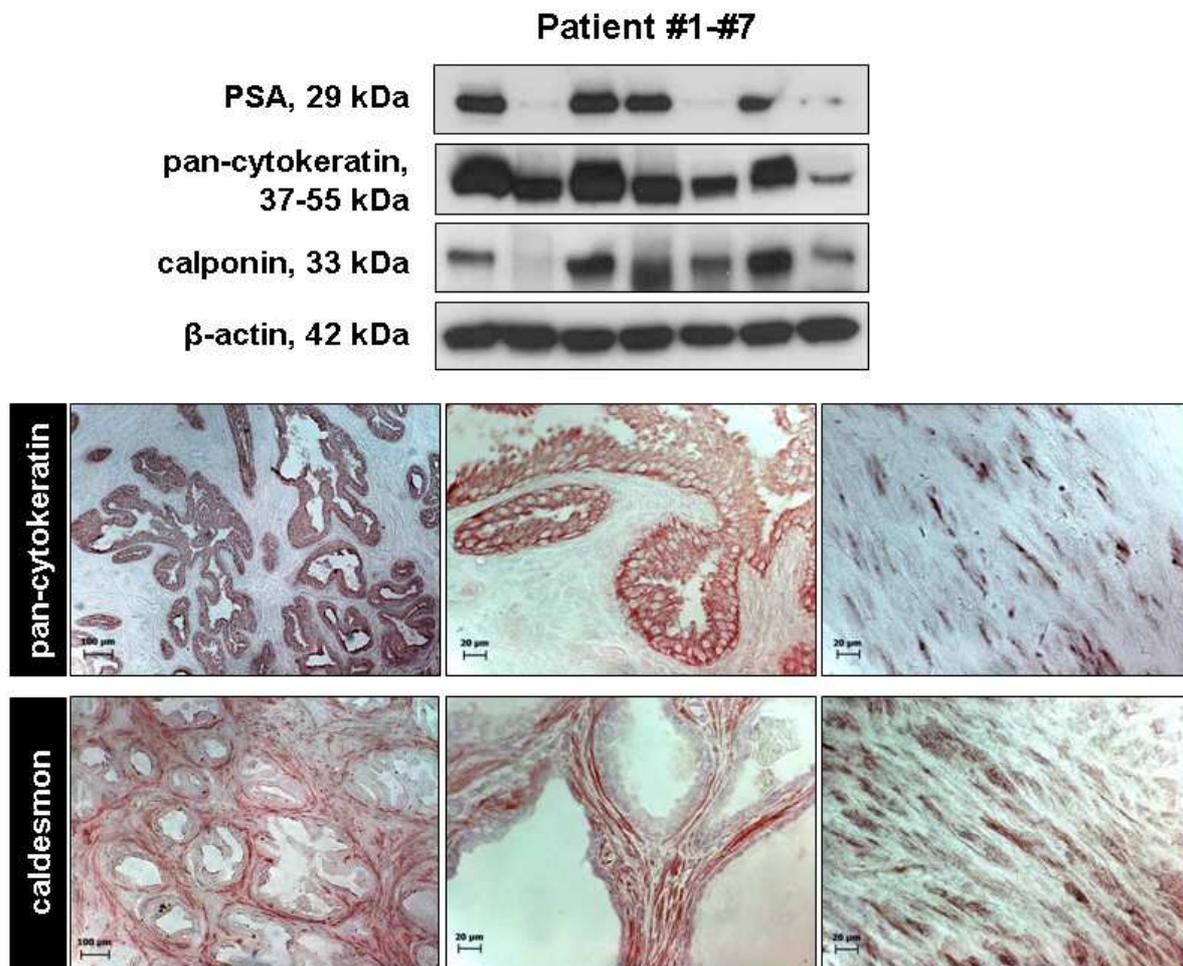


Neues Modell des α_1 -Adrenoceptors in der Prostata. Das gezeigte Modell wurde von unserer Arbeitsgruppe auf der Basis mehrerer eigener Studien entworfen, und 2013 in einem Übersichtsartikel veröffentlicht [1]. Dieses Modell geht über die vorherigen Vorstellungen hinaus, und berücksichtigt neue intra- und extrazelluläre Mediatoren der Kontraktion, sowie nicht-kontraktile Signalwege und die Regulation des α_1 -Adrenoceptors durch Bindung von Interaktions-Partnern. Kontraktile Signalwege sind durch schwarze Pfeile dargestellt, nicht-motorische mit roten Pfeilen. In diesem Modell teilt sich der α_1 -Adrenoceptor verschiedene intrazelluläre Effektoren mit Thromboxan-Rezeptoren, Hormonen, und Wachstumsfaktoren. Im Gegensatz zu vorherigen Betrachtungsweisen ist der α_1 -Adrenoceptor also kein isolierter, statischer Rezeptor, welcher ausschließlich an G-Proteine gekoppelt ist und nur die Kontraktion vermittelt. Vielmehr handelt es sich um einen dynamischen Rezeptor, der in ein komplexes Netzwerk verschiedener Mediatoren eingebettet ist und dort mit verschiedenen anderen Rezeptoren zusammenspielt. Aus: [1].

Der Projektgruppe stehen verschiedene experimentelle Modelle zur Verfügung. Schwerpunkt sind Untersuchungen an intakten, humanen Geweben. Hauptsächlich ist dies nicht-malignes Prostata-Gewebe von Patienten, bei denen eine Tumorbedingte, radikale Prostatektomie durchgeführt wird. Die Anzahl der Prostatektomien an der Urologischen Klinik erlaubt ein kontinuierliches Arbeiten mit diesen Geweben; die Probengewinnung im Rahmen von Prostatektomien wiederum gewährleistet zufriedenstellende Mengen an Material, das in den einzelnen Experimenten eingesetzt werden kann (im Gegensatz zu Gewebespänen von Resektionsverfahren, wo nur kleine Gewebestücke anfallen, die zudem stark traumatisiert sind).

Prostata-Tumoren manifestieren sich ganz überwiegend (mind. 70 %) in der peripheren Zone der Prostata. Die hier verwendeten Gewebe werden dagegen aus der periurethralen Zone entnommen, so dass die Kontaminierung der Proben mit malignem Gewebe kaum erfolgt. Gleichzeitig weisen mind. 80 % der Patienten mit Prostata-Krebs eine BPH auf. Somit handelt es sich bei den eingesetzten Proben um nicht-malignes, hyperplastisches Prostata-Gewebe. Der zwischen den verschiedenen Patienten schwankende Gehalt von PSA (*prostate specific antigen*, Marker für BPH), Calponin oder Caldesmon (Marker für glatte Muskelzellen) und

pan-Zytokeratin (Marker für Epithelzellen = Drüsen) spiegelt eine unterschiedlich starke Ausprägung der BPH wider.



Charakterisierung humaner Prostata-Gewebe mit verschiedenen Markern. Oben: Prostata-Gewebe aus der periurethralen Zone von sieben verschiedenen Patienten, bei denen eine radikale Prostatektomie vorgenommen wurde, wurden mit Western-Blot Analyse auf verschiedene Marker hin untersucht. Solche Gewebe werden von der Arbeitsgruppe bei pharmakologischen Untersuchungen eingesetzt. Gezeigt sind Calponin (glattmuskulärer Marker), pan-Zytokeratin (Marker für Epithelzellen = Drüsen), und PSA (Marker für BPH). Der schwankende Gehalt von PSA spiegelt eine unterschiedliche Ausprägung der BPH zwischen den verschiedenen Patienten wieder. Die interne Kontrolle (β-Aktin) ist dagegen bei allen Proben gleich. Unten: Immunhistochemische Färbungen (Peroxidase). Die Bilder links und in der Mitte zeigen Prostata-Gewebe mit einer typischen Architektur bei BPH, bestehend aus pan-Zytokeratin-positiven/Caldesmon-negativen Drüsen, und dazwischen liegendem, Caldesmon-positivem/pan-Zytokeratin-negativem Stroma. Extraglanduläres Zytokeratin wurde bei solchen Färbungen nur selten beobachtet, und zwar ausschließlich in Bereichen mit erweitertem, ausgedehntem Stroma ohne Drüsen (rechts), welche ebenfalls bei einer BPH auftreten können. (Repräsentative Experimente, B. Rutz 2013).

Prostata-Tumoren manifestieren sich ganz überwiegend (mind. 70 %) in der peripheren Zone der Prostata. Die hier verwendeten Gewebe werden dagegen aus der periurethralen Zone entnommen, so dass die Kontaminierung der Proben mit malignem Gewebe kaum erfolgt. Gleichzeitig weisen mind. 80 % der Patienten mit Prostata-Krebs eine BPH auf. Somit handelt es sich bei den eingesetzten Proben um nicht-malignes, hyperplastisches Prostata-Gewebe. Der zwischen den verschiede-

nen Patienten schwankende Gehalt von PSA (*prostate specific antigen*, Marker für BPH), Calponin oder Caldesmon (Marker für glatte Muskelzellen) und pan-Zyto-keratin (Marker für Epithelzellen = Drüsen) spiegelt eine unterschiedlich starke Ausprägung der BPH wider.

Darüber hinaus werden Untersuchungen an Blasen-Geweben durchgeführt, welche im Rahmen von radikalen, Tumor-bedingten Zystektomien gewonnen werden. Die Fallzahl dieser Operationen liegt jedoch deutlich unter der der Prostatektomien. Die perioperative Entnahme der Gewebe erfolgt in Kooperation mit dem Pathologischen Institut (Campus Großhadern). Entsprechend der Genehmigung der Ethikkommission werden die Proben vollkommen anonymisiert eingesetzt, es werden keinerlei Patienten(-bezogene) Daten gespeichert oder aufgezeichnet.

Ergänzend steht der Projektgruppe seit 2013 die Zellkultur zur Verfügung, die im benachbarten Labor von Prof. Dr. Zimmermann durchgeführt wird. Im Berichtszeitraum wurde die Kultur einer immortalisierten Stroma-Zelllinie aus der nicht-malignen, humanen Prostata etabliert (WPMY1-Zellen). Hier werden die Effekte pharmakologischer Interventionen auf den Zellzyklus von WPMY1-Zellen untersucht.

Im Folgenden werden einzelne Projekte beschrieben, welche 2013 bearbeitet wurden.

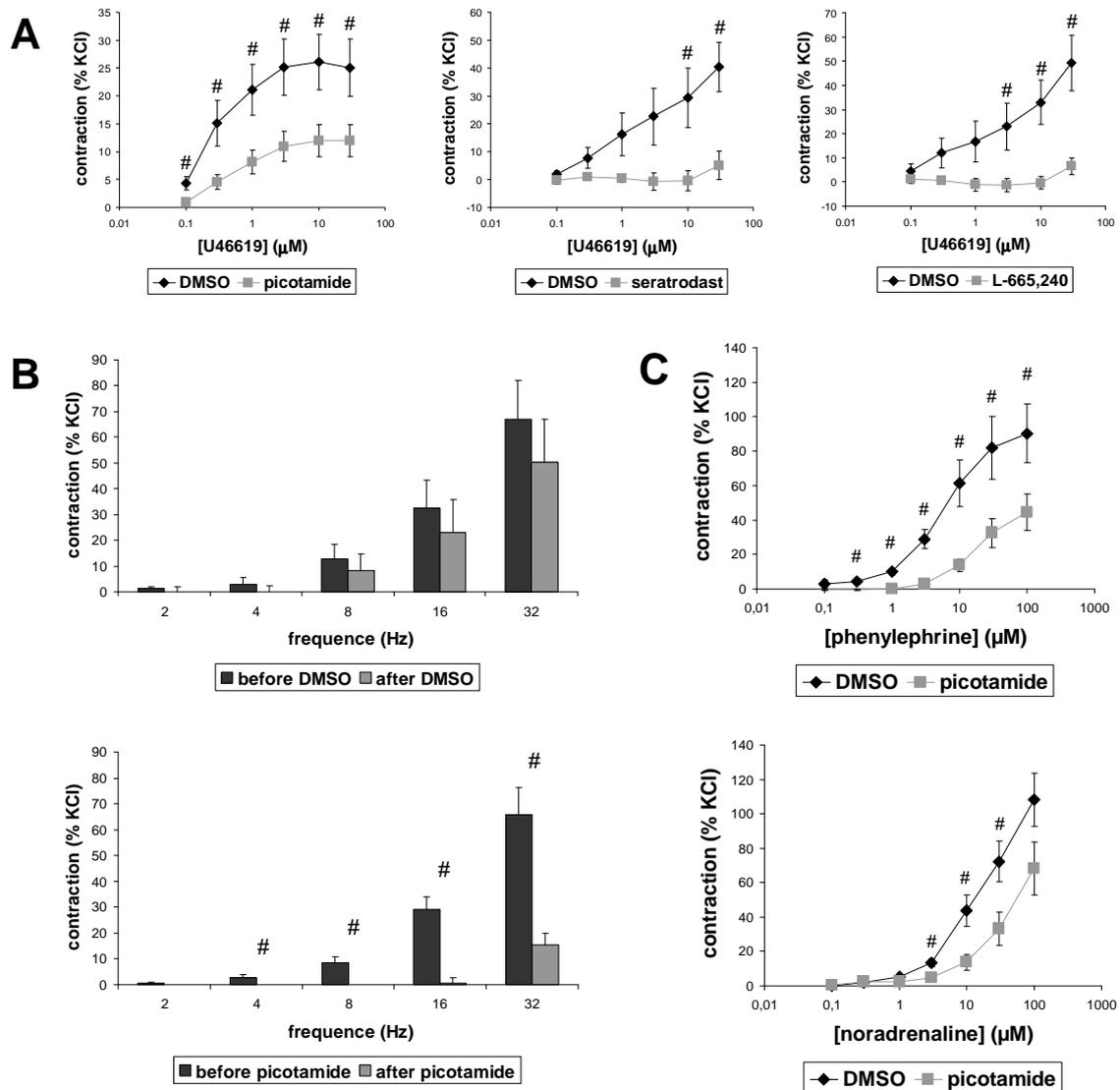
Projekt 1: Effekte von Thromboxan-Rezeptor-Antagonisten auf die Kontraktion der humanen Prostata

Bei Patienten mit BPS führt die Verabreichung von α_1 -Blockern über eine Relaxation der glatten Prostatamuskulatur zu einer Verbesserung der Symptome, und stellt eine Standard-Therapie zur medikamentösen Behandlung von LUTS dar. Dennoch ist die Effektivität von α_1 -Blockern limitiert: während durch α_1 -Blocker eine Verbesserung der Symptome von 30-50% erzielt werden kann, wurde durch Placebos eine Verbesserung von bis zu 40% beobachtet. Dies legte nahe, dass neben α_1 -Adrenozeptoren auch nicht-adrenerge Faktoren zur Kontraktion der glatten Prostatamuskulatur beitragen. 2011 zeigte die Arbeitsgruppe, dass neben α_1 -Adrenozeptoren auch Thromboxan A₂ (TXA₂) durch eine Aktivierung von TXA₂-Rezeptoren (TXA₂R) zu einer glattmuskulären Kontraktion in der humanen Prostata führt [10]. Dabei teilt sich der TXA₂R zur intrazellulären Weiterleitung des kontraktiven Signals verschiedene intrazelluläre Effektoren mit dem α_1 -Adrenozeptor. Dies erklärt, warum durch α_1 -Blocker keine vollständige Verbesserung der Symptome erzielt werden kann.

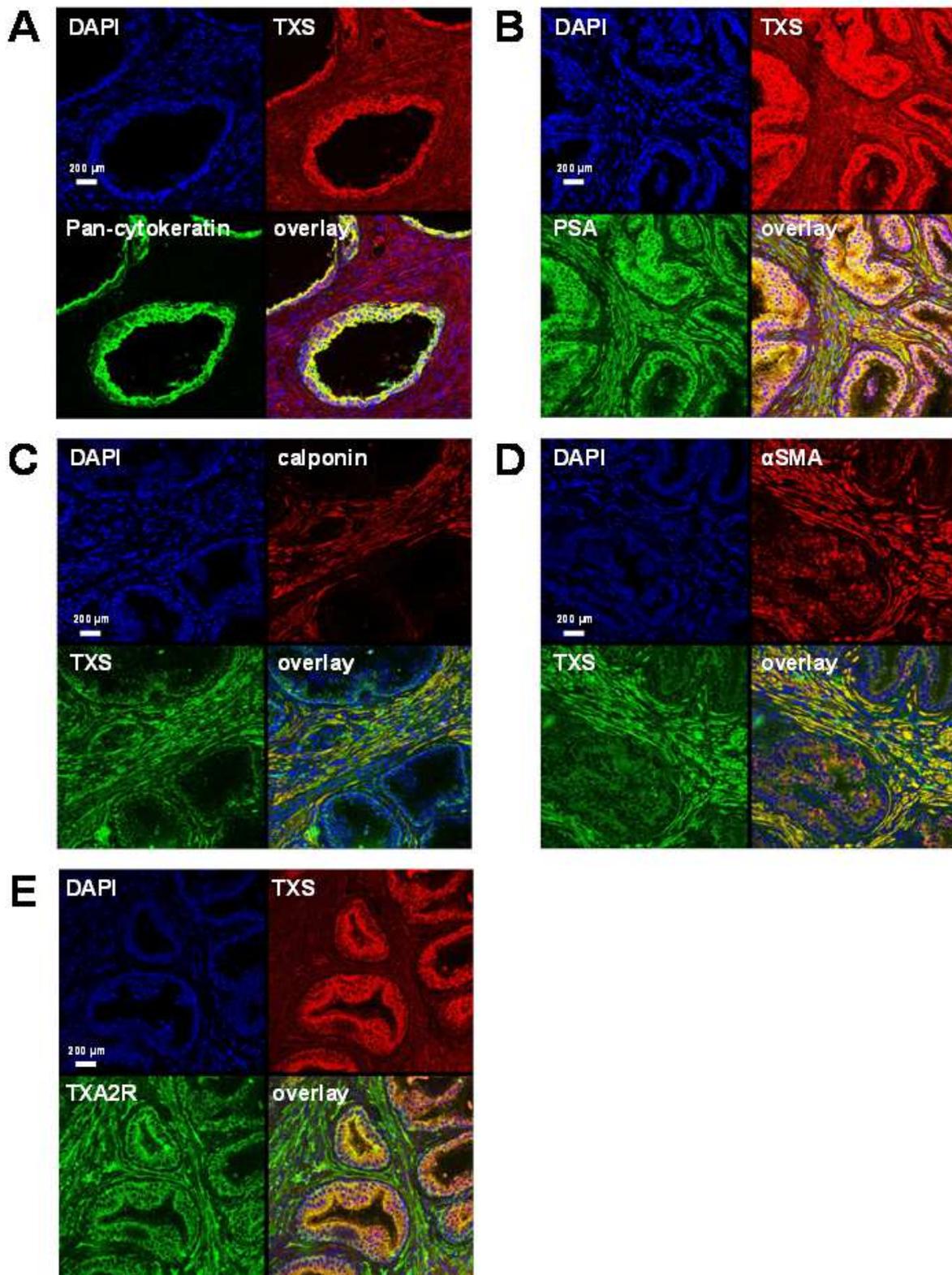
Folgerichtig wurden nun die Effekte von TXA₂R-Antagonisten auf die Kontraktion von humanem Prostata-Gewebe untersucht.

Im Organbad induzierte das stabile Thromboxan-Analogon U46619 eine Kontraktion von humanem Prostata-Gewebe. Diese U46619-induzierte Kontraktion ließ sich durch die TXA₂R-Antagonisten Picotamid, Seratrodast und L-665,240 hemmen. Interessanterweise hemmte Picotamid darüber hinaus auch Kontraktionen, die durch Noradrenalin, durch den α_1 -Adrenozeptor-Agonist Phenylephrin, oder durch elektrische Feldstimulation (EFS) induziert wurden. Bei letzterer werden durch exogene elektrische Impulse in der Organbadkammer Aktionspotentiale simuliert, was durch Ausschüttung endogener Neurotransmitter zur Kontraktion führt. Im Gegensatz zu Picotamid blieben Seratrodast und L-665,240 ohne Effekte auf die

EFS-induzierte Kontraktion. Dies zeigt, dass TXA₂ nicht als Neurotransmitter, sondern vielmehr als parakriner Mediator in der Prostata auftritt. Über Doppelfluoreszenz-Färbungen mit Calponin und alpha *smooth muscle actin* (α SMA) als glattmuskuläre Marker, sowie Zytokeratin und dem *prostate-specific antigen* (PSA) als epitheliale Marker wurde die Verteilung des TXA₂R und der TXA₂-Synthase in der Prostata untersucht.



Hemmung der Prostata-Kontraktion durch Picotamid. Im Organbad wurde der Einfluss von Picotamid (A-C) bzw. weiteren TXA₂-Rezeptor-Antagonisten (A) auf die Kontraktion von humanem Prostata-Gewebe untersucht. Picotamid hemmte signifikant die Kontraktionen, welche durch U46619 (=TXA₂-Analogon) (A), elektrische Feldstimulation (\rightarrow Ausschüttung endogener Neurotransmitter) (B), Noradrenalin (C), oder durch Phenylephrin ($=\alpha_1$ -Adrenozeptor-Agonist) (C) ausgelöst wurden. Aus: [11].



Expression des TXA₂-Systems in der humanen Prostata. Humane Prostata-Gewebe wurden doppelt Fluoreszenz-gefärbt. Calponin und α SMA sind Marker für glatte Muskulatur, pan-Zytokeratin für Epithelzellen (= Drüsen). TXA₂-Synthase und -Rezeptoren werden sowohl im Stroma, als auch im Epithel exprimiert. Dies könnte auf einen bislang unbekanntem, TXA₂-basierten Mechanismus der Stroma-Epithel-Interaktionen in der Prostata hinweisen. Aus: [11].

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

neurogene Kontraktion. Mit Picotamid wurde daher erstmalig eine Substanz gefunden, die gleichzeitig in verschiedene kontraktile Systeme der Prostata eingreift. Bisherige Substanzen, wie die α_1 -Blocker (die zur LUTS-Therapie sehr häufig eingesetzt werden) greifen nur in eines der Systeme ein. Picotamid ist prinzipiell bei Patienten anwendbar, und wurde bereits in zahlreichen klinischen Studien als Blutverdünner bzw. im Zusammenhang mit Herzerkrankungen geprüft. Picotamid hemmt neben seinem Effekt auf den TXA_2R auch die TXA_2 -Synthase, also die Bildung von Thromboxan.

Auf der Basis der beschriebenen Ergebnisse wurde ein DFG-Antrag gestellt, welcher Ende 2012 bewilligt wurde (HE 5825/2-1, ca. 141 k€). Dort sollen die Effekte von Picotamid auf die Kontraktion von humanem Blasengewebe getestet, und die urodynamischen Effekte in einem Tiermodell mit Miktionsbeschwerden untersucht werden. Die Bearbeitung dieser Fragestellungen wurde 2013 begonnen (s. Teilprojekt 5).

Die bisherigen Ergebnisse (TXA_2R -Antagonisten in der Prostata) wurden 2013 in der Zeitschrift „*American Journal of Physiology – Renal Physiology*“ publiziert [11].

Projekt 2: Akzessorische Interaktionspartner des α_1 -Adrenozeptors in der humanen Prostata

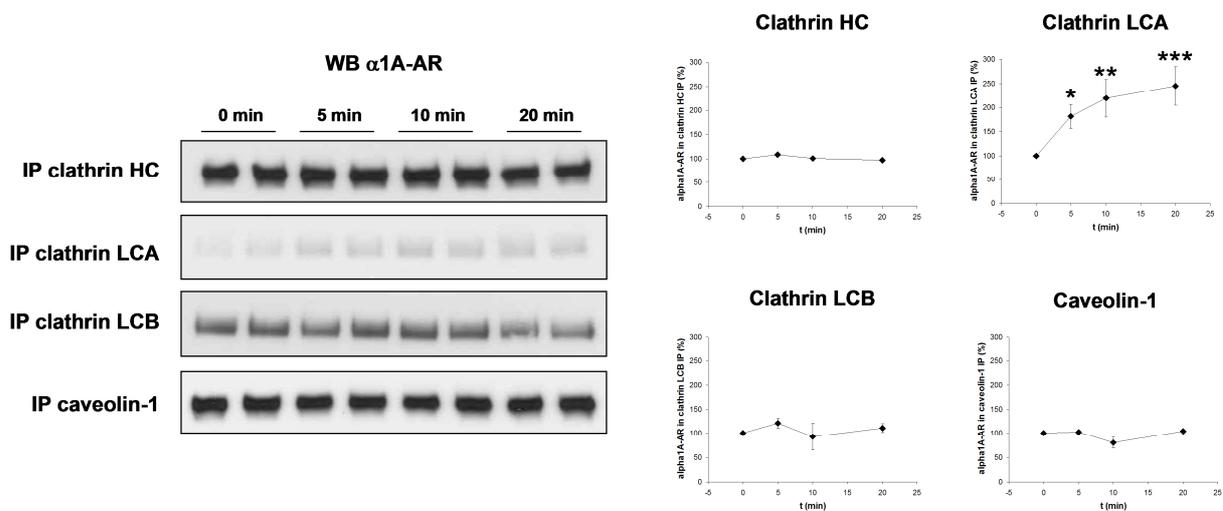
Die Regulation des α_1 -Adrenozeptors in der Prostata wurde auf Expressionsebene eingehend untersucht. Verschiedene Faktoren und Bedingungen, wie Alter, hyperplastische Umbildungen, oder medikamentöse Therapien führen in der Prostata zu Änderungen der α_1 -Adrenozeptor-Expression. Über die Expression hinaus können G-Protein-gekoppelte Rezeptoren jedoch auch stark durch eine posttranslationale Expression reguliert werden. Diese erfolgt durch die Bindung verschiedener Proteine, sog. akzessorischer Bindungspartner, an die Rezeptoren.

Eine solche posttranslationale Regulation des prostatistischen α_1 -Adrenozeptors wurde erstmals 2011 in Betracht gezogen, als die Arbeitsgruppe die Interaktion von β -Arrestin-2 und GRK2-vermittelte Phosphorylierung von Adrenozeptoren beschrieb [7, 9]. Ausgangspunkt ist oft eine Interaktion des Rezeptors mit der „G-Protein-gekoppelten Rezeptor-Kinase 2“ (GRK2) und β -Arrestin-2. In Folge der Rezeptor-Aktivierung kommt es zunächst zu einer Aktivierung der GRK2, und so zu einer (homologen und/oder heterologen) Rezeptor-Phosphorylierung durch GRK2. Die Phosphorylierung ermöglicht die Bindung von β -Arrestin-2 an die Rezeptoren. Die Interaktion der Rezeptoren mit β -Arrestin-2 verhindert die Reassoziierung der Rezeptoren mit heterotrimeren G-Proteinen, bzw. führt zur Verdrängung der G-Proteine von ihren Rezeptoren. Folge ist eine Entkopplung der Rezeptoren von G-Proteinen, und daher eine Unterbrechung der G-Protein-abhängigen Signaltransduktion durch den Rezeptor, also eine massive Änderung von Rezeptor-Aktivität und -Funktion.

β -Arrestin-2-gebundene Rezeptoren können entweder über Clathrin oder über Caveolin internalisiert werden. Diese Endozytose führt zur Lokalisation der Rezeptoren in zytosolischen Endosomen. Hier sind die Rezeptoren einer weiteren Aktivierung durch Agonisten entzogen, und können entweder zurück zur Membran gelangen, gebunden im Zytosol verbleiben, oder aber weiter zu Lysosomen transportiert und dort abgebaut werden. In jedem Fall kommt es aber zu einem Verlust der normalen, Agonisten-stimulierten Rezeptor-Antwort, und so zu

Änderungen von Rezeptor-Aktivität und -Funktion. Bei diesen Prozessen kommt es anschließend an die Rekrutierung von β -Arrestin-2 zu einer Bindung von Dynamin-2 an den Rezeptor. Dies ist Voraussetzung für die weitere Internalisierung, die über Clathrin erfolgen kann. Clathrine binden direkt an den Rezeptor/ β -Arrestin-2-Komplex. Bei der Clathrin-vermittelten Regulation kommt es zur Bildung von Multiprotein-Komplexen, die neben dem Rezeptor aus Clathrin *heavy chains* (HC), sowie den *light chains* A und B (LCA, LCB) bestehen. Durch die Bindung von Clathrin kommt es zur Interaktion des Multiprotein-Komplexes mit weiteren Partnern, insbesondere β -Adaptin. Die Clathrin/ β -Adaptin-vermittelte Endozytose wird durch ARF6 reguliert.

In Untersuchungen durch die Arbeitsgruppe konnte über RT-PCR, Western-Blot Analysen und immunhistochemische Färbungen die Expression von Clathrin HC, LCA, LCB, Caveolin-1, Dynamin-2, β -Adaptin, und ARF6 im humanen Prostata-Gewebe demonstriert werden. Doppelfluoreszenz-Färbungen mit α_{1A} -Adrenozeptoren und *alpha-smooth muscle actin* (α -SMA) zeigten das Vorkommen dieser Faktoren in glatten Muskelzellen. Zudem wurde die Expression aller Faktoren über Peroxidase-Färbungen von Prostata-Schnitten bestätigt. Koimmunopräzipitations-experimente zeigten, dass ein Teil der prostatistischen α_{1A} -Adrenozeptor-Population an Clathrin HC und LCB gebunden ist, jedoch nicht an Caveolin-1. Die Stimulation von Prostata-Gewebe mit Noradrenalin führte zu einer Rekrutierung von Clathrin LCA zum α_{1A} -Adrenozeptor, was einer Vervollständigung des Clathrin-Komplexes am α_{1A} -Adrenozeptor gleichkommt.



Noradrenalin-induzierte Bindung von Clathrin LCA an den α_{1A} -Adrenozeptor in der humanen Prostata. Humanes Prostata-Gewebe wurde für 0-20 min *in vitro* mit Noradrenalin stimuliert (30 μ M). Anschließend wurden die Gewebe schockgefroren und homogenisiert. Definierte Proteinmengen wurden anschließend wie angegeben in Immunpräzipitationen eingesetzt; die Präzipitate wurden dann in Western-Blot Analysen auf α_{1A} -Adrenozeptoren hin untersucht. Für Daten zum unspezifischen Hintergrund und Bindung im Ruhezustand siehe [12]. Die Aktivierung des α_{1A} -Adrenozeptors führt zu einer Rekrutierung von Clathrin LCA an den α_1 -Adrenozeptor. Dies kann zu Änderungen der Rezeptor-Funktion führen, und spiegelt einen dynamischen Rezeptor wider, der in verschiedenen Zuständen vorliegen kann. Gezeigt sind repräsentative Blots und die Quantifizierung aller Experimente (Mittelwerte \pm SEM). Aus: [12]

Zusammenfassend belegen diese Studien erstmalig eine posttranslationale Regulation des prostatistischen α_1 -Adrenozeptors durch eine Reihe von akzessorischen Bindungspartnern, und eine umfassende Interaktion des Rezeptors mit diesen Faktoren. Die Aktivierung des Rezeptors führt zu Änderungen der Rezeptor-Interaktion mit Bindungspartnern. Der prostatistische α_1 -Adrenozeptor ist nicht statisch an G-Proteine gekoppelt, sondern ein Rezeptor, der verschiedene Interaktions-Muster mit Bindungspartner aufweisen kann.

Diese Ergebnisse wurden 2013 in der Zeitschrift „*The Prostate*“ publiziert [12].

Projekt 3: EPAC-Expression und -Regulation in der humanen Prostata

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

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

Western-Blot Analysen mit einem phosphospezifischen Antikörper zeigten, dass die Inkubation humaner Prostata-Gewebe mit OME oder pCPT zu einer Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors Elk1 führt. Diese Phosphorylierung von Elk1 führt zu einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors. Die OME- und pCPT-vermittelte Elk1-Aktivierung konnte über EMSA bestätigt werden. Folge der Elk1-

Aktivierung ist die Bindung von Elk1 an eine spezifische DNA-Sequenz in Promoter-Regionen von Zielgenen. Im EMSA wird diese DNA-Bindung mit Hilfe von Biotin-markierten DNA-Sonden simuliert und nachgewiesen. Diese Untersuchungen ergaben, dass die Stimulation von Prostata-Gewebe mit OME und pCPT tatsächlich die Bindung von Elk1 an solche DNA-Sequenzen auslöst.

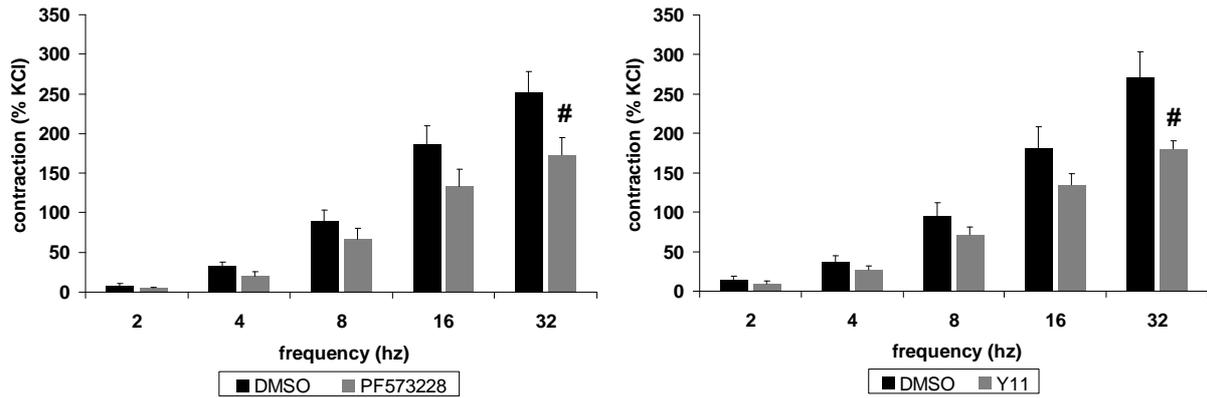
Eine der Hauptfunktionen von EPAC in der humanen Prostata könnte also in der transkriptionellen Regulation bzw. der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren liegen. Da zumindest ein geringer Effekt von EPAC-Aktivatoren auf die α_1 -adrenerge Kontraktion nachgewiesen werden konnte, ist insgesamt von einer multiplen EPAC-Funktion in der humanen Prostata auszugehen.

Die Ergebnisse wurden 2013 in der Zeitschrift „*Biomedical Science*“ publiziert [13].

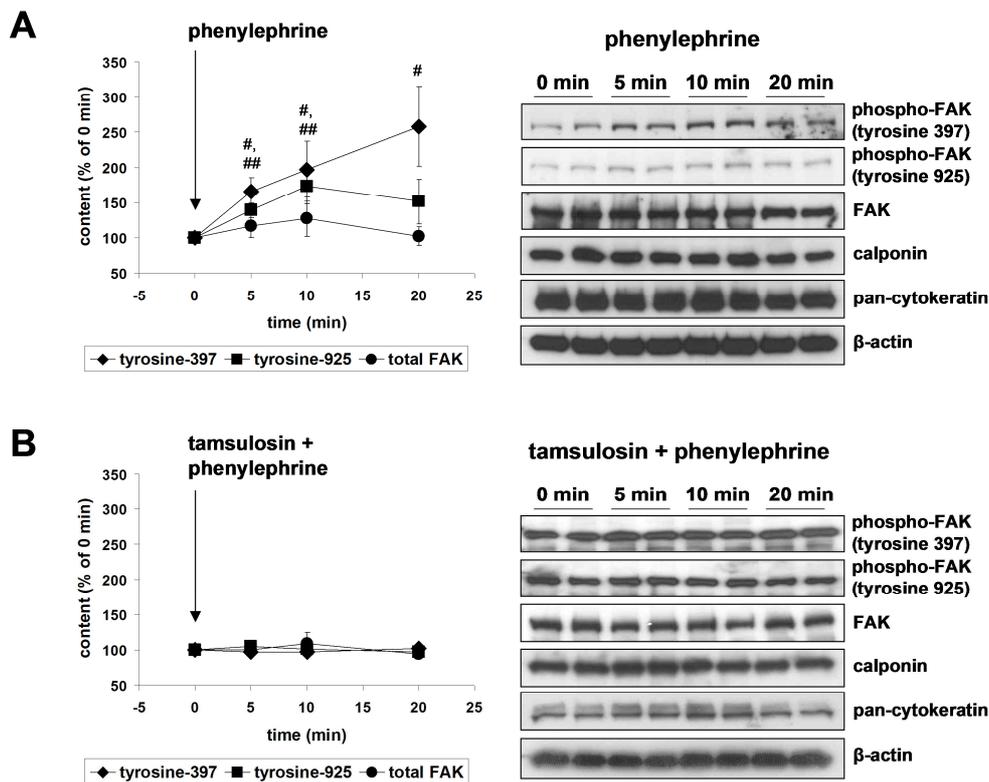
Projekt 4: FAK-vermittelte Kontraktion und Effekte von FAK-Inhibitoren in der humanen Prostata

Die glattmuskuläre Kontraktion erfordert die Verankerung des Zytoskeletts bzw. der Aktin-Filamente an der Zellmembran bzw. die Verknüpfung mit der extrazellulären Matrix. Diese Verbindungen zwischen Zytoskelett, Zellmembranen und extrazellulärer Matrix erfolgen durch „fokale Adhäsionen“. Dabei verknüpfen Integrine die extrazelluläre Matrix mit der Zellmembran. Daran können nun verschiedene Adapterproteine binden (z. B. Talin, Paxilin), an welche die Aktin-Filamente ankoppeln. Diese Protein-Komplexe werden als „fokale Adhäsionen“ oder „*dense plaques*“ bezeichnet. Die Bildung dieser *dense plaques* wird entscheidend durch die fokale Adhäsions-Kinase (*focal adhesion kinase*, FAK) reguliert. Im kardiovaskulären System und in den Atemwegen begünstigt die Aktivierung der FAK daher die glattmuskuläre Kontraktion. Hier wurde nun die Bedeutung der FAK für die glattmuskuläre Kontraktion in der humanen Prostata untersucht.

Im Organbad wurden die Effekte verschiedener FAK-Inhibitoren (PF573228, Y11) auf die Kontraktion humaner Prostata-Gewebe untersucht. Dabei führten sowohl PF573228 und Y11 zu signifikanten Hemmungen der Phenylephrin-, Noradrenalin- und EFS-induzierten Kontraktion. Western-Blot-Analysen zeigten, dass die FAK zwar in der Prostata aller Patienten exprimiert wird, allerdings auf schwankendem Niveau. Dies könnte auf eine Regulation der FAK-Expression hinweisen, die sowohl auf mRNA- als auch Protein-Ebene erfolgen könnte. Über doppelte Immunfluoreszenzfärbungen konnte gezeigt werden, dass die FAK sowohl in den glatten Muskelzellen des Stromas, als auch den Epithelzellen der Drüsen exprimiert wird. Koimmunpräzipitationsexperimente zeigten, dass die FAK in der humanen Prostata Protein-Komplexe mit verschiedenen Adaptor-Proteinen bilden kann. Die Stimulation von Prostata-Geweben mit Phenylephrin oder Noradrenalin führte zu einer Zunahme der FAK-Phosphorylierung an zwei verschiedenen Tyrosin-Positionen (Tyr397, Tyr926), welche durch den α_1 -Blocker Tamsulosin hemmbar war. Da die FAK durch Phosphorylierung an diesen Stellen aktiviert wird, spiegelt dies eine Aktivierung der FAK durch α_1 -Adrenozeptoren wieder.



Hemmung der Prostata-Kontraktion durch FAK-Inhibitoren. Im Organbad wurden die Effekte zwei verschiedener FAK-Inhibitoren (PF573228, Y11) auf die Kontraktion humaner Prostata-Gewebe untersucht. Gezeigt ist die Hemmung der EFS-induzierten Kontraktion (EFS→Ausschüttung endogener Neurotransmitter) durch PF573228 (n=12 Patienten) und Y11 (n=6). Beide Inhibitoren führten auch zu einer Hemmung der Kontraktionen, die durch Noradrenalin oder Phenylephrin ausgelöst wurden. Aus: Kunit et al., *revised version* in Vorbereitung (*Am J Physiol Renal Physiol*, *major revision*).



FAK-Aktivierung durch α_1 -Adrenozeptoren in der humanen Prostata. Humane Prostata-Gewebe wurden *in vitro* für 0-20 min mit dem α_1 -Adrenozeptor-Agonisten Phenylephrin stimuliert. Western-Blot Analysen mit phosphospezifischen Antikörpern zeigten, dass dies zu einer Zunahme des phospho-FAK-Gehaltes führt. Da FAK durch die angegebene Phosphorylierung aktiviert wird, spiegelt dies eine α_1 -adrenerge FAK-Aktivierung wider. Tatsächlich war die Phenylephrin-induzierte FAK-Phosphorylierung sensitiv gegenüber dem α_1 -Blocker Tamsulosin (B). Gezeigt sind repräsentative Western-Blots, und Mittelwerte \pm SEM aller Experimente nach Quantifizierung (n=11 Patienten in A, n=7 in B). Aus: Kunit et al., *revised version* in Vorbereitung (*Am J Physiol Renal Physiol*, *major revision*).

Insgesamt zeigen diese Daten, dass die FAK kritisch an der Regulation des glattmuskulären Tonus in der Prostata beteiligt ist. Zudem wird FAK durch α_1 -Adrenozeptoren aktiviert, was vermutlich von Bedeutung für die intrazelluläre Weiterleitung des kontraktiven Signals durch α_1 -Adrenozeptoren ist. FAK könnte sowohl für die Pathogenese von LUTS als auch für zukünftige Therapien eine Rolle spielen. Die Hemmung der (α_1 -adrenergen) Prostata-Kontraktion stellt eine wichtige Strategie zur Behandlung von LUTS bei Patienten mit BPS dar. Daher sind diese FAK-Inhibitoren interessante, mögliche Kandidaten für urodynamische In-vivo-Untersuchungen. Die hier erzielten Ergebnisse, bei denen FAK-Inhibitoren erstmalig an intakten humanen Gewebe-Präparaten getestet wurden, könnten zu ähnlichen Untersuchungen in anderen humanen Organen ermuntern.

Die bisherigen Ergebnisse wurden beim „*American Journal of Physiology – Renal Physiology*“ eingereicht. Aktuell wird eine revidierte Fassung angefertigt, welche wieder eingereicht werden kann („*major revision*“). Die Ergebnisse werden 2014 auf der Jahrestagung der „*European Association of Urology*“ (EAU) präsentiert.

Projekt 5: Effekte von Picotamid auf die Kontraktion von humanem Blasengewebe

In diesem Teilprojekt werden die Effekte des TXA₂R-Antagonisten Picotamid (s. auch Projekt 1) auf die glattmuskuläre Kontraktion von humanem Blasengewebe untersucht. Das Projekt wird von der DFG gefördert (Einzelantrag HE5825/2-1).

Übermäßige Kontraktionen der glatten Blasenmuskulatur (=Detrusor) verursachen eine „Überaktive Blase“ (*overactive bladder*, OAB) mit irritativen Symptomen („Blasenschwäche“) bis hin zu Inkontinenz. Die Kontraktion des Detrusors erfolgt durch Aktivierung von cholinergen M₃-Rezeptoren. Darüber hinaus führen auch TXA₂ und (zumindest im Trigonum) α_1 -Adrenozeptoren zu einer Detrusor-Kontraktion. Die Standardoption zur medikamentösen Behandlung der OAB stellt die Verabreichung von Anticholinergika dar. Der Erfolg der anticholinergen Therapie bleibt jedoch häufig unbefriedigend: ca. 45 % der Patienten brechen diese Therapie wegen der Wahrnehmung ab, dass die Medikamente nicht die gewünschte Wirkung erbringen. Die Zulassung von β_3 -Adrenozeptor-Agonisten und Botulinum-Toxin zur Behandlung der OAB bzw. irritativen Symptome verdeutlicht, dass nach wie vor ein großer Bedarf an verbesserten medikamentösen Optionen besteht.

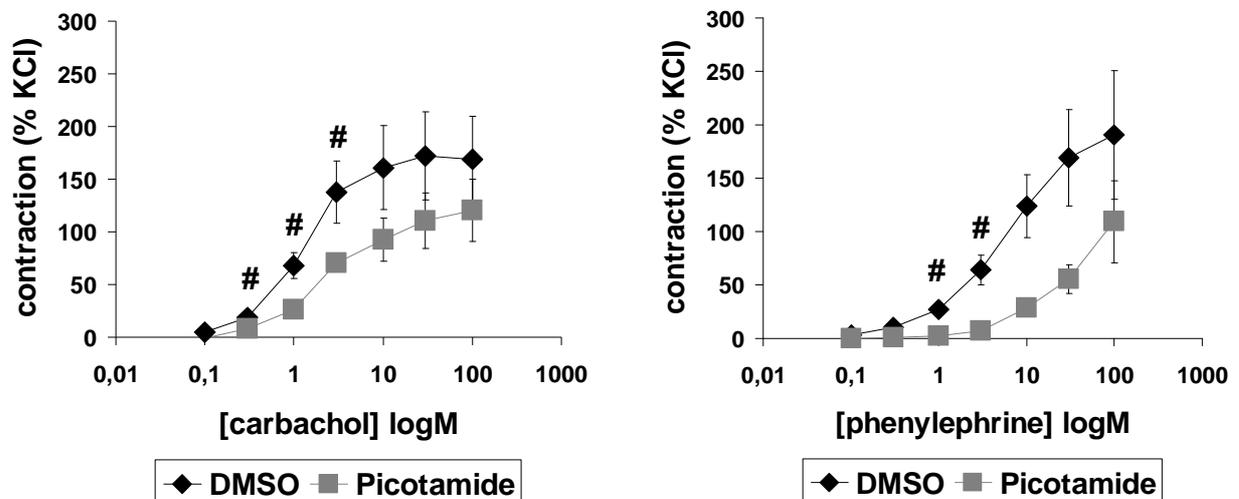
Da die Detrusor-Kontraktion durch verschiedene kontraktile Systeme kontrolliert wird, scheint es naheliegend, dass die Hemmung nur eines Systems bei der OAB unzureichend ist. Mit Picotamid steht erstmals ein Antagonist zur Verfügung, der verschiedene Rezeptoren im unteren Harntrakt ansteuern kann (s. Teilprojekt 1). In der Prostata hemmt Picotamid sowohl die α_1 -adrenerge, als auch die TXA₂-induzierte Kontraktion.

An Detrusor-Geweben von Patienten, bei denen eine radikale, Tumor-bedingte Zystektomie vorgenommen wurde, wurden die Expression des TXA₂-Systems, und die Effekte von Picotamid auf die Kontraktilität untersucht. Verwendet wurden Gewebe aus dem Trigonum männlicher Patienten.

Im Organbad lösten sowohl das Acetylcholin-Analogon Carbachol, als auch der α_1 -Adrenozeptor-Agonist Phenylephrin Konzentrations-abhängige Kontraktionen aus. Diese ließen sich mit Picotamid hemmen. Western-Blot-Analysen zeigten, dass

sowohl der TXA₂-Rezeptor, als auch die TXA₂-Synthase im Trigonum-Gewebe aller untersuchten Patienten exprimiert wurde. Über doppelte Immunfluoreszenz-Färbungen konnte gezeigt werden, dass diese Expression in glatten Muskelzellen erfolgt. Da Picotamid in verschiedene kontraktile Systeme der Blase (mind. Cholinerge und adrenerge Kontraktion) eingreift, könnte die Substanz einen vielversprechenden Kandidat für In-vivo-Studien darstellen (klinische Studien, Tiermodelle). Tatsächlich wurde Picotamid bereits in kardiovaskulären Zusammenhängen an Patienten angewendet, und war hier auch bei jahrelanger Verabreichung gut verträglich.

Die Arbeiten werden aktuell fortgesetzt (EFS-, TXA₂-induzierte Kontraktion), und 2014 abgeschlossen (Manuskript, Publikation).

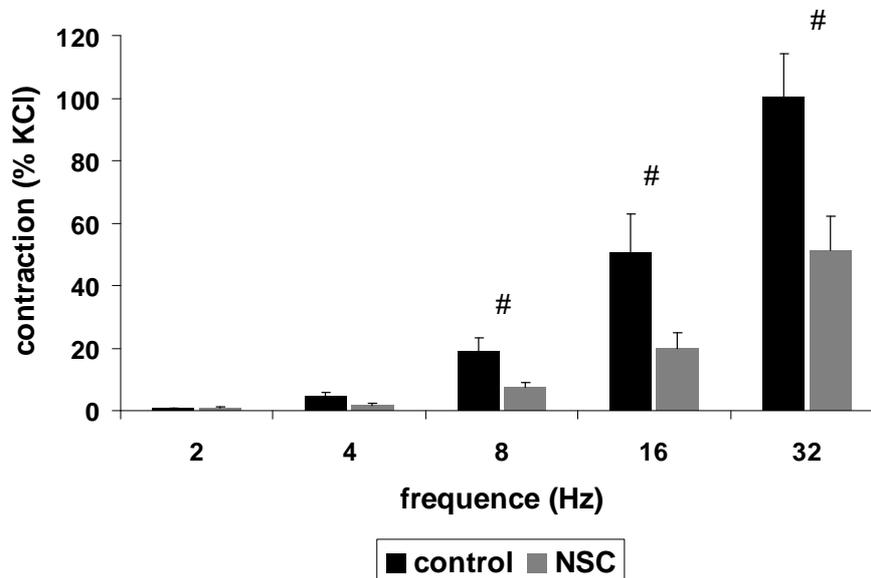
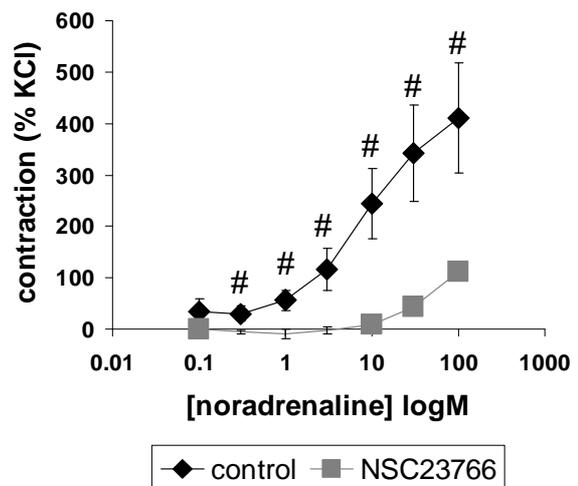
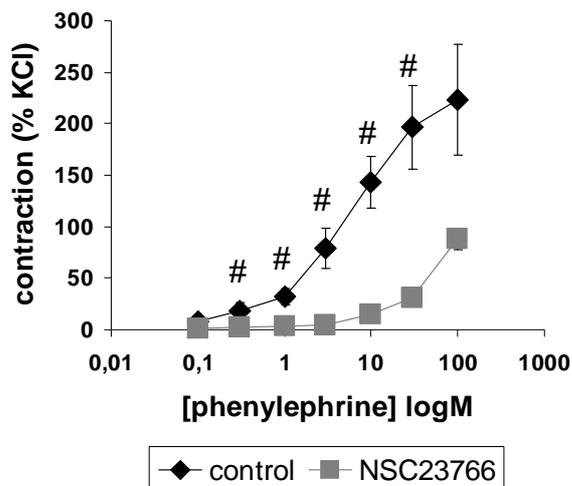


Hemmung der Agonisten-induzierten Detrusor-Kontraktion durch Picotamid. Im Organbad wurde der Effekt von Picotamid auf die Kontraktion von Blasen-Gewebe aus dem äußeren Trigonum untersucht. Picotamid hemmte sowohl die Kontraktion durch den Acetylcholin-Rezeptor-Agonist Carbachol, als auch durch den α_1 -Adrenozeptor-Agonist Phenylephrin (n=10 Patienten für Carbachol, n=5 für Phenylephrin). Vorläufige Daten zeigen auch eine Hemmung der EFS-induzierten Detrusor-Kontraktion durch Picotamid. A. Schreiber 2013, unveröffentlicht.

Projekt 6: Effekte von Rac-Inhibitoren in der humanen Prostata

Rac ist eine monomere GTPase, welche in verschiedenen Organen (kardiovaskuläres System, Atemwege) die glattmuskuläre Kontraktilität reguliert. Untersuchungen für den unteren Harntrakt lagen bislang jedoch noch nicht vor. Hier wurde nun die Bedeutung von Rac für die Regulation glatter Muskelzellen in der humanen Prostata untersucht.

Im Organbad hemmte der Rac-Inhibitor NSC23766 signifikant die Phenylephrin-, Noradrenalin-, und EFS-induzierte Kontraktion von humanem Prostatagewebe. Die Hemmung der Phenylephrin- und Noradrenalin-induzierten Kontraktion konnte kürzlich mit einem anderen Rac-Inhibitor (EHT1864) nachvollzogen werden. Die Effekte von EHT1864 auf die EFS-induzierte Kontraktion werden aktuell untersucht. Über Western-Blot-Analysen und doppelte Immunfluoreszenz-Färbungen konnte die Expression von Rac im humanen Prostatagewebe detektiert und lokalisiert werden.

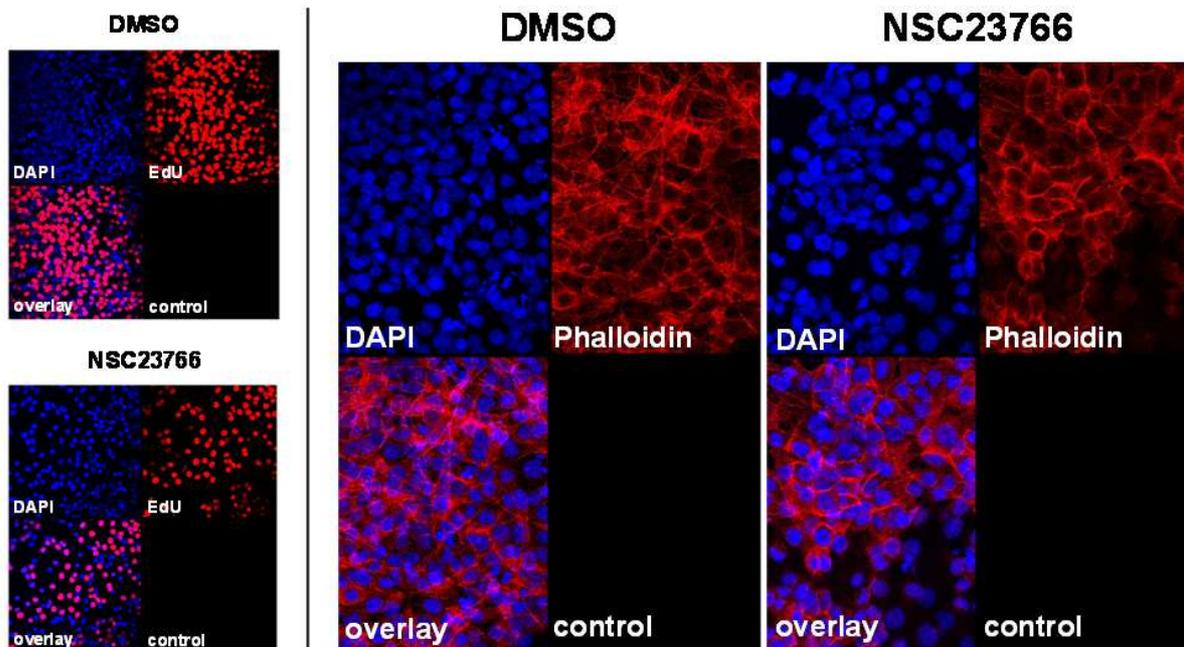


Hemmung der Prostata-Kontraktion durch den Rac-Inhibitor NSC23766. Im Organbad wurde der Effekt von NSC23766 auf die Kontraktion von humanem Prostata-Gewebe untersucht. NSC23766 hemmte Kontraktionen, die durch den α_1 -Agonisten Phenylephrin (n=9 Patienten), durch Noradrenalin (n=5), oder durch elektrische Feldstimulation (\rightarrow Ausschüttung endogener Neurotransmitter) (n=8) ausgelöst wurden. Sehr ähnliche Daten zeichnen sich aktuell mit einem anderen Rac-Inhibitor ab (EHT1864). Y. Wang, T. Kunit, A. Schreiber 2013-14, unveröffentlicht.

In Zellkultur-Experimenten an WPMY1-Zellen wurden weitere Untersuchungen mit Rac-Inhibitoren vorgenommen. Bei WPMY1 handelt es sich um eine immortalisierte Linie von Stromazellen aus der nicht-malignen, humanen Prostata. Die Kultur dieser Zellen wurde im Berichtszeitraum im benachbarten Labor von Prof. Dr. Zimmermann etabliert. Über einen fluoreszierenden EdU-Assay wurde der Effekt einer Rac-Hemmung auf die Proliferation untersucht. NSC23766 führte dabei zu einer Hemmung der Proliferation der WPMY1-Zellen. Über Phalloidin-Fluoreszenz-Färbungen (Färbung von Aktin-Filamenten) wurden die Effekte auf das Zytoskelett

untersucht. Hierbei führte NSC23766 zu einer Deorganisation des Zytoskeletts. Dies könnte die Hemmung der Kontraktion durch Rac-Inhibitoren erklären.

Die Untersuchungen werden aktuell fortgesetzt (Schwerpunkt: Effekte von EHT1864 auf Noradrenalin-, EFS-induzierte Kontraktion, Zellkultur), und 2014 abgeschlossen (Manuskript, Veröffentlichung). Die bisherigen Ergebnisse werden 2014 auf der Jahrestagung der „*American Urological Association*“ (AUA) vorgestellt.

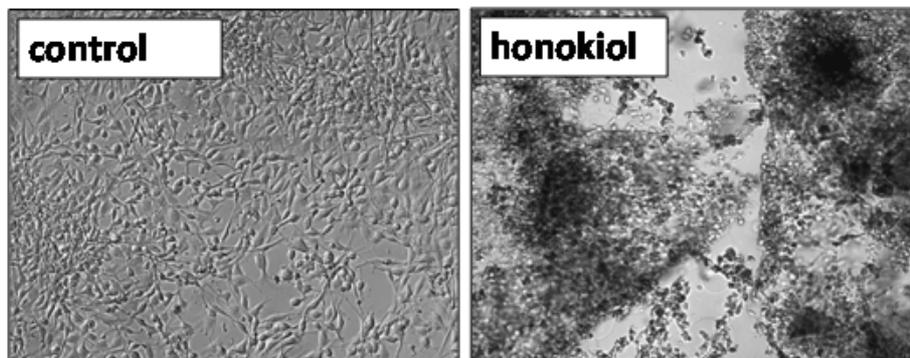
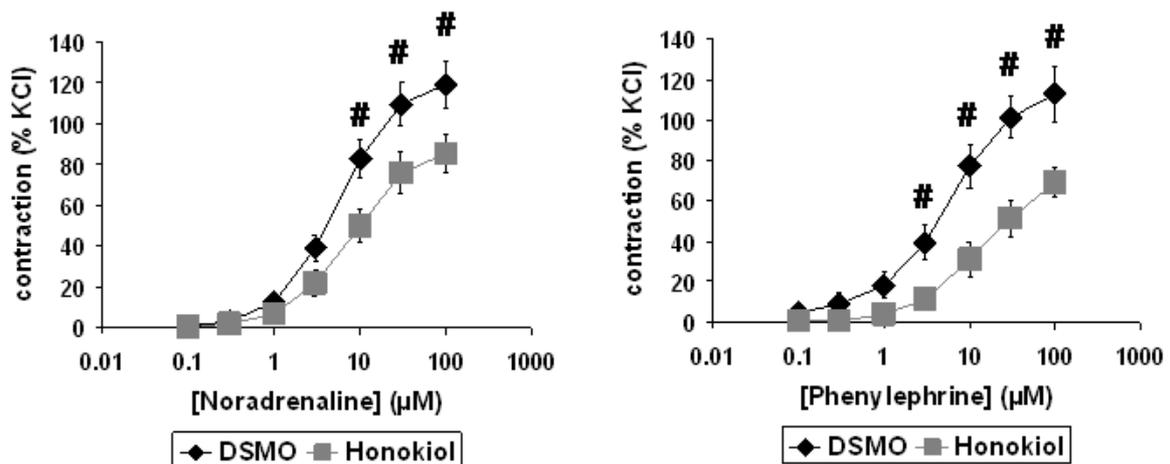


Effekte von NSC23766 auf WPMY1-Zellen. WPMY1 ist eine immortalisierte Zelllinie aus dem Stroma der nicht-malignen, humanen Prostata. Über einen EdU-Assay (links) wurde der Effekt auf die Proliferation untersucht. Offensichtlich hemmt NSC23766 die Proliferation der WPMY1-Zellen. Über fluoreszierende Phalloidin-Färbung (→Färbung von Aktin-Filamenten) (rechts) wurde der Effekt auf das Zytoskelett untersucht. Offensichtlich führt NSC23766 zu einer Deorganisation des Zytoskeletts, welche keine Kontraktion mehr erlauben würde. Damit könnte NSC23766 sowohl das Wachstum, als auch die Kontraktion in der Prostata hemmen, und wäre ein interessanter Kandidat für In-vivo-Studien zur LUTS-Behandlung bei BPS. A. Ciotkowska 2013, unveröffentlicht.

Projekt 7: Effekte der Magnolien-Inhaltsstoffe, Honokiol und Magnolol in der humanen Prostata

Als Alternative zu den klinischen medikamentösen Optionen zur LUTS-Therapie (α_1 -Blocker, 5 α -Reduktase-Inhibitoren) sind Phytotherapeutika weit verbreitet. Obwohl die Kosten für pflanzliche Präparate nicht mehr von den Krankenkassen erstattet werden, und ihre Effekte umstritten sind, machen Phytotherapeutika bis zu 37 % der Gesamtausgaben für LUTS-Medikamente in den westlichen Industrienationen aus. Phytotherapeutika sind damit wesentlicher Bestandteil der LUTS-Therapie. Die Bewerbung pflanzlicher Präparate zur besten Sendezeit im Fernsehen verdeutlicht nicht nur Leidensdruck der Patienten und die hohe Prävalenz der Symptome, sondern auch die Bedeutung der Phytotherapie zur Behandlung von LUTS.

Honokiol und Magnolol sind zwei Lignane, welche in verschiedenen *Magnolia*-Arten vorkommen. Rinden und Blüten von *M. obovata* und *M. officinalis* werden in der traditionellen ostasiatischen Medizin zur Behandlung verschiedener Leiden verwendet. Tatsächlich hemmen Honokiol und Magnolol die glattmuskuläre Kontraktion des kardiovaskulären Systems, der Atemwege, und des Gastrointestinaltrakts. Hier wurden nun die möglichen Effekte von Honokiol und Magnolol in der humanen Prostata untersucht.



Effekte von Honokiol auf die Prostata-Kontraktion und auf WPMY1-Zellen. Im Organbad wurde der Effekt von Honokiol auf die Noradrenalin- und Phenylephrin-induzierte Kontraktion von humanem Prostata-Gewebe untersucht (oben) (n=10 Patienten für Noradrenalin, n=8 für Phenylephrin). Dabei führte Honokiol zu einer signifikanten Hemmung der Kontraktion. In WPMY1-Zellen (eine immortalisierte Zelllinie aus dem Stroma der nicht-malignen humanen Prostata) führte Honokiol zum Absterben der Zellen. D. Herrmann 2013 (oben), A. Ciotkowska 2013 (unten), zur Publikation eingereicht.

Im Organbad hemmte Honokiol signifikant die Phenylephrin- und Noradrenalin-induzierte Kontraktion von nicht-malignem, humanem Prostata-Gewebe. Die EFS-induzierte Kontraktion wurde dagegen nur leicht gehemmt. In Zellkultur-Experimenten führte Honokiol zu einem Absterben von WPMY1-Zellen (immortalisierte Stroma-Zelllinie aus der nicht-malignen, humanen Prostata). Magnolol blieb dagegen ohne Effekt auf die Kontraktion von Prostata-Geweben, bzw. auf kultivierte WPMY1-Zellen.

Dies zeigt, dass sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe durchaus Effekte im unteren Harntrakt aufweisen können, von denen Patienten mit LUTS profitieren könn(t)en. Honokiol könnte simultan in beide Prozesse eingreifen, die bei BPS zur LUTS-Entstehung beitragen, nämlich Kontraktion und Wachstum der Prostata. Die gleichzeitige Hemmung beider Faktoren kann bislang nur durch Kombinations-Therapien erreicht werden (α_1 -Blocker + 5 α -Reduktase-Inhibitoren), bei denen sich jedoch die Nebenwirkungen addieren können. Ob Honokiol zu therapeutisch interessanten, urodynamischen Effekten führt, kann nur in klinischen Studien ermittelt werden.

Ein Manuskript mit diesen Ergebnissen wurde bei der Fachzeitschrift „*Planta Medica*“ eingereicht. Die Ergebnisse werden 2014 auf den Jahrestagungen der „*European Association of Urology*“ (EAU) und der „*American Urological Association*“ (AUA) präsentiert.

Projekt 8: TMEM16A-vermittelte Regulation in der humanen Prostata

TMEM16A ist ein Calcium-aktivierter Chlorid-Kanal. Eine Expression von TMEM16A wurde insbesondere in sekretorischen Epithelien und glatter Muskulatur beobachtet. Mit Hilfe eines spezifischen Inhibitors, T16A(inh)-A01, wurde die Funktion des Kanals eingehend in verschiedenen Organen und Zelltypen charakterisiert. TMEM16A ist ein wichtiger Vermittler bzw. Regulator der glattmuskulären Kontraktion in Blutgefäßen, im Darm, in der Urethra, sowie in den Luftwegen. Dabei scheint TMEM16A auch eine Rolle für verschiedene pathophysiologische Zustände zu spielen. Hier wurden die Expression von TMEM16A und seine Bedeutung für die glattmuskuläre Kontraktion in der humanen Prostata untersucht.

Die Expression von TMEM16A im humanen Prostata-Gewebe konnte über Western-Blot-Analysen dargestellt werden. Über doppelte Fluoreszenz-Färbungen konnte eine Lokalisation in glatten Muskelzellen ausgemacht werden. In Organbad-Versuchen führte die Applikation von T16A(inh)-A01 jedoch nur zu einer geringfügigen Hemmung der Noradrenalin- und Phenylephrin-induzierten Kontraktion.

Das Projekt wurde von der Friedrich-Baur-Stiftung gefördert. Aktuell werden noch in Zellkultur-Experimenten mögliche Effekte von T16A(inh)-A01 auf WPMY1-Zellen geprüft, um das Projekt möglichst mit einer Publikation abschließen zu können.

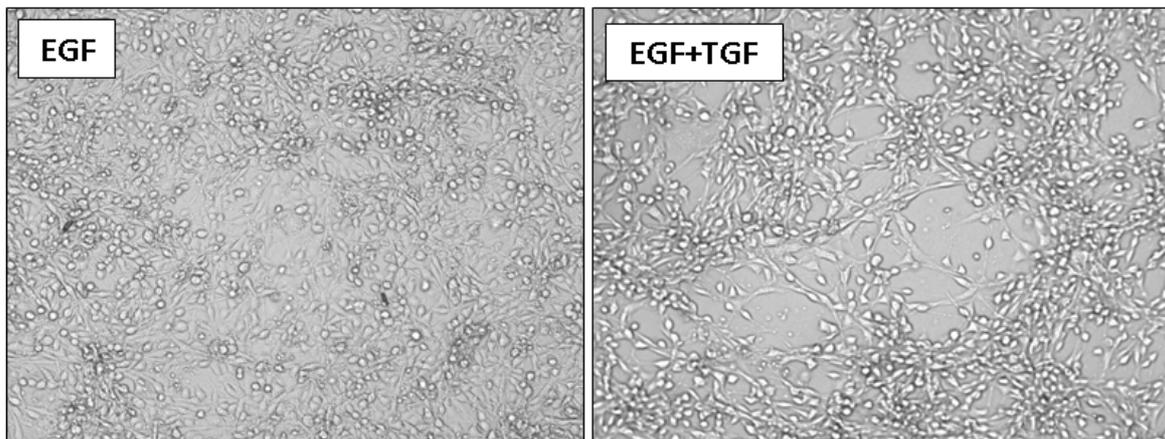
Projekt 9: Antworten von Stromazellen der Prostata auf Wachstumsfaktoren: qualitative und quantitative Unterschiede bei Kombination mehrerer Wachstumsfaktoren

Die Effekte einzelner Wachstumsfaktoren in nicht-malignen Stromazellen der Prostata wurden bereits eingehend von verschiedenen Gruppen untersucht. Die Antworten bei gleichzeitiger Stimulation mit mehreren Wachstumsfaktoren (wie sie in vivo vorkommen dürfte) blieben bislang jedoch vollkommen unberücksichtigt, und sind Gegenstand dieses Teilprojektes.

Die Stimulation mit EGF, FGF, oder TGF allein löste in Zellkultur-Experimenten jeweils eine Hypertrophie von WPMY1-Zellen aus. Dies zeigte sich in signifikanten Anstiegen des Protein/DNA-Quotienten. Alle möglichen Kombinationen (2-fach und

3-fach) führten ebenfalls zu Hypertrophie, jedoch ohne den Effekt der einzelnen Wachstumsfaktoren zu übersteigen. EGF, jedoch nicht TGF oder FGF löste einen signifikanten Anstieg von Cyclin-D1-mRNA aus. Cyclin D1 ist entscheidend an der Proliferation von Zellen beteiligt. Im Gegensatz dazu führten alle Kombinationen, also auch die Kombination von TGF und FGF zu signifikanten Zunahmen der Cyclin-D1-mRNA. Mit einem fluoreszierendem EdU-Assay konnte die Proliferation durch die FGF/TGF-Kombination bestätigt werden.

Die kombinierte Stimulation mit EGF und TGF löste eine Aggregation der WPMY1-Zellen aus, welche sich als Anordnung zu einer neuen, zwei-dimensionalen Struktur beschreiben lässt. Dieser Effekt wurde nicht beobachtet, wenn mit EGF oder TGF allein, bzw. mit anderen Kombinationen stimuliert wurden. Die Bedeutung dieser Aggregation ist noch unklar; denkbar wäre eine Bedeutung für die Morphogenese beim Prostata-Wachstum.



Stimulation von WPMY1-Zellen mit einer Kombination von EGF und TGF. Die simultane Stimulation von WPMY1-Zellen mit EGF und TGF führte zu einer neuen Anordnung der Zellen, die sich als eine Art Aggregation beschreiben lässt. Denkbar wäre eine Bedeutung für die Morphogenese beim Prostata-Wachstum. Bei alleiniger Stimulation mit EGF oder TGF trat dieser Effekt nicht auf.

An humanen Prostata-Geweben wurde das gemeinsame Vorkommen von Wachstumsfaktoren und ihren Rezeptoren untersucht. ELISA und RT-PCR zeigten, dass EGF, TGF und FGF zusammen in jeder der untersuchten Prostatae exprimiert werden. Über Immunfluoreszenz konnte die Kollokalisation von EGF- und TGF-Rezeptoren in denselben Stromazellen demonstriert werden.

Das Projekt wird aktuell fortgesetzt, und 2014 abgeschlossen (Manuskript, Publikation). Die bisherigen Ergebnisse werden 2014 auf der Jahrestagung der „European Association of Urology“ (EAU) präsentiert.

Literatur

1. Hennenberg M, Stief CG, Gratzke C. Prostatic α 1-adrenoceptors: new concepts of function, regulation, and intracellular signaling. **Neurourol Urodyn** [Epub ahead of print].
2. Hennenberg M, Strittmatter F, Beckmann C, Rutz B, Füllhase C, Waidelich R, Montorsi F, Hedlund P, Andersson KE, Stief CG, Gratzke C. Silodosin inhibits noradrenaline-activated

transcription factors Elk1 and SRF in human prostate smooth muscle. **PLOS ONE** 2012;27(11):e50904.

3. Strittmatter F, Walther S, Gratzke C, Göttinger J, Beckmann C, Roosen A, Schlenker B, Hedlund P, Andersson KE, Stief CG, Hennenberg M. Inhibition of adrenergic human prostate smooth muscle contraction by the inhibitors of c-Jun N-terminal kinase, SP600125 and BI-78D3. **Br J Pharmacol** 2012;166(6):1926-1935.
4. Strittmatter F, Walther S, Roosen A, Rutz B, Schlenker B, Limmer S, Waidelich R, Stief CG, Gratzke C, Hennenberg M. Activation of protein kinase B/Akt by alpha1-adrenoceptors in the human prostate. **Life Sciences** 2012;90(11-12):446-453.
5. Walther S, Strittmatter F, Roosen A, Heinzer F, Rutz B, Stief CG, Gratzke C, Hennenberg M. Expression and alpha1-adrenoceptor regulation of caldesmon in human prostate smooth muscle. **Urology** 2012;79(3):745.e5-12.
6. Strittmatter F, Gratzke C, Walther S, Göttinger J, Beckmann C, Roosen A, Schlenker B, Reich O, Stief CG, Hennenberg M. Alpha1-Adrenoceptor signaling in the human prostate involves regulation of p38 mitogen-activated protein kinase. **Urology** 2011;78(4):969e7-969e13.
7. Hennenberg M, Schlenker B, Roosen A, Strittmatter F, Walther S, Stief C, Gratzke C. Beta-arrestin-2 is expressed in human prostate smooth muscle and a binding-partner of α 1-adrenoceptors. **WJU** 2011;29(2):157-163.
8. Bauer RM, Strittmatter F, Gratzke C, Göttinger J, Schlenker B, Reich O, Stief CG, Hedlund P, Andersson KE, Hennenberg M. Coupling of alpha1-adrenoceptors to ERK1/2 in the human prostate. **Urol Int** 2011;86(4):427-433.
9. Hennenberg M, Strittmatter F, Walther S, Hedlund P, Andersson KE, Stief CG, Gratzke C. Alpha1-adrenoceptor activation induces phosphorylation of beta2-adrenoceptors in human prostate. **BJUI** 2011;108(6):922-908.
10. Strittmatter F, Gratzke C, Weinhold P, Steib CJ, Hartmann AC, Schlenker B, Andersson KE, Hedlund P, Stief CG, Hennenberg M. Thromboxane A2 induces contraction of human prostate smooth muscle by Rho kinase- and calmodulin-dependent mechanisms. **Eur J Pharmacol** 2011;650(2-3):655-655.
11. Hennenberg M, Miljak M, Herrmann D, Strittmatter F, Walther S, Rutz B, Hocaoglu Y, Kunit T, Schreiber A, Andersson KE, Stief CG, Gratzke C. The receptor antagonist picotamide inhibits adrenergic and thromboxane-induced contraction of hyperplastic human prostate smooth muscle. **Am J Physiol Renal Physiol** 2013;305(19):F1383-90.
12. Hennenberg M, Miersch J, Rutz B, Strittmatter F, Waidelich R, Stief CG, Gratzke C. Noradrenaline induces binding of clathrin light chain A to α 1-adrenoceptors in the human prostate. **The Prostate** 2013;73(7):715-723.
13. Hennenberg M, Strittmatter F, Schmetkamp H, Rutz B, Walther S, Stief CG, Gratzke C. The cAMP effector EPAC activates Elk1 transcription factor in prostate smooth muscle, and is a minor regulator of α 1-adrenergic contraction. **J Biomed Sci** 2013;20(46):1-13.

4. Drittmittel

Die Gesamtsumme der bewilligten Drittmittel der 2013 laufenden (bewilligten) Projekte ist aufgeführt.

#	Drittmittelgeber (Aktenzeichen)	Empfänger	Laufzeit	T€
Laser- Forschungslabor				
1	BMBF (13N11180; Flendos und Unterauftrag FISBA)	Stepp, Rühm, Betz	09-13	168
2	BMBF (FK2: 0313451C)	Fedorov	11-13	287
3	BMBF (NanoBridge)	Sroka, Fedorov	11-13	10
4	BMBF (Light 4LIFE)	Sroka, Fedorov	11-13	50
5	DAAD-Stipendium	Abdel Hamid, Stepp	12-13	12
6	Firma Kurz	Sroka	12-13	10
7	Firma BioLtec	Sroka	12-13	15
8	Firma Electro Medical Systems S.A.	Sroka	12-13	10
9	Firmen Photonamic/Dornier (Sponsoren LIFE-SommerSeminar 2013)	Sroka, Stepp	13	2
10	Firma STEBA	Sroka	12-13	8
11	Firma Nestlé	Stepp	11-14	570
12	StarMedTec	Sroka	13-14	15
13	Firma Leica	Stepp, Sroka	13-14	3
14	Firma Dornier	Sroka	12-14	15
15	Firma Electro Medical Systems S.A.	Sroka	13-14	8
<i>Summe</i>				1.183
Labor für Tumorummunologie				
1	„Molekulare und systembiologische Medizin“ der LMU München (10/2011)	Zimmermann	12-13	16
2	„Molekulare und systembiologische Medizin“ der LMU München (17/2012)	Pohla, Zimmermann	13-14	16
3	DFG Transregio (SFB-TR127)	Pohla, Jaeckel	12-16	333
<i>Summe</i>				365
Experimentelle Urologie				
1	DFG (GR3333/2-1, bewilligt 2011)	Gratzke	12-15	380
2	DFG (HE 5825/2-1), bewilligt 2012	Hennenberg	13-16	141
3	Friedrich-Baur-Stiftung	Hennenberg	13-14	10
<i>Summe</i>				531
Gesamt				2.079

5. Ernennungen, Preise und Diplom- und Promotionsarbeiten

5.1 Laser-Forschungslabor

5.1.1 Ernennungen und Preise

5.1.2 Abgeschlossene Habilitationen, Promotionen und Diplomarbeiten

Habilitationsarbeiten

Ronald Sroka

Diplom-Master-Bachelor-Arbeiten

Michael Großmann

Peter Sterflinger

Frank Dauenhauer

Jens Brehm

Sebastian Fiedler

Praktikanten

Laura Bienert

Gabriel Scheib

Eduardo Spannaus

Anna von Berg

Sebastian Wick

Matthias Eder

Gastwissenschaftler

Guang Li

Xiahua Tao

Tugba Kiris

Julia Kuznetsova

Sara Abdel-Hamid

5.2 Labor für Tumorummunologie

5.2.1 Ernennungen und Preise

5.2.2 Abgeschlossene Habilitationen, Promotionen und Diplomarbeiten

Medizinische Doktorarbeiten

Dr. med. Carina Welte/Hoffmann

Dr. med. Dong Chen (Promotion März 2014)

5.3 Experimentelle Urologie

5.3.1 Ernennungen und Preise

Dr. med. Frank Strittmatter, Horst-Jürgen-Lühl-Preis, 2000 €

5.3.2 Abgeschlossene Habilitationen, Promotionen und Diplomarbeiten

Medizinische Doktorarbeiten

Dr. med. Josef Miersch (Promotion Februar 2014)

Laufende medizinische Doktorarbeiten:

Christer Beckmann, Daniel Herrmann, Sebastian Limmer, Marijan Miljak, Henning Schmetkamp

6. Publikationen (Originalarbeiten)

Impaktfaktoren (IF) von 2012

6.1 Laser-Forschungslabor

1. Assmann W, Becker R, Otto H, Bader M, Clemente L, Reinhardt S, Schäfer C, Schirra J, Uschold S, Welzmüller A, **Sroka R**. (32)P-haltige Folien als Implantate für die LDR-Brachytherapie gutartiger Stenosen in der Urologie und Gastroenterologie. *Z Med Phys*, 23(1), 21-32 (2013). **IF 1.407**
2. Bader MJ, **Stepp H**, **Beyer W**, **Pongratz T**, **Sroka R**, Kriegmair M, Zaak D, Welsch M, Tilki D, Stief CG, Waidelich R. Photodynamic therapy of bladder cancer - a phase I study using hexaminolevulinate (HAL). *Urol Oncol*, 31(7), 1178-1183 (2013). **IF 3.647**
3. Ladurner R, Hallfeldt KK, Al Arabi N, **Stepp H**, Mueller S, and Gallwas JK. Optical coherence tomography as a method to identify parathyroid glands. *Lasers Surg Med*, 45(10), 654-659 (2013). **IF 2.455**
4. Rink M, Babjuk M, Catto JW, Jichlinski P, Shariat SF, Stenzl A, **Stepp H**, Zaak D, and Witjes JA. Hexyl aminolevulinate-guided fluorescence cystoscopy in the diagnosis and follow-up of patients with non-muscle-invasive bladder cancer: a critical review of the current literature. *Eur Urol*, 64(4), 624-638 (2013). **IF 10.48**
5. Schrötmair F, Suchan F, Kisser U, Hempel J M, **Sroka R**, and Müller J. Promising clinical results of an innovative self-crimping stapes prosthesis in otosclerosis surgery. *Otol Neurotol*, 34(9), 1571-1575 (2013). **IF 2.014**
6. Volgger V, **Stepp H**, Ihrler S, Kraft M, Leunig A, Patel PM, Susarla M, Jackson K, and Betz CS. Evaluation of optical coherence tomography to discriminate lesions of the upper aerodigestive tract. *Head Neck*, 35(11), 1558-1566 (2013). **IF 2.833**
7. Siedek V, Nehls K, zur Nieden K, Leunig A, **Sroka R**. Influence of laser light on bioimplants used in otorhinolaryngology. *Lasers Med Sci* (2013, published online ahead of print), doi: 10.1007/s10103-013-1425-z. **IF 2.402**
8. Betz CS, Zhorzel S, Schachenmayr H, **Stepp H**, Matthias C, Hopper C, Harréus U. Endoscopic assessment of free flap perfusion in the upper aerodigestive tract using indocyanine green: A pilot study. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*, 66(5), 667-674 (2013). **IF 1.439**

9. Ivanov AV, Rummyantseva VD, Shilov IP, Markushev VM, Panas AI, Ryabov As, Mironov AF, Terentyuk GS, **Rühm A**, Barishnikov AY, Shchamkhalov KS. Low toxic ytterbium complexes of 2,4-dimethoxyhematoporphyrin IX for luminescence diagnostics of tumors. *Photon Lasers Med*, 2(3), 175-187 (2013). **IF not listed**
10. **Kniebühler G, Pongratz T**, Betz CS, Göke B, **Sroka R, Stepp H**, Schirra J. Photodynamic therapy for cholangiocarcinoma using low dose mTHPC (Foscan®). *Photodiag Photodyn Therapy*, 10(3), 220-228 (2013). **IF 2.243**
11. **Hennig G**, Brittenham GM, **Sroka R, Kniebühler G**, Vogeser M, **Stepp H**. Bandwidth-variable tunable optical filter unit for illumination and spectral imaging systems using thin-film optical band-pass filters. *Rev Sci Instrum*, 84(4), 043113 (2013). **IF 1.602**
12. **Hennig H, Stepp H, Sroka R, Beyer W**. Comparison of an accelerated weighted fluorescence Monte Carlo simulation method with reference methods in multi-layered turbid media. *Appl Opt*, 52(5), 1066-1075 (2013). **IF 1.689**
13. **Johansson A**, Faber F, **Kniebühler G, Stepp H, Sroka R**, Egensperger R, **Beyer W**, Kreth FW. Protoporphyrin IX fluorescence and photobleaching during interstitial photodynamic therapy of malignant gliomas for early treatment prognosis. *Lasers Surg Med*, 45(4), 225-234 (2013). **IF 2.455**
14. Bader MJ, Zilinberg K, Weidlich P, Waidelich R, **Püls M**, Gratzke C, Stief CG, **Stepp H, Sroka R**. Encrustation of urologic double pigtail catheters - an ex vivo optical coherence tomography (OCT) study. *Lasers Med Sci*, 28(3), 919-924 (2013). **IF 2.402**
15. **Sroka R, Pongratz T, Siegrist K**, Burgmeier C, Barth HD, Schmedt CG. Endovenous laser application strategies to improve endoluminal energy application. *Phlebologie*, 42(3), 121-129 (2013). **IF 0.456**
16. **Sroka R, Hemmerich M, Pongratz T, Siegrist K, Brons J, Linden S, Meier R**, Schmedt CG. Endovenous laser application possibilities of online monitoring. *Phlebologie*, 42(3), 131-138 (2013). **IF 0.456**
17. **Hennig G, Gruber C**, Vogeser M, **Stepp H, Dittmar S, Sroka R**, Brittenham GM. Dual-wavelength excitation for fluorescence-based quantification of zinc protoporphyrin IX and protoporphyrin IX in whole blood. *J Biophot* (2013, published online ahead of print), doi: 10.1002/jbio.201200228. **IF 3.099**

6.2 Labor für Tumormmunologie

1. Zhang H, **Eisenried A, Zimmermann W**, Shively J. Role of CEACAM1 and CEACAM20 in an in vitro model of prostate morphogenesis. *PLOS ONE*, 8(1), e53359 (2013). **IF 3.730**
2. Yuan G, Regel I, Lian F, Friedrich T, Hofheinz R, Langer R, Röcken C, **Zimmermann W**, Schmid RM, Ebert MPA, Burgermeister E. WNT6 is a novel target gene of caveolin-1 promoting chemoresistance to epirubicin in human gastric cancer cells. *Oncogene*, 32(3), 375-87 (2013). **IF 7.357**

3. **Pohla H*, Buchner A*, Stadlbauer B**, Frankenberger B, Stevanovic S, Walter S, Frank R, Baron U, Olek S, Stief CG, Hofstetter A, Pezzutto A, Blankenstein T, Oberneder R, Schendel DJ. High immune response rate and decreased frequencies of regulatory T cells in patients with metastatic renal cell carcinoma after therapeutic tumor cell vaccination. *Mol Med*, 18, 1499-508 (2013). *These authors contributed equally to the study. **IF 4.469**
4. **Gassenmaier M, Chen D, Buchner A**, Henkel L, Schiemann M, Mack B, Schendel DJ, **Zimmermann W*, Pohla H***. CXC chemokine receptor 4 is essential for maintenance of renal cell carcinoma-initiating cells and predicts metastasis. *Stem Cells*, 31, 1467–1476 (2013). **IF 7.701** *Joint last authors.
5. Hachmeister M, Bobowski K, Hogl S, Dislich B, Fukumori A, Eggert C, Mack B, Kremling H, Sarrach S, Coscia F, **Zimmermann W**, Steiner H, Lichtenthaler SF, Gires O. Regulated intramembrane proteolysis and degradation of murine epithelial cell adhesion molecule mEpCAM. *PLOS ONE*, 8(8), e71836 (2013). **IF 3.730**
6. Brämswig KH, Poettler M, Unseld M, Wrba F, Uhrin P, **Zimmermann W**, Zielinski CC, Prager GW. Soluble carcinoembryonic antigen activates endothelial cells and tumor angiogenesis. *Cancer Res*, 73(22), 6584-96 (2013). **IF 7.856**
7. **Chen D, Gassenmaier M**, Maruschke M, **Riesenberg R, Pohla H**, Stief CG, **Zimmermann W*, Buchner A***. Expression and prognostic significance of a comprehensive epithelial-mesenchymal transition gene set in renal cell carcinoma. *J Urol*, 191(2): 479-86 (2014). *Joint last authors. **IF 3.696**
8. Hartmann T, Xu X, **Kronast M**, Muehlich S, Meyer K, **Zimmermann W**, Schwechheimer C, Hurwitz J, Pan Z-Q, Engelhardt S, Sarikas A. Inhibition of Cullin-RING E3 ubiquitin ligase 7 by Simian Virus 40 large T antigen. *Proc Natl Acad Sci USA*, 111(9): 3371-3376 (2014). **IF 9.737**
9. Maruschke M, Hakenberg OW, Koczan D, **Zimmermann W**, Stief CG, **Buchner A**. Expression profiling of metastatic renal cell carcinoma using gene set enrichment analysis. *Int J Urol*, 21(1), 46-51 (2014). **IF 1.734**

6.3 Experimentelle Urologie

1. **Hennenberg M**, Miersch J, Rutz B, **Strittmatter F**, Waidelich R, Stief CG, **Gratzke C**. Noradrenaline induces binding of clathrin light chain A to α 1-adrenoceptors in the human prostate. *The Prostate* 2013; 73(7):715-23. **IF 3.843**
2. **Hennenberg M**, Miljak M, Herrmann D, **Strittmatter F**, Walther S, Rutz B, Hocaoglu Y, Kunit T, Schreiber A, Andersson KE, Stief CG, **Gratzke C**. The receptor antagonist picotamide inhibits adrenergic and thromboxane-induced contraction of hyperplastic human prostate smooth muscle. *Am J Physiol Renal Physiol* 2013;305(10):F1383-90. **IF 3.612**

3. **Hennenberg M**, Stief CG, **Gratzke C**. Prostatic α 1-adrenoceptors: New concepts of function, regulation, and intracellular signaling. *NeuroUrol Urodyn* 2013 [Epub ahead of print]. **IF 2.674**
4. Gandaglia G, **Strittmatter F**, La Croce G, Benigni F, Bettia A, Castiglione F, Moschini M, Mistretta F, **Gratzke C**, Montorsi F, Stief C, Hedlund P. The fatty acid amide hydrolase inhibitor oleoyl ethyl amide counteracts bladder overactivity in female rats. *NeuroUrol Urodyn* 2013 [Epub ahead of print]. **IF 2.674**
5. **Hennenberg M**, **Strittmatter F**, Schmetkamp H, Rutz B, Walther S, Stief CG, **Gratzke C**. The cAMP effector EPAC activates Elk1 transcription factor in prostate smooth muscle, and is a minor regulator of α 1-adrenergic contraction. *J Biomed Sci* 2013;20:46(1-13). **IF 2.458**
6. **Füllhase C**, **Hennenberg M**, Giese A, Schmidt M, Strittmatter F, Soler R, **Gratzke C**, Andersson KE, Stief C. Presence of phosphodiesterase type 5 in the spinal cord and its involvement in bladder outflow obstruction related bladder overactivity. *J Urol* 2013;190(4):1430-5. **IF 3.696**
7. **Füllhase C**, Russo A, Castiglione F, Benigni F, Campeau L, Montorsi F, **Gratzke C**, Bettiga A, Stief C, Andersson KE, Hedlund P. Spinal cord FAAH in normal micturition control and bladder overactivity in awake rats. *J Urol* 2013;189(6):2364-70. **IF 3.696**
8. Hannan JL, Albersen M, Kutlu O, **Gratzke C**, Stief CG, Burnett AL, Lysiak JJ, Hedlund P, Bivalacqua TJ. Inhibition of Rho-kinase improves erectile function, increases nitric oxide signaling and decreases penile apoptosis in a rat model of cavernous nerve injury. *J Urol* 2013;189(3):1155-6. **IF 3.696**
9. Campeau L, **Füllhase C**, Sawada N, **Gratzke C**, Hedlund P, Howlett AC, Andersson KE. Characterization of bladder function in a cannabinoid receptor type 2 knockout mouse in vivo and in vitro. *NeuroUrol Urodyn* 2013 [Epub ahead of print]. **IF 2.674**
10. May F, Buchner A, Schlenker B, **Gratzke C**, Arndt C, Stief C, Weidner N, Matiasek K. Schwann cell-mediated delivery of glial cell line-derived neurotrophic factor restores erectile function after cavernous nerve injury. *Int J Urol*, 2013; 20(3):344-8. **IF 1.734**
11. Hannan JL, Albersen M, Kutlu O, **Gratzke C**, Stief CG, Burnett AL, Lysiak JJ, Hedlund P, Bivalacqua TJ. Inhibition of Rho-Kinase improves erectile function, increases nitric oxide signaling and decreases penile apoptosis in a rat model of cavernous nerve injury. *J Urol* 2013; 189(3):1155-61. **IF 3.696**
12. Soler R, Andersson KE, Chancellor MB, Chapple CR, de Groat WC, Drake MJ, **Gratzke C**, Lee R, Cruz F. Future directions in pharmacotherapy for non-neurogenic male lower urinary tract symptoms. *Eur Urol* 2013;64(4):610-21. **IF 10.476**
13. **Strittmatter F**, **Gratzke C**, Stief CG, Hedlund P. Current pharmacological treatment options for male lower urinary tract symptoms. *Expert Opin Pharmacother* 2013;14(8):1043-54. **IF 2.860**

14. **Füllhase C**, Chapple C, Cornu JN, De Nunzio C, **Gratzke C**, Kaplan SA, Marberger M, Montorsi F, Novara G, Oelke M, Porst H, Roehrborn C, Stief C, McVary KT. Systematic review of combination drug therapy for non-neurogenic male lower urinary tract symptoms. *Eur Urol* 2013;64(2):228-43. **IF 10.476**
15. **Gratzke C**, Andersson KE. α -Blockers and antimuscarinics for male lower urinary tract symptoms: the search goes on. *Eur Urol* 2013;63(1):166-7. **IF 10.476**
16. **Hennenberg M**. Editorial comment to "Cyclic guanosine monophosphate-enhancing reduces androgenic extracellular regulated protein kinases-phosphorylation/Rho kinase II-activation in benign prostate hyperplasia. *Int J Urol* 2014;21(1):92-3. **IF 1.734**
17. **Füllhase C**, Soler R, **Gratzke C**. New strategies in treating male lower urinary tract symptoms. *Curr Opin Urol* 2014 [Epub ahead of print]. **IF 2.195**
18. **Füllhase C**, Campeau L, Sibaev A, Storr M, **Hennenberg M**, **Gratzke C**, Stief C, Hedlund P, Andersson KE. Bladder function in a cannabinoid receptor type 1 knockout mouse. *BJU Int* 2014;113(1):144-51. **IF 3.046**

7. Patente

7.1 Laser-Forschungslabor

1. Gary M. Brittenham, **Herbert Stepp**, **Georg Hennig**. Measurement of a fluorescent analyte using tissue excitation. WO 2013040398 A1. Eingetragen 14. Sept. 2012. Veröffentlichungsdatum 21. März 2013
2. **Herbert Stepp**, Jochen Herms, **Gesa Kniebühler**, **Adrian Rühm**, **Georg Hennig**, **Christoph Polzer**, David Brucker. Verfahren und Vorrichtung zur Abstandsüberwachung zwischen einer Sonde und einem fluoreszierendem Objekt. DE 102013104959 A1. Eingetragen 14. Mai 2013. Veröffentlichungsdatum 14. Nov. 2013