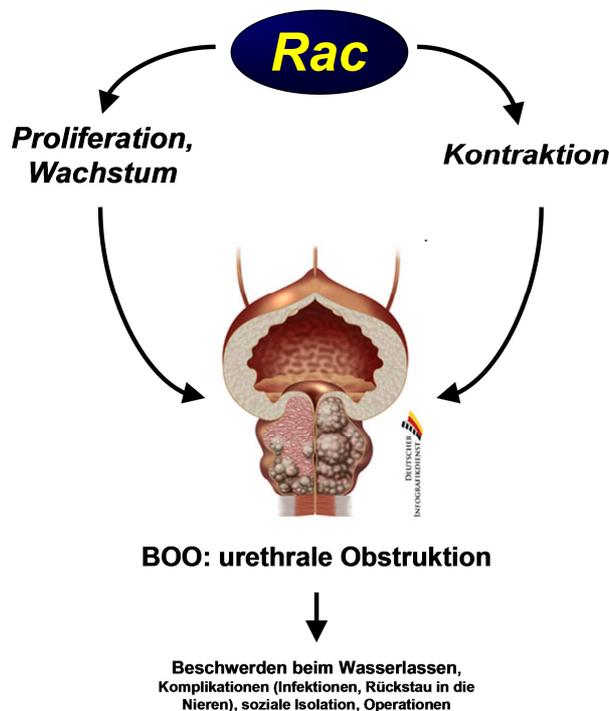




Tätigkeitsbericht LIFE-Zentrum

2014

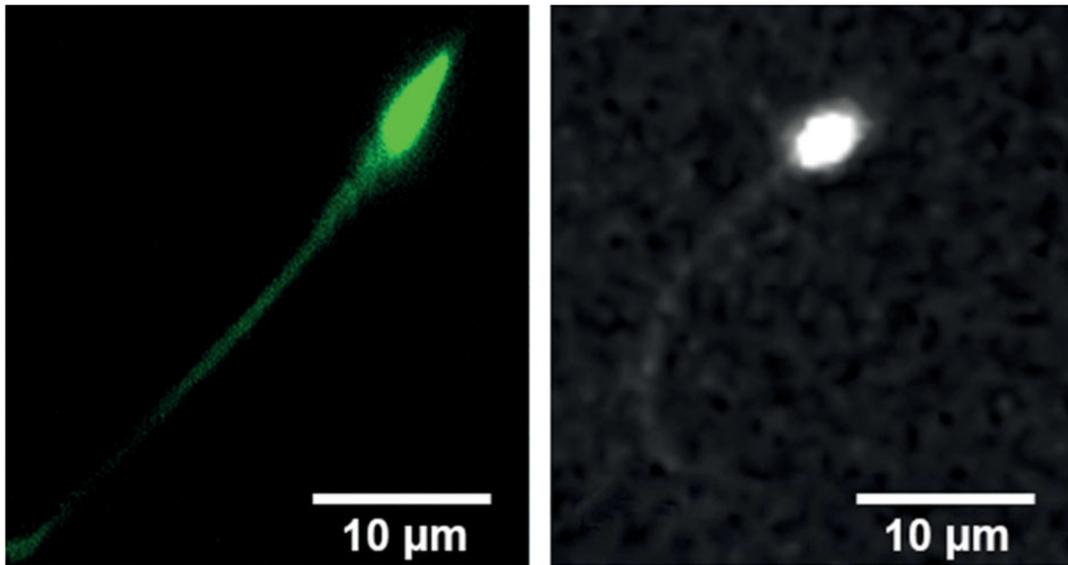
Highlights



Gemeinsame Schaltstelle für Prostata-Wachstum und –Kontraktion entdeckt

Bei Männern sind Miktionsbeschwerden häufig auf eine urethrale Obstruktion zurückzuführen, welche die Blasenentleerung behindert und so zu Symptomen des unteren Harntraktes (*lower urinary tract symptoms*, LUTS) führt. Dieser Zustand (*bladder outlet obstruction*, BOO) tritt oft in Folge einer benignen Prostatahyperplasie (BPH) auf. Dabei tragen zum einen Wachstum und Vergrößerung der Prostata (mechanische Komponente), und zum anderen ein erhöhter glattmuskulärer Tonus in der Prostata (dynamische Komponente) zur Verengung der Harnröhre bzw. zur Ätiologie der Symptome bei. Beide Prozesse sind folglich Angriffspunkt für die medikamentöse Therapie BPH-bedingter LUTS. Dabei werden unterschiedliche Medikamente und Kombinationstherapien eingesetzt, um über eine Relaxation der glatten Prostata-Muskulatur (durch α_1 -Blocker) und/oder eine Hemmung des Prostata-Wachstums (durch 5 α -Reduktase-Inhibitoren) eine Verbesserung der Symptome herbeizuführen, bzw. die Progression der Krankheit sowie das Auftreten von Komplikationen und Operationen zu vermeiden. Auch aus Sicht der Grundlagenwissenschaft wurden beide Prozesse (Wachstum und Kontraktion des Prostata-Stromas) bislang überwiegend separat betrachtet. Die Arbeitsgruppe „Experimentelle Urologie“ konnte nicht nur zeigen, dass zwischen beiden Vorgängen offensichtlich Zusammenhänge bestehen, sondern auch erstmalig einen molekularen Schalter identifizieren, welcher beide dieser Prozesse gleichzeitig kontrolliert. Die monomere GTPase Rac fördert zum einen die glattmuskuläre Kontraktion im hyperplastischen, humanen Prostata-Gewebe, und begünstigt zum anderen die Proliferation glatter Muskelzellen aus der humanen Prostata. Beide Vorgänge ließen sich durch verschiedene Rac-Inhibitoren (NSC23766, EHT1864) hemmen. Dies zeigt, dass es prinzipiell möglich ist, mit einer einzigen Substanz in die mechanische und dynamische Komponente der BOO einzugreifen.

Wang et al. Inhibition of prostate smooth muscle contraction and prostate stromal cell growth by the inhibitors of Rac, NSC23766 and EHT1864. *Br J Pharmacol* (2015, published online ahead of print), doi: 10.1111/bph.13099.

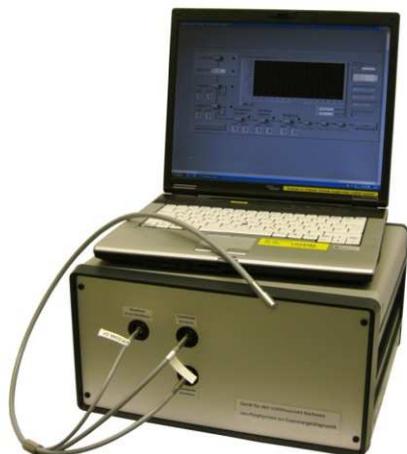


Vergleich der Visualisierung eines Spermium mittels Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM, links) und Probe-based Confocal Laser Endomicroscopy (pCLE, rechts) mit der Pro Flex™ UltraMini O-Sonde und Acriflavin-Färbung.

Ist intraoperatives Aufspüren von Spermien mittels pCLE eine Zukunftsvision?

Bei an Azoospermie leidenden Patienten werden in der Regel Spermatozoen mittels testikulärer Spermien-Extraktion (TESE) gewonnen. Leider ist die Erfolgsrate dieses Verfahrens eher moderat, da die Extraktion von testikulärem Gewebe beschränkt ist. Um die Auffindungsrate von Spermien zu erhöhen, könnten innovative optische Methoden wie die Probe-based Confocal Laser Endomicroscopy (pCLE) herangezogen werden. Dieses Verfahren eröffnet die Möglichkeit, unter nicht-invasiver Realtime-Beobachtung bei histologischer Auflösung Gewebeareale mit hohem Spermienanteil für eine gezielte Gewebeentnahme aufzuspüren. In einem ersten Schritt konnte die Visualisierung von *Tubuli seminiferi contorti* und lokalisierten vitalen Spermatozoen in *Ex-vivo*-Experimenten erfolgreich durchgeführt und mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM) bestätigt werden. Ein erster Schritt auf eine zukunftssträchtige Methode hin.

Trottmann *et al.* Probe-based confocal laser endomicroscopy (pCLE) – a new imaging technique for in situ localization of spermatozoa. *J Biophotonics* (2014, published online ahead of print), doi: 10.1002/jbio.201400053.



Messung der Zink-Protoporphyrin-IX-Fluoreszenz *in vivo* zur Eisenmangeldetektion. Abgebildet ist der in einer klinischen Studie evaluierte Prototyp V1 inklusive der Lichtleitfaser zur Fluoreszenzangregung und -detektion. Nach Aufsetzen der Faser auf die Unterlippe der Probandin wird eine Messung von etwa 10 Sekunden Dauer durchgeführt.

***In-vivo*-Eisenmangel-Nachweis ohne Blutentnahme**

In diesem internationalen interdisziplinären Projekt (LFL, Gynäkologie, Labor-Medizin, Hämatologie USA) wird ein Verfahren zum nicht-invasiven Nachweis von Eisenmangel entwickelt. Ein solches Verfahren ist insbesondere in Regionen mit eingeschränkter Laborinfrastruktur von großem Nutzen, um dort ein Screening nach Eisenmangel mit gegebenenfalls anschließender Therapie durchführen zu können. Dies ist besonders in Malariagebieten essentiell, da Studien gezeigt haben, dass die durch Malaria bedingte Mortalität bei Kindern mit Eisenmangel erhöht ist. Eine pauschale Substitution „auf Verdacht“ ist nicht möglich, da dadurch das Immunsystem der nicht unter Eisenmangel Leidenden geschwächt wird. Ein Screening ist also essentiell. Auch in hochentwickelten Ländern ist ein solches Verfahren z. B. für das Screening von Kleinkindern oder bei Schwangeren von hohem Nutzen.

Als Indikator des Eisenmangels wird die Fluoreszenz von Zink-Protoporphyrin IX (ZnPP) aus Erythrozyten bestimmt. Erste Vorarbeiten laufen bereits seit 2009. In Vorversuchen konnte gezeigt werden, dass das Verhältnis ZnPP/Häm bzw. Protoporphyrin IX (PPIX)/Häm fluoreszenzspektroskopisch an verdünnten Blutproben nachgewiesen werden kann. Mit dem weiter entwickelten Verfahren wird es möglich sein, mittels Lichtwellenleiter, aufgesetzt auf die Unterlippe, *in vivo* die Fluoreszenzangregung und -detektion innerhalb von 10 Sekunden durchzuführen und den persönlichen Wert des Verhältnis ZnPP/Häm bzw. Protoporphyrin IX (PPIX)/Häm als Maß für den Eisenmangel zu ermitteln.

Hennig *et al.* 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* 89510J (2014), doi: 10.1117/12.2039279.

Inhaltsverzeichnis

Highlights	3
Tätigkeitsbericht LIFE-Zentrum 2014	11
1. Personal	11
1.1 Laser-Forschungslabor (LFL).....	11
1.2 Labor für Tumorummunologie (LTI)	11
1.3 Experimentelle Urologie	11
2. Lehre	12
2.1 Pflichtveranstaltungen.....	12
2.2 Wahlveranstaltungen	12
2.3 Veranstaltungen.....	13
3. Forschungsschwerpunkte	13
3.1 Laser-Forschungslabor	13
3.1.1 Optische In-vivo-Pathologie	14
Verbundprojekt „Gliotax“	14
Faseroptisches Fluoreszenzspektrometer: Nachweis von Zink- Protoporphyrin IX als Indikator von Eisenmangel	15
3.1.2 Klinische Laserbehandlungen.....	17
Lithotripsie	17
Untersuchungen zur Indikation des 1940-nm-Thulium-Faser-Lasers in der Pulmologie	18
Endovenöse Lasertherapie mit Thulium-Laser und radialer Lichtapplikation	18
Untersuchungen zur laser-assistierten Entfernung von Cholesteatomen.....	19
Wundheilungsmodulation durch lokal platzierte Betastrahler	19
3.1.3 Photodynamische Therapie (PDT).....	20
Einfluss der Tumorheterogenität (Tumorstammzellen, Immunogenität) auf die PPIX-Photosensibilisierung und PDT- Reaktion bei Glioblastomen	20
Interstitielle PDT in der Neurochirurgie	21
PDT mit Chlorin e6	22
Lichtapplikatoren und Sensorik für die interstitielle PDT	24
3.1.4 Das Kompetenznetzwerk Endoskopie (T.E.A.M.)	26
Untersuchung des diagnostischen Potentials von Mikroskop- basierter optischer Kohärenztomographie (OCT) und Vergleich mit endoskopischer OCT	26

Konfokale Fluoreszenzendoskopie (pCLE) zur hochaufgelösten intraoperativen Gewebediagnostik.....	27
3.1.5 Kooperationsverbünde.....	29
Deutsch-Russischer Kooperationsverbund Biotechnologie	29
Light4LIFE - Netzwerk	30
3.2 Labor für Tumorummunologie	31
Einführung.....	31
3.2.1 Identifizierung und Validierung von Zielstrukturen und Prognosemarkern	32
Sind Stammzellen des Pylorus Zielzellen für Transformation und Entstehung von Tumorstammzellen im Magenkarzinom?	32
Charakterisierung und medikamentöse Beeinflussung von Tumorstammzellen im Nierenzellkarzinom (RCC)	37
Identifikation neuer Prognosemarker beim Nierenzellkarzinom mittels Expressionsprofilen und neuer Filterstrategien	42
3.2.2 Entwicklung, Optimierung und klinische Testung von Tumorstammzellen ..43	
Allogene genetisch modifizierte Tumorstammzellen zur Therapie von Patienten mit metastasiertem Nierenzellkarzinom (RCC) und von Patienten mit hormonrefraktärem Prostatakarzinom.....	43
Individualisierte DC-Vakzine für Patienten mit hormonrefraktärem Prostatakarzinom.....	45
Einsatz einer Multipeptidvakzine zur Behandlung von Patienten mit metastasiertem Nierenzellkarzinom.....	45
Einsatz einer mRNA-Vakzine zur Behandlung von Patienten mit metastasiertem hormonrefraktärem Prostatakarzinom	46
3.2.3 Untersuchungen zur T-Zellantwort nach PDT bei Glioblastomen	47
3.2.4 Modulation der Funktion regulatorischer T-Zellen.....	49
3.2.5 Weiterentwicklung des Immunmonitorings	53
3.3 Experimentelle Urologie	55
3.3.1 Projektgruppe Endocannabinoide.....	55
3.3.2 Projektgruppe „glattnuskuläre Kontraktilität und Wachstum im unteren Harntrakt“.....	61
4. Drittmittel	84
5. Ernennungen, Preise, Abschlüsse, Gastaufenthalte	84
5.1 Laser-Forschungslabor	84
5.1.1 Ernennungen und Preise	84
5.1.2 Abgeschlossene Habilitationen, Promotionen und Diplom-Master- Bachelor-Arbeiten	84
5.1.3 Abgeschlossene Praktika und Gastaufenthalte	85

5.2 Labor für Tumorummunologie	85
5.2.1 Ernennungen und Preise	85
5.2.2 Abgeschlossene Habilitationen, Promotionen und Diplom-Master- Bachelor-Arbeiten	85
5.3 Experimentelle Urologie	86
5.3.1 Ernennungen und Preise	86
5.3.2 Abgeschlossene Habilitationen, Promotionen und Diplom-Master- Bachelor-Arbeiten	86
6. Publikationen (Originalarbeiten)	86
6.1 Laser-Forschungslabor	86
6.2 Labor für Tumorummunologie	88
6.3 Experimentelle Urologie	88

Tätigkeitsbericht LIFE-Zentrum 2014

Geschäftsführung:

Professor Dr. med. Stefan Endres

Professor Dr. med. Christian Stief

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

Telefon: 4400 74895

Telefax: 4400 74864

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

Sekretariat: Kornelia Eberle (Telefon: 4400 74865)

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

1. Personal

1.1 Laser-Forschungslabor (LFL)

Wissenschaftliche Mitarbeiter

Planstellen: 3

Drittmittel: 2

Nichtwissenschaftliche Mitarbeiter

Planstellen: 1

Drittmittel: 0

1.2 Labor für Tumorimmunologie (LTI)

Wissenschaftliche Mitarbeiter

Planstellen: 2

Drittmittel: 1

Nichtwissenschaftliche Mitarbeiter

Planstellen: 1

Drittmittel: 0

1.3 Experimentelle Urologie

Wissenschaftliche Mitarbeiter

Planstellen: 1

Drittmittel: 2x 0,5

Gastwissenschaftler: 1

Nichtwissenschaftliche Mitarbeiter

Planstellen: 0
Drittmittel: 0

2. Lehre

2.1 Pflichtveranstaltungen

LTI

MeCuM Immunologietutorial „Allergie“

Experimentelle Urologie

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

VOBI (7M1376): „Forschung für Karriere und Wissenschaft, am Beispiel der experimentellen Urologie“

2.2 Wahlveranstaltungen

LIFE-Zentrum

Physikalische und molekularbiologische Methoden in der medizinischen
Forschung (7C4002); LIFE-Seminar mit eingeladenen Rednern (7C2000); LIFE-
SommerSeminar für Doktoranden

LTI

MeCuM-Seminar Immunologie; Ringvorlesung Promotionsstudium „System-
biologische und Molekulare Medizin“

9 Medizindoktoranden, eine Biologiedoktorandin (Dr. rer. nat.), eine Biologie-
Masterandin

LFL

Medizin-Seminare mit Übungen: Laser in der Urologie

Physik-Hauptseminar: Anwendungen physikalischer Methoden in der Medizin;
Medizin-Vorlesung: Laser in der Medizin: Grundlagen und klinische Anwendungen in
HNO, Urologie und Gynäkologie

Schulexkursionen: Schüler entdecken Laser in der Medizin (n = 3)

15 Doktoranden in Ausbildung, davon 5 Dr. biol. hum, 8 Dr. med., 2 Dr. med. dent.,
sowie Diplomanden, Masteranden, Bacheloranden, und Praktikanten

Experimentelle Urologie

8 Medizindoktoranden

2.3 Veranstaltungen

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

SPIE-Photonics West - Biomedical Optics, San Francisco, USA, 1.-6. Februar 2014

DGLM-Jahrestagung, Ulm, Germany, 28.-29. Juni 2014

LALS-Tagung, Ulm, Germany, 29. Juni - 3. Juli 2014

Laser Optics, St. Petersburg, Russia, 2.-5. Juli 2014

3. Forschungsschwerpunkte

Die Forschungsschwerpunkte der Forschungseinrichtung sind ausgerichtet auf die Charakterisierung von therapieresistenten Stammzellen solider Tumoren als Therapietargets 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 den medizinischen Partnern 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 (Lehrstuhl: Medizinische Physik Prof. Parodi) 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 breit gefächerten Engagement des Laser-Forschungslabors wider. Im Laser-Forschungslabor werden drei Forschungsgebiete schwerpunktmäßig bearbeitet: Optische *In-*

vivo-Pathologie, klinisch orientierte Laserbehandlungen, und Photodynamische Therapie.

3.1.1 Optische *In-vivo*-Pathologie

Bei diesem Forschungsschwerpunkt, der auch unter dem Namen *Optical Biopsy* bekannt ist, werden endoskopgestützte Methoden entwickelt, mit denen eine histopathologische Befundung ohne Entnahme einer Gewebeprobeentnahme möglich ist. Dazu müssen prä maligne und maligne Areale mit hoher Sensitivität und Spezifität vorwiegend in Hohlorganen lokalisiert werden können. 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. Die nachfolgend beschriebenen Projekte wurden 2014 in diesem Forschungsschwerpunkt bearbeitet:

Verbundprojekt „Gliotax“

Adrian Rühm, Herbert Stepp, Niklas Markwardt, Gabriel Scheib, Sebastian Fiedler

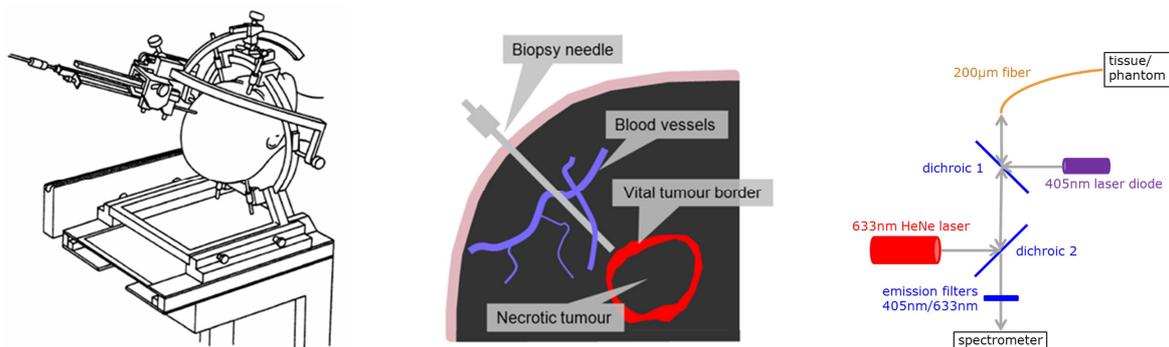
Förderung: BMBF / FASIE - Joint German-Russian funding competition

Die Gewinnung von Gewebebiopsien kann unter geeigneten Voraussetzungen mittels spektroskopischer Verfahren sicherer und genauer gemacht werden. Im Rahmen eines 2015 anlaufenden bilateralen deutsch-russischen Verbundprojekts „Gliotax“ soll ein entsprechendes Verfahren für die stereotaktische Biopsie bei Glioblastom-Patienten erarbeitet werden. Dazu wird das mechanische Instrumentarium durch die Integration von Lichtleitfasern so ausgestattet, dass bei der Einführung der Biopsienadel a) größere Blutgefäße über die Fluoreszenz von intraluminalen Indocyanin-Grün (ICG) rechtzeitig erkannt und b) vitales Gehirntumorgewebe über die Fluoreszenz mittels darin angereichertem Protoporphyrin IX (PPIX) eindeutig identifiziert werden kann. Die optischen Signale sollen der präoperativen 3D-Bildgebung in Echtzeit überlagert werden.

2014 wurden vorbereitende Arbeiten zu diesem Verbundprojekt durchgeführt. Geeignete Lichtleitfasern wurden identifiziert sowie deren Integrierbarkeit in eine Biopsienadel verifiziert. Zur Erarbeitung geeigneter Detektionskonzepte wurden Vorexperimente mit *Bare-fiber*-Sonden und vom LFL in Zusammenarbeit mit der Hochschule München hergestellten Seitblick-Sonden durchgeführt. Die technische Umsetzung des am LFL erarbeiteten Detektionskonzepts erfolgt in Zusammenarbeit mit den Projektpartnern. Initial ist die Integration von zwei *Bare-fiber*-Sonden und zwei Seitblick-Sonden in eine seitlich abscherende Biopsiezange (mit oder ohne Gewebeansaugung) vorgesehen, wobei die *Bare-fiber*-Sonden in einem geeigneten Abstand voneinander in Vorwärtsrichtung ausgerichtet sind und der frühzeitigen Erkennung von Blutgefäßen bzw. Tumorgewebe während dem Vorschieben der Biopsienadel dienen. Die in axialer Richtung leicht gegeneinander versetzten

Seitblick-Sonden dienen dann dazu, an der Position der seitlichen Öffnung in der Biopsiezange PPIX-haltiges (Tumor-)Gewebe und ICG-führende Blutgefäße zu erkennen. Über die Gewebe-Erkennung soll die Zielgenauigkeit und Relevanz der Biopsie verbessert werden, über die Blutgefäßererkennung soll eine Beschädigung von größeren Blutgefäßen beim Sondenvortrieb oder beim Ansaugen bzw. Abscheren des Biopiegewebes vermieden werden.

Vorarbeiten zur thermischen Belastung des sensiblen Hirngewebes, welche bei der interstitiellen Lichtapplikation stets berücksichtigt werden muss, wurden 2014 für den Fall der ICG-Detektion publiziert.¹ Eine weitere Publikation für den Fall der PPIX-Detektion ist in Vorbereitung. Im Rahmen des aktuellen Projekts wird die Umsetzung eines bereits angemeldeten Schutzrechts² und die Entstehung neuer Schutzrechte angestrebt.



Optimierung der stereotaktischen Biopsieentnahme bei Gliomen. Im linken Teil der Abbildung ist an einem Stereotaxierahmen befestigtes Biopsieequipment angedeutet, welches eine Biopsienadel mit integrierten optischen Fasern beinhaltet. Ziel ist es, anhand der über die Fasern aufgefangenen Signale Blutgefäße durch ICG-Fluoreszenz und Tumorgewebe durch PPIX-Fluoreszenz zu erkennen (Mitte der Abbildung). Der optische Weg von Anregungslicht und Fluoreszenzsignal ist in der rechten Abbildung dargestellt.

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

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

Kooperation: Gary Brittenham (Columbia University, NY)

Förderung: Industrie

Ziel dieses Projekts ist es, ein Verfahren zum nicht-invasiven Nachweis von Eisenmangel zu entwickeln. Ein solches Verfahren wäre insbesondere in Regionen

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* 11(3), 307-318 (2014).

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.

mit eingeschränkter Laborinfrastruktur von großem Nutzen, um dort ein Screening nach Eisenmangel mit gegebenenfalls anschließender Therapie durchführen zu können. Dies ist besonders in Malariagebieten essentiell, da Studien gezeigt haben, dass die Malariamortalität bei Kindern mit Eisenmangel erhöht ist. Eine pauschale Substitution „auf Verdacht“ ist jedoch nicht möglich, da dadurch das Immunsystem der nicht unter Eisenmangel Leidenden geschwächt wird. Ein Screening ist also essentiell. Auch in hochentwickelten Ländern wäre ein solches Verfahren z. B. für das Screening von Kleinkindern oder bei Schwangeren von hohem Nutzen.

Als Indikator eines Eisenmangels soll in diesem Projekt die Fluoreszenz von Zink-Protoporphyrin IX (ZnPP) aus Erythrozyten bestimmt werden. Erste Vorarbeiten dazu laufen bereits seit 2009. In Vorversuchen konnte gezeigt werden, dass das Verhältnis ZnPP/Häm bzw. Protoporphyrin IX (PPIX)/Häm fluoreszenzspektroskopisch an verdünnten Blutproben nachgewiesen werden kann. Diese Ergebnisse wurden im Jahr 2014 publiziert.³

Auf diesen Ergebnissen aufbauend wurde ein Prototyp V0 entwickelt und im Rahmen einer klinischen Studie an Wöchnerinnen evaluiert. Die Studie wurde in der Gynäkologischen Klinik der LMU in Großhadern in Zusammenarbeit mit PD Dr. Hasbargen durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass der Autofluoreszenzuntergrund bei Gewebemessungen mittels Zwei-Wellenlängen-Anregung im Mittel um 92% reduziert werden kann.⁴



Messung der Zink-Protoporphyrin-IX-Fluoreszenz *in vivo* zur Eisenmangeldetektion. Abgebildet ist der in einer klinischen Studie evaluierte Prototyp V1 inkl. der Lichtleitfaser zur Fluoreszenz-anregung und -detektion. Nach Aufsetzen der Faser auf die Unterlippe der Probandin wird eine Messung von etwa 10 Sekunden Dauer durchgeführt.

³ Hennig G, Gruber C, Vogeser M, Stepp H, Dittmar S, Sroka R, Brittenham GM. Dual-wavelength excitation for fluorescence-based quantification of zinc protoporphyrin IX and protoporphyrin IX in whole blood. *J Biophotonics*, 7(7), 514-524 (2014).

⁴ 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* 89510J (2014), doi: 10.1117/12.2039279.

Mit Hilfe dieser Erkenntnisse wurde ein weiterer Prototyp V1 entwickelt und im zweiten Teil der klinischen Studie evaluiert. Diese Studie wurde im Dezember 2014 abgeschlossen, wobei 56 Probanden gemessen wurden. Obwohl die Auswertung der Studie derzeit läuft, deutet sich bereits jetzt eine gute Korrelation zwischen der *in vivo* gemessenen ZnPP-Fluoreszenz und der Kontrollmessung im Blut an.

3.1.2 Klinische Laserbehandlungen

Als einziges Labor für Lasermedizin in Bayern hat sich die Arbeitsgruppe „Lasermedizin“ im LFL zum Ziel gesetzt, die neuesten Lasersysteme und -verfahren ausgehend von *In-vitro*-Laborversuchen bis hin zu klinischen Studien auf ihre Effizienz hin zu untersuchen. Abhängig von den Laserparametern werden dabei Effekte der Gewebekoagulation und Vaporisation bis hin zur Steinertrümmerung untersucht. Die Forschungsarbeiten wurden schwerpunktmäßig in Kooperation mit den klinischen Fächern Urologie und HNO durchgeführt. Die nachfolgend beschriebenen Projekte wurden 2014 in diesem Forschungsschwerpunkt durchgeführt:

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 Abtragraten, sowie Rückstoßuntersuchungen, und allgemeine Handhabungen der Systeme, sowie das Abbrandverhalten von Lichtwellenleitern und Sicherheitsaspekte im OP. Als neue Variante bei der Laser-Lithotripsie stehen Verfahren 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. Im vergangenen Jahr wurden zwei Arbeiten zu diesem Themenkomplex publiziert^{5,6}, eine weitere Publikation ist in Vorbereitung.

⁵ Bader MJ, Pongratz T, Khoder W, Stief CG, Herrmann T, Nagele U, Sroka R. Impact of pulse duration on Ho:YAG laser lithotripsy: fragmentation and dusting performance. *World J Urol* 33(4), 471-477 (2015).

⁶ Sroka R, Pongratz T, Scheib G, Khoder W, Stief CG, Herrmann T, Nagele U, Bader MJ. Impact of pulse duration on Ho:YAG laser lithotripsy: treatment aspects on the single-pulse level. *World J Urol* 33(4), 479-85 (2015).

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

Ronald Sroka

Kooperation: Wolfgang Gesierich, Johannes Frank (Pulmologie Gauting)

Förderung: Industrie

Der chirurgische Einsatz des Thulium (Tm)-Faser-Lasers wurde in einer klinischen Machbarkeitsstudie 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-Laser-Behandlung geringen Nebenwirkungen wurde stenotisches Gewebe entfernt. Große Vorteile konnten bei der Behandlung eingewachsener Stents ermittelt werden. Eine komplette Bergung der Stents wurde erstmalig möglich. Die Ergebnisse wurden publiziert.⁷

Im Rahmen einer experimentellen Studie (medizinische Doktorarbeit) wurde die Entflammbarkeit von Endotrachealstents unterschiedlicher Materialien in einem *Ex-vivo*-Tracheal-Modell in Abhängigkeit unterschiedlicher Laser-Parameter und Sauerstoff-Umgebungen untersucht. Nach Beendigung der Experimente befindet sich dieses Projekt nun in der Auswertephase.

Endovenöse Lasertherapie mit Thulium-Laser und radialer Lichtapplikation

Ronald Sroka

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

Förderung: Industrie

Experimentelle und klinische Untersuchungen deuten darauf hin, dass die Endovenöse Lasertherapie (ELT) mit Laser-Wellenlängen im Spektralbereich hoher Wasserabsorption Vorteile im Vergleich zur ELT mit anderen Wellenlängen hat. Die Emissionswellenlänge des Thulium (Tm)-Lasers liegt mit 1940 nm in einem lokalen Absorptionsmaximum von Wasser bei vernachlässigbarer Hämoglobinabsorption. Mit der hier vorgestellten Untersuchung wurde überprüft, ob die ELT mit Tm-Laser effektiv und sicher anwendbar ist und einen hohen Komfort für die Patienten ermöglicht.

An der Klinik für Gefäßchirurgie am Diakonie-Klinikum Schwäbisch Hall wurde in Kooperation mit dem LFL eine unizentrische, prospektive Beobachtungsstudie mit standardisierter Dokumentation aller konsekutiven ELT-Behandlungen durchgeführt (Erhebung der Patientendaten und der technischen Details der Prozeduren, standardisierte Befragung, klinische und farbcodierte Duplexsonographie präoperativ, 3 Tage, 4 Wochen und 6 Monate postoperativ).

Im Beobachtungszeitraum wurden 72 ELT-Prozeduren (Tm-Laser, 1940 nm) bei 55 Patienten durchgeführt. Die longitudinale endovenöse Energiedichte (LEED) betrug

⁷ Gesierich W, Reichenberger F, Fertl A, Haeussinger K, Sroka R. Endobronchial therapy with a thulium fiber laser (1940 nm). *J Thorac Cardiovasc Surg* 147(6), 1827-1832 (2014).

bei der *Vena saphena magna* (VSM) im Mittel 64,3 Joule/cm (40,3-98,2 Joule/cm) und bei der *Vena saphena parva* (VSP) im Mittel 51,0 Joule/cm (37,6-72,7 Joule/cm). Die Okklusion der Vene und Elimination des Refluxes wurde bei 72/72 (100%) der behandelten Stammvenen erreicht. Die maximale nicht okkludierte Stumpflänge betrug durchschnittlich 6,0 mm (1,0-20,0 mm). Eine Propagation des endovenösen hitzeinduzierten Thrombus (EHIT) wurde bei 1/72 (1,4%) beobachtet. Weitere unerwünschte Ereignisse waren: Parästhesie 10/72 (13,9%), Ekchymose 1/72 (1,4%), Lymphozele 1/72 (1,4%) und Hyperpigmentierung 1/72 (1,4%). Die maximale postoperative Schmerzintensität (NAS 0-10) betrug durchschnittlich 1,3 (1-3), im Mittel wurden postoperativ 1,8 (1-10) Analgetika-Einzelgaben appliziert. Die normale körperliche Aktivität wurde durchschnittlich nach 3 Tagen (1-21) erreicht.

Die ELT mit Tm-Laser bei einer Wellenlänge von 1940 nm und radialer Lichtapplikation eliminiert effektiv den Reflux in der behandelten Stammvene und reduziert den Durchmesser signifikant. Das Risikoprofil korreliert mit dem der segmentalen Radiofrequenztherapie. Die geringe postoperative Schmerzintensität und der geringe postoperative Analgetikabedarf mit rascher Rekonvaleszenz deuten auf einen hohen Patientenkomfort hin.

Untersuchungen zur laser-assistierten Entfernung von Cholesteatomen

Ronald Sroka, Sebastian Fuchs

Kooperation: Florian Schrözlmaier (HNO)

Im Rahmen einer gemeinsamen medizinischen Promotionsarbeit werden anhand von Cholesteatom-Resektaten deren optische Eigenschaften und deren Verhalten bei der lasergestützten Ablation untersucht. Ziel dieser Studie ist es, einen optimalen Laser-Parametersatz (Wellenlänge, Leistung) zu eruieren, so dass potentiell klinisch benachbarte Gewebeareale bei der Laseranwendung nicht belastet werden.

Wundheilungsmodulation durch lokal platzierte Betastrahler

Ronald Sroka

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

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 war es, radioaktive Implantate aus Betastrahlern zu entwickeln und ihre Auswirkungen auf den Wundheilungsprozess zu untersuchen. Zusätzlich wurden die Präparate mittels innovativer Konfokal-Sonden unmittelbar während der Explantation untersucht.

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

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

Seit 2012 wurden beide Ansätze von den fortführenden Wissenschaftlern und Klinikern weiter verfolgt. Zudem sind Publikationen zu den BetaMod-Teilprojekten Urologie und Gastroenterologie in Vorbereitung. Für das Teilprojekt Urologie ist eine klinische Studie in der Projektierungsphase. Die Aufarbeitung des Teilprojektes HNO des BetaMod-Vorläufers BioMatRad ist im Rahmen einer Promotionsarbeit experimentell abgeschlossen, die statistische Auswertung befindet sich vor dem Abschluss, eine Publikation ist in Vorbereitung.

3.1.3 Photodynamische Therapie (PDT)

Einfluss der Tumorheterogenität (Tumorstammzellen, Immunogenität) auf die PPIX-Photosensibilisierung und PDT-Reaktion bei Glioblastomen

Herbert Stepp, Wolfgang Zimmermann, Heike Pohla, Patricia Müller

Kooperation: Rainer Wittig, Institut für Lasermedizin, Ulm; Nabila Hamdi, German University in Cairo; Neurochirurgie (geplant)

Förderung: FöFoLe; EU-Antrag eingereicht im Rahmen einer ERA-NET Ausschreibung

Der Therapieerfolg einer Photodynamischen Therapie (PDT) hängt zum einen wesentlich davon ab, dass insbesondere die Tumorzellen mit erfasst werden, aus denen sich das Tumorgewebe wesentlich erneuert, also die Tumorzellen mit Stammzellcharakter. Zum anderen ist auch die Stimulation und Aufrechterhaltung einer Immunantwort durch die und nach der Behandlung ein wesentlicher Erfolgsfaktor. Die gründliche Erforschung beider Aspekte ist Gegenstand laufender Untersuchungen am LIFE-Zentrum.

Wir konnten bereits zeigen (siehe letzter Tätigkeitsbericht), dass unter bestimmten Kulturbedingungen das Membrantransportprotein ABCG2 den Photosensitizer Protoporphyrin IX (PPIX) aus Zellen ausschleusen kann. Da ABCG2 Multidrug-Resistenz vermittelt und vermehrt in Tumorstammzellen gefunden wird, wären Tumorstammzellen bei Anwendung von photodynamischer Therapie (PDT) möglicherweise weniger gut photosensibilisiert als der Rest des Tumors. Mit entsprechenden Zellkulturuntersuchungen wurde begonnen, über gesicherte Erkenntnisse kann aber noch nicht berichtet werden.

Die Interaktion der in Glioblastomen durchaus vorhandenen, aber „ruhig gestellten“ Immunzellen, die Mikroglia, mit der PDT ist Gegenstand weiterer Untersuchungen, für die die methodische Vorgehensweise augenblicklich etabliert wird.

Des Weiteren wird die T-Zellantwort auf mit PDT behandelte Tumorzellen untersucht. Die bisherigen Ergebnisse hierzu finden sich im Berichtsteil des Labors für Tumorummunologie (3.2.3).

Aus den vorgenannten Untersuchungsthemen rekrutiert sich der Beitrag des LIFE-Zentrums zu einem Förderantrag an die EU (Koordinator: LIFE-Zentrum), an dem Neurochirurgische Zentren in Frankreich (Bestrahlungsplanung), Österreich (Immunhistochemie) und Spanien (klinische Studienvorbereitung) beteiligt sind.

Interstitielle PDT in der Neurochirurgie

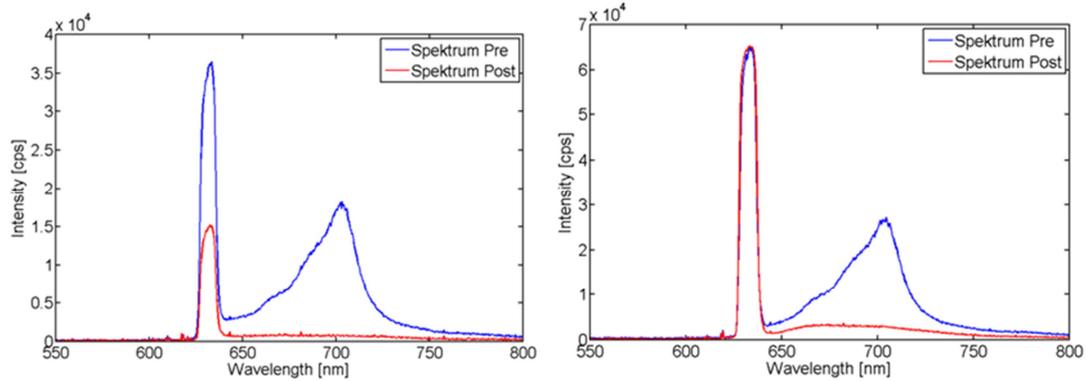
Adrian Rühm, Herbert Stepp, Wolfgang Beyer, Maurice Hermwille, Julian Rudrof

Kooperation: Friedrich-Wilhelm Kreth (Neurochirurgie)

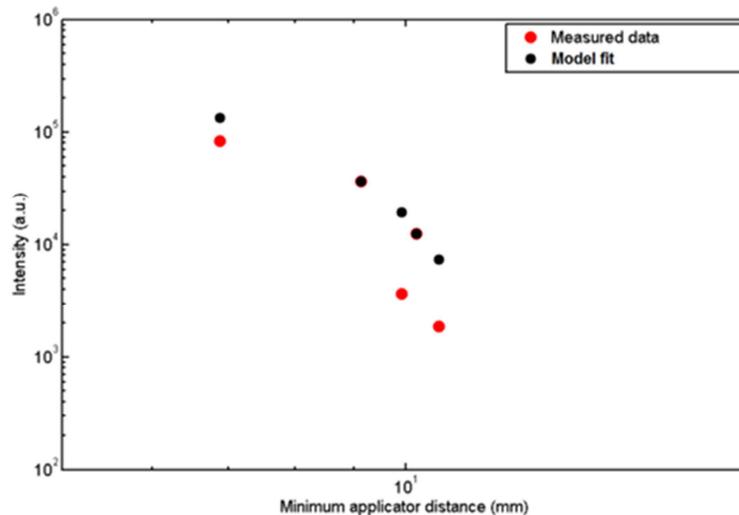
Im Rahmen von Heilversuchen wurden inoperable Glioblastome mit stereotaktischer interstitieller PDT basierend auf 5-ALA-induziertem PPIX behandelt. Dabei wurde das Anregungslicht zur Aktivierung des Photosensibilisators interstitiell über zylindrische Lichtleiter appliziert. Bei Lichteinstrahlung über einzelne Applikatoren können vor und nach der Bestrahlung wichtige Monitoring-Informationen über das behandelte Gewebavolumen erhalten werden. Hierzu wurden die übrigen Applikatoren kurzzeitig als Sensoren verwendet. Das anfängliche Fluoreszenzsignal lässt dabei Rückschlüsse auf den Grad der Anreicherung des Photosensitizers im Gewebe zu, woraus bereits vor Beginn der PDT Hinweise auf deren Erfolgsaussichten gewonnen werden können. Eine Abnahme des Fluoreszenzsignals im Verlauf der PDT zeigt das sukzessive Ausbleichen des Photosensitizers infolge der Lichteinstrahlung an. Ein vollständiges Ausbleichen wurde in allen Fällen beobachtet und ist im Hinblick auf den Therapieerfolg wünschenswert. Darüber hinaus deutet sich an, dass neben der Fluoreszenzintensität auch weitere Details der zwischen je zwei Applikatoren transmittierten Lichtspektren, deren zeitlicher Verlauf während der PDT, sowie deren meist räumlich inhomogene Charakteristik einen prognostischen Wert im Hinblick auf den Therapieerfolg haben könnte. Weitere Bestrebungen gehen dahin, Therapie-Responder und Nicht-Responder frühzeitig erkennen zu können, um das Behandlungskonzept individuell bestmöglich anpassen zu können.

Sowohl im Zuge einer PDT als auch bei einer Biopsie-Entnahme im Vorfeld können vitale Tumor-Regionen mit erhöhter PPIX-Konzentration stereotaktisch anhand ihrer PPIX-Fluoreszenz lokalisiert werden.⁸ Hierfür ist ein miniatur-endoskopischer Ansatz geeignet und auch mit dem Biopsieverfahren kompatibel realisierbar, was in einer 2014 erschienenen Publikation demonstriert wurde. Das Verfahren der fluoreszenzgestützten Biopsie-Entnahme zielt darauf ab, die Qualität des Eingriffs verbessern und diesen gleichzeitig vereinfachen können. In der endoskopischen Umsetzung könnte hierdurch Tumorgewebe bereits vor der Entnahme hinsichtlich seiner Eignung für histologische und biomolekulare pathologische Untersuchung bewertet werden. Prinzipiell könnte dieser Ansatz auch in Situationen, in denen kein Neuropathologe im OP anwesend ist, eine gezielte Entnahme von Gewebeproben und deren anschließende Versendung an spezialisierte Labors ermöglichen.

⁸ Eigenbrod S, Trabold R, Brucker D, Erös C, Egensperger R, La Fougere C, Göbel W, **Rühm A**, Kretschmar HA, Tonn JC, Herms J, Giese A, Kreth FW. Molecular stereotactic biopsy technique improves diagnostic accuracy and enables personalized treatment strategies in glioma patients. *Acta Neurochir* 156(8), 1427-1440 (2014).



Vor und nach der PDT gemessene Spektren am Beispiel zweier Applikatorpaare. Die blauen Kurven entsprechen den Spektren vor der iPDT, die roten denen nach der iPDT. Das Fluoreszenzsignal bei Wellenlängen um 700 nm verschwindet in beiden Fällen, bis auf ein Restsignal von anderweitigen Quellen. Im Graphen links fällt die transmittierte Anregungsintensität bei 635 nm auf etwa 40% der Ausgangsintensität ab, im Graphen rechts bleibt sie gleich.



Abstandsabhängigkeit der zwischen Paaren von Zylinderapplikatoren transmittierten Anregungslichtintensität. Diskrepanzen in den experimentellen Daten (rot) im Vergleich zu den Modellrechnungen (schwarz) lassen auf Inhomogenitäten im behandelten Gewebe schließen.

PDT mit Chlorin e6

Herbert Stepp, Michael Heide, Sara Abdel Hamid

Kooperation mit der German University of Cairo (GUC)

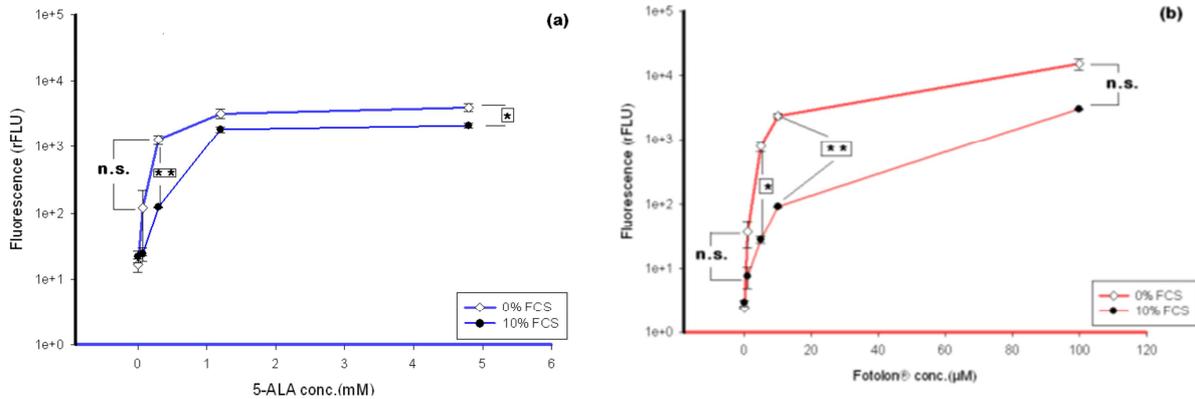
Kooperation mit dem Institut für Anorganische Chemie II der Uni Ulm

Förderung: DAAD

Von September 2012 bis Oktober 2013 war die Pharmaziestudentin Frau Abdel Hamid als DAAD-Stipendiatin am LFL. Sie hat Ihre Dissertation 2014 abgeschlossen, ab Juni 2015 wird sie weitere Untersuchungen am LFL durchführen.

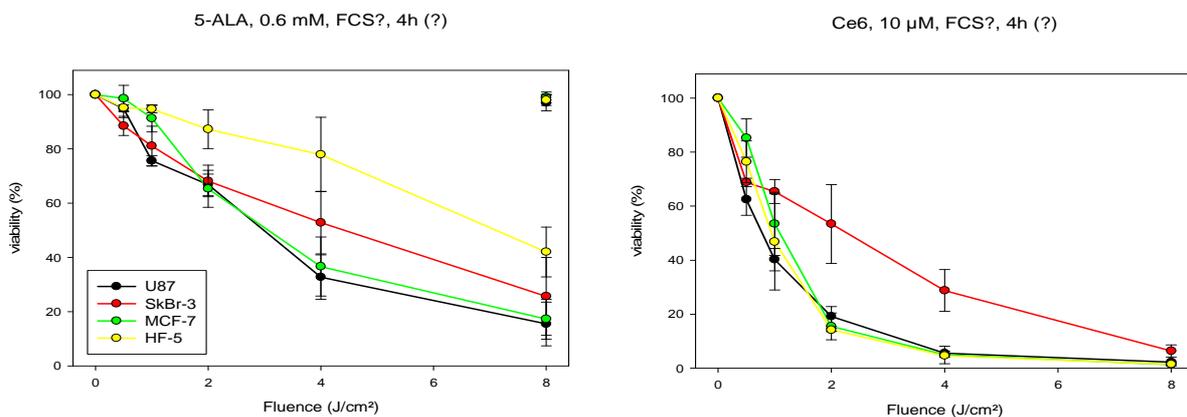
In Ihrer Dissertation verglich sie u. a. die Photosensitizer 5-ALA-induziertes PpIX mit Chlorin e6 (Fotolon der Fa. Apocare). Die wichtigsten Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen:

Der Einfluss von Serumproteinen im Inkubationsmedium auf die Photosensitizer-Akkumulation in den Zellen ist bei Chlorin e6 deutlich stärker als bei 5-ALA-induziertem PpIX. Dies konnte erwartet werden, weil Chlorin e6 stark an Serum-Albumin bindet und deshalb bei mittleren Konzentrationen schlechter für die intrazelluläre Aufnahme verfügbar ist.



Konzentrationsabhängige Photosensitizer-Akkumulation in MCF-7-Mammakarzinom-Zellen. Links: 5-ALA-induziertes PpIX, rechts: Chlorin e6. In jedem Graphen sind Daten ohne (obere Kurve) und mit (untere Kurve) fötalem Kälberserum (10%) im Kulturmedium verglichen.

Eine *In-vitro*-PDT an einer Glioblastom- (U87), zwei Mammakarzinom- (Sk-Br-3 und MCF-7) sowie einer normal Fibroblasten-Zelllinie (HF-5) ergab das interessante Resultat, dass die Zelllinien unterschiedlich auf die beiden Photosensitizer reagieren. Insbesondere fällt auf, dass nach Inkubation mit 5-ALA die Karzinom-Zelllinien besser ansprechen als die Fibroblasten, während sich unter Chlorin e6 hier kein tumorselektives Verhalten ableiten lässt, sondern ausgerechnet die HER2-positive Mammakarzinom-Zelllinie am schwächsten reagiert.

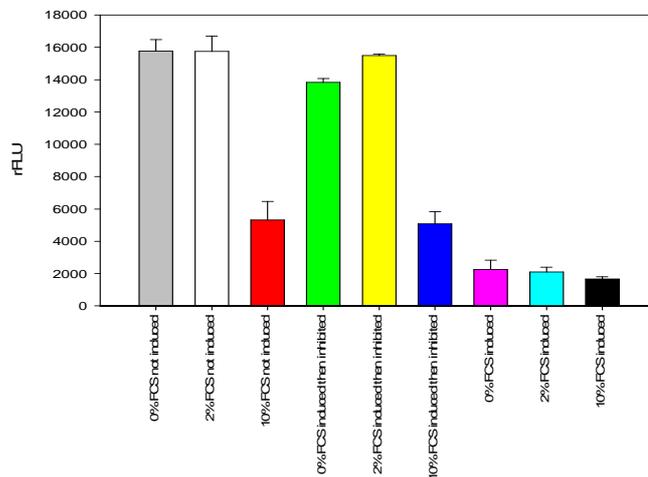


Lichtdosisabhängiges Überleben vier verschiedener Zelllinien. Ergebnisse nach Inkubation mit 5-ALA (links) und Chlorin e6 (rechts).

Chlorin e6 scheint zudem ein gutes Substrat für ABCG2 zu sein, wie eine Untersuchung unter Verwendung von ABCG2-transfizierten U251-Zellen zeigt. Die linken drei Balken in nachfolgender Abbildung zeigen die Chlorin-e6-Konzentration (quantifiziert über das Fluoreszenz-Signal) bei abgeschalteter ABCG2-Expression für drei unterschiedliche Serum-Konzentrationen im Kulturmedium. Nach Anschalten der ABCG2-Expression durch Doxycyclin vor der Chlorin-e6-Inkubation ergeben sich die

rechten drei Balken. Die intrazelluläre Speicherung von Chlorin e6 ist erheblich reduziert. Dieser Effekt lässt sich vollständig aufheben, wenn die Aktivität des ABCG2 durch eine Substanz namens KO143 blockiert wird, wie man an den mittleren drei Balken sieht. Diese Beobachtung hat potenziell klinische Relevanz.

Fluorescence of 100 micromolar Ce6 after 4hr incubation with U251L106 cells under several conditions



Akkumulation von Chlorin e6 unter verschiedenen Bedingungen. Siehe Text.

Lichtapplikatoren und Sensorik für die interstitielle PDT

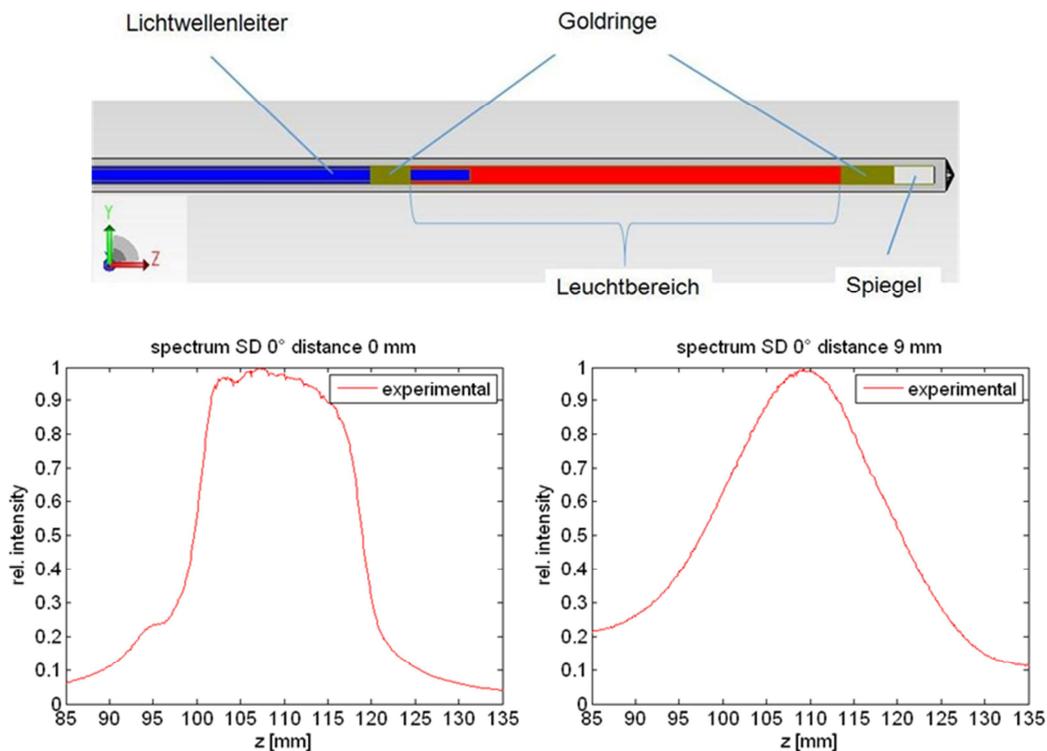
Adrian Rühm, Max Eisel, Bastian Hollnburger, Gabriel Scheib, Sebastian Fiedler, Thomas Pongratz, Ronald Sroka

Kooperation: Alwin Kienle (ILM, Ulm)

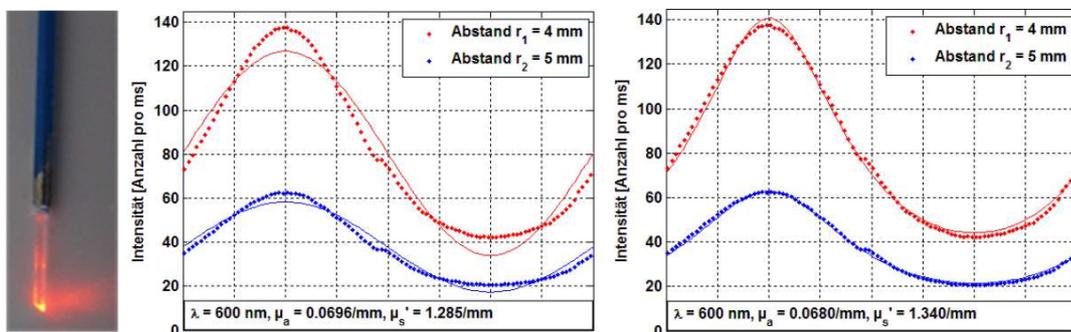
Förderung: DFG (nach erfolgreichen Voruntersuchungen)

Fasergestützte zylindrische Lichtapplikatoren können bei der interstitiellen PDT, z. B. bei Glioblastomen und in der Prostata, eingesetzt werden, um das Therapielicht im betroffenen Gewebavolumen zu verteilen. Dabei muss die Abstrahlcharakteristik ausreichend gut charakterisiert sein, um die Dosisverteilung im Gewebe vorhersagen zu können. Hierfür wurden entsprechende Messverfahren etabliert und mit Simulationsrechnungen abgeglichen.

Aus dem Vergleich von Experiment und Simulation ergeben sich verschiedene Konzepte, wie die distal angebrachten Licht-Diffusoren gestaltet werden können, um eine homogene Lichtabstrahlung zu gewährleisten. Die Wahl des Applikatorkonzepts beeinflusst gleichzeitig auch die Eignung der Applikatoren als interstitielle Sonden für die Detektion von Licht. Dies ist relevant, wenn auch die optischen Eigenschaften des behandelten Gewebes *in vivo* charakterisiert werden sollen. Mit Hilfe neuer Auswertkonzepte ist es möglich, solche Informationen durch Messung der Lichttransmission zwischen interstitiell platzierten zylindrischen Applikatoren zu erhalten (siehe "Interstitielle PDT in der Neurochirurgie").



Abstrahlcharakteristik zylindrischer Lichtapplikatoren. Oben: Aufbau eines zylindrischen Lichtapplikators, unten: Messung der Abstrahlcharakteristik eines zylindrischen Lichtapplikators mittels sphärischem Detektor in Wasser, aufgetragen gegen die Position des Detektors entlang der Applikator-Achse. Links: Abstand 0 mm, rechts: Abstand 9 mm



Richtungsabhängige Messung der Strahldichte 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 und rechten Teil der Abbildung ist die Richtungsabhängigkeit des in dieser Weise detektierten Lichts als Funktion des Sonden-Drehwinkels dargestellt, wie sie sich für zwei verschiedene Abstände zwischen isotroper Quelle und Seitblick-Sonde ergibt, wenn beide Komponenten in ein Medium mit gewebeähnlichen optischen Eigenschaften eingetaucht werden. Der linke der beiden Graphen zeigt eine Modellanpassung auf Basis der Diffusionsapproximation, der rechte Graph eine qualitativ deutlich bessere Modellanpassung auf Basis einer genaueren Theorie. Die ermittelten optischen Eigenschaften unterscheiden sich um nur wenige Prozent.

Darüber hinaus wurde ein weiteres Konzept zur Ermittlung der optischen Eigenschaften von Gewebe *in vivo* entwickelt, welches auf der richtungsabhängigen Detektion von Licht mittels interstitiell platzierter Seitblick-Sonden basiert. Entsprechende Sonden wurden hergestellt und anhand von Gewebephantomen erprobt.

Dabei zeigt sich, dass übliche Näherungsverfahren (Diffusionsmodell) zur Beschreibung der Messdaten nicht ausreichen. Nach Einbeziehung genauerer Theorien zur Lichtausbreitung in stark streuendem Gewebe wurden diese weiter verfeinert. Im weiteren Verlauf werden die zunächst mit kleinen sphärischen Lichtquellen durchgeführten Demonstrationsexperimente auf ausgedehnte zylindrische Lichtapplikatoren erweitert, wie sie z. B. in der PDT Verwendung finden.

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

Sprecher: Herbert Stepp

Untersuchung des diagnostischen Potentials von Mikroskop-basierter optischer Kohärenztomographie (OCT) und Vergleich mit endoskopischer OCT

Herbert Stepp, Christian Homann, Julia Kuznetsova, Daniel Doering, Ronald Sroka

Kooperation: Matthias Trottmann (Urologie), Sabine Kölle (UCD School of Medicine & Medical Science, University College Dublin, Ireland), Klaus Hallfeldt, Roland Ladurner (Viszeral- und Endokrine Chirurgie)

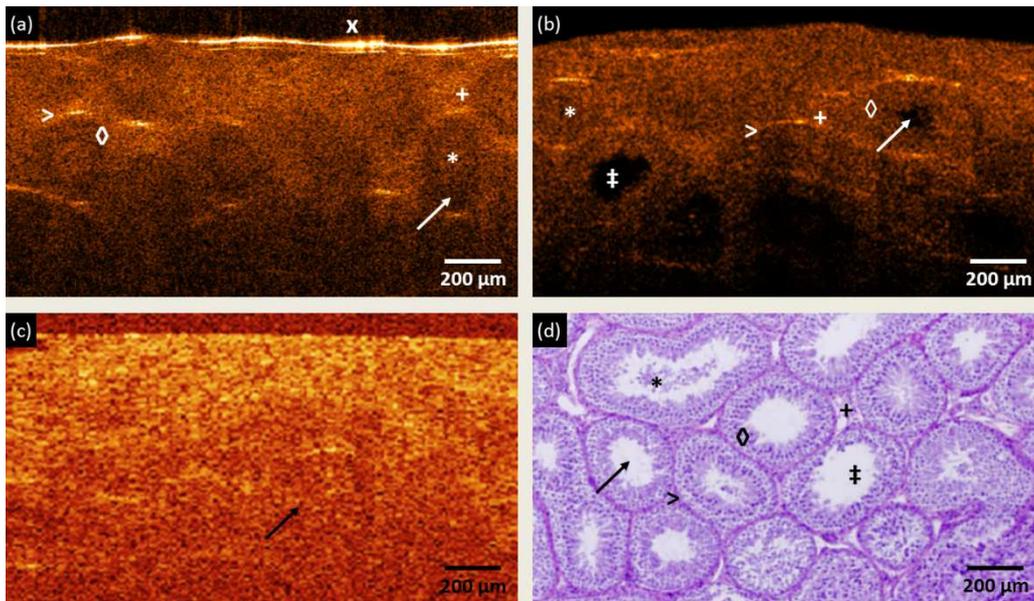
Förderung: Industrie

Ziel einer Kooperation mit dem Fachbereich Urologie (Dr. Trottmann) und der UCD School of Medicine & Medical Science der Universität Dublin (Prof. Kölle) ist es, das Potential der OCT für die Reproduktionsmedizin zu erforschen. Dafür wurden im Rahmen des Projekts Light4Life von der Firma Thorlabs zwei moderne Mikroskop-basierte OCT-Systeme zur Verfügung gestellt (Ganymede HRTM, TelesioTM). Mit diesen wurden verschiedene urologische (Nebenhoden, Hoden, Samenleiter) sowie gynäkologische (Ampulla, Isthmus, Uterus, Eizelle) Proben von Rindern untersucht. Die so gewonnenen Aufnahmen wurden mit Aufnahmen eines endoskopischen OCT-Systems (Niris Imaging System, Imalux, Ohio) sowie mit histologischen Schnitten verglichen.

Dabei zeigt sich, dass mit den Mikroskop-basierten Systemen eine Auflösung und ein Detailreichtum nahe an histologischen Schnitten erreichbar sind. Dies birgt hohes diagnostisches Potential, z. B. für eine verbesserte Spermienextraktion durch eine OCT-gestützte Hodenbiopsie. Allerdings ist mit den derzeit zur Verfügung stehenden endoskopischen Systemen die nötige Auflösung noch nicht erreichbar. Für einen sinnvollen klinischen Einsatz, sind daher technische Weiterentwicklungen der endoskopischen OCT-Systeme erforderlich.

In Kooperation mit der Chirurgischen Klinik (Prof. Hallfeldt, Dr. Ladurner) wurde die Eignung der OCT zur Differenzierung von Geweben bei der Schilddrüsenchirurgie (Schilddrüse, Nebenschilddrüse, Lymphknoten) evaluiert. Diese Untersuchungen wurden teilweise bereits publiziert⁹ und werden fortgeführt. Sie sollen zum einen durch fluoreszenzendoskopische Verfahren ergänzt werden, zum anderen sollen auch hier die Möglichkeiten, die sich durch eine Mikroskop-basierte OCT-Technik bieten, untersucht werden.

⁹ 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).



Ex-vivo-OCT-Aufnahmen eines Rinderhodens und Vergleich mit histologischem Schnitt. Teilbild (a) zeigt eine Aufnahme mit dem Ganymede HRTM System, (b) mit dem TelestoTM System, (c) mit dem endoskopischen Nirx-System und (d) einen histologischen Schnitt (H&E gefärbt). Das Lumen der Samenkanälchen (Pfeil), die Zellen der Spermatogenese (◇), peritubuläre Kollagenfasern (>) sowie das interstitielle Gewebe (+) konnten aufgelöst werden. Gefüllte (*) und leere Samenkanälchen (‡) konnten unterschieden werden. Reflektionen an der Oberfläche der Probe erzeugen die weißen Striche (x). (accepted in *J. Biophotonics*).

Konfokale Fluoreszenzendoskopie (pCLE) zur hochauflösten intraoperativen Gewebediagnostik

Herbert Stepp

Kooperation: Christian Betz, Veronika Volgger, Anna Englhard, Olivier Gires, Brigitte Mack, Sofiya Doncheva, Alexander Palara (HNO), Julia Gallwas, Christian Dannecker (Gynäkologie), Matthias Trottmann, Sabine Kölle (Urologie), Jürgen Behr, Wolfgang Gesierich, Frank Reichenberger (Pneumologie, Bronchoskopie)

Förderung: Großgeräteantrag

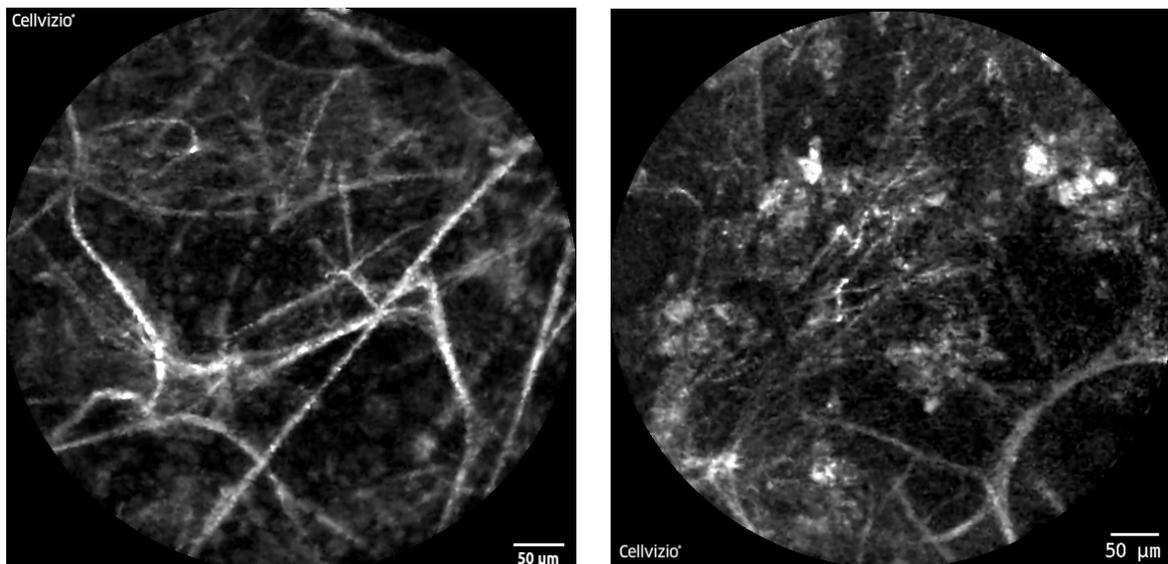
Dieses Vorhaben ist Bestandteil des Verbundes T.E.A.M. am Klinikum. Aufbauend auf der LFL-Entwicklung der Fluoreszenzendoskopie, die als *Red-flag*-Technologie mit hoher Sensitivität auf makroskopischer Ebene malignes Gewebe identifiziert, besteht die Erwartung, dass mithilfe von weiteren optischen Technologien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

2014 fanden weitere 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 Ergebnisse sind publiziert.¹⁰

PD Dr. Betz et al. untersuchten die pCLE zur Darstellung von Läsionen der Mundschleimhaut. 2014 wurden Arbeiten an Biopsaten durchgeführt und die Möglichkeiten einer *Ex-vivo*-Markierung mit EGFR- und EpCAM-Antikörpern untersucht. Vor allem mit dem EpCAM-Antikörper scheint eine spezifische Markierung möglich zu sein. Das Eindringen der oberflächlich aufgetragenen Antikörper-Lösung ist zwar auf wenige Zellschichten beschränkt, könnte aber für eine Darstellung mit der pCLE ausreichen.

Die Pulmologische Klinik Gauting hat sich angesichts der vielversprechenden klinischen Ergebnisse ein eigenes pCLE-Gerät angeschafft und führt eigene Untersuchungen durch. Es wird insbesondere die Charakterisierung verschiedenartiger fibrotischer Erkrankungen des Lungenparenchyms angestrebt (siehe Abbildung). Dazu soll eine objektive Bildanalyse zu Rate gezogen werden. Ein entsprechender Kontakt zu Bildverarbeitungsexperten wurde vermittelt.



Konfokalendoskopische Aufnahmen von Lungenbläschen. Links: Weitgehend normales Lungenbläschen: Nur das Netzwerk der elastischen Fasern ist sichtbar. Rechts: Verändertes Lungenbläschen. Geringere Anzahl netzförmig aufgespannter elastischer Fasern. Zwischen die Fasern sind Entzündungszellen eingewandert.

¹⁰ Trottmann M, Stepp H, Sroka R, Heide M, Liedl B, Reese S, Becker AJ, Stief CG, Kölle S. Probe-based confocal laser endomicroscopy (pCLE) - a new imaging technique for in situ localization of spermatozoa. *J Biophotonics* (2014, published online ahead of print), doi: 10.1002/jbio.201400053.

3.1.5 Kooperationsverbände

Deutsch-Russischer Kooperationsverbund Biotechnologie

Michael Fedorov, Ronald Sroka

Mit einer Förderung in Höhe von 1,1 Mio. Euro unterstützte 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.

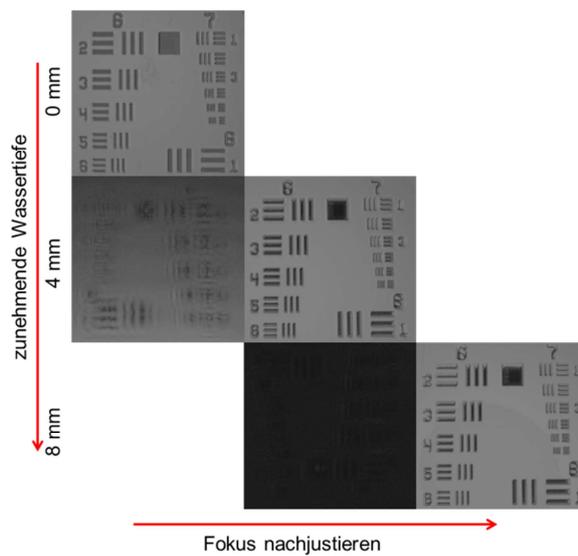
2014 wurden für dieses Netzwerk die Abschlüsse durchgeführt und die entsprechenden Berichte vorgelegt.

Light4LIFE - Netzwerk

Ronald Sroka, Michael Fedorov, Daniel Doering, Christian Homann

Förderung: BMBF Land of Ideas

Die Internationalisierung und Verbreitungen biophotonischer Technologien ist wesentlicher Bestandteil des Netzwerkes Light4LIFE, welches einerseits der Förderung der internationalen wissenschaftlichen Ausbildung sowie der Identifizierung internationaler wissenschaftlicher Partnerschaften dienen, 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.



Experimentelles Verfahren zur Ermittlung der lateralen und axialen optischen Auflösung von OCT-Geräten mittels USAF-Standard unter einer Schicht Wasser. Die Abbildung verdeutlicht, dass es bei zunehmender Dicke der Wasserschicht (Bildfolge von oben nach unten) essentiell ist, die Fokusposition exakt nachzuzustieren (Bildfolge von links nach rechts), um die optimale Auflösung zu erzielen.

In 2014 wurden vergleichende Untersuchungen zur lateralen und axialen Auflösung unterschiedlicher OCT-Geräte durchgeführt. Es ist beabsichtigt, die hierbei entwickelten Standarduntersuchungsverfahren für den Vergleich mit zukünftigen klinischen OCT-Verfahren (z. B. Kooperation mit HNO PD Dr. Betz in 2015) zu nutzen.

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

Sind Stammzellen des Pylorus Zielzellen für Transformation und Entstehung von Tumorstammzellen im Magenkarzinom?

Mira Kronast, Elena Vetter, Dina Kouhestani, 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. Als Modell wählten wir eine von uns generierte SV40-T-Antigen-transgene Mauslinie (CEA424-SV40-TAg), die mit 100-prozentiger Penetranz neuroendokrine Magenkarzinome in der Pylorusregion entwickelt. Zur Charakterisierung von Tumorstammzellen verfolgen wir zwei Strategien:

(1) Einmal wollten wir bekannte Tumorstammzellmarker zur Anreicherung von potentiellen Stammzellen des Magenkarzinoms verwenden und diese Zellen funktionell charakterisieren. (2) In einem zweiten Ansatz gingen wir von der Hypothese aus, dass Tumorstammzellen durch Transformation von normalen Gewebestammzellen entstehen. Da genetische Modelle existieren, die *in vivo* eine stabile Fluoreszenz-Markierung von Stammzellen erlauben, erhofften wir uns, dass auch Tumorstammzellen in Tumoren von CEA424-SV40-TAg-Mäusen markierbar sind und sich aufgrund ihrer Fluoreszenz isolieren lassen.

(1) Als erfolgversprechendster Marker für die von unserem transgenen Magenkarzinommodell¹¹ (CEA424-SV40-T-Antigen-Mäuse, TAg) abgeleiteten Magenkarzinomzellen (mGC3, mGC8) zeigte sich CXCR4, ein Marker mit dessen Hilfe wir kürzlich auch in Nierenkarzinomzellen Tumorstammzellen anreichern konnten.¹² 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.

Weiterhin konnten wir zeigen, dass in den Magenkarzinom-Zelllinien 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 Abbildung 3.2.1.1).

¹¹ 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).

¹² **Gassenmaier M**, **Chen D**, **Buchner A**, Henkel L, Schiemann M, Mack B, Schendel DJ, **Zimmermann W**, **Pohla H**. CXCR4 chemokine receptor 4 is essential for maintenance of renal cell carcinoma-initiating cells and predicts metastasis. *Stem Cells* 31, 1467–1476 (2013).

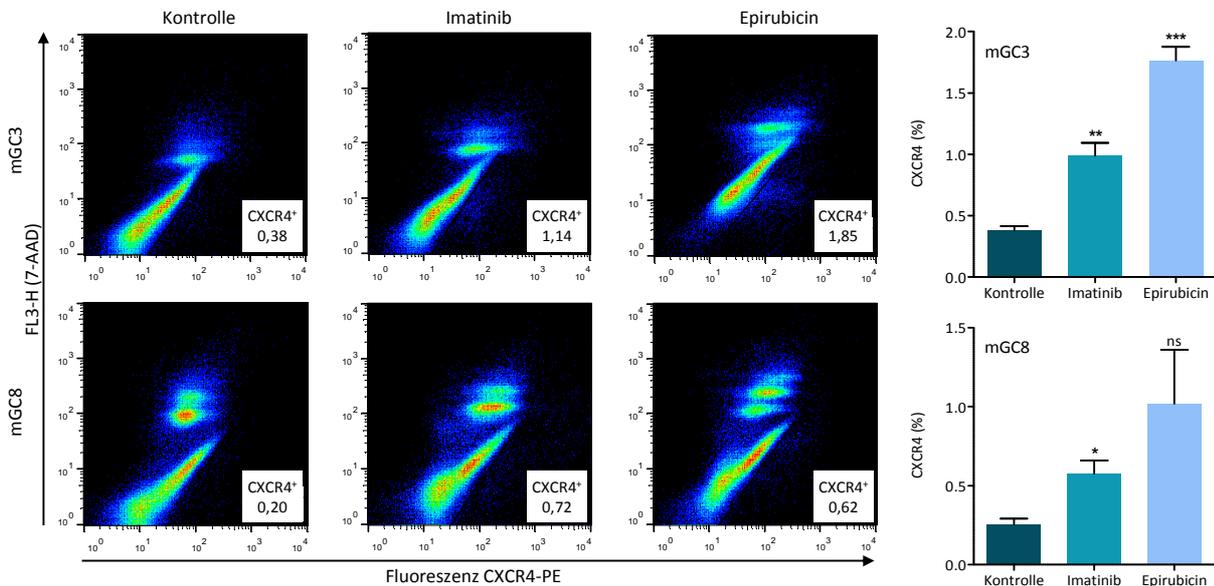
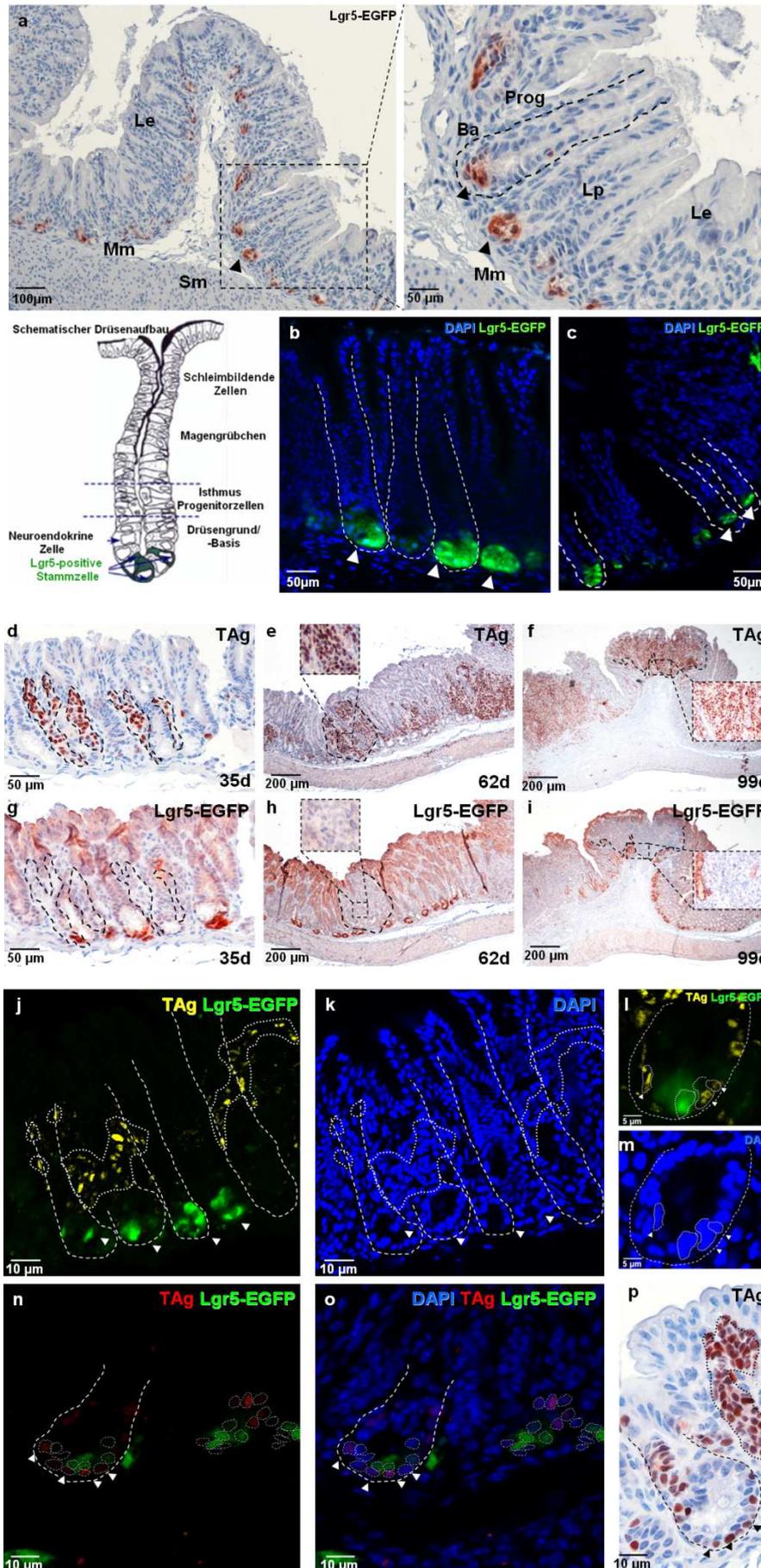


Abbildung 3.2.1.1: Unter Hemmstoffbehandlung kommt es zur Anreicherung der CXCR4-positiven Subpopulation in mGC-Zellen. Der Gehalt an CXCR4-positiven Zellen von mGC3- (A, B, C) sowie mGC8-Zellen (D, E, F) ohne Einwirkung von Chemotherapeutika (A, D), nach dreitägiger Inkubation mit 20 μ M Imatinib (B, E) bzw. 100 mM Epirubicin (C, F) wurde durch Durchflusszytometrie mittels PE-markierten anti-CXCR4-Antikörpern bestimmt. Die verwendeten Inhibitor-Konzentrationen entsprechen jeweils IC_{50} -Dosen. Der Anteil der positiven Zellen in % ist angegeben. Beispielhaft sind die Ergebnisse eines Versuchs von 3 identisch durchgeführten Versuchen dargestellt. Nach 72 h Inkubation von mGC3 bzw. mGC8 mit Imatinib oder Epirubicin (IC_{50}) nimmt der Anteil CXCR4-positiver Zellen signifikant in der Population überlebender Zellen zu (Graphen im rechten Teil der Abbildung). mGC3: p (Imatinib) = 0,0051, p (Epirubicin) = 0,0003; mGC8: p (Imatinib) = 0,0243, p (Epirubicin) = 0,0904. Dargestellt sind Mittelwerte aus jeweils 3 unabhängigen Messungen mit Standardfehler. Kronast, unveröffentlicht.

Gegenwärtig testen wir die Validität von zwei *In-vitro*-Tumorstammzellassays zur Quantifizierung von Tumorstammzellen für die mGC-Zelllinien (Sphereformation in Gegenwart von Serum, Koloniebildungsassay). Dies erfolgt durch Quantifizierung der Expression einer Reihe typischerweise in Stammzellen exprimierter Gene (u.a. *Sox2*, *c-Myc*, *Pou5f1*, *Klf4*, *Nanog*) z. B. in adhärenz oder als *spheres* gewachsener mGC-Zellen. Falls sich diese Tests als geeignet für die Quantifizierung von Tumorstammzellen erweisen, sollen sie zur Analyse der Wirksamkeit von Hemmstoffen gegenüber Tumorstammzellen verwendet werden.

Zusammengenommen eröffnen diese Befunde neue Perspektiven in der Entwicklung neuartiger Tumorthérapien u.a. durch zielgerichtete Inhibierung des Chemokinrezeptors CXCR4. Die nächsten Schritte umfassen Suche nach Tumorstammzell-toxischen Inhibitoren und deren Wirkung auf Tumoren von CEA424-SV40-T-Antigen-Mäusen (CEA-TAg-Mäuse).

(2) LGR5 ist im Pylorus-Epithel des Mausmagens ausschließlich in den für die Erneuerung aller epithelialen Zelltypen verantwortlichen Stammzellen exprimiert. Die Gruppe von Hans Clevers hatte sich dies zunutze gemacht und durch Einbringen einer EGFP-Cre-ER^{T2}-Expressionseinheit in das LGR5-Gen der Maus eine Mauslinie generiert (*Lgr5-EGFP-IRES-Cre-ER^{T2}*; *Lgr5*-Mäuse), die a) das fluoreszierende Protein EGFP in intestinalen Stammzellen so auch in Pylorusstammzellen exprimiert und diese dadurch mikroskopisch nachweisbar macht und die es erlaubt b) über die Tamoxifen-induzierbare Cre-Rekombinase in geeigneten Mauslinien gezielt zu gewünschten Zeitpunkten stammzellspezifisch Rekombination in (mit flox-Sequenzen flankierten) Marker-Genen auszulösen.



In der Annahme, dass es durch Expression des potenten Onkogens SV40-T-Antigen-Gens in der langlebigen Pylorusstammzelle zur Tumorbildung in CEA424-SV40-TAG-Mäusen kommt und dass die daraus resultierenden Tumorstammzellen noch das *Lgr5*-Gen exprimieren, haben wir CEA-TAG-Mäuse und *Lgr5*-Mäuse gekreuzt und untersucht, ob EGFP-positive Tumorzellen in den doppeltransgenen Nachkommen zu beobachten sind. Erwartungsgemäß konnten EGFP-positive Pylorusstammzellen am Boden der Magengrübchen immunhistologisch bzw. durch Fluoreszenz-Mikroskopie sichtbar gemacht werden (Abbildung 3.2.1.2 a-c). Allerdings konnten zu keinem Zeitpunkt der Tumorentwicklung (T-Antigen-positive Tumorzellen sind ab einem Alter von 19 Tagen nachweisbar) EGFP und T-Antigen doppelpositive Tumorzellen immunhistologisch (Abbildung 3.2.1.2 d-i). bzw. fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen werden (Abbildung 3.2.1.2 j-o).

Daraus lässt sich folgern, dass die Magentumore der CEA-TAG-Mäuse sich entweder nicht von den Pylorusstammzellen ableiten oder dass die Tumor(stamm)zellen das *Lgr5*-Gen nach Transformation nicht mehr exprimieren. Einen direkten hemmenden Einfluss von T-Antigen auf die Expression des durch Wnt-Signaltransduktion gesteuerten *Lgr5*-Gens konnten wir durch Einbringung eines Wnt-Signaling-Indikatorsystems (Topflash-Luziferase) zusammen mit einem T-Antigen-Expressionsvektor in menschliche Tumorzellen ausschließen. Leider entfällt dadurch eine Möglichkeit, Stammzellen des CEA-TAG-Tumors durch Sortierung von EGFP-positiven Tumorzellen zu isolieren und zu charakterisieren.

Um zu untersuchen, ob Pylorusstammzellen nach Transformation durch T-Antigen das *Lgr5*-Gen nicht mehr exprimieren, wurde in *Lgr5* x CEA-TAG-Mäuse ein durch Cre-vermittelte Rekombination aktivierbares Indikatorgen (*red fluorescent protein*, *RFP*) durch Verpaarung eingebracht. In diesen dreifachtransgenen Mäusen ist es möglich, nach Aktivierung des *RFP*-Gens (Entfernung einer Transkription-blockierenden Sequenz) durch Tamoxifen-vermittelte Cre-Kerntranslokation und Rekombination alle Tochterzellen von intestinalen Stammzellen dauerhaft mit RFP zu markieren (Abbildung 3.2.1.3 a-c).

Abbildung 3.2.1.2: EGFP-exprimierende Stammzellen lassen sich am Magendrüsengrund, nicht jedoch innerhalb der Tumoreale von *Lgr5* x CEA-TAG-Mäusen nachweisen. Das unter der Kontrolle des *Lgr5*-Promoters exprimierte EGFP diente als Surrogatmarker für die Expression von LGR5 in Pylorusstammzellen. EGFP wurde entweder immunhistologisch oder über die Eigenfluoreszenz von EGFP im konfokalen Lasermikroskop nachgewiesen. **(a)** Immunhistologischer Nachweis von EGFP in den basalen Stammzellen des Drüsengrunds in der Pylorusregion im Magen einer 19 Tage alten *Lgr5*-EGFP- Maus, sowie der schematischer Aufbau eines Magengrübchens. Die LGR5-positiven Stammzellen befinden sich am Drüsengrund. Skizze modifiziert aus: Barker et al., 2010. **Ba:** Basis der Magendrüse, **Prog:** Progenitorzellbereich, **Le:** *Lamina epithelialis mucosae*, **Lp:** *Lamina propria*, **Mm:** *Muscularis mucosae*, **Sm:** Submucosa. Die grüne Fluoreszenz markiert die EGFP-exprimierenden Stammzellen der Pylorusregion einer 42 Tage alten transgenen Maus. Die Zellkerne wurden mit DAPI markiert. Die weißen Pfeilköpfe markieren die Magendrüsen **(b, c)**. Durch immunhistologischen Anfärbung von benachbarten Parallelschnitten ließ sich keine Koexpression von T-Antigen und EGFP in Tumorzellen von Magengewebe von 35 **(d, g)**, 62 **(e, h)** und 99 Tage alten *Lgr5* x CEA-TAG-Mäusen **(f, i)** nachweisen. Es konnten keine EGFP-positiven Tumorzellen innerhalb der Tumoreale (gestrichelte Linien) detektiert werden. Mit Hilfe der Immunfluoreszenz ließ sich ebenfalls keine Kolokalisation von T-Antigen-markierten Zellkernen und EGFP-markiertem Zytoplasma innerhalb einer Tumorzelle zeigen. **(l-o)** Durch anti-SV40-T-Antigen-Antikörper rot **(n, o)** bzw. gelb **(l, m)** markierten Tumorzellen einer 30 Tage alten doppeltransgenen Maus schmiegen sich an die EGFP-positiven Stammzellen mit T-Antigen negativen, jedoch DAPI positiven Kernen an. Zwar befinden sich die T-Antigen-positiven Zellen am Grund der Magendrüsen **(p, Pfeilköpfe)**, jedoch sind sie klar von den EGFP-positiven Stammzellen unterscheidbar (hier als darüberliegende, Hämalau-positive Kerne sichtbar). - Legende zu gegenüberliegenden Abbildung.

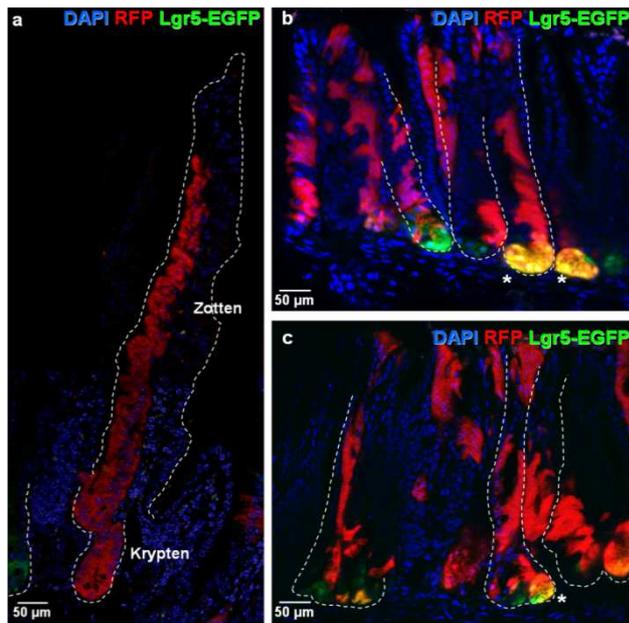


Abbildung 3.2.1.3: Erfolgreiches tracing der Nachkommen Lgr5-EGFP-exprimierender Stammzellen durch RFP. Immunfluoreszenzanalyse von Dünndarmkryoschnitten einer 99 Tage alten LGR5-EGFP x CEA424-TAg x Rosa26 Maus (33Ro), 39 Tage nach Tamoxifen-Induktion (a). Das rot fluoreszierende Tracer-Protein kann bis in die Spitzen der Dünndarmzotten verfolgt werden. Auch im Magen konnten die Nachkommen der Lgr5-EGFP-exprimierenden Stammzellen anhand des RFP verfolgt werden (b, c). Beachte die durch Überlagerung entstandene gelbe Färbung bei sowohl EGFP- als auch RFP-doppelpositiven Zellen in den Basen der Magendrüsen (Sterne). Es wurde eine 42 Tage alte Maus mit frühem Induktionsbeginn im Alter von 7 Tagen verwendet.

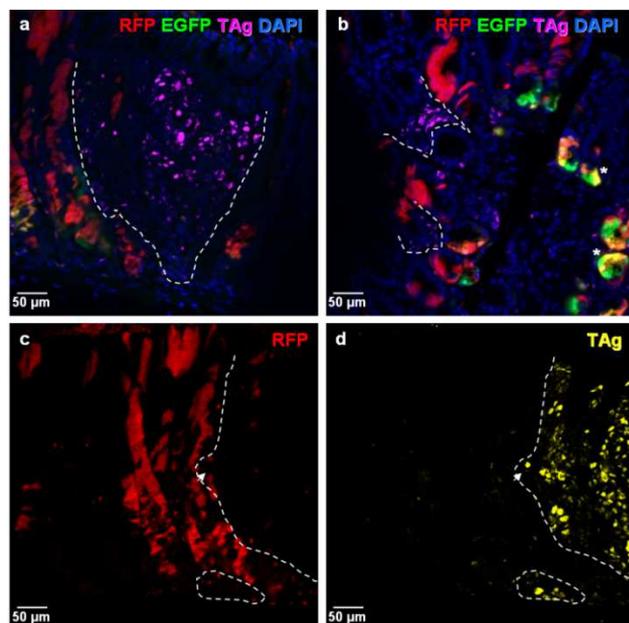


Abbildung 3.2.1.4: RFP-positive Zellen lassen sich nicht innerhalb von CEA-TAg-Tumorealen nachweisen. Tracing wurde durch Gabe von Tamoxifen in 7 Tage alten Lgr5-EGFP x CEA424-SV40-TAg x Rosa26-Mäusen induziert. Erfolgreiches Tracing bei frühem Induktionsbeginn ist nach 35 Tagen durch das Auftreten von Ketten rotfluoreszierenden Zellen, der Nachkommen Lgr5-EGFP-exprimierender Stammzellen, nachweisbar. Beachte die durch Überlagerung entstandene gelbe Färbung bei sowohl EGFP- als auch RFP-doppelpositiven Zellen in den Basen der Magendrüsen (Sterne). Tumoreale (begrenzt durch gestrichelte Linien) wurden hier mittels ihrer anti-SV40-T-Antigen-Antikörper violett (a, b) bzw. gelb (d) gefärbten Zellkerne sichtbar gemacht. Sie bleiben von der RFP-Markierung ausgespart (c, d; siehe auch Pfeilköpfe). Exemplarische Darstellung einer Tumorregion des Pylorusbereichs einer 42 Tage alten dreifach transgenen Maus (25RoE).

In den dreifach transgenen Mäusen wurde einmal sehr früh während der Tumorentstehung (in 7 Tage alten Mäusen) und in 60 Tage alten Mäusen mit etablierten Magenkarzinomen durch Tamoxifengabe das *RFP*-Gen aktiviert und nach ca. 7 Wochen RFP-positive Zellen in den Tumoren analysiert. In keinem der T-Antigen-positiven Tumorzellarealen konnten RFP-exprimierende Tumorzellen gefunden werden. Dies macht es sehr unwahrscheinlich, dass sich die CEA-TAg-Tumore von Pylorusstammzellen herleiten. Möglicherweise kommen weitere, im Pylorusepithel noch nicht charakterisierte Stammzellen (in Dünndarm sind weitere Stammzellen im Bereich der Progenitorzellen in Position +4 der Krypten bekannt) als Ursprungszellen des Tumors in Frage.

Charakterisierung und medikamentöse Beeinflussung von Tumorstammzellen im Nierenzellkarzinom (RCC)

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

Kooperation: Elfriede Nössner (Institut für Molekulare Immunologie, Helmholtz Zentrum München); Gerald Assmann (Institut für Pathologie, Ludwig-Maximilians-Universität München)

Tumorstammzellen umfassen häufig nur einen kleinen Anteil aller Zellen in einem Tumor, spielen jedoch eine entscheidende Rolle bei der Ausbildung von Tumorerheterogenität, 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 (SK-RC-17, RCC-53) einen Oberflächenrezeptor, nämlich den Chemokinrezeptor 4 (CXCR4) zu identifizieren, der bevorzugt von Tumorstammzellen gebildet wird.¹³ Wir konnten zeigen, dass CXCR4-exprimierende Zellen *in vitro* eine Behandlung mit häufig bei diesem Tumor verwendeten Medikamenten (wie dem Rezeptortyrosinkinase-Inhibitor Sunitinib) besser überstehen.

Diese Befunde lassen befürchten, dass auch *in vivo* die Tumorstammzellen einen selektiven Überlebensvorteil haben. Um dies zu untersuchen, haben wir die humanen RCC-Zelllinien SK-RC-17 und RCC-53 in immundefiziente NOD.CB17-*Prkdc*^{scid}/J-Mäuse (NOD/SCID) subkutan injiziert und nach Anwachsen der Tumoren mit der oralen Behandlung der Mäuse mit Sunitinib begonnen. Dies führte zu einem Wachstumsstopp beider Tumoren (Abbildung 3.2.1.5 a, e). Neben einer möglichen direkten Wirkung Sunitinib auf die Tumorzellen, beeinflusst Sunitinib das Tumorstammzellwachstum durch Inhibition der Tumorangio-genese. Dies konnte durch Bestimmung der Dichte der Blutkapillaren durch fluoreszenzmarkierte CD31-Antikörper nachgewiesen und quantifiziert werden. Die Hemmung der Kapillardichte betrug 70 bzw. 95% (Abbildung 3.2.1.5 b-d, f-h). Eine Anreicherung von CXCR4-positiven (putativen) Tumorstammzellen war zumindest in Fall von RCC-53-Tumoren zu vermuten (Abbildung 3.2.1.5 c, d; g, h). Um dies unabhängig zu belegen, analysierten wir die Expression von sogenannten *Stemness*-Genen in scheinbehandelten und Sunitinib-behandelten Tumoren. Solche Gene sind in Tumorstammzellen vieler Tumorentitäten, so auch im RCC wie wir kürzlich zeigen konnten¹², verstärkt exprimiert. Dies konnten wir für die *Stemness*-Gene NANOG, POU5F1 und SOX2 in beiden Tumoren, für CXCR4 und MYC jeweils nur in einem der beiden Tumoren zeigen (Abbildung 3.2.1.6).

Diese Befunde legen nahe, dass es bei Therapie mit dem gegenwärtig für die Erstlinientherapie von RCC-Patienten eingesetzten Rezeptortyrosinkinase-Inhibitor Sunitinib zum selektiven Überleben von Tumorstammzellen kommen kann.

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, 1467–1476 (2013).

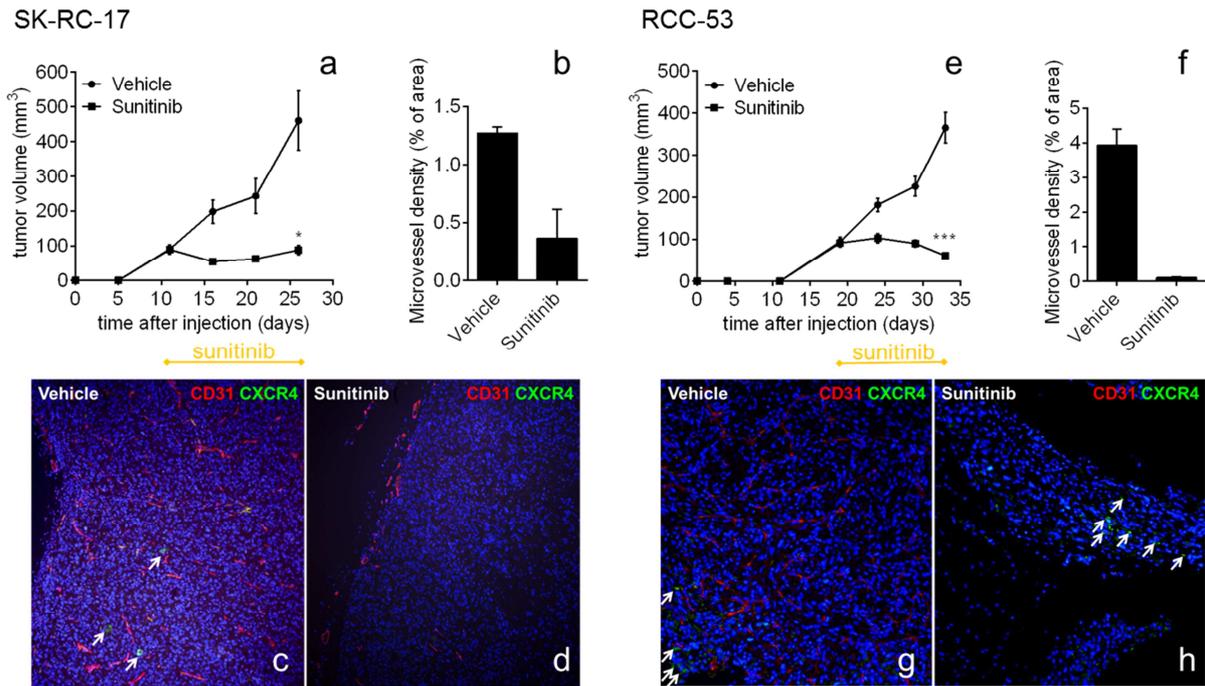


Abbildung 3.2.1.5: Führt Sunitinib-Behandlung von xenotransplantierten RCC-Tumoren zur Anreicherung von CXCR4-positiven Tumorzellen? In NOD/SCID-Mäuse wurden in die rechte und linke Flanke 10^4 SK-RC-17- (a) bzw. RCC-53-Zellen (b) injiziert. Sobald eine mittlere Tumorgöße von 100 mm^3 erreicht war, wurden die Mäuse oral entweder mit Lösungsmittel (Zitratpuffer pH 3,5) oder mit Sunitinib (40 mg/kg) täglich für 2 Wochen behandelt. In Schnitten Formalin-fixierter Paraffin-eingebetteter Tumoren wurden die Kapillarendothelzellen nach Färbung mit Phycoerythrin-markierten anti-Maus-CD31-Antikörpern sichtbar gemacht (c, d; g, h) und quantifiziert (b, f). Der Nachweis von CXCR4-exprimierende Zellen erfolgte mit einem monoklonalen Kaninchen-anti-CXCR4-Antikörper. Die Reduktion von CD31-positiven Zellen nach Sunitinib-Behandlung ist deutlich sichtbar; CXCR4-positive Zellen erscheinen lokal vermehrt in RCC-53-Tumoren aufzutreten (Pfeile). SK-RC-17: n = 3; RCC-53: n = 5. *, p < 0,05; ***, p < 0,001.

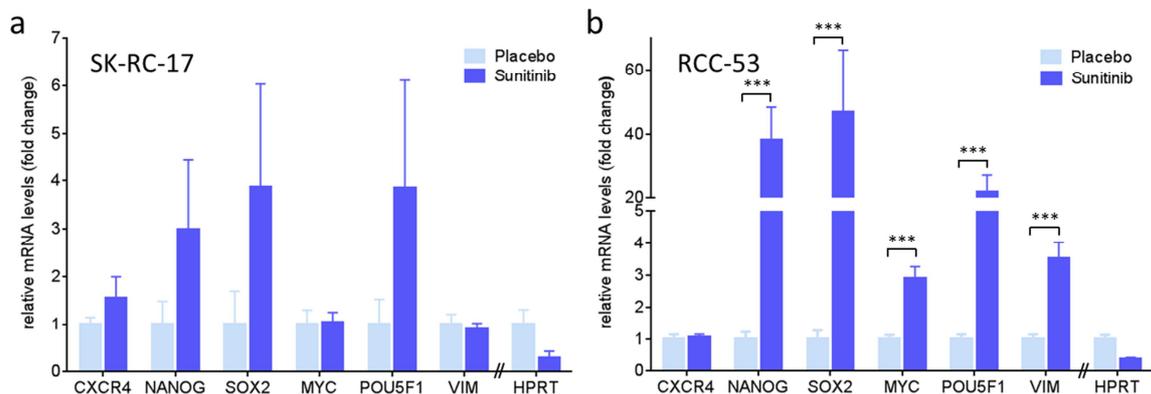


Abbildung 3.2.1.6: Sunitinib-Behandlung von xenotransplantierten RCC-Tumoren führt zu erhöhten Stemness-Gen-mRNA-Mengen. Mit Hilfe von quantitativer PCR und humanspezifischen Primern wurden Stemness-Gen- und Vimentin-mRNA-Mengen in SK-RC-17- und RCC-53-Tumoren nach reverser Transkription bestimmt (Behandlung siehe Abbildung 3.2.1.5). Gezeigt sind die auf die Expression in Tumoren ohne Sunitinib-Behandlung normalisierten Expressionswerte nach Normalisierung auf den mRNA-Gehalt des *Housekeeping*-Gens HPRT. Rechts in der Graphik sind die relativen HPRT-Mengen ohne HPRT-mRNA-Normalisierung gezeigt. SK-RC-17: n = 6; RCC-53: n = 10. ***, p < 0,001 (Mann-Whitney-Test).

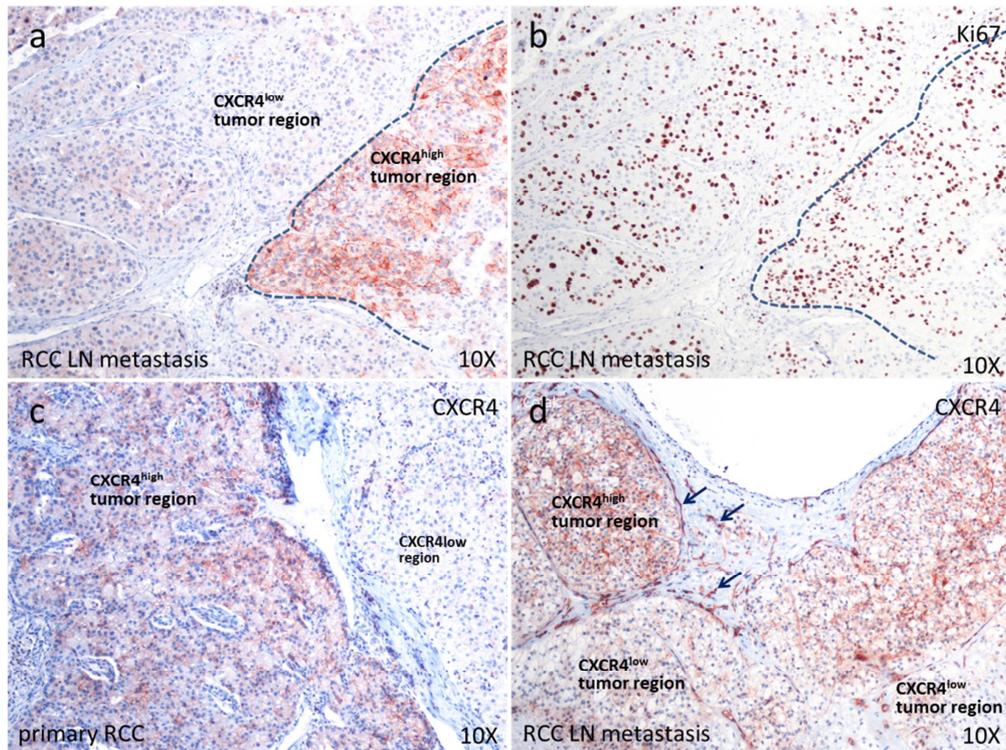


Abbildung 3.2.1.7: CXCR4-positive Zellen sind regional gehäuft in primären RCC und Lymphknotenmetastasen zu finden. Schnitte von paraffin-eingebetteten primären RCC (c) und RCC-Lymphknoten von zwei unbehandelten Patienten (a, d) wurden mit einem CXCR4-spezifischen Antikörper angefärbt (a, c, d). Neben Tumorzellen mit Oberflächenfärbung und zytoplasmatischer Färbung wurde auch ein Teil der Blutkapillaren (Pfeile in d) markiert. Einzelne Regionen der Tumore (von Septen abgegrenzt?) färben sich unterschiedlich stark an (CXCR4^{low} und CXCR4^{high}). Stark CXCR4-positive Zellen exprimieren den Proliferationsmarker Ki-67 (Kernfärbung) häufiger (ca. 80%) im Vergleich zu CXCR4-negativen bzw. schwach exprimierenden Tumorzellen (ca. 48%; a, b).

Interessanterweise findet man immunhistologisch sowohl in primärem RCC als auch in Lymphknotenmetastasen, Bereiche mit unterschiedlich starker CXCR4-Expression, was für eine inhomogene Verteilung von Tumorstammzellen im Tumor sprechen könnte (Abbildung 3.2.1.7). Dies muss allerdings noch durch Kolo-kalisation von CXCR4 und anderen Stammzellmarkern wie POU5F1 überprüft werden. Zurzeit testen wir die Hypothese des selektiven Überlebens von Tumorstammzellen nach Sunitinib-Behandlung in Tumorgewebe von neoadjuvant mit Sunitinib-behandelten RCC-Patienten (Proben von Dr. Bex, Netherlands Cancer Institute, Amsterdam) durch immunhistologische und fluoreszenzmikroskopische Analysen.

Die bisherigen Befunde legen nahe, dass die Miterfassung oder selektive Ausschaltung von Tumorstammzellen positiv auf den Therapieerfolg auswirken könnte. Daher 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-Antibiotikum, das von *Streptomyces albus* gebildet wird sowie Sulforaphan, ein sekundärer Pflanzenstoff und Antioxidans, das im Brokkoli vorkommt. Die beiden letztgenannten Verbindungen zeigten bei anderen Tumorentitäten eine selektive Wirkung auf Tumorstammzellen.

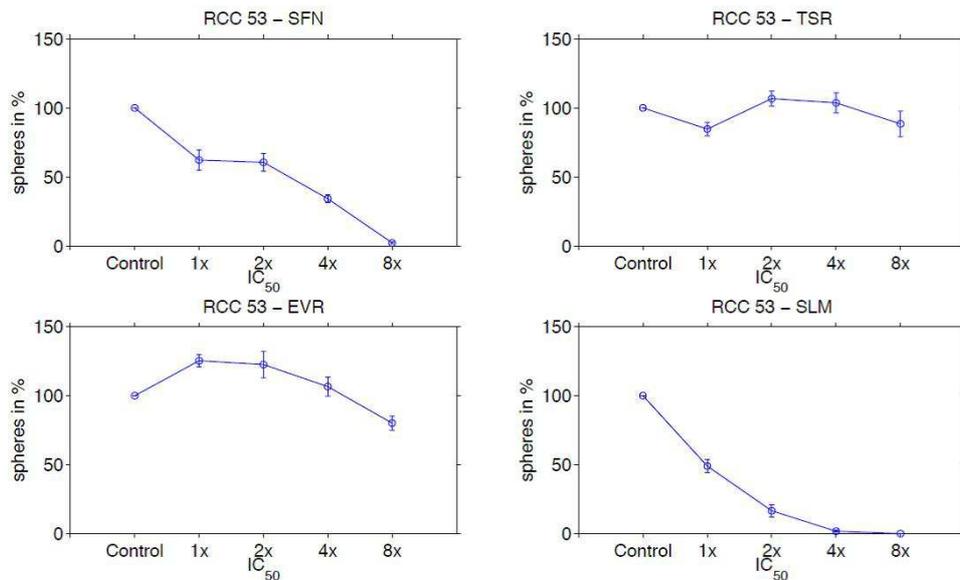


Abbildung 3.2.1.8: Einfluss von Sulforaphan (SFN), Temsirolimus (TSR), Everolimus (EVR) und Salinomycin (SLM) auf die Sphere-Bildung bei RCC-53. Es wurden 1500 RCC-53 Zellen pro well in 96er-*ultra low attachment*-Mikrotiterplatten in serumfreien Medium angesetzt. Am Tag 2 wurden die Medikamente zugesetzt und am Tag 8 wurden die Spheres gezählt. Angegeben sind steigende Konzentrationen ausgehend von der IC₅₀-Konzentration (SFN: 2,8 µM; TSR: 1,2 µM; EVR: 0,3 µM; SLM: 0,04 µM). Ngo und Pohla, unveröffentlicht.

Wie aus Abbildung 3.2.1.8 zu ersehen ist, blockieren Sulforaphan und Salinomycin bereits in geringer Konzentration die Sphere-Bildung, während Temsirolimus kaum hemmt 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.

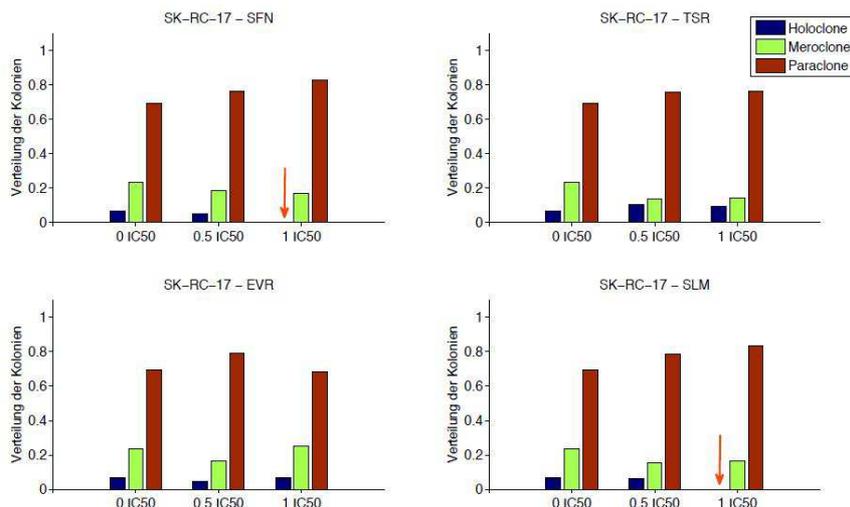


Abbildung 3.2.1.9: Einfluss von Sulforaphan (SFN), Temsirolimus (TSR), Everolimus (EVR) und Salinomycin (SLM) auf die Koloniebildung bei SK-RC-17. Es wurden 200 Zellen pro well einer 12-well-Platte ausgesät. An Tag 2 wurden die Medikamente zugesetzt. Angegeben sind steigende Konzentrationen ausgehend von der IC₅₀ Konzentration (SFN: 3,3 µM; TSR: 1,9 µM; EVR: 0,1 µM; SLM: 0,05 µM). Ngo und Pohla, unveröffentlicht.

Des Weiteren haben wir die Wirkung der Substanzen auf die Koloniebildung der RCC-Zelllinien getestet. Wie am Beispiel der Zelllinie SK-RC-17 gezeigt, konnten nur Sulforaphan und Salinomycin in der IC₅₀-Konzentration die Bildung von Holoklonen blockieren, die vermutlich von Tumorstammzellen abstammen (Abbildung 3.2.1.9).

Im Gegensatz zu den anderen Medikamenten ist Salinomycin auch die Substanz, die besondere die Vitalität von aus *Spheres* stammenden Zellen hemmen kann. Von diesen Zellen nimmt man an, dass sie - zumindest zum Zeitpunkt der Isolierung und nach kurzer adhärenter Kultivierung - für Tumorstammzellen angereichert sind (Abbildung 3.2.1.10).

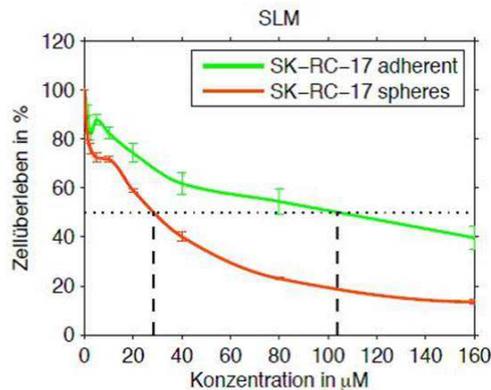


Abbildung 3.2.1.10: Einfluss von Salinomycin (SLM) auf die Zellvitalität der parentalen adhärenenten SK-RC-17 Zellen bzw. der *Spheres*. Es wurden 1500 adhärenent oder als *spheres* gewachsene Zellen pro well einer 96-well-Mikrotiterplatte ausgesät, am 2. Tag Salinomycin zugesetzt und am 3. Tag im *Celltiter-Blue*-Assay die Vitalität überprüft. Ngo und Pohla, unveröffentlicht

Als Nächstes wurde die Wirkung von Sunitinib und Salinomycin auf die Tumorbildung in immundefizienten Mäusen überprüft. Hier zeigte sich allerdings nur ein geringer additiver Effekt bei gemeinsamer Gabe von Sunitinib und Salinomycin (Abbildung 3.2.1.11).

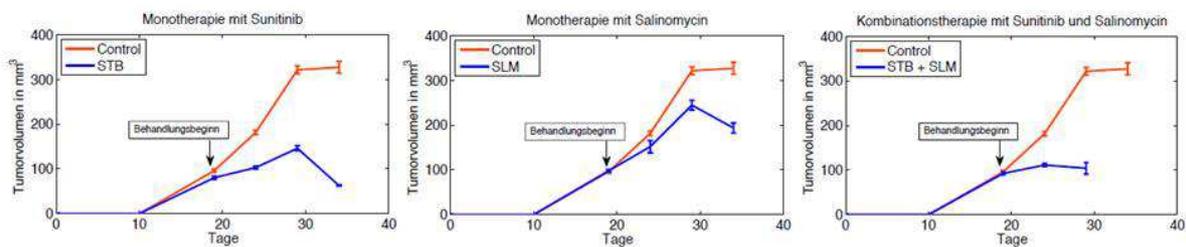


Abbildung 3.2.1.11: Einfluss von Sunitinib und Salinomycin im NOD/SCID-Mausmodell. 40.000 RCC-53 Zellen wurden s. c. in 100 µl Matrigel/DMEM/F12 (1:1) in die Flanke der Mäuse injiziert. Sobald die Tumoren einen Durchmesser von 100 mm³ erreicht hatten, wurde mit der oralen Sunitinib-Behandlung begonnen (1x tgl. 40 mg/kg für 14 Tage) bzw. i. p. Salinomycin injiziert (5 mg/kg 1x tgl.). Als Kontrolle wurde mit Lösungsmittel gefüttert bzw. injiziert.

Identifikation neuer Prognosemarker beim Nierenzellkarzinom mittels Expressionsprofilen und neuer Filterstrategien

Alexander Buchner, Dong Chen

Kooperation: Matthias Maruschke (Urologische Klinik, Universität Rostock)

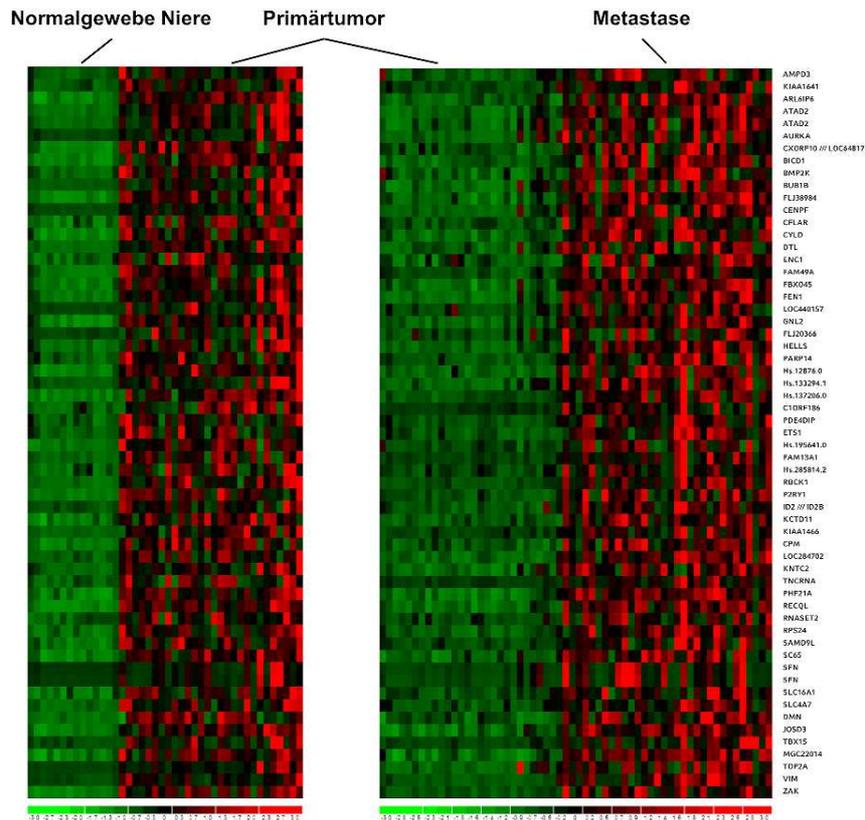
Patienten mit Nierenzellkarzinom zeigen oft auch bei ähnlicher TNMG-Klassifikation einen sehr unterschiedlichen Krankheitsverlauf. Um eine möglichst optimale, dem individuellen Risikoprofil angepasste Follow-up- und Therapieplanung zu ermöglichen, ist die Identifikation neuer unabhängiger Prognosefaktoren 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 Tumorbiologie 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.

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



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.

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 und publiziert. Es wurden weder Vakzine-induzierte Autoimmunität noch systemische Nebenwirkungen beobachtet.

Die Vakzinierungen zeigten sich somit als sicher und ambulant gut durchführbar. Bei fast allen Patienten waren Vakzine-induzierbare T-Zellantworten gegen mindestens eines oder mehrere Tumor-assoziierte Antigene nachweisbar. Damit sind zelluläre Tumorzellimpfstoffe durchaus als sinnvolle Option für zukünftige Kombinationstherapien zu bewerten.

a) *Klinische Phase-I-Studie mit RCC-26/CD80/IL-2 zur Behandlung von 15 Nierenzellkarzinompatienten in München und Klinische Phase-I-Studie mit RCC-26/CD80/IL-7 in Berlin* publiziert in *Human Gene Therapy* 2010, *Gene Therapy* 2011 und *Molecular Medicine* 2013.

b) *Klinische Phase-I/II-Studie mit LNCaP/IL-2/IFN- γ zur Behandlung von 30 Prostatakarzinompatienten* publiziert in *Journal of Gene Medicine* 2007 und *Human Gene Therapy* 2009.

Die im Folgenden zusammengefassten Ergebnisse zur Prostatakarzinomstudie sind noch nicht publiziert:

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.

Im Vergleich zu gesunden Spendern wiesen etwa 50% der Patienten eine leicht erhöhte Frequenz an natürlichen regulatorischen T-Zellen (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 Korrelation zum PSA-Wert oder zur *immune response rate* konnte nicht gefunden werden. Hinsichtlich der Analyse myeloider Suppressorzellen sind die Untersuchungen noch nicht abgeschlossen.

Zur Analyse des Zytokinprofils im Serum und in Haut-infiltrierenden Lymphozyten wurden 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 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 Zytokin-Konzentrationen 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.

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, jetzt: Trianta Immunotherapies, Fa. Medigene, Martinsried)

Aus den Immunmonitoringdaten unserer Prostatakarzinomstudie sind die besten d.h. immunogensten Tumor-assoziierten Antigene herausgesucht worden (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. Die Expression der entsprechenden Antigene auf den DC wurde jeweils überprüft. Die DC sollen später als Vakzine verwendet werden. Falls T-Zellklone generiert werden können, werden auch die T-Zellrezeptoren (TCR) charakterisiert, um diese dann für den adoptiven Transfer TCR-transduzierter T-Zellen nutzen zu können. Diese Arbeiten sind derzeit unterbrochen, da Frau Prof. Schendel und ihre Arbeitsgruppe jetzt bei Medigene arbeiten.

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 Tumorstoffvakzine. Die Peptide wurden aufgrund ihrer Überexpression in primärem RCC-Gewebe ausgewählt. Sie besteht aus neun HLA-Klasse-I-bindenden Peptiden und einem HLA-Klasse-II-bindenden Peptid und ist in der Lage, CD8⁺ zytotoxische T-Zellen (CTL) und CD4⁺ T-Helferzellen zu aktivieren. Entwickelt wurde diese Vakzine von der Firma *immatics biotechnologies GmbH* in Tübingen (www.immatics.com). IMA901 stellte sich in einer multizentrischen klinischen Phase-I-Studie als eine sehr sichere gut verträgliche und immunogene Multipeptidvakzine heraus (IMA901-101, Kooperation: M. Staehler, Urologische Klinik, LMU), 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 identifizieren¹⁴.

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 haben wir die Blutproben für das immunologische *Monitoring* bearbeitet (in Kooperation mit der Urologischen Klinik München-Planegg, der Urologischen Klinik rechts der Isar und der Urologischen Klinik des Klinikums Straubing). Die Ergebnisse der Phase-III-Studie werden Ende 2015 erwartet.

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

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

¹⁴ 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).

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 hochregulierten¹⁵. 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 sind¹⁶. Außerdem wiesen T-Zell-defiziente Mäuse eine deutlich geringere Therapieantwort nach PDT auf im Vergleich zu immunkompetenten Tieren. Etminan et al.¹⁷ konnten in Gliomzell/Immunzell-Kokulturen zeigen, dass PDT-Behandlung von Gliomzellen die Reifung und Migration von dendritischen Zellen fördert; diese wiederum sind bekannte Induktoren einer T-Zellantwort¹⁸.

Der Einfluss PDT-behandelter Gliomzellen auf die T-Zellantwort ist bislang nicht untersucht worden. Zunächst wurde die Glioblastom-Zelllinie U87 mit dem Photosensibilisator 5-ALA inkubiert (25 µg/ml), mit Laserlicht unterschiedlicher Stärke bestrahlt (1, 3, 5 J/cm²) und dann zusammen mit PBMC gesunder Spender kokultiviert. In früheren Experimenten konnte in einer durchflusszytometrischen

¹⁵ 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).

¹⁶ Korbelik M, Sun J. Photodynamic therapy-generated vaccine for cancer therapy. *Cancer Immunol Immunother* 55(8):900-9 (2006).

¹⁷ 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).

¹⁸ 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).

Analyse bereits gezeigt werden, dass PDT-behandelte U87 zu einer gesteigerten Expression des frühen Aktivierungsmarkers CD69 und des sekundären kostimulatorischen Markers CD134 in den T-Zellen führt. Gleichzeitig kam es zu einer niedrigeren Expression des inhibitorischen Moleküls CTLA-4 (CD152) auf den T-Zellen (Abbildung 3.2.3.1).

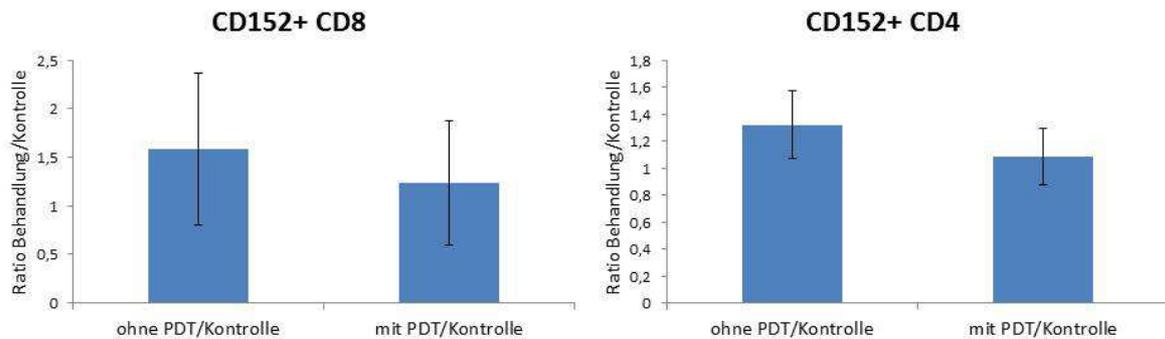


Abbildung 3.2.3.1: Verringerte Expression des inhibitorischen Moleküls CTLA-4 (CD152) nach 48-stündiger Kokultur von PBMC mit PDT-behandelten U87-Zellen. Gezeigt ist die Expression jeweils in CD8⁺- und CD4⁺- T-Zellen. Strauß und Pohla, unveröffentlicht.

Ferner wurden nach der Kokultur CD8⁺-T-Zellen mit Magnetbeads angereichert und in einer RT-PCR auf die Expression von IFN- γ - und Perforin-mRNA überprüft. Hier zeigte sich eine höhere Expression von IFN- γ -mRNA und Perforin-mRNA als Zeichen einer gesteigerten zytotoxischen Aktivität nach Kontakt mit PDT-behandelten U87-Zellen (Abbildung 3.2.3.2).

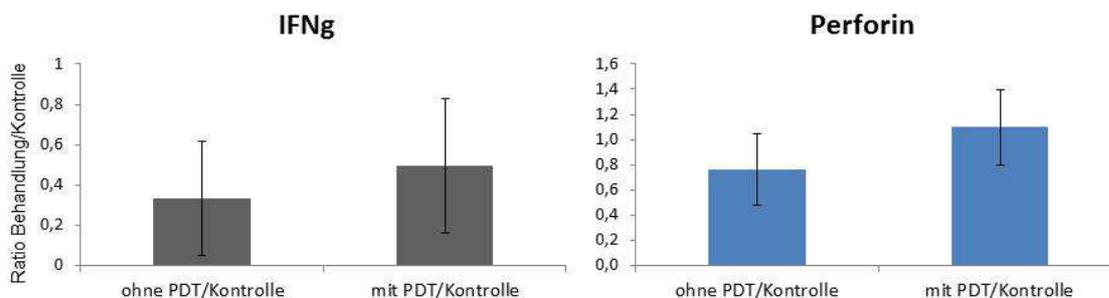


Abbildung 3.2.3.2: Gesteigerte Expression von IFN- γ und Perforin-mRNA in CD8⁺-T-Zellen nach 48-stündiger Kokultur von PBMC mit PDT-behandelten U87-Zellen. Strauß und Pohla, unveröffentlicht.

Interessant war jetzt die Frage nach einer Gedächtnisantwort der CD8⁺-T-Zellen nach wiederholter Inkubation mit naiven unbehandelten U87-Zellen. Dazu wurden die T-Zellen in einem Perforin-ELISPOT-Assay getestet. Es zeigte sich, dass T-Zellen, die bereits zuvor mit PDT-behandelten U87-Zellen Kontakt hatten, eine gesteigerte Perforinsekretion aufwiesen (Abbildung 3.2.3.3).

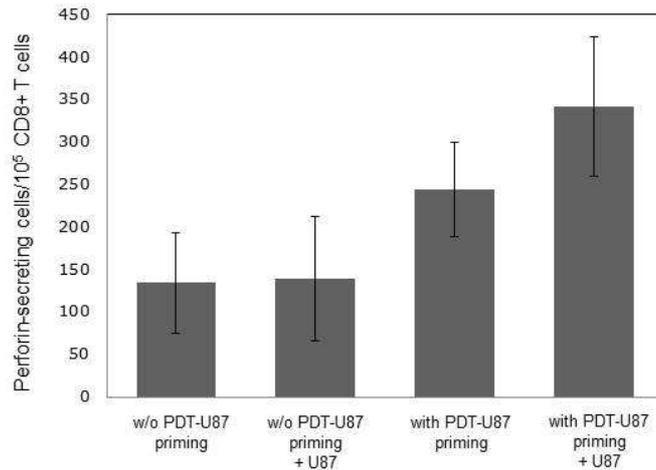


Abbildung 3.2.3.3: Gesteigerte Perforinsekretion bei CD8⁺-T-Zellen, die bereits zuvor in Kontakt waren mit PDT-behandelten U87-Zellen. Gezeigt ist hier die Anzahl der Perforin-sezernierenden T-Zellen pro eingesetzte 10⁵ CD8⁺- T-Zellen nach erneuter Kultur mit 10⁴ naiven U87-Zellen. Strauß und Pohla, unveröffentlicht.

3.2.4 Modulation der Funktion regulatorischer T-Zellen

Heike Pohla, Birgit Stadlbauer, Mingqian Li; Förderung: SFB TR 127 (07/2012-06/2016)

Kooperation: Bruno Reichart, Paolo Brenner, Jan Michael Abicht und Tanja Mair (Walter-Brendel-Zentrum München), Jochen Seissler (Diabetes Zentrum, LMU 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. Die Organspende ist kontinuierlich rückläufig. 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.

Zunächst wurden Methoden zur Isolierung, Anreicherung und Expansion humaner und nicht-humaner Primaten nTreg aus peripherem Blut und Nabelschnurblut

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. Für den adoptiven Transfer werden die xenoreaktiven Treg dann expandiert (Abbildung 3.2.4.1).

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 (Abbildung 3.2.4.2).

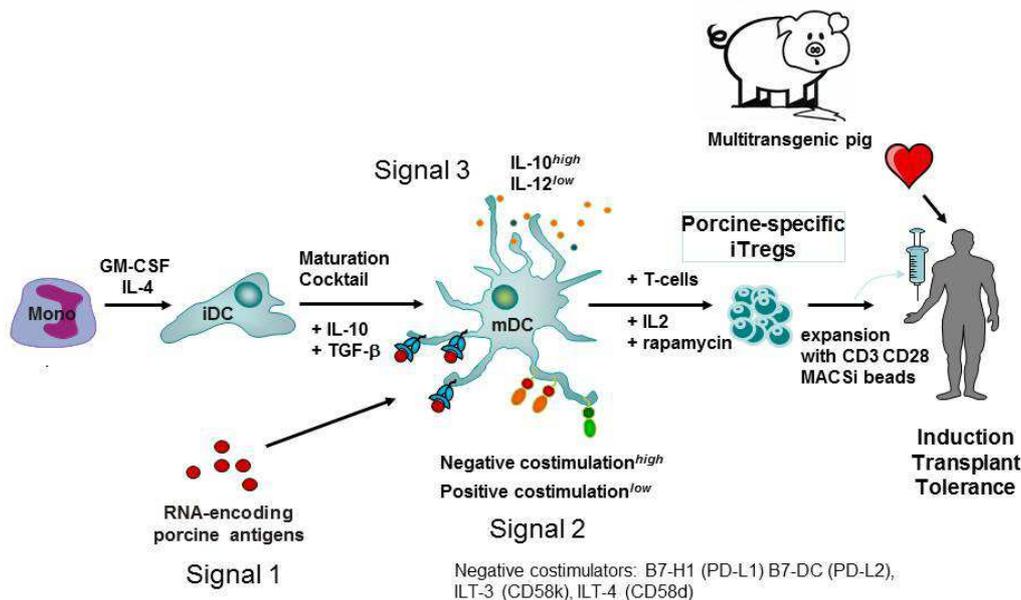


Abbildung 3.2.4.1: Schema zur Herstellung xenoreaktiver Treg für den adoptiven Transfer bei der Transplantation multitransgener Schweineherzen in Paviane.

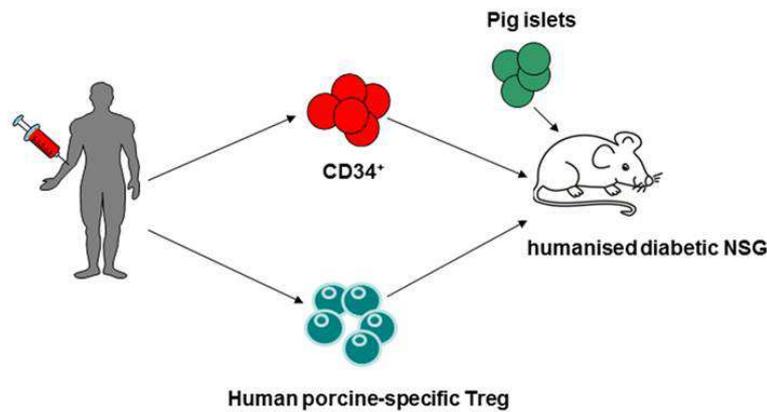


Abbildung 3.2.4.2: Schema zur Herstellung xenoreaktiver Treg für den adoptiven Transfer bei der Transplantation multitransgener Inselzellen in humanisierte diabetische NOD/SCID-Mäuse.

Um die Funktion der Treg zu überprüfen, wurde ein 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 3.2.4.3) bestimmt.

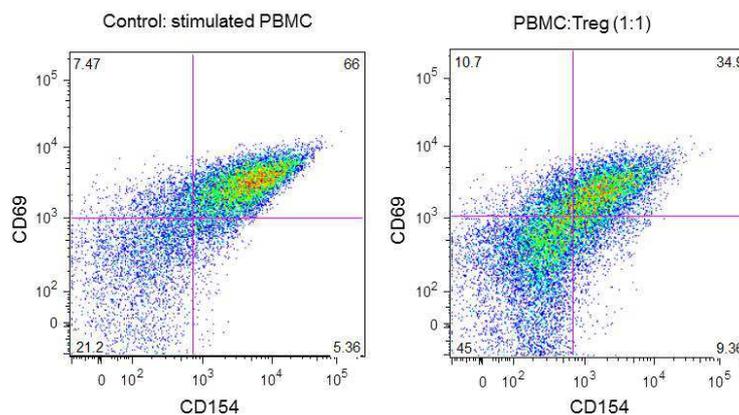


Abbildung 3.2.4.3: Funktionsassay aus humanem Nabelschnurblut expandierter Treg. T-Zellen wurden mittels CD3/CD28-Beads stimuliert in Abwesenheit oder Anwesenheit von Treg. Die Expression von CD69 (Aktivierungsmarker) und CD154 (kostimulatorisches Molekül auf aktivierten T-Zellen) wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Es zeigt sich deutlich eine Inhibierung der Expression durch Treg (siehe rechter oberer Quadrant). Li und Pohla, unveröffentlicht.

Es gelang uns tolerogene DC herzustellen, die Schweine-spezifische Antigene auf der Zelloberfläche nach Elektroporation von ivt-RNA aus PHA-stimulierten Schweine-PBMC exprimieren konnten (Abbildung 3.2.4.4).

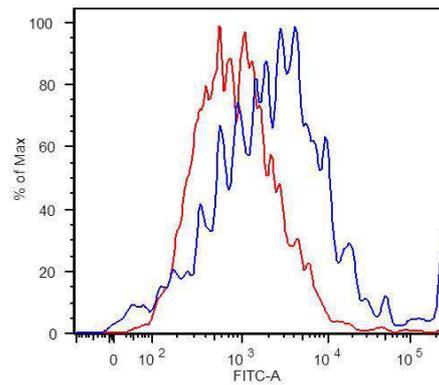


Abbildung 3.2.4.4: Expression von Schweine-spezifischem MHC-Klasse-I-Molekül auf der Zelloberfläche tolerogener DC. Im Histogramm sind blau dargestellt die DC, 24 Stunden nach Elektroporation mit Schweine-spezifischer ivt-RNA, rot die DC nach Elektroporation mit Leerkontrolle. Li und Pohla, unveröffentlicht.

Mit diesen DC konnten dann Schweine-spezifische Treg (PsTreg) hergestellt werden. Die Spezifität wurde anhand unseres Funktionsassays überprüft (Abbildung 3.2.4.5).

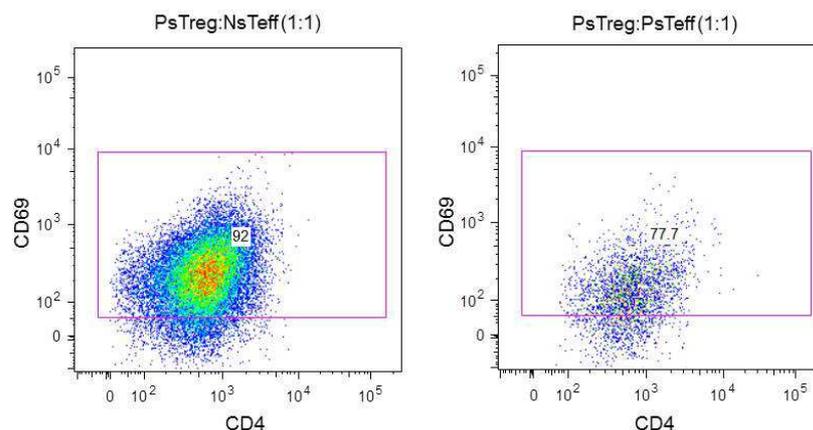


Abbildung 3.2.4.5: Funktionstest Schweine-spezifischer Treg am Beispiel der Expression des frühen Aktivierungsmarker CD69. Links ist die Kokultur von stimulierten unspezifischen Effektor-T-Zellen mit Schweine-spezifischen Treg gezeigt und rechts die Kokultur von stimulierten Schweine-spezifischen Effektor-T-Zellen mit Schweine-spezifischen Treg.

Ferner wurden Blutproben von bisher 7 Pavianen vor und nach Xenotransplantation für ein Immunmonitoring gesammelt, die PBMC isoliert und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Nach Vorbehandlung mit Rituximab (anti-CD20 Antikörper) sank wie zu erwarten war, die Frequenz der B-Zellen drastisch ab.

Nach Transplantation stieg der Prozentsatz aktivierter CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen eines Pavians stark an (Abbildung 3.2.4.6). Dieser Pavian zeigte die kürzeste Überlebenszeit. Dagegen stieg der Prozentsatz der Treg nach Transplantation bei zwei Pavianen an. Diese Paviane wiesen die längste Überlebenszeit auf (Abbildung 3.2.4.7).

Diese Analysen werden auch im kommenden Jahr weitergeführt.

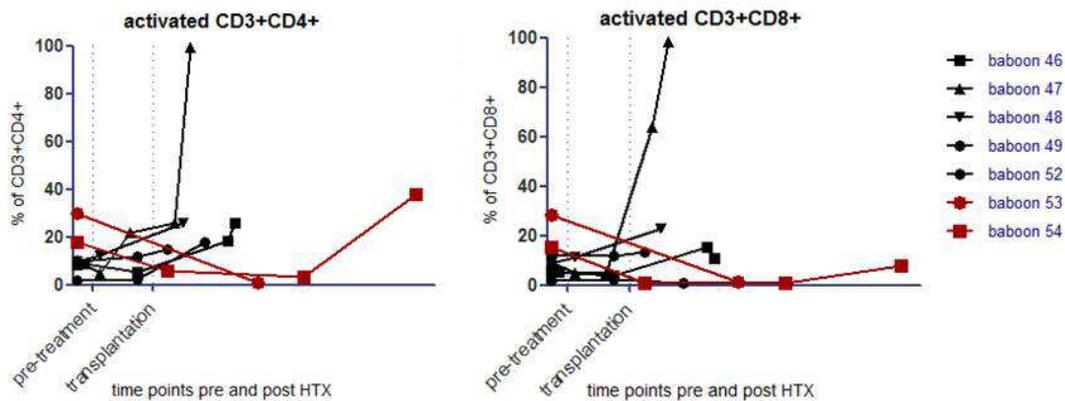


Abbildung 3.2.4.6: Monitoring aktivierter CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen vor und nach heterotoper Transplantation multitransgener Schweineherzen in Paviane. Li und Pohla, unveröffentlicht.

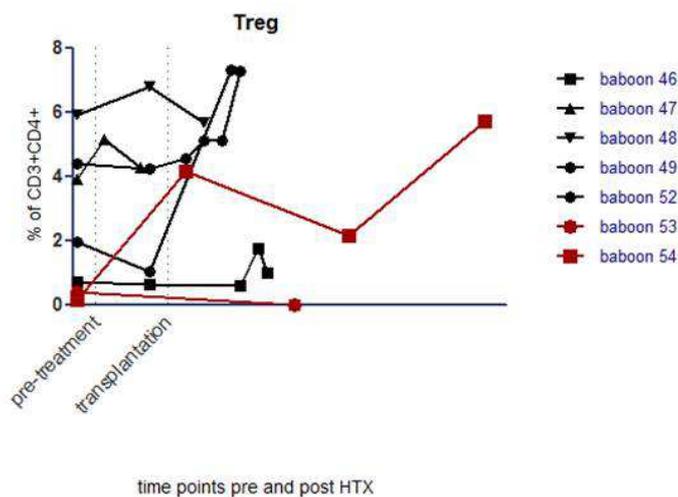


Abbildung 3.2.4.7: Monitoring von Treg vor und nach heterotoper Transplantation multitransgener Schweineherzen in Paviane. Gezeigt ist der Prozentsatz von Treg in lebenden CD3⁺CD4⁺-T-Zellen, gemessen mittels Durchflusszytometrie. Li und Pohla, unveröffentlicht.

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⁺ Tumorspezifischer T-Zellen auch ohne Kenntnis des Antigens erlaubt, Multiparameter-Immunfluoreszenz am LSRII-FACS-Gerät, für eine kombinierte phänotypische und funktionelle Analyse verschiedener T-Zell-Subpopulationen, MHC/Peptid-Multimer-Bindungsanalysen, die quantitative TCR-Analyse mittels *Real-time-RT-PCR* sowie die Frequenzbestimmung von nTreg und MDSC (*myeloid-derived suppressor cells*).

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. Stattgefunden hat auch ein erneutes *Gating*-Panel für intrazelluläre FACS-Analysen und ein erstes MDSC-Panel. Die Auswertungen sind noch offen. Geplant sind Proficiency Panels für die Detektion von Treg und ein weiteres Panel für MDSC.

3.3 Experimentelle Urologie

3.3.1 Projektgruppe Endocannabinoide

Frank Strittmatter, Andrea Schreiber, Martin Hennenberg, Christian Gratzke

Die klinische Grundlage des Forschungsprojektes basiert auf der Tatsache, dass Patienten mit einer Überaktiven Blase (*over active bladder*, OAB) und damit assoziierten Symptomen des unteren Harntraktes (*lower urinary tract symptoms*, 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 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]. Tatsächlich sind diese Rezeptoren an der Regulation des Tonus der Blasenmuskulatur beteiligt. Dies wurde nicht nur *in vitro*, sondern auch *in vivo* durch die Verwendung spezifischer Antagonisten und Agonisten bewiesen. In urodynamischen Untersuchungen an Ratten zeigte sich z. B. eine Erhöhung des Miktionsintervalls, des Blasenschwellendruckes, der Blasenkapazität und des Blasenvolumens durch selektiv peripher wirksame CB2-Agonisten [3]. Aufbauend auf diesen Arbeiten wurde weiterhin die Wirkung des hoch-selektiven CB2-Rezeptor Agonisten Cannabinor an Ratten in urodynamischen Untersuchungen erforscht. Die intravenöse Applikation von Cannabinor in verschiedenen Dosierungen führte zu ähnlichen Effekten wie die Verwendung des hochpotenten CB1/CB2-Rezeptor-Agonisten CP 55,940. Durch diese Arbeit konnte der Beweis der Wirkung exogen-selektiver Cannabinoide in der Blasenfunktion erbracht werden [5, 6].

Dennoch scheint die Applikation exogener Cannabinoid-Derivate wegen ihrer potentiell negativen und unerwünschten zentralen Effekte limitiert. Daher konzentrierten sich weitere Untersuchungen auf die Regulation der Verfügbarkeit der körpereigenen Cannabinoide. Unsere Arbeitsgruppe sieht darin einen äußerst innovativen und neuen therapeutischen Ansatz zur Therapie der OAB.

Das endogene Cannabinoid-System besteht neben seinen Rezeptoren und seinen endogenen Liganden („Endocannabinoide“) auch aus Enzymen für die Regulation von Biosynthese und Abbau der endogenen Cannabinoide [7, 8]. Entscheidende Schlüsselenzyme sind die Fettsäureamid-Hydrolase (FAAH) und die Monoacylglycerase (MAGL), welche für den Abbau der endogenen Cannabinoide verantwortlich sind und so die Verfügbarkeit der endogenen Cannabinoide kritisch regulieren. Es existieren zwei verschiedene endogene Cannabinoide; dies sind Anandamid (Arachidonylethanolamid), welches durch FAAH abgebaut wird, und 2-

Arachidonoylglycerol (2-AG), welches durch MAGL abgebaut wird [9]. Es ist bekannt, dass FAAH sowohl zentral als auch peripher an einer Vielfalt von physiologischen Prozessen beteiligt ist. Beispielsweise kann es durch eine Inhibierung der FAAH durch spezifische 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 Hemmung der FAAH die Miktionsbeeinflussung, 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. Immunohistochemische Untersuchungen zeigten eine deutliche Kollokalisierung von FAAH und CB2-Rezeptoren im Urothel. Füllhase und Hennenberg zeigten mittels Western-Blot und Immunhistochemie das Vorkommen der CB-Rezeptoren sowie FAAH-Enzyms im spinalen Miktionszentrum einem miktionsrelevanten Abschnitt des Rückenmarks [4].

Durch den FAAH-Inhibitor Oleoylethanolamide (OEtA) wurden nach intravenöser oder intravesikaler 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.

2013/14 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 bei chronischer Behandlung signifikante Verbesserungen verschiedener urodynamischer Parameter beobachtet. Diese Ergebnisse wurden 2014 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 Einengen der Harnröhre (partielle urethrale Obstruktion, PUO) (Abbildung 3.3.1.1) kann in Ratten eine Blasenüberaktivität induziert werden (Abbildung 3.3.1.2), 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 Miktions [4].

Insgesamt zeigt dies, dass FAAH in der Blase und in 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).

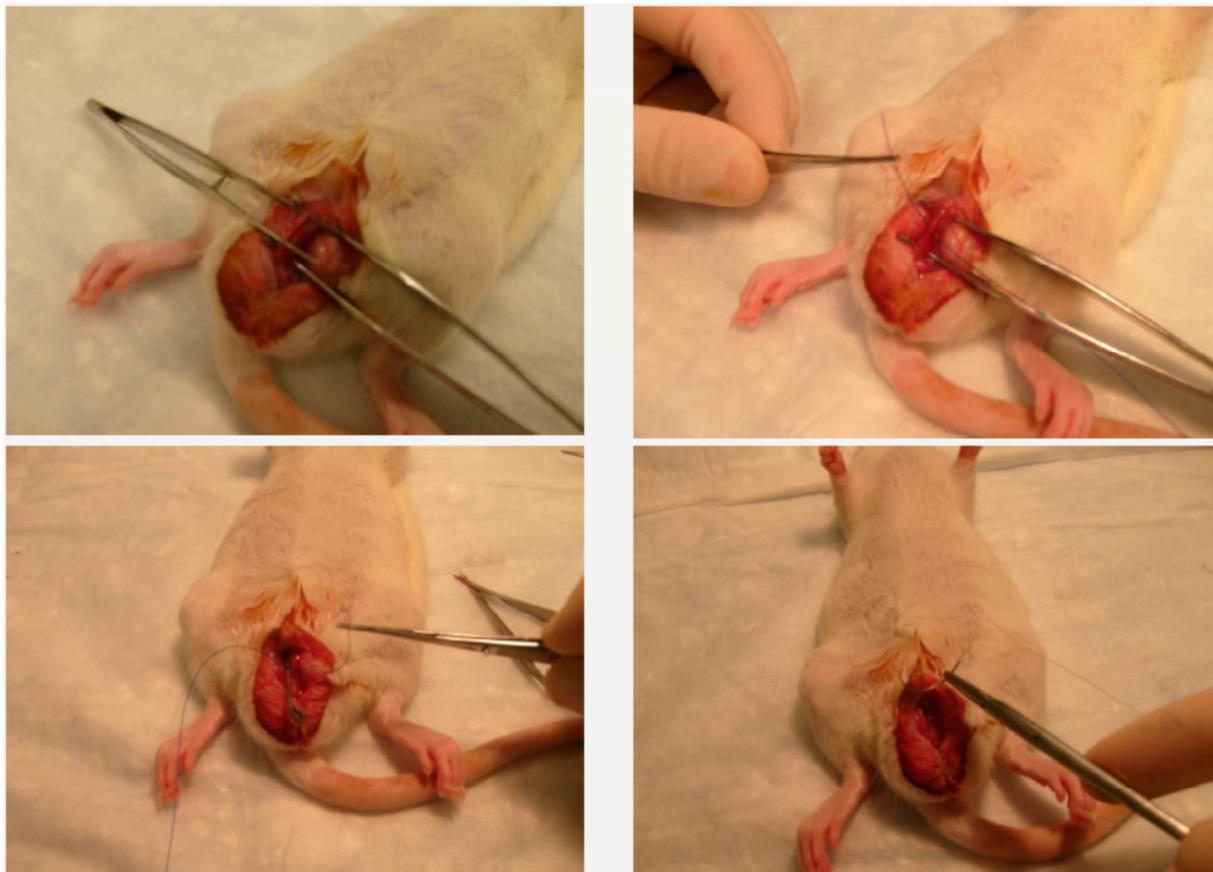


Abbildung 3.3.1.1: Chirurgisches partielles Einengen der Harnröhre (PUO). Wichtige Schritte des Operationsverlaufs sind von links oben nach rechts unten gezeigt: Darstellung der Harnröhre auf den Schwellkörpern über perinealen Schnitt, Unterfahung der isolierten Harnröhre mittels nicht-resorbierbarem Faden, Knoten des Fadens und somit Schließen einer Schlaufe um die Harnröhre und einem passager eingebrachten Mandrin, Hautnaht (nach Mandrinentfernung).

Die durch FAAH-Inhibierung durch OEtA erzielten Effekte lassen sich durch eine intravesikale Applikation eines CB2-Rezeptor-Blockers vollständig und durch einen CB1-Rezeptor-Blocker nur vereinzelt aufheben. Diese gewonnenen Ergebnisse zeigen erstmalig eine mögliche Rolle des endogenen Cannabinoid-Systems im Bereich der mechanoafferenten Blasenfunktion der Ratte. Diese Ergebnisse stimmen mit den Untersuchungen zur chronischen FAAH-Inhibierung (siehe Leistungsbericht 2011) und deren positiven Effekt auf urodynamische Parameter der normalen Blasenfunktion und der überaktiven Blase überein.

Die Bedeutung sowohl von CB1- als auch CB2-Rezeptoren im peripheren bzw. zentralen Nervensystem für die Miktionskontrolle konnte von unserer Arbeitsgruppe im Berichtszeitraum an knockout-Mäusen nachvollzogen werden. Hierbei erfolgte eine urodynamische Charakterisierung von CB1- und CB2-Rezeptor ko-Mäusen. Diese Ergebnisse wurden 2014 in den Fachzeitschriften „*BJU International*“ sowie „*Neurourology and Urodynamics*“ veröffentlicht [15, 16].

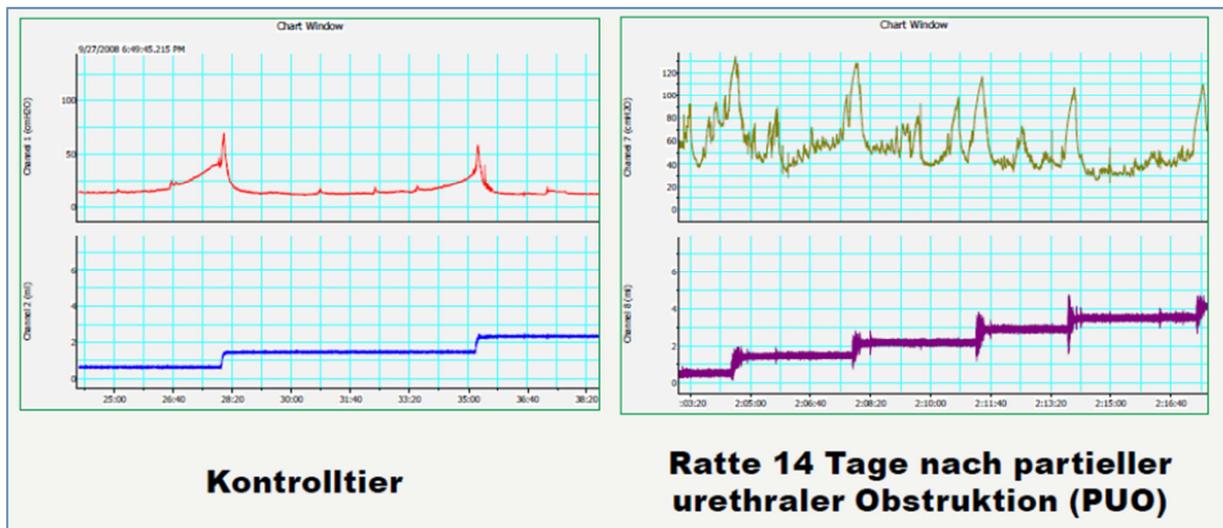


Abbildung 3.3.1.2: Messung der Blasenaktivität in einem Rattenmodell für Blasenüberaktivität. Das Modell der menschlichen Blasenüberaktivität bei gutartiger Prostatavergrößerung (benigne Prostatahyperplasie, BPH) wird durch partielle Ligatur der Harnröhre der Ratte generiert. Repräsentative 15-minütige urodynamische Aufzeichnungen eines normalen Kontrolltieres (links) sowie eines obstruierten Versuchstieres (rechts) sind gezeigt. Intravesikaler Druck (obere Kurve), synchron hierzu aufgezeichnete Miktionsvolumina (untere Kurve).

Neben der FAAH, welche Anandamid abbaut, ist auch die 2-AG-Degradation durch MAGL ein kritischer Vorgang des Endocannabinoid-Systems. Im Zusammenhang mit dem unteren Harntrakt wurde MAGL nun erstmals von unserer Arbeitsgruppe untersucht. 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 der Prostata und Blase, bzw. im Urothel demonstriert (Abbildung 3.3.1.3). Interessanterweise zeigten Muskelzellen des Detrusors keine Kolo-kalisation von FAAH und MAGL, so dass Teile des Detrusors offenbar unabhängig von der FAAH, jedoch durch MAGL reguliert werden. Dies legt nahe, dass eine Berücksichtigung von MAGL bei Cannabinoid-basierten Therapien zu besseren urodynamischen Effekten führen könnte, als die alleinige Hemmung von FAAH.

In ersten Pilotstudien wurden im Organbad die Effekte von KML29 und JW642, zwei verschiedenen, hochspezifischen MAGL-Inhibitoren auf die Kontraktion von humanem Prostatagewebe untersucht (Abbildung 3.3.1.4). Dabei führten beide Inhibitoren in einer Konzentration von 20 μM zu effektiven, wenn auch nicht signifikanten Hemmung der Kontraktionen, welche durch elektrische Feldstimulation (EFS) ausgelöst wurden. Bei der EFS werden durch definierte elektrische Impulse

von außen Aktionspotentiale in den Geweben simuliert, wodurch es zur Ausschüttung von Neurotransmittern und Kontraktion kommt. Dies zeigt, dass eine pharmakologische Hemmung der MAGL prinzipiell zu einer Senkung des glattemuskulären Tonus im unteren Harntrakt führen kann. Ob dies *in vivo* urodynamische Effekte bewirkt, soll Gegenstand zukünftiger Projekte sein.

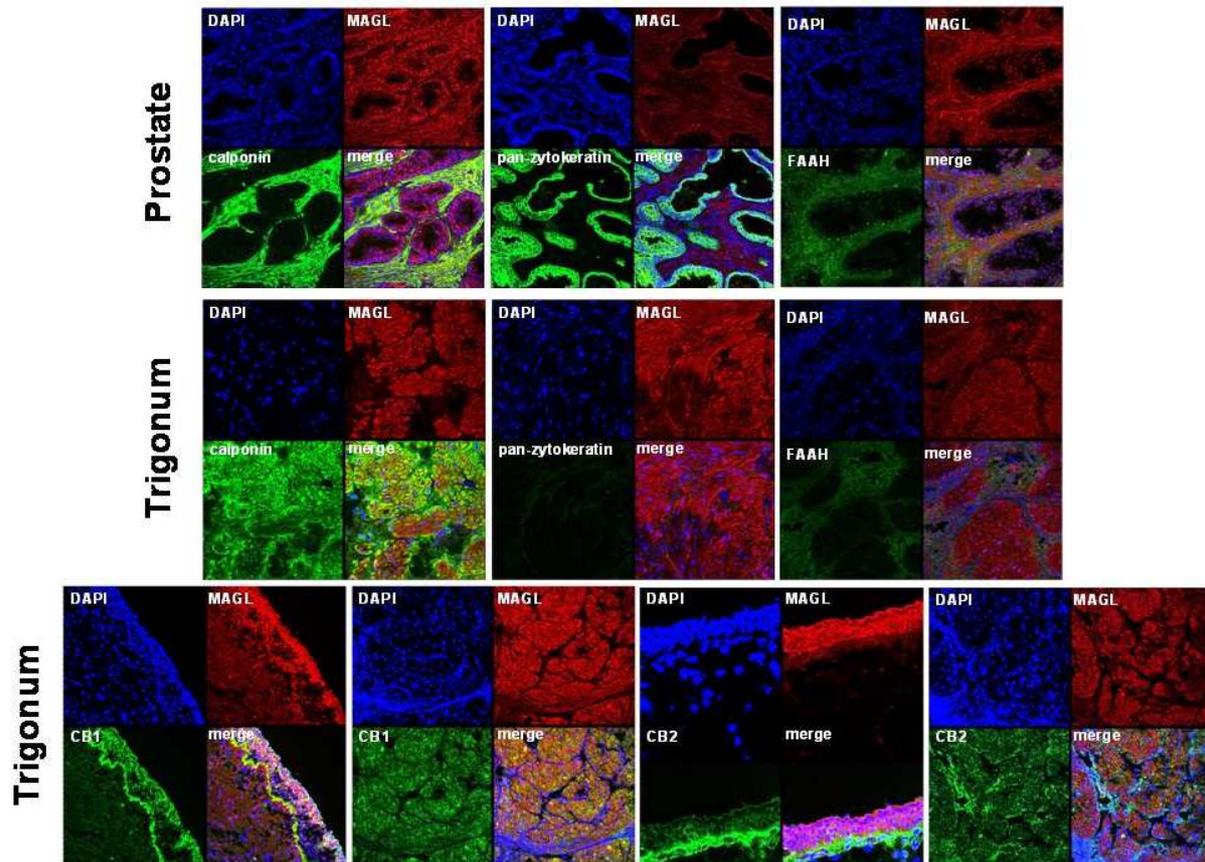


Abbildung 3.3.1.3: Expression von MAGL in der Prostata und Blase des Menschen. Gewebeproben aus radikaler Prostatektomie bzw. Zystektomie wurden mit verschiedenen Antikörpern Fluoreszenz-gefärbt. Dies zeigt die Expression von MAGL in glatten Muskelzellen der Prostata und des Trigonums, und eine starke Expression im Urothel.

Die bisherigen Ergebnisse zu Vorkommen und Funktion von MAGL im unteren Harntrakt wurden 2014 auf den Jahrestagungen der „*American Urological Association*“ (AUA) sowie der „*Deutschen Gesellschaft für Urologie*“ (DGU) vorgestellt. Ein Manuskript mit diesen Ergebnissen wurde bei der Fachzeitschrift „*Journal of Biomedical Sciences*“ eingereicht, und befindet sich dort in Begutachtung [17].

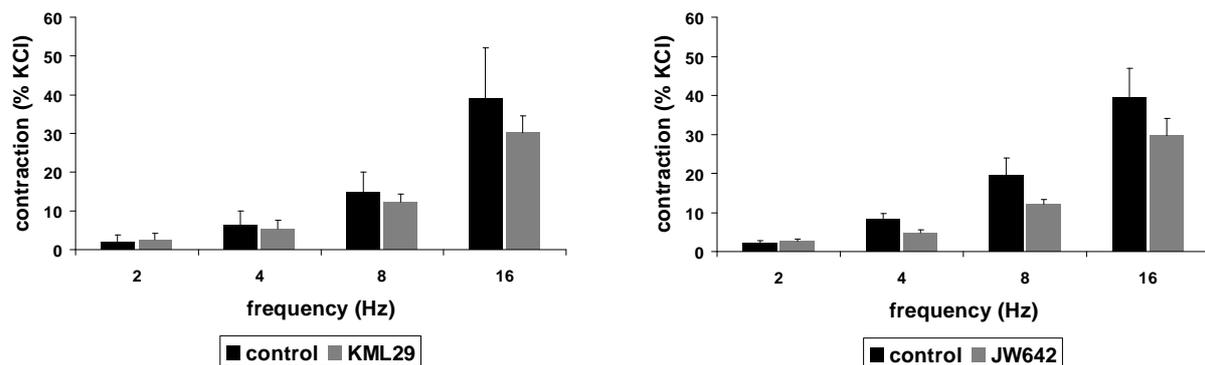


Abbildung 3.3.1.4: Effekte der MAGL-Inhibitoren KML29 und JW642 auf die EFS-induzierte Kontraktion humaner Prostata-Gewebe. Im Organbad wurde die Kontraktion von Gewebeproben aus radikaler Prostatektomie getestet, wobei die Kontraktion 30 min nach Inkubation mit den angegebenen MAGL-Inhibitoren (jeweils 20 μ M) bzw. DMSO (Kontrollen) ausgelöst wurden. Bei der EFS werden durch definierte elektrische Impulse von außen Aktionspotentiale in den Neuronen der Präparate simuliert, wodurch es durch Ausschüttung endogener Neurotransmitter zur Kontraktion der glatten Prostatamuskulatur kommt. Beide Inhibitoren führten zu einer effektiven, wenn auch nicht signifikanten Hemmung der Kontraktion. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM von Serien mit Geweben von n=5 (links) bzw. n=4 (rechts) Patienten/Gruppe.

Literatur

- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Gratzke, C., et al., Effects of cannabimor, a novel selective cannabinoid 2 receptor agonist, on bladder function in normal rats. *Eur Urol*, 2010. 57(6): p. 1093-100.
- Gratzke, C., et al., Cannabimor, a selective cannabinoid-2 receptor agonist, improves bladder emptying in rats with partial urethral obstruction. *J Urol*, 2011. 185(2): p. 731-6.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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*, 2014. 33(8): p. 1251-1258.
15. Campeau, L., et al., Characterization of bladder function in a cannabinoid receptor type 2 knockout mouse *in vivo* and *in vitro*. *Neurourol Urodyn*, 2014. 33(5): p. 566-570.
16. Füllhase, C., et al., Bladder function in a cannabinoid receptor type 1 knockout mouse. *BJU Int*, 2014. 113(1): p. 144-151.
17. Hennenberg, M., et al., Monoacylglycerase in the human prostate and bladder: potential target for cannabinoid-based treatment of lower urinary tract symptoms? *J Biomed Sci*, in review.

3.3.2 Projektgruppe „glattmuskuläre Kontraktilität und Wachstum im unteren Harntrakt“

Martin Hennenberg, Yiming Wang, Thomas Kunit, Beata Rutz, Anna Ciotkowska, Alexander Tamalunas, Frank Strittmatter, 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 [1,2]. 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, aber dennoch 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.

Jahrzehntelang wurde die BOO als einziger Grund für LUTS bei Männern in Betracht gezogen. Mittlerweile weiß man jedoch, dass auch bei Männern sehr häufig eine OAB und irritative Symptome zu den Symptomen des unteren Harntraktes beitragen. Tatsächlich leiden viele Männer nicht an obstruktiven oder irritativen Symptomen, sondern oft an einer Mischung aus beiden. Dabei tritt die OAB meist in Folge BOO auftritt, da auf Grund der BOO höhere Miktionsdrücke erforderlich sind, was zu einer chronischen Überbeanspruchung der glatten Muskulatur der Blasenwand (Detrusor) und entsprechenden Anpassungen führt. Dennoch ändert dies nichts an der Bedeutung der BOO, welche in Anbetracht der demographischen Entwicklung der westlichen Industrienationen und der stark steigenden Prävalenz mit zunehmendem Alter tatsächlich sogar zunehmen dürfte.

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. Prostatistische α_1 -Adrenozeptoren sowie das Prostata-Wachstum sind daher bei Patienten mit BPH die wichtigsten Angriffspunkte für die medikamentöse Behandlung von LUTS. 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.

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.

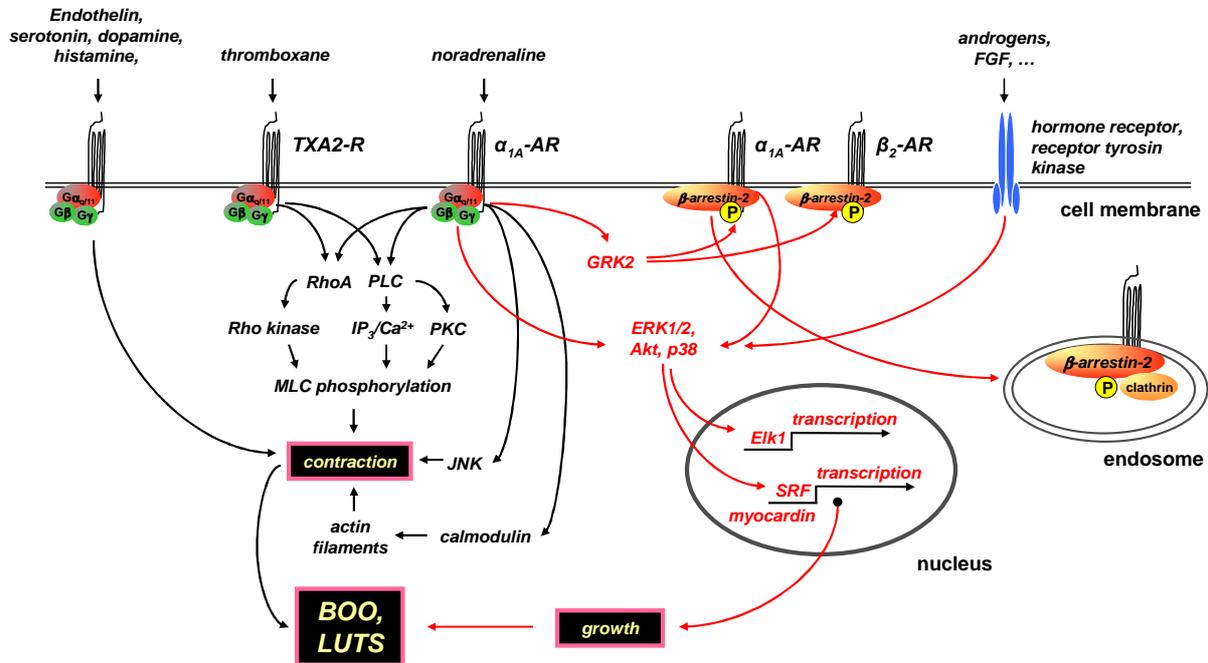
Vor diesem Hintergrund wären daher sowohl aus Sicht der Patienten als auch der Ärzte bessere Optionen der medikamentösen LUTS-Therapie sehr wünschenswert. Daher sind 1) die physiologischen Grundlagen, und 2) die pharmakologische Beeinflussung der glattmuskulären Kontraktilität in der Prostata bzw. im unteren Harntrakt von großem Interesse. Neue Strategien, die in experimentellen Modellen die Kontraktion der glatten Prostata-Muskulatur hemmen, stellen im Idealfall die Grundlage für zukünftige Therapien dar.

Die Projektgruppe befasst sich daher mit neuen (Regulations-)Mechanismen der glattmuskulären Kontraktion und des Wachstums im unteren Harntrakt. Verschiedene Teilprojekte vor dem Berichtszeitraum [3-11] zeigten bereits, dass frühere, etablierte 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 nur unzureichend verstanden.

Weiterhin konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass neben α_1 -Adrenozeptoren auch nicht-adrenerge Mediatoren entscheidend zum glattmuskulären Prostata-Tonus beitragen, was die limitierten Effekte von α_1 -Blockern (s.o.) erklären kann [12,13]. Obwohl mit dem hyperplastischen Prostata-Wachstum oft ein überhöhter α_1 -adrenerger Tonus auftritt und beide Faktoren gemeinsam zu Miktionsbeschwerden führen, sind mögliche Zusammenhänge zwischen beiden Kontraktion und Wachstum in der hyperplastischen Prostata nahezu unbekannt. Ergebnisse aus den Projekten der Arbeitsgruppe unterstützen nicht nur die Vermutung, dass zwischen beiden Faktoren Zusammenhänge bestehen könnten, sondern konnten im Berichtszeitraum nun auch erstmals die molekularen Schaltstellen dieser Verknüpfung identifizieren (s. „Highlights“).

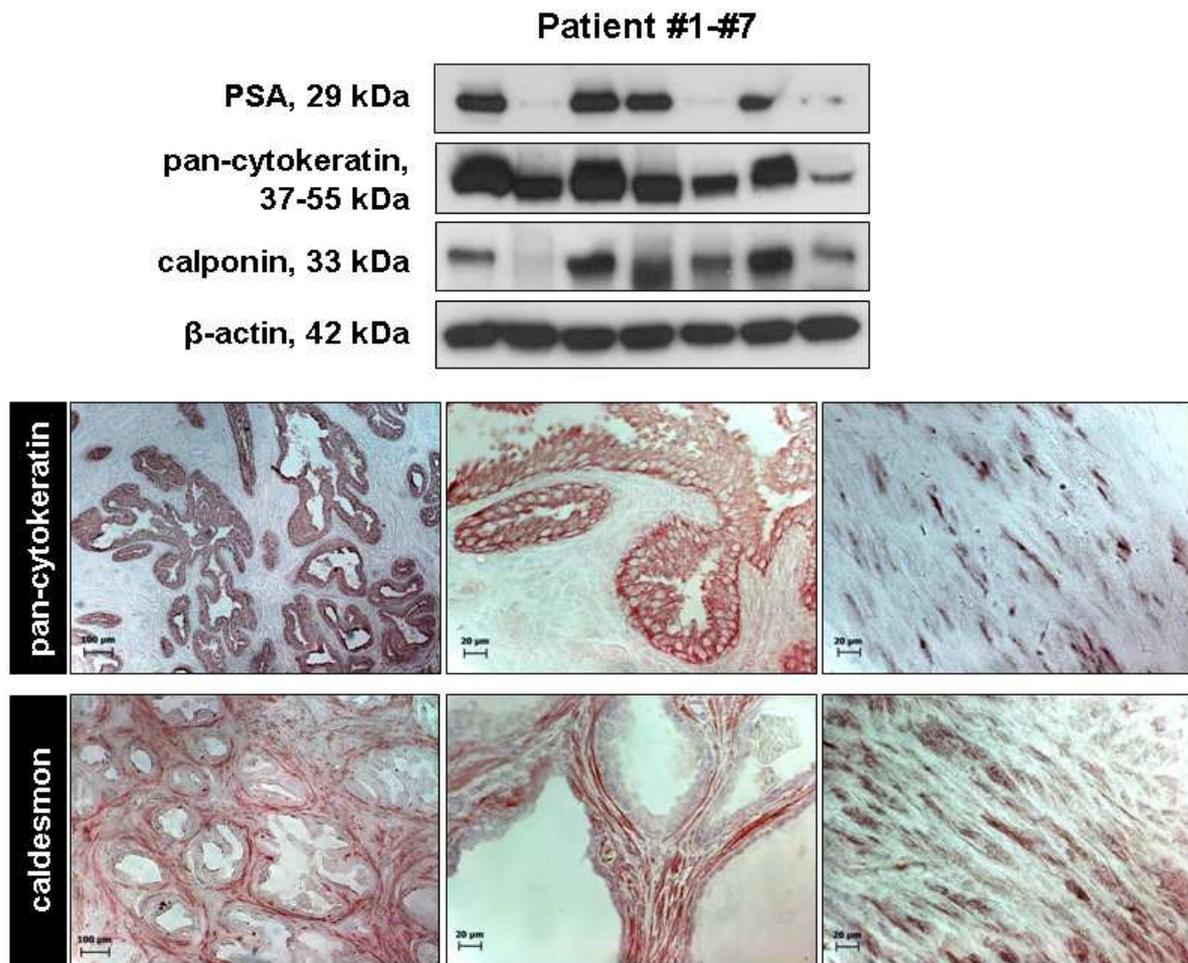
Einige der bisherigen Ergebnisse der Projektgruppe wurden in einem Übersichtsartikel zusammengefasst, welcher 2014 publiziert wurde [1]. Hier wurden die Ergebnisse verschiedener Projekte zusammengeführt, um auf dieser Basis ein neues Modell des prostatistischen α_1 -Adrenozeptors zu beschreiben, welches weit über die vorherigen Vorstellungen hinausgeht [1]. In einem weiteren, 2014 erschienenen Übersichtsartikel der Arbeitsgruppe lag der Schwerpunkt nicht auf prostatistischen α_1 -Adrenozeptoren, sondern allgemein auf der Therapie-relevanten Pharmakologie des

unteren Harntraktes [2]. Ein weiterer Übersichtsartikel der Arbeitsgruppe („commissioned review article“), der voraussichtlich 2015 erscheint, wird die jüngsten Entwicklungen hinsichtlich der Kombinationstherapien von α_1 -Blockern mit anderen LUTS-Medikamenten beschreiben [14].



Neues Modell des α_1 -Adrenozeptors in der Prostata. Das gezeigte Modell wurde von unserer Arbeitsgruppe auf der Basis mehrerer eigener Studien entworfen, und 2014 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 -Adrenozeptors 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 -Adrenozeptor verschiedene intrazelluläre Effektoren mit Thromboxan-Rezeptoren, Hormonen, und Wachstumsfaktoren. Im Gegensatz zu vorherigen Betrachtungsweisen ist der α_1 -Adrenozeptor 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. Nicht enthalten sind verschiedene Mechanismen, die erst 2014 erarbeitet wurden Aus: [1].

Der Projektgruppe stehen verschiedene experimentelle Modelle zur Verfügung. Schwerpunkt sind Untersuchungen an intakten, humanen Geweben. Eine wichtige Säule sind nicht-maligne Prostata-Gewebe von Patienten, bei denen Tumorbedingte, radikale Prostatektomien durchgeführt werden. Die Anzahl der Prostatektomien an der Urologischen Klinik erlaubt ein kontinuierliches Arbeiten mit diesen Geweben. Im Gegensatz zu Gewebespänen von Resektionsverfahren, wo nur kleine Gewebestücke anfallen, die zudem stark traumatisiert sind, gewährleistet die Probengewinnung aus radikalen Prostatapräparaten einigermaßen zufriedenstellende Mengen an Material, das in den einzelnen Experimenten eingesetzt werden kann.



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 bei den verschiedenen Patienten wider. 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/Calponin-negativen Drüsen, und dazwischen liegendem, Calponin-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 verschiedenen Patienten schwankende Gehalt von PSA (*prostate specific antigen*, Marker für BPH), Calponin (Marker für glatte Muskelzellen) und pan-Zytokeratin (Marker für Epithelzellen = Drüsen) spiegelt die unterschiedlich starke Ausprägung der BPH bei den verschiedenen Patienten 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 Prostataektomien. Die perioperative Entnahme der Prostata- und Blasen-Gewebe erfolgt in Kooperation mit dem Pathologischen Institut (Campus Großhadern, Prof. Dr. Kirchner und Mitarbeiter). 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. Hier wurde die Kultur einer immortalisierten Stroma-Zelllinie aus der nicht-malignen, humanen Prostata etabliert (WPMY1-Zellen); dabei werden die Effekte pharmakologischer Interventionen auf den Zellzyklus, das Überleben, sowie das Zytoskelett von WPMY1-Zellen untersucht.

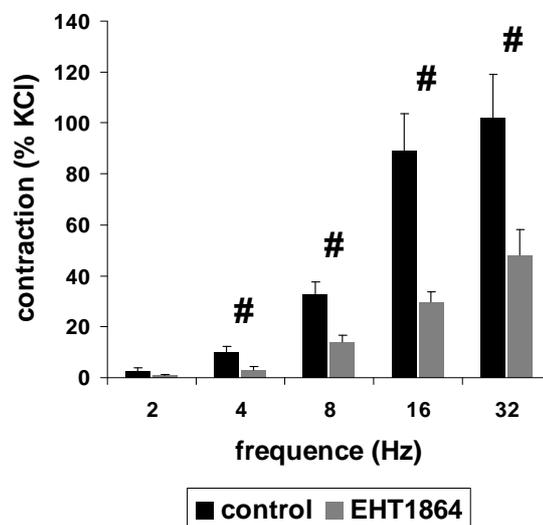
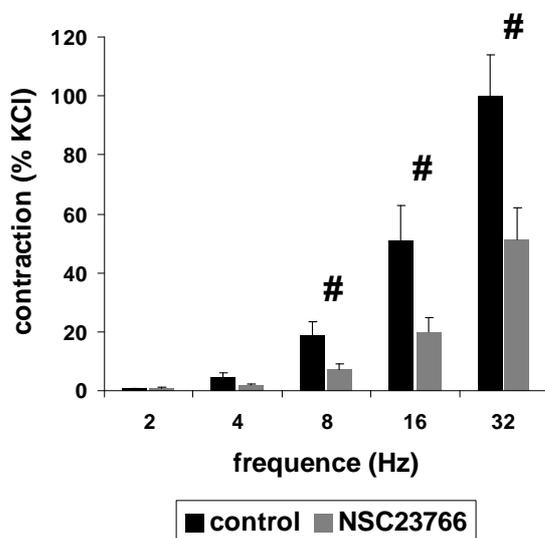
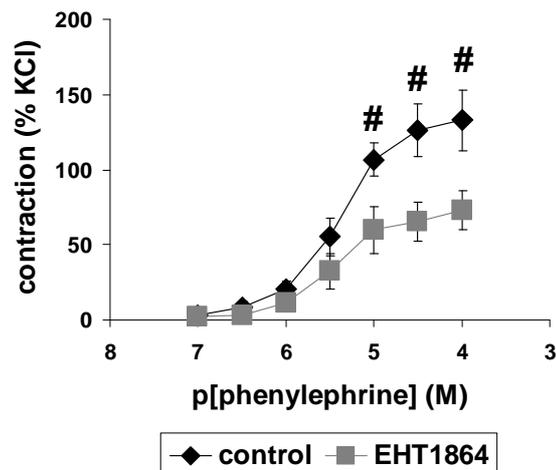
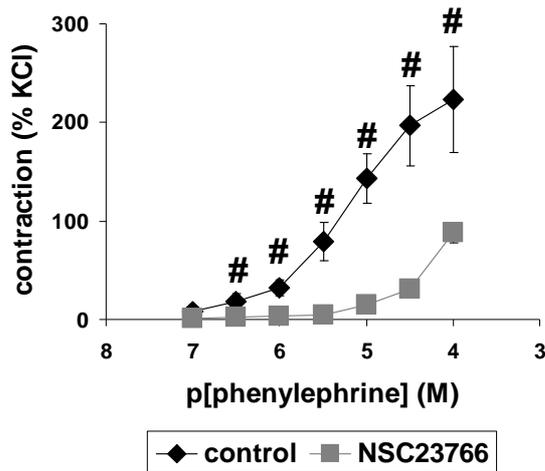
Im Folgenden werden einzelne Projekte beschrieben, welche einen Bezug zum Berichtszeitraum (2014) aufweisen.

Projekt 1: 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 hemmten verschiedene, strukturell nicht näher miteinander verwandte Rac-Inhibitoren (NSC23766, EHT1864) signifikant die Phenylephrin-, Noradrenalin-, und EFS-induzierte Kontraktion von humanem Prostatagewebe. Diese Hemmung fiel vergleichsweise stark aus, und bewegte sich zwischen 40-90 %. Solche Werte sind mit denen für α_1 -Blocker vergleichbar, welche im Organbad meist zu einer 30-80 %igen Hemmung der Kontraktion humaner Prostatagewebe führen. Über Western-Blot Analysen und doppelte Immunfluoreszenz-Färbungen konnte die Expression von Rac im humanen Prostatagewebe detektiert und lokalisiert werden.

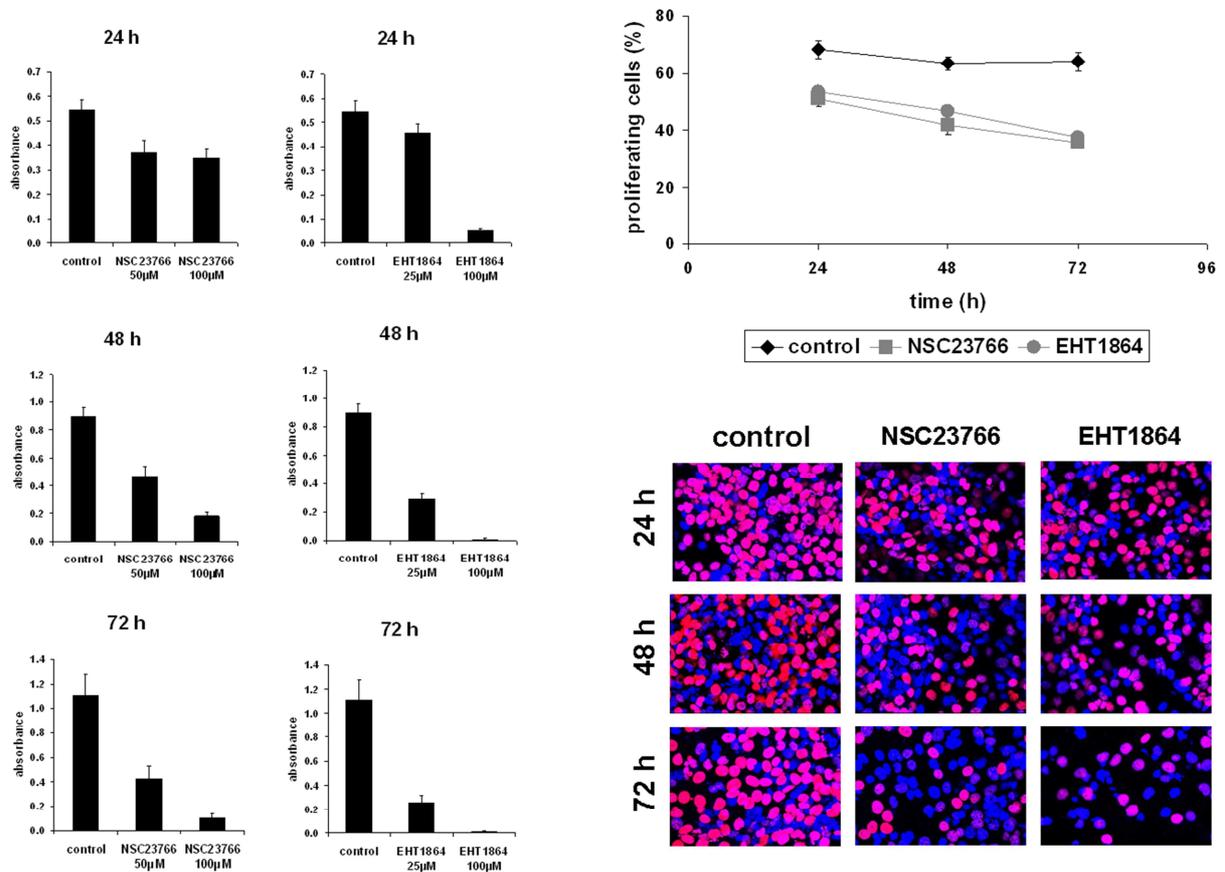
In Zellkultur-Experimenten an WPMY1-Zellen wurden weitere Untersuchungen mit Rac-Inhibitoren vorgenommen. Bei WPMY1-Zellen handelt es sich um eine immortalisierte Zell-Linie aus dem Stroma der nicht-malignen, humanen Prostata. Im Rahmen dieses Projektes wurde gezeigt, dass WPMY1-Zellen α_{1A} -Adrenozeptoren sowie den glattmuskulären Marker Caldesmon exprimieren, was ein wichtiges Muster glatter Muskelzellen der Prostata darstellt. Daher können WPMY1-Zellen als glatte Prostata-Muskelzellen betrachtet werden, oder ähneln solchen zumindest sehr stark. Tatsächlich ist dies der häufigste Zelltyp im Stroma der Prostata. Über *pull-down*-Assays konnte die Hemmung von Rac1 durch NSC23766 und EHT1864 in WPMY1-Zellen nachgewiesen werden.



Hemmung der Prostata-Kontraktion durch die Rac-Inhibitor NSC23766 und EHT1864. Im Organbad wurden der Effekt von NSC23766 (100 μ M) und EHT1864 (100 μ M) auf die Kontraktion von humanem Prostata-Gewebe untersucht. Beide Inhibitoren hemmten Kontraktionen, die durch den α_1 -Agonisten Phenylephrin (oben), durch Noradrenalin (nicht gezeigt), oder durch EFS (unten) ausgelöst wurden. Aus [15].

Über einen CCK-8-Assay wurden die Effekte der Rac-Inhibitoren auf das Überleben der WPMY1-Zellen untersucht („Zytotoxizität“). 24 h nach Inkubation der Zellen mit 50 oder 100 μ M NSC23766 bzw. mit 25 μ M EHT1864 lag der Anteil überlebender Zellen zwischen 64-81 %. 48 bzw. 72 h nach der Inkubation kam es durch beide Inhibitoren zu einer Konzentrations-abhängigen Senkung des Überlebens, mit einer maximalen Überlebensrate von 52 % (50 μ M NSC23766, 48 h), und einer minimalen Überlebensrate von 1 % (100 μ M EHT1864, 48 und 72 h). Über einen fluoreszierenden EdU-Assay wurde der Effekt einer Rac-Hemmung auf die Proliferation der verbleibenden Zellpopulationen untersucht. NSC23766 und EHT1864 führten dabei zu einer Senkung der Proliferationsrate der WPMY1-Zellen. Diese Abnahme erfolgte progressiv, da der Anteil proliferierender Zellen nach 72 h nach der Inkubation mit einem der Inhibitoren war geringer war als nach 24. Über

Phalloidin-Fluoreszenz-Färbungen (Färbung von Aktin-Filamenten) wurden die Effekte auf das Zytoskelett untersucht. Hierbei führten NSC23766 und EHT1864 zu einer Deorganisation des Zytoskeletts.



Effekte der Rac-Inhibitoren NSC23766 und EHT1864 auf das Überleben und die Proliferationsrate von WPMY1-Zellen. Zytotoxische Effekte wurden über einen CCK-8-Assay bestimmt, und traten insbesondere bei längerer Exposition und höheren Konzentrationen auf (links). In den verbleibenden Zellpopulationen führten beide Inhibitoren zu einer Hemmung der Proliferationsrate, welche über einen EdU-Assay untersucht wurde (rechts). Aus [15]

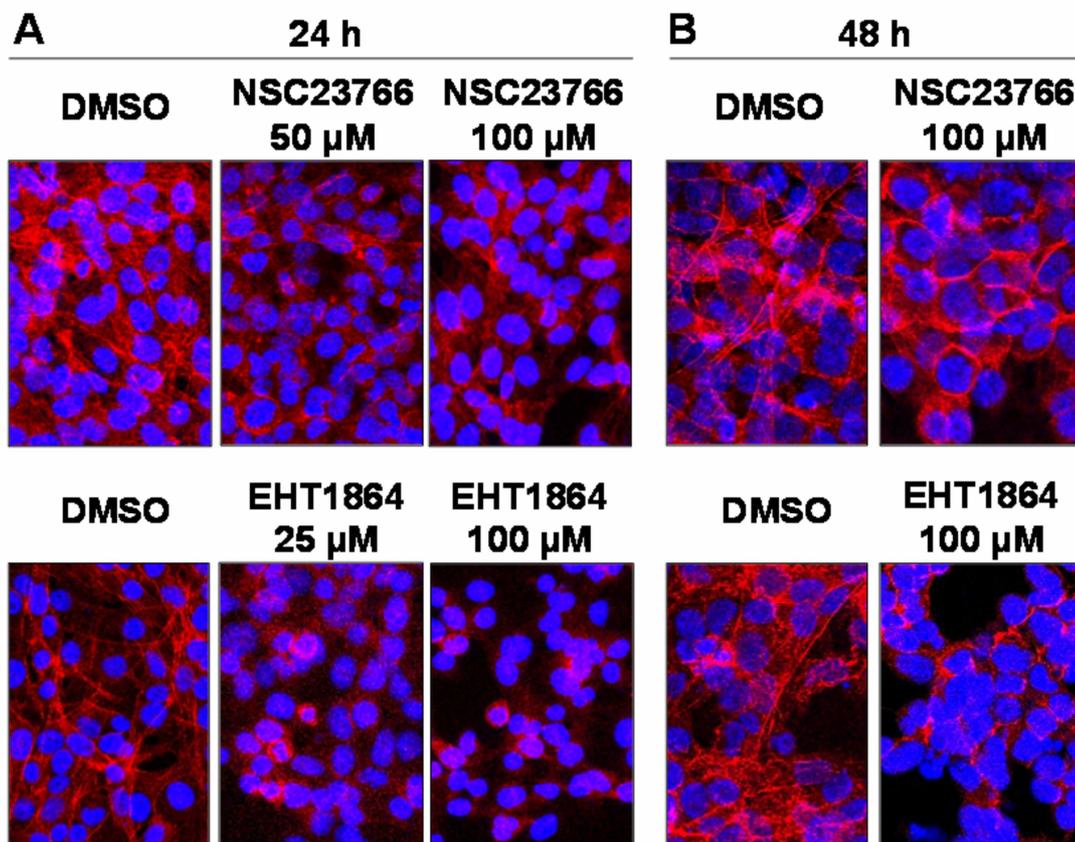
Diese Deorganisation des Zytoskeletts erfolgt vermutlich auch in den Prostatageweben im Organbad, und ist dort wahrscheinlich für die Hemmung der Kontraktion verantwortlich. Tatsächlich sind die Polymerisation von Aktin und die korrekte Organisation der Aktinfilamente Grundvoraussetzung für die glattmuskuläre Kontraktion. Weniger wahrscheinlich erscheint, dass die Hemmung der Kontraktion aus einem sofortigen Absterben der Zellen durch die Rac-Inhibitoren hervorgeht, da das in der Zellkultur ermittelte Überleben der Stromazellen selbst nach 24 noch zwischen 64-81 % lag (s. o.).

Die Ergebnisse aus diesem Projekt legen nahe, dass die Rac-GTPasen einen Link darstellen, welcher die Kontrolle des glattmuskulären Tonus mit der Regulation des Wachstums bzw. der BPH in der Prostata miteinander verbinden (s. „Highlights“). Vermutlich erfolgt beides über die Organisation des Zytoskeletts. Über seine Bedeutung für die glattmuskuläre Kontraktion hinaus ist die Organisation von Aktin-Filamenten tatsächlich auch für die Mitose bzw. Proliferation, und damit für das Wachstum unabdingbar. Es erscheint denkbar, dass Rac durch seinen Einfluss auf

die Organisation des Zytoskeletts sowohl die glattmuskuläre Kontraktion, als auch das (hyperplastische) Wachstum kontrolliert, und beide Komponenten miteinander verknüpft.

Tatsächlich sind beide Faktoren wichtige Angriffspunkte der bedeutendsten medikamentösen Therapien obstruktiver Symptome. Derzeit sind jedoch verschiedene Medikamente bzw. Kombinationstherapien erforderlich, um in beide Prozesse einzugreifen (5 α -Reduktase-Inhibitoren zur Hemmung des Prostata-Wachstums, α_1 -Blocker zur Relaxation der glatten Prostatamuskulatur). Die hier erzielten Daten zeigen, dass beide Vorgänge prinzipiell auch mit einer einzelnen Substanz angegriffen werden könnte.

Diese Ergebnisse wurden 2014 beim „*British Journal of Pharmacology*“ eingereicht, und im Januar 2015 nach umfangreicher Revision zur Veröffentlichung angenommen [15].

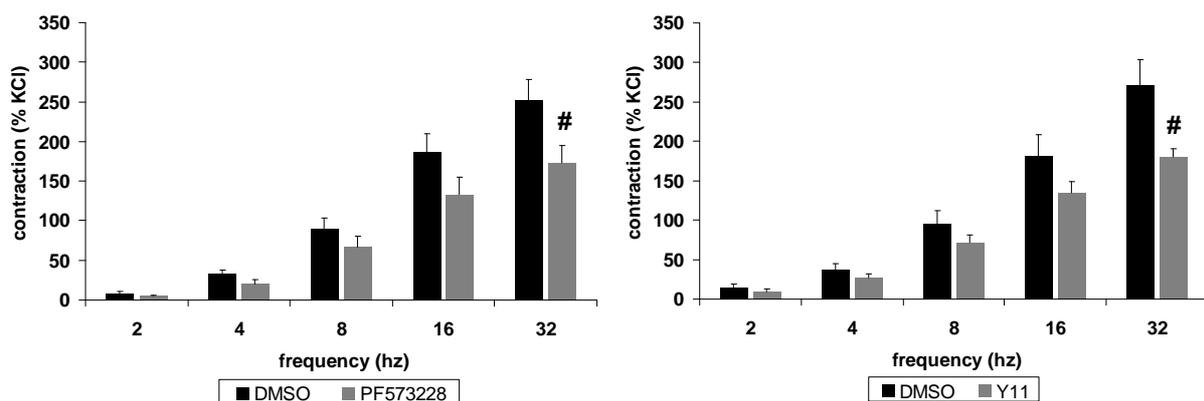


Effekte der Rac-Inhibitoren NSC23766 und EHT1864 auf Organisation von Aktin-Filamenten in WPMY1-Zellen. Polymerisiertes Aktin wurde durch Phalloidin-Färbungen (rote Fluoreszenz) visualisiert. Beide Rac-Inhibitoren führten zu einem Zusammenbruch der Organisation des Aktin-Zytoskeletts. Vermutlich tritt dieser Effekt auch in den Prostata-Geweben im Organbad auf, und ist verantwortlich für die Hemmung der Prostata-Kontraktion durch Rac-Inhibitoren, sowie für die Hemmung der Proliferation (vgl. oben). Offensichtlich verknüpft Rac also die Kontrolle der Proliferation mit der Regulation der Kontraktion in glatten Muskelzellen der Prostata. Aus [15].

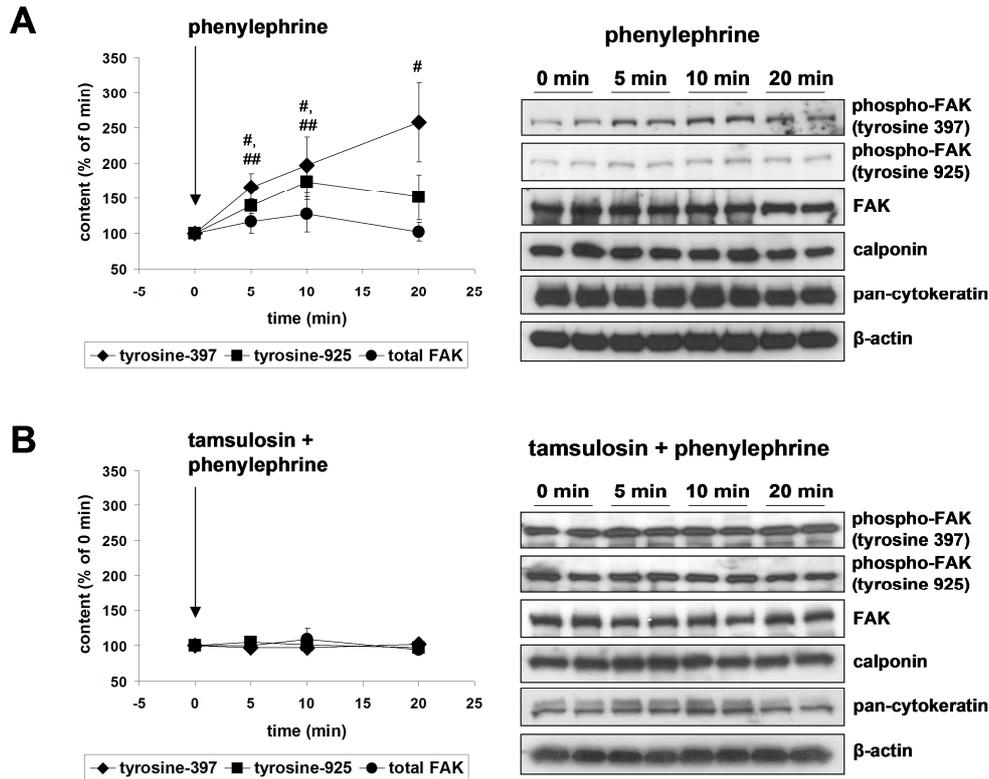
Projekt 2: FAK-vermittelte Kontraktion und Effekte von FAK-Inhibitoren in der humanen Prostata

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 Immunfluoreszenz-Färbungen 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 wider.



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 zudem zu Hemmungen der Noradrenalin- und Phenylephrin-induzierten Kontraktionen [15]. Aus [16].



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 [16].

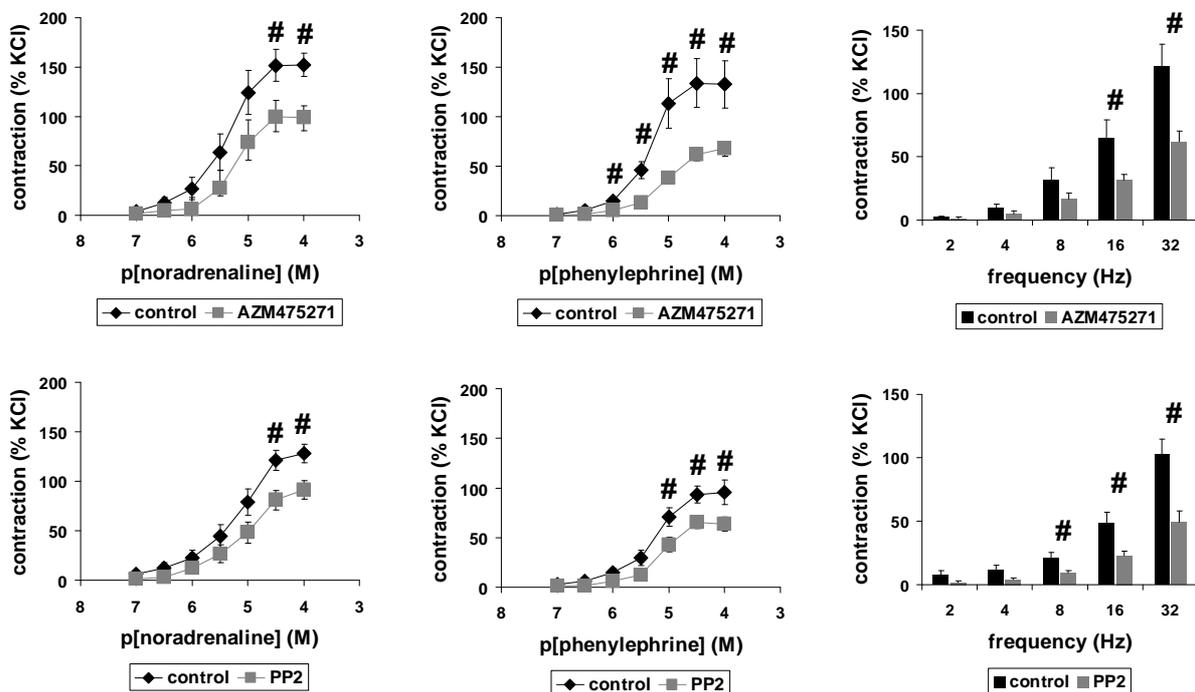
Insgesamt zeigen diese Daten, dass die FAK kritisch an der Regulation des glattmuskulären Tonus in der Prostata beteiligt ist. Zudem wird FAK durch α_1 -Adrenozeptoren aktiviert, was vermutlich von Bedeutung für die intrazelluläre Weiterleitung des kontraktiven Signals durch α_1 -Adrenozeptoren ist. 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.

Diese Ergebnisse wurden 2014 im „*American Journal of Physiology – Renal Physiology*“ publiziert [16].

Projekt 3: Effekte von Src family Kinase-Inhibitoren in der humanen Prostata

Die Mitglieder der Src family kinases (SFKs) umfassen neben der c-Src mind. 8 weitere Mitglieder, und sind in verschiedenen Zelltypen und Organen an zentralen Zellfunktionen, sowie an der Regulation von Zellzyklus, Überleben, Zytoskelett-abhängiger Prozesse beteiligt. Aus dem kardiovaskulären System, gastrointestinalen Trakt und Uterus von Nagetieren bzw. Schweinen wurde zudem eine Rolle der c-Src bei der glattmuskulären Kontraktion bekannt. Dies veranlasste die Arbeitsgruppe, die Effekte von zwei verschiedenen SFK-Inhibitoren (AZM475271, PP2) auf die Kontraktion von humanem Prostatagewebe, sowie in WMPY1-Zellen zu untersuchen.

Im Organbad hemmten sowohl AZM475271 als auch PP2 die Kontraktionen von humanem Prostatagewebe, welche durch Noradrenalin, Phenylephrin, oder EFS ausgelöst wurden. Beide Inhibitoren hemmen ein unterschiedliches Spektrum der SFKs, wobei die Schnittmenge derjenigen Mitglieder, die durch AZM475271 und PP2 gehemmt werden, bei c-Src und Lck liegt. Über Western-Blot-Analysen und RT-PCR konnte die Expression beider Kinasen in Prostata-Geweben aller untersuchten Patienten nachvollzogen werden. Immunfluoreszenz-Färbungen (Doppelfärbungen mit dem glattmuskulären Marker Calponin) zeigten jedoch, dass offensichtlich nur die c-Src, nicht aber Lck in den glatten Muskelzellen der hyperplastischen humanen Prostata vorkommt. Dies führt zu der Vermutung, dass hauptsächlich eine Hemmung der c-Src für die Hemmung der Prostata-Kontraktion im Organbad verantwortlich ist.



Hemmung der Prostata-Kontraktion durch die SFK-Inhibitoren AZM475271 und PP2. Im Organbad wurden der Effekt von AZM475271 (10 μ M) und PP2 (10 μ M) auf die Kontraktion von humanem Prostata-Gewebe untersucht. Beide Inhibitoren hemmten Kontraktionen, die durch Noradrenalin (links), den α_1 -Agonisten Phenylephrin (Mitte), oder durch EFS (rechts) ausgelöst wurden. Daten von Y. Wang (2014), Manuskript in Vorbereitung.

In WPMY1-Zellen wurden über einen CCK-8-Assay wiederum zunächst Untersuchungen zur Zytotoxizität von AZM475271 und PP2 vorgenommen. Das Überleben der Zellen war dabei Konzentrations- und Zeit-abhängig. 24 nach Inkubation mit 10 μM AZM475271 oder PP2 betrug der Anteil überlebender Zellen noch $87\pm 4.1\%$ bzw. $76\pm 4.8\%$. Dieselbe Konzentration senkte das Überleben nach 72 h dagegen auf $27\pm 0.4\%$ or $25\pm 0.9\%$, während 100 μM AZM475271 oder PP2 das Überleben schon nach 24 stündiger Inkubation auf $17\pm 0.8\%$ bzw. $48\pm 5\%$ senkten.

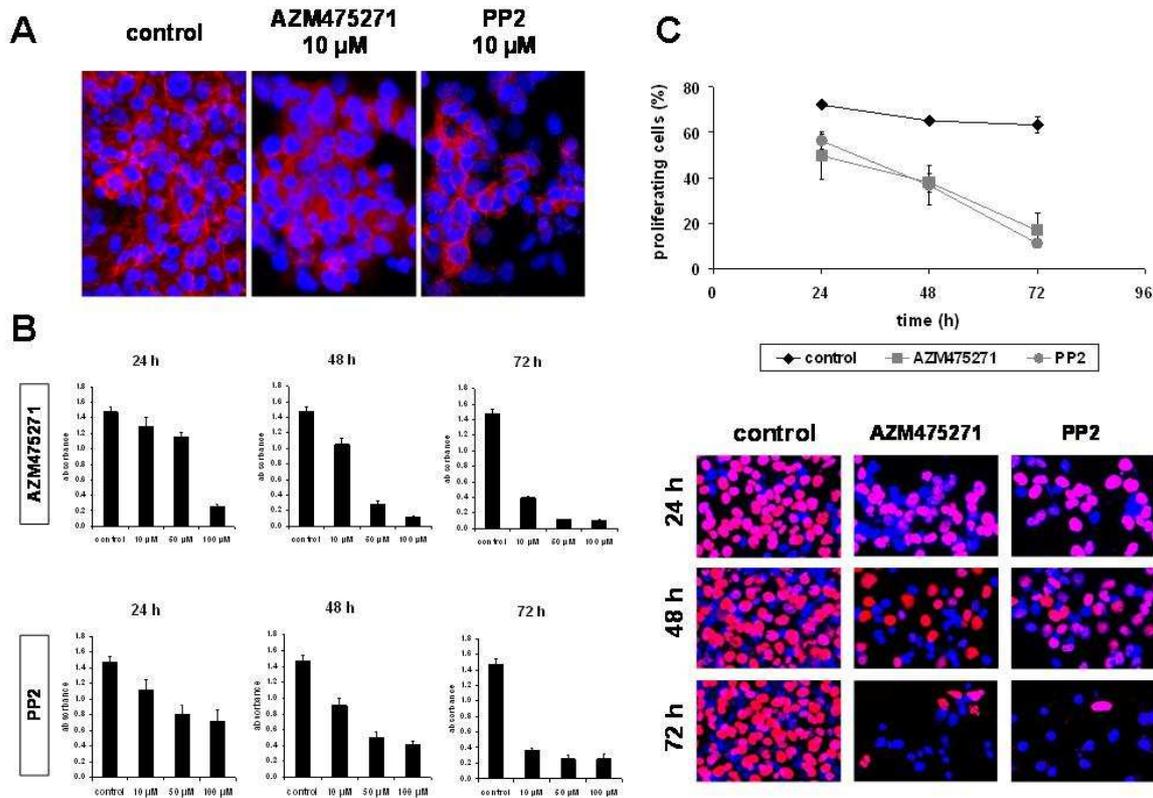
Parallel dazu verminderten beide Inhibitoren auch die Proliferationsrate der verbleibenden Zellen, welche über einen EdU-Assay ermittelt wurde. Dabei wird die Anzahl der proliferierenden Zellen auf die Anzahl aller Zellen (DAPI-Färbung) bezogen, so dass die Proliferationsrate unabhängig von der Gesamtzahl ermittelt werden kann. Bereits in Konzentrationen von 10 μM führten beide Inhibitoren zu einer Senkung der Proliferationsrate, wobei diese Verminderung progressiv auftrat und nach 72 stärker ausfiel als nach 24 (jedoch unverändert über denselben Zeitraum in Kontroll-Zellen ohne Inhibitor).

Über Phalloidin-Färbungen wurde wiederum der Einfluss von AZM475271 und PP2 auf die Organisation der Aktin-Filamente untersucht. Innerhalb von 24 h führte jeder der beiden Inhibitoren in einer Konzentration von 10 μM zu einem Zusammenbruch der Aktinfilamente, bzw. deren Organisation. In Kontroll-Zellen ohne Inhibitor (DMSO für 24 h) waren die Aktin-Filamente zu langen, dünnen Fortsätzen angeordnet, welche einander überlappende Verlängerungen der Zellen bildeten. AZM475271 oder PP2 (10 μM , 24 h) lösten einen vollständigen Zusammenbruch dieser Organisation aus, welcher in einem runden Zelltyp ohne jegliche Fortsätze resultierte.

Ähnlich wie für Rac (s. Projekt 1) führen diese Ergebnisse zur Vermutung, dass SFKs die Kontrolle der glattemuskulären Kontraktion mit der Regulation des Wachstums in der hyperplastischen Prostata miteinander verknüpfen könnten. Unabhängig von jeglichem möglichen translationalen Wert zeigen die Ergebnisse dieses Projekts, dass beide Prozesse durch SFKs aneinander gekoppelt sind. Kontraktion und Proliferation haben gemeinsam, dass sie beide von der korrekten Organisation des Zytoskeletts bzw. der Aktinfilamente abhängen. Die Segregation von Chromosomen während der Mitose erfordert die korrekte Anordnung und Platzierung des Spindelapparates, welcher hauptsächlich aus zytoskelettalen Bestandteilen aufgebaut ist. Die Entstehung der *cleavage furrows* sowie die eigentliche Zellteilung bei der Zytokinese werden wiederum durch einen Apparat aus Aktinfilamenten reguliert. Daher erscheint es nachvollziehbar, dass die Desorganisation der Aktinfilamente durch SFK-Inhibitoren in WPMY1-Zellen von einer Verminderung der Proliferationsrate begleitet war.

Insgesamt erscheint die Idee solcher Verknüpfungen zwischen Kontraktion und Wachstum durchaus attraktiv, da beides wichtige Angriffspunkte für die medikamentöse Therapie obstruktiver Symptome sind. Derzeit sind noch unterschiedliche Medikamente bzw. Kombinationstherapien erforderlich, um beide Faktoren gleichzeitig zu treffen. Die hier erzielten Ergebnisse zeigen abermals, dass es prinzipiell durchaus möglich ist, Kontraktion und Wachstum in der Prostata mit einer einzigen Substanz zu hemmen.

Aktuell wird ein Manuskript erstellt, welches 2015 eingereicht wird (*Nature Medicine*). Die Ergebnisse werden 2015 auf der Jahrestagung der „European Association of Urology“ vorgestellt.

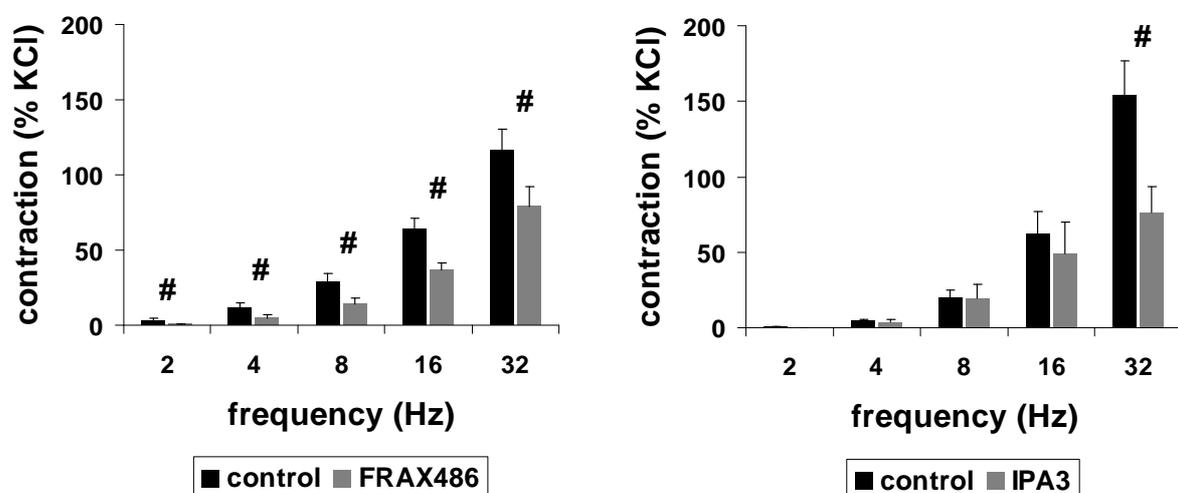


Effekte der SFKc-Inhibitoren AZM475271 und PP2 in WPMY1-Zellen. Polymerisiertes Aktin wurde durch Phalloidin-Färbungen (rote Fluoreszenz) visualisiert (**A**). Beide Rac-Inhibitoren führten zu einem Zusammenbruch der Organisation des Aktin-Zytoskeletts. Zytotoxische Effekte wurden über einen CCK-8-Assay bestimmt, und traten insbesondere bei längerer Exposition und höheren Konzentrationen auf (**B**). In den verbleibenden Zellpopulationen führten beide Inhibitoren zu einer Hemmung der Proliferationsrate, welche über einen EdU-Assay untersucht wurde (**C**). Vermutlich tritt die Deorganisation des Aktin-Zytoskeletts durch SFKc-Inhibitoren auch in den Prostata-Geweben im Organbad auf, und ist verantwortlich für die Hemmung der Prostata-Kontraktion durch, sowie für die Hemmung der Proliferation. Offensichtlich verknüpfen SFKs (ähnlich wie Rac, s.o.!) die Kontrolle der Proliferation mit der Regulation der Kontraktion in glatten Muskelzellen der Prostata.

Projekt 4: Effekte von p21-activated kinase-Inhibitoren in der humanen Prostata

Bei den *p21-activated kinases* (PAK) handelt es sich um Serin/Threonin-Kinasen, welche neben ihrer Bedeutung für verschiedene Funktionen auch an der Regulation der Calcium-unabhängigen Kontraktion der glatten Muskulatur in den Atemwegen und des Gastrointestinaltrakts beteiligt sind. Vorkommen und Bedeutung der PAK in der glatten Muskulatur bzw. Stroma der nicht-malignen, hyperplastischen Prostata sind dagegen unbekannt. In diesem Projekt werden daher die Effekte von PAK-Inhibitoren in humanem Prostatagewebe sowie in WPMY1-Zellen untersucht.

Im Organbad wurde die mögliche Beeinflussung der EFS-, Phenylephrin- und Noradrenalin-induzierten Kontraktion humaner Prostatagewebe durch zwei unterschiedliche PAK-Inhibitoren, FRAX486 und IPA3 untersucht. Sowohl FRAX486 (30 μ M) als auch IPA3 (300 μ M) führten zu Hemmungen der EFS-induzierten Kontraktion. Für FRAX486 wurden signifikante Hemmungen bei 2 Hz ($p < 0,05$ vs. Kontrolle), 4 Hz ($p < 0,05$), 8 Hz ($p < 0,02$), 16 Hz ($p < 0,002$) und 32 Hz ($p < 0,03$) beobachtet. Für IPA3 wurde eine signifikante Hemmung bei 32 Hz ($p < 0,03$) beobachtet. Interessanterweise löste jedoch keiner der beiden Inhibitoren eine Hemmung der Noradrenalin- oder der Phenylephrin-induzierten Kontraktion aus. Dies legt den Schluss nahe, dass es sich bei PAK in der humanen Prostata um einen präsynaptischen Regulator handelt, welcher die Neurotransmission zu den glatten Muskelzellen im Stroma kontrolliert.



Hemmung der Prostata-Kontraktion durch die PAK-Inhibitoren FRAX486 und IPA3. Im Organbad wurde der Effekt von FRAX486 (30 μ M) und IPA3 (300 μ M) auf die Kontraktion von humanem Prostata-Gewebe untersucht. Beide Inhibitoren hemmten Kontraktionen, die durch EFS ausgelöst wurden. Im Gegensatz dazu wurden die Kontraktionen nach endogener Zugabe der Rezeptor-Agonisten Noradrenalin oder Phenylephrin nicht gehemmt (nicht dargestellt). Dies zeigt, dass PAK als präsynaptischer Regulator der Kontraktion agiert, welcher die Kontrolle der Neurotransmission zu den glatten Muskelzellen kontrolliert. Daten von Y. Wang (2014), Manuskript in Vorbereitung.

Über Western-Blot-Analysen war PAK1 in Prostata-Geweben aller untersuchten Patienten detektierbar. Über doppelte Markierungen in Immunfluoreszenzfärbungen zusammen mit Tyrosinhydroxylase, einem Marker für katecholaminerge Neuronen, konnte eine neuronale Lokalisation von PAK1 im Prostatastroma festgestellt werden. Dies unterstützt die aus den Organbadversuchen abgeleitete Hypothese, dass PAK die glattmuskuläre Kontraktion durch eine präsynaptische Regulation der Neurotransmitterausschüttung reguliert. Darüber hinaus war durch Doppelfärbungen mit dem glattmuskulären Marker jedoch auch eine Lokalisation in glatten Muskelzellen festzustellen.

Ende 2014/Anfang 2015 wurden die Effekte von FRAX486 und IPA3 auf WPMY1-Zellen untersucht. Über einen CCK-8-Assay wurden zunächst wieder Untersuchungen zur Zytotoxizität beider Inhibitoren vorgenommen. Das Überleben

der Zellen war dabei Konzentrations- und Zeit-abhängig. In geringer Dosis (1 μM) zeigte IPA3 kaum zytotoxische Effekte (24, 48, 72 h), wohingegen diese bei einer Dosis von 5 μM zunehmend, bzw. bei 10 μM stark ausgeprägt waren. FAX486 reduzierte das Überleben der Zellen in geringer Konzentration (1 μM) in den ersten 48 h etwa um die Hälfte, während bei Konzentrationen von 5-10 μM nach 48-72 h kaum noch Zellen überlebten. Dagegen nahmen beide Inhibitoren nach 24 stündiger Inkubation eher geringen Einfluss auf die Proliferationsrate, so dass diese bei Konzentrationen von 1-10 μM im Vergleich zu Kontrollen lediglich um etwa 30 % gesenkt wurde.

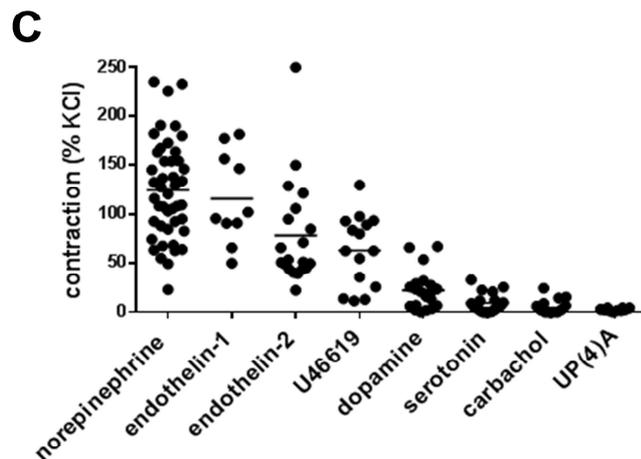
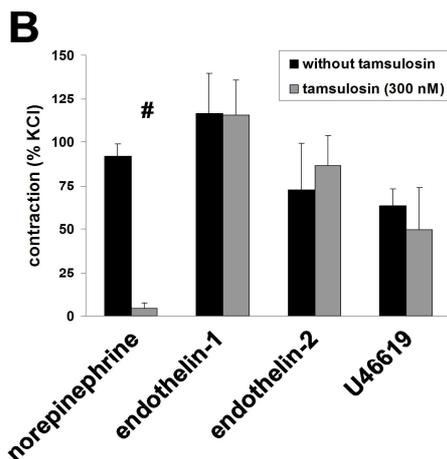
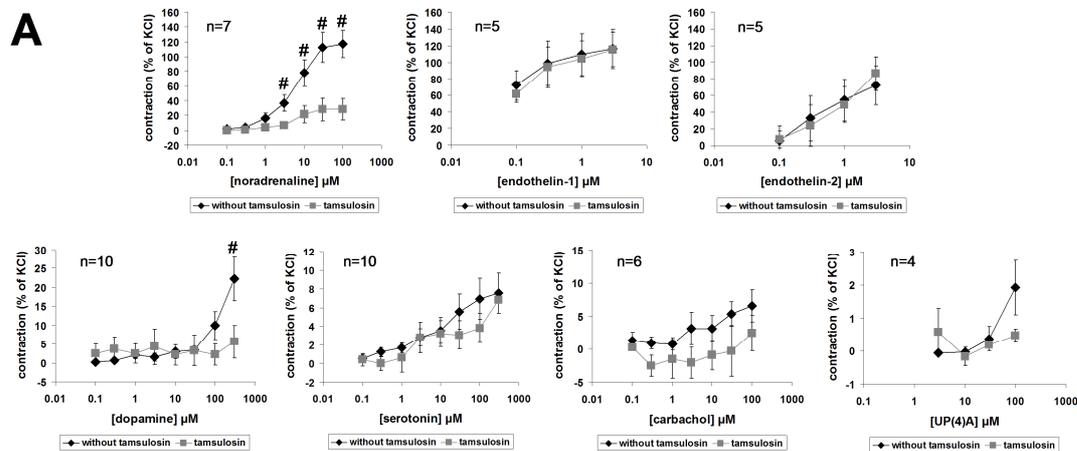
Aktuell wird das Projekt fortgesetzt. Dabei werden zum einen die Effekte von FRAX486 und IPA3 auf die Organisation von Aktinfilamenten (Phalloidinfärbungen) von WPMY1-Zellen, sowie auf die Endothelin-induzierte Kontraktion untersucht. Zum anderen sollen Analysen mit Isoform-spezifischen Primern bzw. Antikörpern (RT-PCR, Western-Blot, Fluoreszenzfärbung) Aufschluss über die Expression der verschiedenen PAK-Isoformen (PAK1-6) geben. Diese Untersuchungen werden 2015 beendet, so dass das Projekt mit einem Manuskript abgeschlossen werden kann. Die bisherigen Ergebnisse werden 2015 auf der Jahrestagung der „*European Association of Urology*“ vorgestellt.

Projekt 5: Bedeutung und Kooperationen nicht-adrenerger Mediatoren der glattemuskulären Kontraktion in der humanen Prostata

Die Kontraktion der glatten Prostata-muskulatur ist ein kritischer Faktor bei der Ätiologie und Therapie obstruktiver Symptome, die sekundär in Folge einer BPH auftreten. Obwohl die Behandlung mit α_1 -Blockern den Goldstandard der medikamentösen Therapie darstellt, sind deren Effekte auf eine maximal 50 %ige Verbesserung der Symptome (IPSS) und urodynamischen Parameter (Q_{max}) beschränkt. Untersuchungen aus der Arbeitsgruppe führten zu der Vorstellung, dass dieses Limit der α_1 -Blocker-Therapie durch den Beitrag nicht-adrenerger Mediatoren der Prostata-Kontraktion erklärt werden kann. Solche Mediatoren können parallel zu α_1 -Adrenozeptoren zu einer Kontraktion der glatten Prostata-muskulatur führen. Zwar wurden verschiedene solcher Mediatoren in der Prostata identifiziert (Thromboxan, Endothelin, und weitere). Deren Bedeutung ist jedoch kaum bekannt, ein Vergleich zur α_1 -adrenergen Kontraktion wurde bestenfalls ausnahmsweise vorgenommen. Zudem wurden die Mediatoren stets isoliert betrachtet; etwaige Kooperationen wurden nicht in Betracht gezogen. *In vivo* jedoch dürften die verschiedenen Mediatoren nicht alleine auftreten, sondern vielmehr gleichzeitig und auch zusammen mit Noradrenalin auf die glatte Prostata-muskulatur einwirken. In diesem Projekt wird die Relevanz verschiedener nicht-adrenerger Mediatoren untersucht, indem ihre kontraktile Effekte mit der α_1 -adrenergen Kontraktion verglichen wurden. Insbesondere werden auch die möglichen kooperativen Effekte und das Zusammenspiel verschiedener kontraktiler Mediatoren beleuchtet.

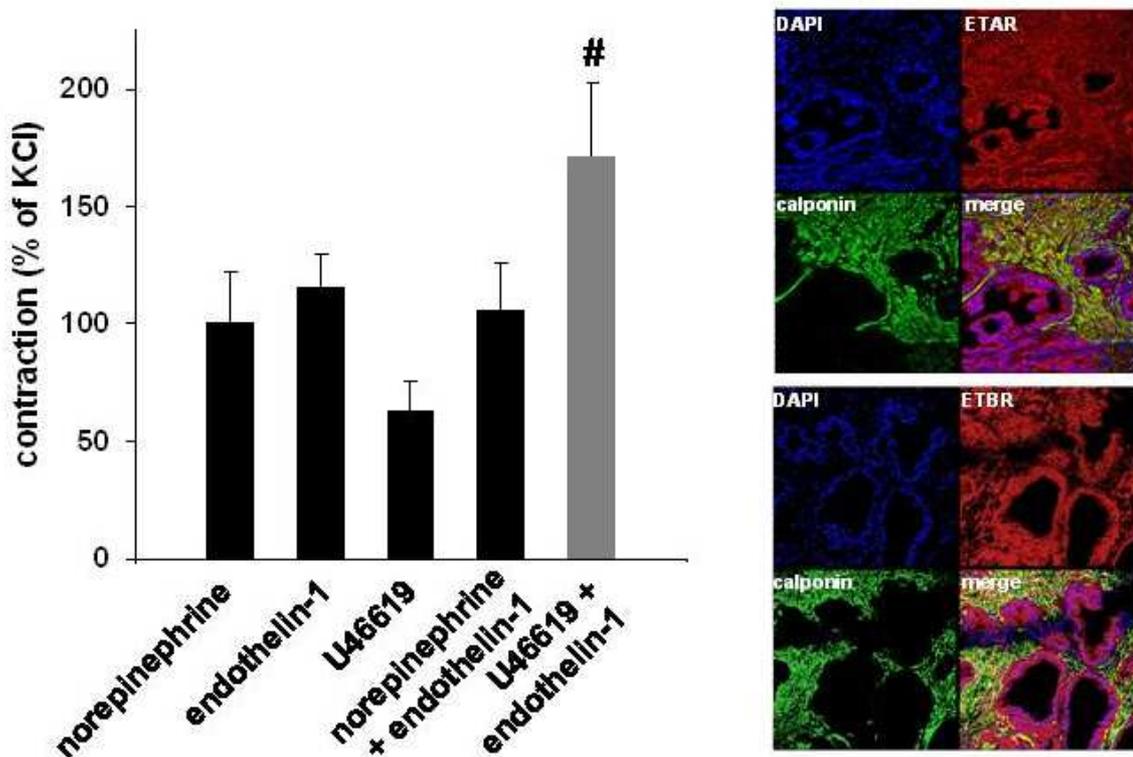
Die maximale Kontraktion humaner Prostata-Gewebe durch Endothelin-1 (ET-1) (0,1-3 μM), Endothelin-2 (ET-2) (0,1-3 μM) sowie Noradrenalin (NA) (0,1-100 μM) war von ähnlicher Stärke (ET-1 116 \pm 23% der KCl-induzierten Kontraktion; ET-2 86 \pm 17%; NA 117 \pm 18%). Die maximale Kontraktion durch das Thromboxan-Analog U46619 (10 μM) betrug im Schnitt etwa 50% der NA-induzierten Kontraktion (63 \pm 9% of KCl). Weder die ET-1-, noch die ET-2-vermittelte Kontraktion wurde durch den α_1 -Blocker Tamsulosin (300 nM) gehemmt, während die NA-induzierte Kontraktion fast

vollständig, und die U46619-induzierte Kontraktion zumindest teilweise geblockt wurden. Dopamin (0,1-300 μM) und Serotonin (0,1-300 μM) induzierten nur sehr leichte Kontraktionen ($22\pm 4\%$ und $9\pm 2\%$ von KCl), welche von geringer bzw. lokaler (Dopamin) Bedeutung sein könnten. Carbachol, Histamin und Uridin-Adenosin-Tetraphosphat induzierten keine Kontraktionen der Prostatagewebe.



Kontraktion humaner Prostata-Gewebe durch verschiedene Mediatoren. Im Organbad wurden Konzentrations-Wirkungs-Kurven für verschiedene Mediatoren (mit und ohne den α_1 -Blocker Tamsulosin) aufgenommen (A). Die maximalen Kontraktionen wurden miteinander verglichen, und als Mittelwerte \pm SEM (B), bzw. durch Daten aller einzelnen Gewebe und Organbadkanäle (C) dargestellt. Daten von A. Acevedo und A. Tamalunas (2014).

Nach maximaler Vorkontraktion mit NA führte die Applikation von ET-1 zu keiner weiteren Erhöhung des glattmuskulären Tonus. Im Gegensatz dazu waren die Kontraktionen durch ET-1 (3 μM) und U46619 (10 μM) jedoch additiv, so dass der Tonus nach kombinierter Anwendung von ET-1 und U46619 ($172\pm 25\%$ von KCl) höher war als die maximale NA-induzierte (100 μM) Kontraktion ($p < 0,05$). Sowohl die ET-1-, als auch die ET-2-induzierte Kontraktion der Prostata-Gewebe ließ sich durch Picotamid (vgl. Projekt 6) hemmen.



Kooperationen kontraktile Mediatoren (links) und Expression von ET-Rezeptoren (rechts) in humanem Prostata-Gewebe. Im Organbad wurden Kombinationen aus verschiedenen kontraktile Mediatoren getestet (**links**). Die Kontraktion durch die Kombination des Thromboxan-Analogons U46619 mit Endothelin-1 ist stärker als die α_1 -adrenerge Kontraktion. Dies könnte die limitierten Effekte von α_1 -Blockern bei der LUTS-Therapie erklären. Beide Isoformen des ET-Rezeptors (ETAR, ETBR) werden in glatten Muskelzellen der hyperplastischen Prostata exprimiert (**rechts**). Daten von A. Acevedo und B. Rutz (2014).

Ergänzend zu den funktionellen Organbad-Experimenten wurden Untersuchungen zur Expression der Rezeptoren im Prostata-Gewebe vorgenommen. Beide Isoformen des ET-Rezeptors, ETAR und ETBR, waren über Western-Blot-Analysen in Prostatagewebe aller untersuchten Patienten, bzw. über Fluoreszenzfärbungen (zusammen mit Calponin) in glatten Muskelzellen des Stromas detektierbar. Darüber hinaus wurde die Expression weiterer Rezeptoren dokumentiert (D1DR, SR2A, H2A-R, M3, P2X1, P2X3, P2X5).

Die bisherigen Ergebnisse aus diesem Projekt zeigen, dass Endothelin-1 und -2 für den Tonus der glatten Prostatamuskulatur (und damit möglicherweise auch für die BOO) von ähnlicher Bedeutung wie Noradrenalin sind. Insbesondere wurde beobachtet, dass die kooperativen Effekte von ET-1 und U46619 (also ohne jede Beteiligung von Noradrenalin) die adrenerge Kontraktion sogar übersteigen, was sich nicht durch Tamsulosin hemmen lässt. Dies kann sehr gut erklären, warum die Wirkung von α_1 -Blockern bei der Behandlung obstruktiver Symptome limitiert ist. Picotamid dagegen könnte sowohl die Endothelin- und Thromboxan-induzierte, als auch die Noradrenalin-induzierte Kontraktion hemmen.

Das Projekt wird aktuell fortgesetzt; u. a. erfolgen noch Untersuchungen zu den Effekten von ET-3. Nach Möglichkeit soll auch die Quelle der ET-Freisetzung in der

Prostata identifiziert werden. Unabhängig vom weiteren Verlauf soll jedoch 2015 ein Manuskript über die dann zur Verfügung stehenden Daten verfasst werden.

Projekt 6: Effekte von Picotamid auf die Kontraktion von humanem Blasengewebe

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.

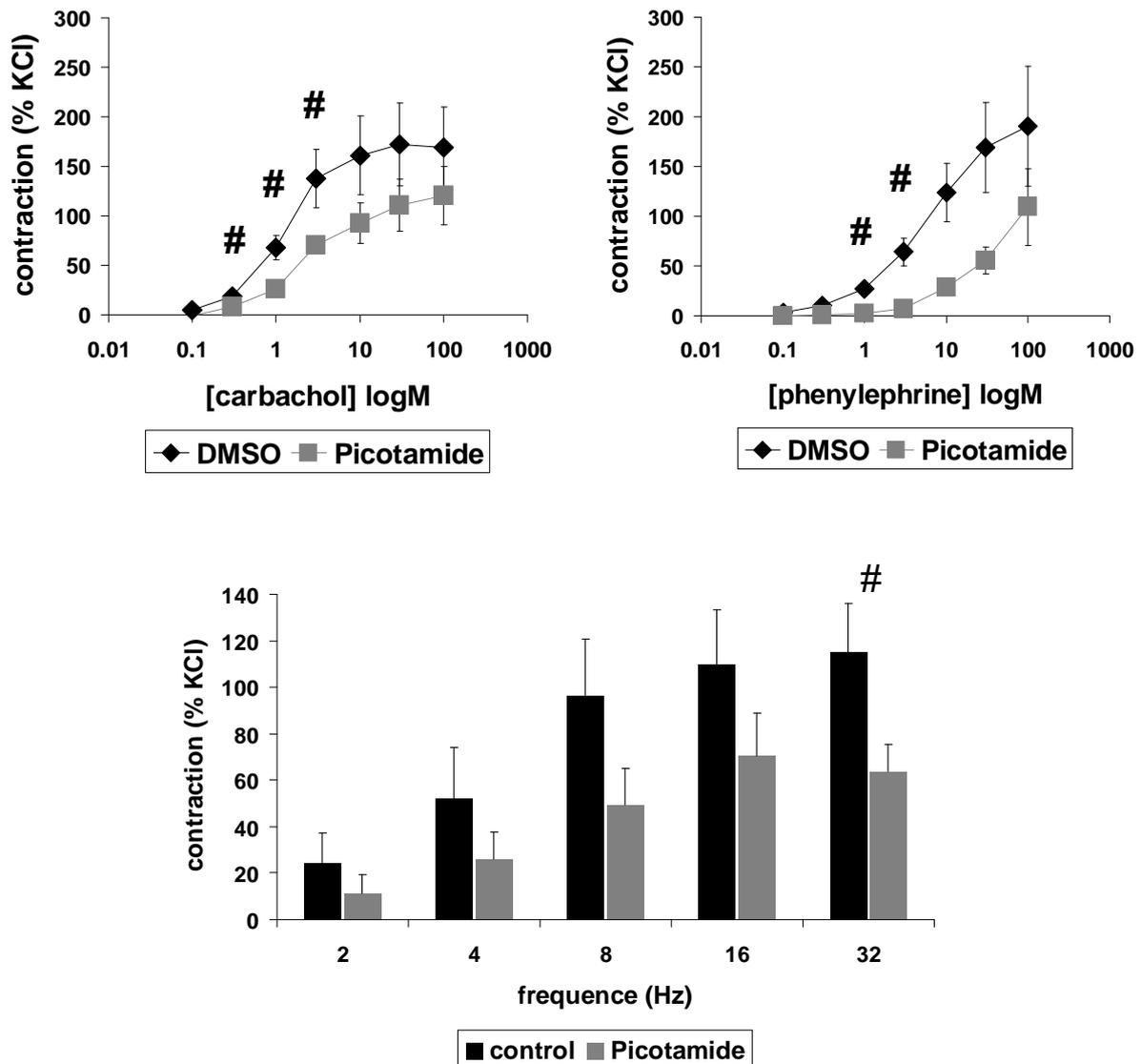
2013 konnte die Arbeitsgruppe zeigen, dass der Thromboxan-Rezeptor- (TXA₂R-) Antagonist Picotamid in der humanen *Prostata* nicht nur die TXA₂-induzierte, sondern auch die adrenerge und EFS-induzierte Kontraktion hemmt [13]. Mit Picotamid stand nun erstmalig ein Antagonist zur Verfügung, der anders als die bislang zugelassenen LUTS-Medikamente gleichzeitig in verschiedene kontraktile Systeme der Prostata eingreifen kann. Da auch die Detrusor-Kontraktion der Blase durch verschiedene kontraktile Systeme kontrolliert wird, scheint es naheliegend, dass Picotamid auch hier die Kontraktion durch verschiedene Mediatoren hemmen könnte. Auf der Basis der vorherigen Ergebnisse aus den Prostata wurde daher ein DFG-Antrag gestellt, welcher bewilligt wurde und bis 2016 läuft (HE 5825/2-1, ca. 141 k€). Dort werden die Effekte von Picotamid auf die Kontraktion von humanem Blasengewebe getestet. Die Bearbeitung dieser Fragestellungen wurde 2013 begonnen.

An Detrusor-Geweben von Patienten, bei denen eine radikale, Tumor-bedingte Zystektomie vorgenommen wurde, werden die Expression des TXA₂-Systems, und die Effekte von Picotamid auf die Kontraktilität untersucht. Verwendet werden Gewebe aus dem Trigonum männlicher Patienten. Im Organbad lösten das Acetylcholin-Analogon Carbachol, sowie der α_1 -Adrenozeptor-Agonist Phenylephrin Konzentrations-abhängige Kontraktionen aus. Diese ließen sich mit Picotamid hemmen. Überdies hemmte Picotamid auch die Frequenz-abhängigen, EFS-induzierten Kontraktionen. Aktuell werden die Effekte auf die Kontraktionen durch das TXA₂-Analogon U46619 untersucht.

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 vorliegt. Über einen EIA konnte das Vorkommen von endogenem TXA₂ in Trigonumgeweben nachgewiesen werden. Da Picotamid in verschiedene kontraktile Systeme der Blase (cholinerge, adrenerge, neurogene 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, und nach Beendigung der noch ausstehenden Versuchsreihe (TXA₂-induzierte Kontraktion) mit einem Manuskript abgeschlossen. Die bisherigen Ergebnisse werden 2015 auf der Jahrestagung der „European Association of Urology“ präsentiert.



Hemmung der Detrusor-Kontraktion durch Picotamid. Im Organbad wurde der Effekt von Picotamid (300 μM) auf die Kontraktion von Blasen-Gewebe aus dem äußeren Trigonum untersucht. Picotamid hemmte die Kontraktion durch den Acetylcholin-Rezeptor-Agonist Carbachol, durch den α₁-Adrenozeptor-Agonist Phenylephrin, sowie durch EFS (n=10 Patienten für Carbachol, n=5 für Phenylephrin, n=9 Patienten für EFS). Daten von A. Schreiber und Y. Wang (2013-14).

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

Als Alternative zu den verschreibungspflichtigen Medikamenten der LUTS-Therapie (α_1 -Blocker, 5 α -Reduktase-Inhibitoren) sind Phytotherapeutika weit verbreitet. Obwohl die Kosten für pflanzliche Präparate nicht 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.

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.

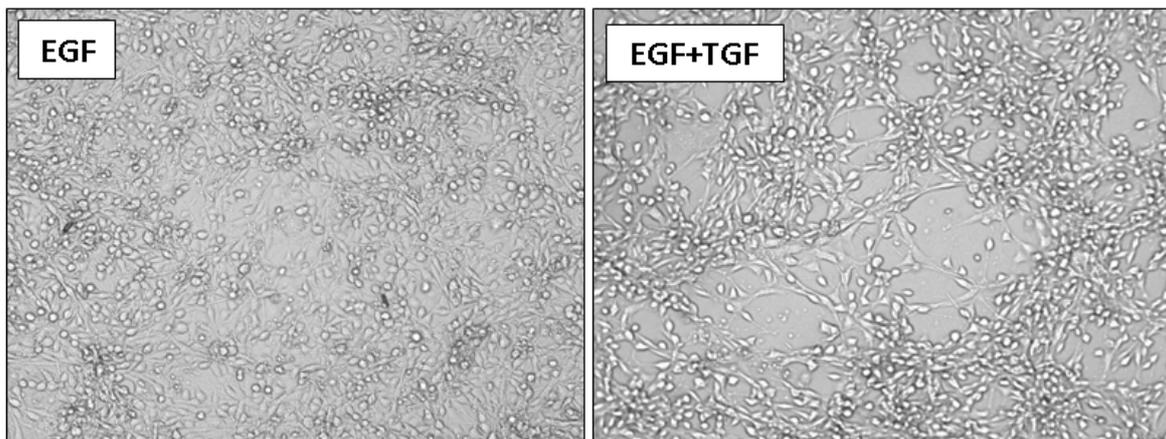
Diese Ergebnisse wurden 2014 in der Fachzeitschrift „*Prostate International*“ publiziert [17].

Projekt 8: Antworten von Stroma-Zellen 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. *In vivo* wirken auf die Stromazellen jedoch wohl kaum einzelne, isolierte Wachstumsfaktoren ein, sondern vermutlich mehrere gleichzeitig. Solche Szenarien wurden in bisherigen experimentellen Ansätzen jedoch nur sehr selten berücksichtigt, und sind daher 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 Prostaten exprimiert werden. Über Immunfluoreszenz konnte die Kolo-kalisation von EGF- und TGF-Rezeptoren in denselben Stromazellen demonstriert werden.

Diese Ergebnisse wurden 2014 in der Fachzeitschrift „*Life Sciences*“ publiziert [18].

Projekt 9: Effekte der Guanylyl-Zyklase Modulatoren BAY41-2272 und BAY60-2770 in Ratten mit experimentell erzeugter BOO

Stickstoffmonoxid (NO) wird von den sog. löslichen Guanylylzyklasen (*soluble guanylyl cyclase*, sGC) gebildet, und führt über die Bildung des sekundären

Botenstoffes cGMP zu einer Relaxation glatter Muskulatur. Phosphodiesterasen (PDEs) wiederum bauen cGMP ab, und leisten so durch die Beendigung des NO-induzierten Signals einen kritischen Beitrag zur Regulation des glattemuskulären Tonus verschiedener Organe. Eine Hemmung der PDEs führt zu einer Akkumulation von cGMP, und folglich zu einer Relaxation glatter Muskulatur. Dies wird bei der LUTS-Therapie mit PDE5-Hemmern ausgenutzt, welche seit einigen Jahren in Europa und den USA zur Behandlung obstruktiver Symptome zugelassen ist.

In diesem Projekt wurden nun die Effekte zwei verschiedener Stimulatoren bzw. Aktivatoren der sGC (BAY41-2272, BAY60-2770) auf die Miktion von PUO-Ratten (s.o.) untersucht, und mit PDE5-Inhibitoren verglichen bzw. kombiniert. Beide Aktivatoren verlängerten die Miktionsintervalle und senkten den Miktionsdruck im selben Ausmaß wie der PDE5-Inhibitor Vardenafil. Die Verabreichung von Vardenafil nach vorheriger Applikation der sGC-Aktivatoren führte zu keinen weiteren Änderungen der Miktionsparameter. Konsequenterweise wurde die Behandlung mit sGC-Aktivatoren als neue, denkbare Strategie zur Behandlung der OAB vorgeschlagen. Die Ergebnisse wurden 2014 in der Fachzeitschrift „*Neurourology and Urodynamics*“ veröffentlicht [19].

Literatur

1. Hennenberg M, Stief CG, Gratzke C. Prostatic α 1-adrenoceptors: new concepts of function, regulation, and intracellular signaling. *Neurourol Urodyn* 2014;33(7):1074-1085.
2. Hennenberg M, Stief CG, Gratzke C. Pharmacology of the lower urinary tract. *Ind J Urol* 2014;30(2):181-188.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. 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.

10. 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.
11. 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.
12. 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.
13. 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.
14. Hennenberg M, Stief CG, Gratzke C. α -adrenergic receptor antagonists as single versus combination therapies in patients with BPH-associated LUTS. *Nat Rev Urol*, in preparation (comissioned review article).
15. Wang Y, Kunit T, Ciotkowska A, Rutz B, Schreiber A, Strittmatter F, Waidelich R, Liu C, Stief CG, Gratzke C, Hennenberg M. Inhibition of prostate smooth muscle contraction and prostate stromal cell growth by the inhibitors of Rac, NSC23766 and EHT1864. *Br J Pharmacol* 2015 [Epub ahead of print].
16. Kunit T, Gratzke C, Schreiber A, Strittmatter F, Waidelich R, Rutz B, Loidl W, Andersson KE, Stief CG, Hennenberg M. Inhibition of smooth muscle force generation by focal adhesion kinase inhibitors in the hyperplastic human prostate. *Am J Physiol Renal Physiol* 2014; 307(7):F823-32.
17. Herrmann D, Schreiber A, Ciotkowska A, Strittmatter F, Waidelich R, Stief CG, Gratzke C, Hennenberg M. Honokiol, a constituent of Magnolia species, inhibits adrenergic contraction of human prostate strips and induces stromal cell death. *Prostate Int* 2014;2(3):140-6.
18. Hennenberg M, Schreiber A, Ciotkowska A, Rutz B, Waidelich R, Strittmatter F, Stief CG, Gratzke C. Cooperative effects of EGF, FGF, and TGF- β 1 in prostate stromal cells are different from responses to single growth factors. *Life Sci* 2014 [Epub ahead of print].
19. Füllhase C, Hennenberg M, Sandner P, Strittmatter F, Niedworok C, Bauer RM, Gratzke C, Soler R, Stief C, Andersson KE. Reduction of obstruction related bladder overactivity by the guanylyl cyclase modulators BAY 41-2272 and BAY 60-2770 alone or in combination with a phosphodiesterase type 5 inhibitor. *Neurourol Urodyn* 2014 [Epub ahead of print].

4. Drittmittel

Die Gesamtsumme der bewilligten Drittmittel der 2014 laufenden (bewilligten) Projekte ist aufgeführt.

#	Drittmittelgeber (Aktenzeichen)	Empfänger	Laufzeit	T€
Laser- Forschungslabor				
1	BMBF (NanoBridge)	Sroka, Fedorov	12-14	8
2	BMBF (Light 4LIFE)	Sroka, Fedorov	12-14	40
3	Firma Nestlé	Stepp	12-15	570
4	Firma Biolitec Pharma	Sroka	14	10
5	Firma Photonamic	Stepp	14	7
6	Heraeus-Stiftung (LIFE-SommerSeminar)	Homann, Sroka	14	2
7	Firma Dornier	Sroka	12-14	15
8	Firma Leica	Stepp, Sroka	13-14	2
9	Firma Biolitec GmbH	Sroka	14-15	10
10	Firma Boston Scientific	Sroka	14-15	30
<i>Summe</i>				694
Labor für Tumorummunologie				
1	„Molekulare und systembiologische Medizin“ der LMU München (17/2012)	Pohla, Zimmermann	13-14	16
2	DFG Transregio (SFB-TR127)	Pohla, Jaeckel	12-16	333
3	China Scholarship Council (CSC)	Pohla	13-15	36
4	„Molekulare und systembiologische Medizin“ der LMU München (17/2013)	Stepp, Zimmermann	14-15	16
<i>Summe</i>				401
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				1.626

5. Ernennungen, Preise, Abschlüsse, Gastaufenthalte

5.1 Laser-Forschungslabor

5.1.1 Ernennungen und Preise

5.1.2 Abgeschlossene Habilitationen, Promotionen und Diplom-Master-Bachelor-Arbeiten

Habilitation

PD Dr. rer. biol. hum. Ronald Sroka

Doktorarbeiten

Dr. rer. biol. hum. Gesa Kniebühler

Dr. rer. biol. hum. Georg Hennig

Diplom-Master-Bachelor-Arbeiten

Dipl.-Phys. Michael Großmann

B.Sc. Frank Dauenhauer

B.Sc. Jens Brehm

B.Sc. Sebastian Fiedler

B.Sc. Matthias Eder

5.1.3 Abgeschlossene Praktika und Gastaufenthalte

Praktikanten

Alexander Eberle

Laura Bienert

Gabriel Scheib

Eduardo Spannaus

Sebastian Wick

Maurice Hermwille

Bjoern Hemb

Gastwissenschaftler

Tugba Kiris

Julia Kuznetsova

Sara Abdel-Hamid

Neda Haj-Hosseini

Nabila Hambdi

5.2 Labor für Tumorimmunologie

5.2.1 Ernennungen und Preise

Preise

Maximilian Gassenmaier, Georg Heberer Award 2014, 10.000 € für die Arbeit:

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).

5.2.2 Abgeschlossene Habilitationen, Promotionen und Diplom-Master-Bachelor-Arbeiten

Medizinische Doktorarbeiten

Dr. med. Dong Chen (Promotion März 2014)

5.3 Experimentelle Urologie

5.3.1 Ernennungen und Preise

Professur

Prof. Dr. med. Christian Gratzke

Preise

PD Dr. med. Frank Strittmatter, Wolfgang-Mauermayer-Preis, 5.000 €

5.3.2 Abgeschlossene Habilitationen, Promotionen und Diplom-Master-Bachelor-Arbeiten

Habilitation

PD Dr. med. Frank Strittmatter

Medizinische Doktorarbeiten

Dr. med. Christer Beckmann

Dr. med. Sebastian Limmer

Dr. med. Josef Miersch

6. Publikationen (Originalarbeiten)

Impaktfaktoren (JIF) von 2013

6.1 Laser-Forschungslabor

1. **Hennig G, Gruber C, Vogeser M, Stepp H, Dittmar S, Sroka R, Brittenham GM.** Dual-wavelength excitation for fluorescence-based quantification of zinc protoporphyrin IX and protoporphyrin IX in whole blood. *J Biophotonics*, 7(7), 514-524 (2014). **JIF₂₀₁₃ 3.856**
2. Trottmann M, **Stepp H, Sroka R, Heide M**, Liedl B, Reese S, Becker AJ, Stief CG, Kölle S. Probe-based confocal laser endomicroscopy (pCLE) - a new imaging technique for in situ localization of spermatozoa. *J Biophotonics* (2014, published online ahead of print), doi: 10.1002/jbio.201400053. **JIF₂₀₁₃ 3.856**
3. Gallwas J, Stanchi A, Dannecker C, Ditsch N, Mueller S, Mortensen U, **Stepp H.** Effect of acetic acid on optical coherence tomography (OCT) images of cervical epithelium. *Lasers Med Sci*, 29(6), 1821-1828 (2014). **JIF₂₀₁₃ 2.419**
4. **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*, 11(3), 307-318 (2014). **JIF₂₀₁₃ 2.524**

5. Eigenbrod S, Trabold R, Brucker D, Erös C, Egensperger R, La Fougere C, Göbel W, **Rühm A**, Kretzschmar HA, Tonn JC, Herms J, Giese A, Kreth FW. Molecular stereotactic biopsy technique improves diagnostic accuracy and enables personalized treatment strategies in glioma patients. *Acta Neurochir*, 156(8), 1427-1440 (2014). **JIF₂₀₁₃ 1.788**
6. Khoder WY, Bader M, **Sroka R**, Stief C, Waidelich R. Efficacy and safety of Ho:YAG laser lithotripsy for ureteroscopic removal of proximal and distal ureteral calculi. *BMC Urol*, 14, 62 (2014). **JIF₂₀₁₃ 1.937**
7. Havel M, Betz CS, Leunig A, **Sroka R**. Diode laser-induced tissue effects: *In vitro* tissue model study and *in vivo* evaluation of wound healing following non-contact application. *Lasers Surg Med*, 46(6), 449–455 (2014). **JIF₂₀₁₃ 2.611**
8. **Rühm A, Baumgartl M, Steigenhöfer D, Pongratz T**, Bader M, Khoder W, **Sroka R**. Investigation of repulsion effects during lithotripsy. *Photonics Lasers Med*, 3(1), 47-55 (2014). **JIF₂₀₁₃ not listed**
9. Khoder WY, Bader MJ, Haseke N, Stief CG, **Baumgartl M, Pongratz T, Sroka R**. *In vitro* comparisons of retropulsion and fragmentation efficacy of 2 cordless, handheld pneumatic and electromechanical lithotripsy devices. *Urology*, 83(4), 726-731 (2014). **JIF₂₀₁₃ 2.132**
10. Gesierich W, Reichenberger F, Fertl A, Häussinger K, **Sroka R**. Endobronchial therapy with a thulium fiber laser (1940 nm). *J Thorac Cardiovasc Surg*, 147(6), 1827-1832 (2014). **JIF₂₀₁₃ 3.991**
11. Stummer W, Tonn JC, Goetz C, Ullrich W, **Stepp H**, Bink A, Pietsch T, Pichlmeier U. 5-Aminolevulinic acid-derived tumor fluorescence: the diagnostic accuracy of visible fluorescence qualities as corroborated by spectrometry and histology and postoperative imaging. *Neurosurgery*, 74(3), 310-319, discussion 319-320 (2014). **JIF₂₀₁₃ 3.031**
12. Bader MJ, **Pongratz T**, Khoder W, Stief CG, Herrmann T, Nagele U, **Sroka R**. Impact of pulse duration on Ho:YAG laser lithotripsy: fragmentation and dusting performance. *World J Urol*, 33(4), 471-477 (2014). **JIF₂₀₁₃ 3.423**
13. **Sroka R, Pongratz T**, Khoder W, Stief CG, Herrmann T, Nagele U, Bader MJ. Impact of pulse duration on Ho:YAG laser lithotripsy: treatment aspects on the single pulse level. *World J Urol*, 33(4), 479-485 (2015). **JIF₂₀₁₃ 3.423**
14. Khoder WY, Stief CG, **Fiedler S, Pongratz T, Beyer W, Hennig G, Rühm A, Sroka R**. *In-vitro* investigations on laser-induced smoke generation mimicking the laparoscopic laser surgery purposes. *J Biophot* (2014, published online ahead of print), doi: 10.1002/jbio.201400061. **JIF₂₀₁₃ 3.856**
15. Schmedt CG, Dikic S, Esipova A, Demhasaj S, Sroka R. Endovenöse Laser Therapie der Varikosis – Evidenz und Perspektiven. *Gefässchirurgie*, 19(7), 622-628 (2014), doi: 10.1007/s00772-014-1355-5. **JIF₂₀₁₃ not listed**

16. Schrözlmaier F, Müller M, **Pongratz T, Eder M**, Johnson T, Vogeser M, von Holzschuher V, Zengel P, **Sroka R**. Laser lithotripsy of salivary stones – correlation with physical and radiological parameters. *Las Surg Med* (2015, published online ahead of print), doi: 10.1002/Ism.22333. **JIF₂₀₁₃ 2.611**

6.2 Labor für Tumorimmunologie

1. **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), 479-486 (2014). *Joint last authors. **JIF₂₀₁₃ 3.753**
2. 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). **JIF₂₀₁₃ 9.809**
3. 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). **JIF₂₀₁₃ 1.798**
4. Heckta T, Bickert T, Jeschkea A, Seitz S, Schulze J, Ito WD, **Zimmermann W**, Amling M, Schinke T, Horst AK and Keller J. Increased osteoclastogenesis in mice lacking the carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1. *PLoS ONE*, 9(12), e114360 (2014). **JIF₂₀₁₃ 3.534**

6.3 Experimentelle Urologie

1. **Wang Y, Kunit T, Ciotkowska A, Rutz B, Schreiber B, Strittmatter F, Waidelich R**, Liu C, **Stief CG, Gratzke C, Hennenberg M**. Inhibition of prostate smooth muscle contraction and prostate stromal cell growth by the inhibitors of Rac, NSC23766 and EHT1864. *Br J Pharmacol* 2015 [Epub ahead of print], doi: 10.1111/bph.13099. **JIF₂₀₁₃ 4.99**
2. **Gratzke C**, Bachmann A, Descazeaud A, Drake MJ, Madersbacher S, Mamoulakis C, Oelke M, Tikkinen KA, Gravas S. EAU Guidelines on the Assessment of Non-neurogenic Male Lower Urinary Tract Symptoms including Benign Prostatic Obstruction. *Eur Urol* 2015 [Epub ahead of print], doi: 10.1016/j.eururo.2014.12.038, pii: S0302-2838(14)01394-3. **JIF₂₀₁₃ 12.48**
3. **Hennenberg M, Schreiber A, Ciotkowska A, Rutz B, Waidelich R, Strittmatter F, Stief CG, Gratzke C**. Cooperative effects of EGF, FGF, and TGF- β 1 in prostate stromal cells are different from responses to single growth factors. *Life Sci* 2015;123:18-24. **JIF₂₀₁₃ 2.538**
4. **Kunit T, Gratzke C, Schreiber A, Strittmatter F, Waidelich R, Rutz B, Loidl W, Andersson KE, Stief CG, Hennenberg M**. Inhibition of smooth muscle force generation by focal adhesion kinase inhibitors in the hyperplastic human prostate. *Am J Physiol Renal Physiol* 2014;307(7):F823-32. **JIF₂₀₁₃ 3.753**
5. **Gratzke C**, Engel J, **Stief CG**. Role of radical prostatectomy in clinically non-organ-confined prostate cancer. *Curr Urol Rep* 2014;15(11):455. **JIF₂₀₁₃ n. a.**

6. **Herrmann D, Schreiber A, Ciotkowska A, Strittmatter F, Waidelich R, Stief CG, Gratzke C, Hennenberg M.** Honokiol, a constituent of Magnolia species, inhibits adrenergic contraction of human prostate strips and induces stromal cell death. *Prostate Int* 2014;2(3):140-6. **JIF₂₀₁₃ n. a.** (published since 2013)
7. **Hennenberg M, Stief CG, Gratzke C.** Prostatic α 1-adrenoceptors: New concepts of function, regulation, and intracellular signaling. *NeuroUrol Urodyn* 2014;33(7):1074-85. **JIF₂₀₁₃ 2.674**
8. 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* 2014;33(8):1251-8. **JIF₂₀₁₃ 2.674**
9. **Hennenberg M, Stief CG, Gratzke C.** Pharmacology of the lower urinary tract. *Indian J Urol* 2014;30(2):181-8. **JIF₂₀₁₃ 0.00**
10. 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* 2014;33(5):566-70. **JIF₂₀₁₃ 2.674**
11. **Gratzke C**, Engel J, **Stief CG.** Role of radical prostatectomy in metastatic prostate cancer: data from the Munich Cancer Registry. *Eur Urol* 2014;66(3):602-3. **JIF₂₀₁₃ 12.48**
12. **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. **JIF₂₀₁₃ 1.747**
13. **Füllhase C**, Soler R, **Gratzke C.** New strategies in treating male lower urinary tract symptoms. *Curr Opin Urol* 2014;24(1):29-35. **JIF₂₀₁₃ 2.115**
14. **Füllhase C, Hennenberg M, Sandner P, Strittmatter F, Niedworok C, Bauer RM, Gratzke C, Soler R, Stief C, Andersson KE.** Reduction of obstruction related bladder overactivity by the guanylyl cyclase modulators BAY 41-2272 and BAY 60-2770 alone or in combination with a phosphodiesterase type 5 inhibitor. *NeuroUrol Urodyn* 2014 [Epub ahead of print], doi: 10.1002/nau.22665. **JIF₂₀₁₃ 2.674**
15. **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. **JIF₂₀₁₃ 3.046**