

## **Toll-like Receptors(TLRs): evolving importance in Health and Diseases**

**F 1**

*O. Ofodile*

Center for Cardiovascular Research (CCR), Institute of Pharmacology & Toxicology, AG: THEURING, Charite-Universitätsmedizin Berlin, Berlin

Inflammation is seemingly symbiotically associated with major side effects of almost every surgery, thereby represents a major problem for the public health. Despite enormous investigative efforts and large resources invested in this area of research in the last decade, the exact source of inflammation, the exact nature of the pathogenic agents responsible for the initiation of inflammation, and both the molecular pathways and the nature of receptors mediating this process are incompletely understood. Now, recent advances have revealed that the major actions of innate immune system, which provides an immediate and first line defense against infection by recognition of pathogen -derived factors by macrophages, are largely managed by a family of transmembrane pattern-recognizing and signal-transducing receptor proteins called, Toll-like receptors (TLRs). About 13 TLRs have been identified to date.

TLRs play a central role in innate immunity for recognizing specific molecular patterns derived from pathogens, including lipids, protein, DNA and RNA, and endogenous ligands ( HSP-60, HSP-70, Heparan sulfate, m-RNA) and small molecular synthetic compounds, thereby presenting TLRs as appealing target for robust pharmacological intervention in pathological conditions in which inflammatory consequences are a greater problem than the threat of infection itself. Hence, increased understanding of the biology and the activities of TLRs may bear relevance to pathology and therapy.

## **Prognostischer Einfluss der Lokalisation des extrazellulären Matrix Metalloproteinase Induzierers (EMMPRIN) in operablen nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen**

**F 2**

*W. Siemel, C. Stremmel, S. Eggeling, W. Jungraithmayr, C. A. Klein, B. Passlick*

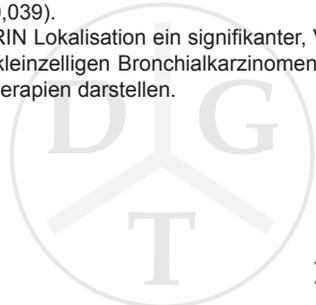
Universitätsklinikum Freiburg, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg, Abteilung Thoraxchirurgie, Freiburg

EMMPRIN steigert die Lokalisation von Matrix Metalloproteinasen an der Oberfläche von Tumorzellen und begünstigt hierdurch ihre Invasion *in vitro*. Ob bei nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen eine membranständige EMMPRIN-Lokalisation besteht und einen prognostischen Effekt hat wurde in der vorliegenden Studie untersucht.

Operationspräparate von 150 Patienten mit nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen wurden mit Hilfe eines kommerziellen anti-EMMPRIN Antikörpers (BD Pharmingen) immunhistochemisch untersucht. Das Färbemuster wurde in membranständig und in zytoplasmatisch eingeteilt. Die Krankheitsverläufe wurden über 10 Jahren im Rahmen der Tumornachsorge erfasst. Prognostische Kovariablen wurden mittels Cox-Regressions-Analyse berücksichtigt.

Eine membranständige EMMPRIN-Lokalisation wurde bei 102 (68,0%) Primärtumoren beobachtet. Es war keine Korrelation zu klinisch-pathologischen Parametern feststellbar. Patienten mit pN0-pN1 Tumoren hatten bei membranständiger EMMPRIN-Lokalisation eine signifikant ungünstige Prognose ( $p=0,029$ ). Eine multivariate Analyse dieser Patienten zeigte, dass die membranständige EMMPRIN-Lokalisation ein unabhängiger prognostischer Parameter ist ( $p=0,039$ ).

Diese Arbeit zeigt erstmals, dass eine membranständige EMMPRIN Lokalisation ein signifikanter, Vorhersagewert für ungünstige Krankheitsverläufe bei frühen nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen ist. EMMPRIN könnte somit ein interessantes Ziel von adjuvanten Therapien darstellen.



## **Durch die Aktivierung von Stress-Kinasen und Caspasen induziert die Kombinationsbehandlung mit dem Histon-Deacetylase-Inhibitor Phenylbutyrat (PBA) und Gemcitabine beim humanen Bronchialkarzinom eine deutliche Steigerung der Zytotoxizität sowohl in vitro als auch in vivo.** **F 3**

*B. Schniewind, R. Kurdow, K. Heintz, H. Kalthoff, P. Dohrmann*

Universität Schleswig-Holstein, Campus Kiel, Klinik für Allgemeine Chirurgie und Thoraxchirurgie, Kiel

Einleitung: Zum besseren Verständnis der Therapieresistenz des Bronchialkarzinoms wurden drei humane Zelllinien in Hinblick auf die Induzierbarkeit des Zelltodes durch Gemcitabine sowie die Modifizierbarkeit durch das klinisch einsetzbare PBA untersucht.

Methoden: Schlüsselproteine der „klassischen“ Apoptose wurden analysiert (Caspase 3, 8, 9, PARP, BID, Cyt-C), die Regulation bekannter endogener Apoptose-Inhibitoren (c-FLIP und IAP-Familie) sowie die Relevanz verschiedener Stress-Kinasen (Akt/PkB, MAPK/ERK1/2, SAPK/JNK, p38 MAPK) wurde überprüft. Weiterhin wurde in einem orthotopen Tiermodell in SCID-bg Mäusen (n=48) die Effizienz eines Kombinationstherapieansatzes überprüft.

Ergebnisse: Gemcitabine als auch PBA induzierten dosisabhängig Apoptose, wobei in Kombination ein deutlicher Synergieeffekt nachweisbar war (Vitalität nach Gemcitabine: 65%, PBA: 78%, Gemcitabine + PBA: 28%). Gemcitabine induzierte die Freisetzung von Cyt-C ins Cytoplasma, die Spaltung von Caspase 3, -9 und PARP, wie es bei „Typ II“ Apoptose bekannt ist. Die Kombination mit PBA führte zusätzlich zur Spaltung von Caspase 8 und BID sowie zur Aktivierung verschiedener Stress-Kinasen. Im orthotopen Mausmodell konnte eine Tumorgößenreduktion von fast 75% bei Kombination von PBA mit Gemcitabine im Vergleich zu Gemcitabine allein erreicht werden (p=0,016).

Zusammenfassung: PBA vermag die Apoptose-Induktion durch Gemcitabine beim Bronchialkarzinom in vitro als auch in vivo z.T. erheblich zu steigern.

## **Welche Referenzgene eignen sich am besten für Expressionsuntersuchungen von Lungentumoren mittels real-time PCR?** **F 4**

*M. Fleischhacker, A. Radonic, J. Hergesell, S. Weickmann, B. Schmidt,*

*F. Schäper, G. Leschber*

Charité Universitätsmedizin Berlin, Med. Klinik II, Onkologie u. Hämatologie, Berlin

Die Methode der quantitativen real-time PCR hat sich als „Goldstandard“ für eine schnelle und zuverlässige Quantifizierung der Genexpression etabliert. Dabei ist die Wahl der verwendeten Referenzgene von entscheidender Bedeutung, da sie idealerweise in normalen und in Tumorzellen in gleicher Weise reguliert werden sollten. Häufig werden bisher die Gene, die für die Glycerinaldehyde 3-phosphate dehydrogenase, für beta-actin und für andere, sogenannte „house-keeping Gene“ kodieren, verwendet. Es stellte sich aber heraus, daß die Verwendung dieser Gene als Referenzgene zu falschen Ergebnissen führen kann, nachdem beobachtet wurde, daß die Transkriptionsregulation durch experimentelle Parameter beeinflusst werden kann. Außerdem konnte gezeigt werden, daß einige dieser Gene in verschiedenen Geweben unterschiedlich reguliert werden.

Für die Untersuchungen wurden Op-präparate von Lungentumoren gewonnen. Gewebe aus der normalen Lunge und dem Tumor wurde in einer Stabilisatorlösung (RNAlater RNA Stabilization Reagent der Firma Qiagen) entsprechend dem Protokoll aufbewahrt. Letztlich wurden diese Proben in kleinere Aliquots zerteilt und bei -80°C gelagert. Es wurde die RNA isoliert, mittels reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben und die Expression einer Palette verschiedener Referenzgene in Normalzellen und im Tumor mittels real-time PCR analysiert. Wir werden die Ergebnisse der Untersuchungen, die die Etablierung eines optimalen Referenzgenpanels zum Ziel hat, vorstellen.

## Pathologisch-anatomische Befunde nach laserinduzierter Thermoablation im ex-vivo-Lungenmodell

F 5

*M. Krismann, U. Laskowski, S. Fillmer, K.-M. Müller, A. Linder*

Institut f. Pathologie der RUB, BG-Kliniken Bergmannsheil Bochum, Bochum

Die laserinduzierte Thermoablation (LITT) kann Bedeutung bei der Metastasentherapie bzw. Patienten mit eingeschränkter Operabilität erlangen. Bislang existieren keine pathologisch-anatomischen Befunde zur Dokumentation der Ergebnisse. Wir stellen Erfahrungen zur Prüfung der Eignung des Verfahrens zur Therapie primärer maligner Lungentumoren und die geweblichen Veränderungen vor. An 8 nicht-kleinzelligen Lungenzinomen wurde nach Resektion eine LITT mittels Sonden im ex-vivo-Lungenmodell (vgl. Abstract Laskowski et al.) appliziert. 9 Vergleichsfälle ohne Lasertherapie nach Perfusion und Ventilation. Die Präparate blieben bis 6 Stunden nach OP im Modell. Die makroskopische und histologische Aufarbeitung erfolgte unter Berücksichtigung der eingeführten Thermoablationssonden und Temperatursonden. Vergleichsfälle mit grundsätzlich erhaltenem Gewebe ohne starke Autolyse, ohne Ödeme. Bis 9x5cm große Tumoren teils mit ausgedehnter spontaner Tumorregression. Bei Tumoren nach LITT 1 Fall mit großer zentraler Zerfallshöhle, ansonsten bräunliche Verfärbung über ca. 1mm. Histologisch bis maximal 2mm in das Gewebe eindringende Koagulations-/ Karbonisationszonen. Bei Applikation im gesunden Parenchym bis 1,5 mm eindringende Karbonisationszone. Keine nennenswerten Blutungen, keine Perforation der Pleura. Grundsätzlich ist das Modell zur Prüfung der Frage geeignet. Die Methode zeigte erwünschte Wirkungen, jedoch sind vor klinischer Anwendung weitere Untersuchungen und Standardisierung erforderlich.

## Interstitielle Laserablation – Experimentelle Temperaturmessung am humanen Ex-Vivo-Lungenmodell

F 6

*U. Laskowski, S. Fillmer, N. Hosten, A. Linder*

Lungenklinik Hemer, Thoraxchirurgie, Hemer

Einleitung: Die Laserablation von Lungentumoren wird als minimal invasive Behandlungsmethode bei funktionell inoperablen Patienten beschrieben. Erste klinische Erkenntnisse über die Laserablation von Lungenmetastasen liegen vor. Über zelluläre oder interstitielle biologische und physikalische Vorgänge gibt es bislang keine Aussagen. Mit dem Ex-Vivo-Lungenperfusionsmodell können erstmals die thermischen Vorgänge in Lungentumoren und im Lungenparenchym zeit- und leistungsabhängig gemessen werden und daraus Rückschlüsse auf die biologische Wirkung gezogen werden.

Methode: Anatomisch resezierte Lungenpräparate werden im ex-vivo-Experiment reperfundiert und beatmet. Bis zu drei Laserfasern werden interstitiell im Tumor platziert. Über die in definiertem Abstand zur Laserfaser eingebrachten Thermoablationselemente wird der Temperaturverlauf während der Laserbestrahlung im Tumor- und Lungengewebe gemessen und online aufgezeichnet.

Ergebnisse: Die Messungen an 20 perfundierten Präparaten haben ein charakteristisches Temperaturverhalten des Gewebes gezeigt, das die reine Wärmeleitung sowie Phasenübergänge plausibel abbildet. Es konnte gezeigt werden, dass die Temperaturentwicklung im Tumorgewebe abhängig von dessen anisotroper Gewebebeschaffenheit bei gleicher Laserleistung variiert. Dennoch gelingt es, die erforderliche Bestrahlungsleistung so zu steuern, dass eine für eine wirksame Therapie definierte Mindest- und Maximaltemperatur im Tumorgewebe erreicht werden.



## L-Arginin verbessert die Funktion der transplantierten Lunge von traumatisierten Organspendern

F 7

G. Preissler, U. Ebersberger, I. Huff, K. W. Jauch, F. Löhe

Klinikum Grosshadern der Universität München, Chirurgische Klinik und Poliklinik, München

Organspender sind häufig Traumapatienten nach hämorrhagischem Schock und Resuscitation (HSR). Ziel war es die Transplantatfunktion derartiger Spenderlungen zu analysieren und festzustellen, wie L-Arginin (L-Arg) den Ischämie-/Reperfusionsschaden (IRS) beeinflusst. An 18 Schweinen wurden Einzellungen-transplantiert. In der Kontrollgruppe (Kon; n=6) wurden die Spenderlungen perfundiert (60 ml/kg, 4° C Perfadex) und entnommen. In der HSR (n=6) und HSR/L-Arg-Gruppe (n=6) wurde den Spendern 40% des Blutvolumens entzogen. Nach 120 min Schock wurde Elektrolytlösung (4x Menge des Blutverlustes) infundiert. Die Entnahme erfolgte nach 180 min Resuscitation. Nach 18 h Konservierung wurde transplantiert und die Funktion (paO<sub>2</sub> [mmHg]) über 6 h untersucht. Die Empfänger erhielten NaCl (Kon/HSR) oder L-Arg (HSR/L-Arg) als Bolus (50ml/kg) plus Infusion (100mg/kg/h) über 2h iv. Am Ende wurde die Transplantatgewichtszunahme bestimmt. Im Vergleich zu Kon (paO<sub>2</sub> [mmHg] 30 min: 437±37, 2h: 444±52, 4h: 464±41, 6h: 481±27) war der paO<sub>2</sub> bei HSR signifikant schlechter (30 min: 229±29\*, 2h: 309±44, 4h: 258±35\*, 6h: 273±20\* mmHg). L-Arg verbesserte den paO<sub>2</sub> (30 min: 420±49, 2h: 462±41, 4h: 458±44, 6h: 425±35 mmHg). Die Transplantatgewichtszunahme ( [%] Kon: 66±12; HSR: 84±24; HSR/L-Arg: 46±17) war tendenziell höher bei HSR. HSR beim Spender verstärkt den ISR in Lungentransplantaten und führt zur Funktionseinschränkung. L-Arg in der Reperfusion verbessert die Transplantatfunktion.

## Neue Konzepte in der Immunsuppression bei Lungentransplantationen-Hemmung des Homings von T-Lymphozyten in den Lymphknoten

F 8

C. Stremmel, W. Jungraithmayr, W. Siemel, Kuchroo, B. Passlick

Universität Freiburg, Thoraxchirurgie, Freiburg

Trotz Verbesserungen in der Strategie zur Immunsuppression von Patienten mit Lungentransplantationen, stellt die Abstoßungsreaktion immer noch ein großes klinisches Problem dar. In einem Tiermodell wurde die Rolle des T-Zellhoming in Lymphknoten und die Auswirkung der T-Zellaktivierung auf das Überleben des Transplantats untersucht.

In diesem Projekt wurden verschiedene Mausestämme verwendet, auf die unterschiedliche allogene Tumoren transplantiert wurden. Das Homing von T-Zellen in Lymphknoten wurde durch PTX (Pertussistoxin) in vivo manipuliert. Darüber hinaus wurden die Mechanismen untersucht, die die Abstoßung durch T-Zellen beeinflussen. Zusätzlich wurde die Wirkung von PTX auf T-Zellen und deren Homing peptidspezifisch in transgenen DO11.10 Mäusen analysiert.

PTX verlängerte dosisabhängig das Überleben der Allotransplantate von 8 auf 42 Tage. Darüber hinaus wurde durch PTX auf T-Lymphozyten der Homingrezeptor CD62L herunterreguliert. In den DO11.10 transgenen Mäusen konnte peptidspezifisch gezeigt werden, dass PTX behandelte T-Zellen nicht in Lymphknoten einwanderten und dadurch die allospezifischen T-Lymphozyten nicht expandiert werden konnten. Des Weiteren wurde eine Th2 Immunantwort als zusätzlicher Marker für ein Allotransplantatüberleben gefunden.

Die Herunterregulation des Homingrezeptors CD62L und die Induktion einer Th2-Immunantwort in den transplantierten Tieren unterdrückt die akute allogene Abstoßungsreaktion.

## Erfolgreicher intraoperativer Einsatz eines pumpenlosen extrakorporalen Lungenunterstützungssystemes (PECLA)

F 9

*K. Wiebe, M. Arlt, A. Philip, R. Winkler, D. E. Birnbaum*

Klinikum der Universität Regensburg, Klinik für Herz- und Thorax und herznahe Gefäßchirurgie, Regensburg

Einleitung: Ziel dieser Studie war es, das Potential einer extrakorporalen Unterstützung in der Phase der apnoeischen Oxygenierung aufzuzeigen.

Methoden: Verglichen wurde die Oxygenation, die CO<sub>2</sub> Elimination und die Hämodynamik mit und ohne PECLA. Bei zwei Patienten, die in der Vorgeschichte pneumorektomiert worden waren, lag die Indikation für eine Resektion an der noch erhaltenen Lunge vor. Nach ausreichender Voroxxygenierung erfolgte eine apnoeische Oxygenierung bis die Blutgaswerte entgleisten ( pO<sub>2</sub> < 50, pCO<sub>2</sub> > 100). Nach einer Stabilisierungsphase an der Beatmung erfolgte eine erneute Phase der apnoeischen Oxygenierung diesmal mit Verwendung einer PECLA. Diese wurde über die Arterie und Vene in der Leiste eingebracht. Der Fluss über den Oxygenator betrug 1,2 bis 1,6 liter.

Ergebnisse: Die apnoeische Oxygenierung mußte im Mittel nach 26 (25-27) min aufgrund einer progredienten Hyperkapnie bei ausreichender Oxygenierung abgebrochen werden. Der Einsatz der PECLA führte unter den gleichen Bedingungen aber zu einer Ausdehnung der apnoeischen Oxygenierungsperiode auf 90 (61 –120) min. Abgebrochen wurde bei zu schlechter Oxygenierung. Hämodynamisch wurde der Shuntfluß über den Oxygenator gut vertragen. Das HzV stieg unter der Anwendung der PECLA unter der Verwendung von Noradrenalin um 20 % an.

Schlussfolgerung: Durch eine effektive Elimination des CO<sub>2</sub> über den Membranoxygenator (PECLA) konnte die Zeitdauer einer möglichen apnoeischen Oxygenierung signifikant erhöht werden.

## Funktionell – phenotypisch prognostische Faktoren beim Adenokarzinom im Stadium I

F 10

*T. Szöke, K. Kayser, I. Trojan, G. Kayser, J. Furak, L. Tiszlavicz, J.-D. Baumhäkel, H.-J. Gabius*

Klinik für Chirurgie, Universität Szeged, Ungarn, Szeged

Problemstellung: Bestimmung prognostischer Faktoren beim operierten Lungen –Adenokarzinom im Stadium I mit Hilfe der quantitativen Lektin/Immunohistochemie und der Messung der Tumor – Mikrovaskularisation.

Methoden: In histologischen Schnittpräparaten von 96 radikal operierten Lungenkrebspatienten mit einem Adenokarzinom im Stadium I wurden die Expression von Galektin-1, -3, und Heparin - bindendem Lektin, sowie die Bindung von Galektin-1, -3, CL-16 und Hyaluronsäure ligando/immunohistochemisch untersucht. Die Schnitte wurden qualitativ (gefärbt/nicht gefärbt) und quantitativ unter Anwendung der syntaktischen Strukturanalyse analysiert. Die Mikrogefäße wurden durch Antikörper gegen Faktor VIII-Antigen nachgewiesen und vermessen. Der Zusammenhang zwischen den oben genannten Parametern und dem Überleben der Patienten wurde unter Verwendung der Regressionsanalyse nach Cox sowie nach Kaplan-Meier analysiert.

