

# Ausbildungsinitiative der Deutschen Gesellschaft für Urologie für innovative Forschung

## Workshops 2009

### Einleitung

Die Arbeitsgruppe Urologische Forschung (AuF, <http://www.dgu-forschung.de>) verabschiedete im Oktober 2008 ihre Statuten als Beratungs- und Koordinierungsgremium des Vorstandes der Deutschen Gesellschaft für Urologie (DGU). Die Aufgaben der AuF sind die Förderung der Kommunikation und die Initiierung von Gemeinschaftsprojekten innerhalb der deutschen Urologie und in der Kooperation mit Nachbarfächern und -ländern. Eine Kernkompetenz stellt die wissenschaftliche Fortbildung dar, mit den Zielen Förderung von Kooperationen und wissenschaftlichem Austausch sowie Stärkung des urologischen Forschungsstandortes und des wissenschaftlichen Nachwuchses.

Um die kompetitive und kooperative Forschung national und international auf entsprechend hohem Standard zu führen, hat die AuF 2009 vier 2,5-tägige Workshops in entsprechend renommierten Laboren mit den folgenden Themenschwerpunkten angeboten: "Tumorzellkultur", „Gene silencing“, „Proteomics“ und „Tissue engineering“.

Das Ziel der „Wet-lab-Workshops“ bestand in der Vermittlung theoretischer und praktischer Grundlagen bezüglich der gewählten Hauptthemen und der möglichen Einsatzgebiete der geschulten Methoden sowie die Grenzbereiche ihrer Einsetzbarkeit. Dabei wurden sowohl die

theoretischen Grundlagen gelegt als auch anhand praktischer Durchführung das Erlernte umgesetzt und vertieft.

### „Tumorzellkultur“

#### Invasion, Migration und Angiogenese: Zellkulturkuren für die onkologische Forschung

Basierend auf den Erfahrungen eines Kurses im Rahmen des Weiterbildungsprogramms des Deutschen Prostatakarzinomkonsortiums (DPKK e.V.) hielt Prof. Dr. rer. nat. Gerhard Unteregger im März 2009 in der urologischen Universitätsklinik Homburg/Saar den ersten „Wet-lab-Workshop“ ab.

Grundlage für experimentelle onkologische Forschung sind dynamische Untersuchungssysteme, um von der rein deskriptiven Beurteilung der Malignität zu einem funktionellen Verständnis der unterschiedlichen Formen des Tumorwachstums zu gelangen. Die Mobilität der Tumorzelle vor allem in Kombination mit deren destruktiven invasiven Wachstum und der Vaskularisierung des Tumors sind Prozesse, durch die das Patientenschicksal bestimmt wird und somit Ziel der Target-Therapie darstellen. Bei diesen Vorgängen spielt die zelluläre Umgebung, das Mikromilieu, eine zentrale Rolle: Parakrine Wechselwirkungen durch Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktion sind wesentliche Bestandteile der balancierten Regu-

lation im Normalgewebe. Bei der Tumorgenese gerät diese Wechselwirkung aus dem Gleichgewicht.

Ziel der experimentellen onkologischen Forschung ist es, in einem anspruchsvollen Zellkultursystem diese dynamischen Vorgänge zu simulieren, damit die Faktoren, welche das veränderte Verhalten einer Tumorzelle charakterisieren, erkannt, dokumentiert und ggf. isoliert werden können.

Unter Verwendung verschiedener Tumorzelllinien untersuchten die Kursteilnehmer die Auswirkung unterschiedlicher Beschichtungen auf das zelluläre Wachstum sowohl in der Standardversion auf der 96-Well-Mikrotiterplatte als auch in der direkten Kokultur. Durch einen solchen Versuchsaufbau kann der Einfluss von Fibroblasten auf die Proliferation von Tumorzellen quantitativ bestimmt werden. Diese Informationen können zur quantitativen Bestimmung von Migration und Invasion von Tumorzellen unter Verwendung verschiedener Attractants wie sezernierte Faktoren (SDF1 von Fibroblasten) herangezogen werden. Im Rahmen des „Wet-lab-Workshops“ wurden Migration und Invasion mit der Fluoroblocktechnologie anhand der Propidiumjodidfärbung direkt im Mikroskop als auch mit der Calcein-Färbung als „live cell imaging“ – jeweils als Screeningansatz im 24-Well-Format – indirekt im Reader von den Kursteilnehmern quantitativ bestimmt.

Die Kokultur ist eine Möglichkeit, auf dem Weg zur 3D-Zellkultur, bei der sich parakrine Wechselwirkungen und die Zell-Zell-Interaktion sehr gut in vitro simulieren lassen. Eine echte 3D-Kultur ist z. B. die Bildung von „tube-like structures“ als erster Schritt der Angiogenese, wobei die Menge der entstehenden vernetzten Strukturen der verwendeten humanen Endothelzellen einem direkten Maß für eine pro- bzw. antiangiogenetische Aktivität sezernierter Faktoren entspricht.

Höhepunkt des Workshops stellten die Bildung von 3D-Tumorsphäroiden und die abschließenden histologischen/immunzytochemischen Analysen dieser 3D-Strukturen nach invasivem Wachstum dar.

### „Gene silencing“

#### Funktionelle Analytik von Proteinen mittels si-RNA-Techniken

Resultierend aus der Tumorentwicklung schließt sich die moderne medikamentöse Therapie an, deren „Target-Therapie“ immer stärker im Zentrum der Behandlungsmöglichkeiten verschiedener Krankheiten tritt. Im zweiten „Wet-lab-Workshop“ wurde im Mai 2009 an der Urologischen Universitätsklinik der TU München unter der Leitung von Dr. rer. nat. Roman Nawroth das Verständnis der Rolle, die bestimmte Proteine bei biologischen Vorgängen übernehmen sollte, wie z. B. der Tumorentstehung oder -progression, geschaffen.

Als erfolgreiches Beispiel bietet sich in der Target-Therapie die medikamentöse Blockade des „vascular endothelial growth factor“ (VEGF) an, einem Zelloberflächenprotein, das für die Auslösung der Tumorangio-genese essenziell ist. Um die Entwicklung eines Medikaments oder seine Wirkmechanismen und Erfolgsaussichten präklinisch evaluieren zu können, bedarf es einer gezielten Fragestellung und dem Wissen um entsprechende Methoden zur entsprechenden Beantwortung.

Mit dem Vermitteln des theoretischen und praktischen Hintergrundwissens können unter Verwendung verschiedener experimenteller Methoden zur Charakterisierung Proteine und zelluläre Signalwege beurteilt werden. Mit der Absicht der ge-

zielten Fragebeantwortung des „Wet-lab-Workshops“ wurden drei Themenschwerpunkte erarbeitet:

1. Wahl eines passenden In-vitro-Modellsystems,
2. Möglichkeiten der molekularen Manipulation des Zielproteins,
3. Überblick verschiedener funktioneller Methoden.

Ein In-vitro-System hat immer verschiedene Eigenschaften, die häufig gut charakterisiert sind und damit bei der Wahl z. B. einer bestimmten Zelllinie oder eines Zellsystems helfen. Basiswissen über Charakteristika und Wachstumsbedingungen von Zelllinien sind die Grundlagen zur Auswahl des entsprechenden In-vitro-Modellsystems. Inhaltlich knüpfte dieser Kurs an den vorangegangenen mit dem Hauptaugenmerk auf die Manipulation von Proteinaktivität und Expression an. Dabei wurden die molekulargenetischen Grundlagen und Vor- und Nachteile der Expression rekombinanter und genetisch modifizierter Proteine, aber gleichzeitig der Hintergrund und die praktische Anwendung kleiner RNA (siRNA, miRNA) in Theorie und Praxis vermittelt, mit deren Hilfe Proteine gezielt genetisch ausgeschaltet werden können. Im dritten Teil wurden Methoden und Überprüfung der Expressionseffektivität (DNA/RNA-Konstrukte, Infektions- bzw. Transfektionsmethoden) vorgestellt, mit denen die eigentliche Fragestellung, die Funktion des zu untersuchenden Proteins/Signalweges in der onkologischen Zelle, charakterisiert wird.

Zellreaktionen (Einzelparameter wie Proliferation, Apoptose, Zelladhäsion oder auch Migration) im Kontext zur Funktion eines Proteins/Signalweges ermöglichen Aussagen zu einem neuen potentiellen Therapieansatz.

### „Proteomics“

#### Goldstandards und neue Techniken

Neben der genomischen Ebene ist die Analyse der Proteinexpression wesentlich für die Analyse der veränderten Regulation bei unterschiedlichsten Erkrankungen sowie zur Identifizierung von Biomarkern. Hierzu stehen heute Techniken

zur Verfügung, die einerseits die Definition von spezifischen komplexen Proteinstereotypen und andererseits die Analyse und Quantifizierung einzelner Proteine erlauben.

Im Rahmen des 3. „Wet-lab-Workshops“ wurden in der Klinik und Poliklinik für Urologie des Universitätsklinikums Jena unter der Leitung von Frau PD Dr. med. Kerstin Junker die Vermittlung theoretischer und praktischer Grundlagen der Proteinanalyse, die Einsatzgebiete und auch Grenzen der unterschiedlichen Methoden aufgezeigt.

Zunächst wurden die Möglichkeiten und die sachgemäße Durchführung der Gewebeanalyse für unterschiedliche Gewebearten (Blut, Urin, Gewebeprobe) sowie die Probenaufbereitung vermittelt, da diese Voraussetzungen für qualitativ hochwertige experimentelle Analysen sind. In einem theoretischen Überblick über die aktuell verfügbaren Methoden des Proteinprofiling (Massenspektrometrie, 2D-PAGE, Proteinarrays) wurden die Vor- und Nachteile dieser Techniken bezüglich des Ausgangsmaterials, der zu analysierenden Massenbereiche sowie der Eignung als Hochdurchsatzverfahren für die Identifizierung von klinisch relevanten Biomarkern dargestellt. Anschließend wurden spezifische Aspekte der Durchführung von Massenspektrometrie und bioinformatischen Analysen ausführlich besprochen. Einen breiten Raum nahm die Darstellung und Diskussion verschiedener Techniken zur Validierung und Quantifizierung von Kandidatenproteinen ein (Westernblot, ELISA, Immunhistochemie), die ein wesentlicher Bestandteil der Biomarkeridentifizierung sind. Analog führten die Kursteilnehmer im praktischen Teil verschiedene Arbeitsschritte der genannten Methoden, insbesondere bei der 2D-Gelelektrophorese, beim Westernblot oder bei der Immunhistochemie durch.

### „Tissue engineering“

#### Grundlegende Techniken für regenerative Medizin

Der Bereich „tissue engineering“ hat die Bereitstellung kompatibler und funktionaler Zellen und Gewebe zur Rekon-

struktion oder zum vollständigen Ersatz erkrankter oder funktionsunfähiger Organe zum Ziel. „Tissue engineering“ ist eine etablierte Forschungsrichtung mit dem Potenzial, die chirurgisch-rekonstruktiven Möglichkeiten der Urologie zu erweitern, welches sich mittels bioartifizialen autologen Geweben auf Grund der physiologischen und immunologischen Kompatibilität umsetzen lässt.

In der Urologischen Klinik des Universitätsklinikums Tübingen wurden unter der Leitung von Prof. Dr. med. Karl-Dietrich Sievert und Dr. rer. nat. Gerhard Feil im Oktober 2009 die grundsätzlichen Methoden des „tissue engineering“ im Rahmen des 4. und letzten „Wet-lab-Workshops“ 2009 vermittelt und in praktischen Ansätzen durchgeführt.

Mit dem Überblick über den aktuellen Wissensstand und die Legislative bezüglich des „tissue engineering“ und der damit eng verbundenen Stammzelltherapie erfolgte der Einstieg in die angewandte Materie anhand der Gewinnung, Primärkultur und Propagierung urothelialer Zellen. Die so propagierten Zellen können als Suspension oder als Gewebe stratifiziert entweder solitär oder auf entsprechender Trägersubstanz im Empfänger genutzt werden. Die durchgeführte Markierung der Urothelzellen mit einem fluoreszenten Zellmarker erlaubt ein experimentelles In-vitro- und In-vivo-Tracking und entsprechende Untersuchungen in der zeitlichen Achse. Die Vermittlung der notwendigen praktischen und theoretischen Grundlagen über Kultur, Charakterisierung und Differenzierung mesenchymaler Stammzellen ist die Grundlage für die erfolgreiche Verwendung in der regenerativen Medizin. In anschaulicher Art und Weise wurden die Möglichkeiten stammzellbasierter Therapien und der schwierige Weg von der Etablierung primärer Zellkulturen und deren Weiterentwicklung zu einem Ersatzgewebe mit und ohne Trägermatrizes vermittelt unter der gleichzeitigen Berücksichtigung dieses ggf. auch gemäß GMP einzusetzen.

## Zusammenfassung

Die „Wet-lab-Workshops“ 2009 dienen zur Veranschaulichung der praktischen und damit auch klinischen Relevanz ent-

## Zusammenfassung · Abstract

Urologe 2010 · 49:91–94 DOI 10.1007/s00120-009-2216-9  
© Springer Medizin Verlag 2010

K.-D. Sievert · G. Unteregger · R. Nawroth · K. Junker · C. Becker · B. Wullich ·  
Für die Arbeitsgruppe urologische Forschung (AuF), Beratungs- und Koordinierungsgremium des Vorstandes der Deutschen Gesellschaft für Urologie (DGU)

### Ausbildungsinitiative der Deutschen Gesellschaft für Urologie für innovative Forschung. Workshops 2009

#### Zusammenfassung

Die Arbeitsgruppe Urologische Forschung (AuF) der Deutschen Gesellschaft für Urologie (DGU) hat als Aufgaben die Förderung der Kommunikation und die Initiierung von Gemeinschaftsprojekten innerhalb der deutschen Urologie und in der Kooperation mit Nachbarfächern und -ländern. Seit 2009 organisiert die AuF jährlich „Wet-lab-Workshops“ diesjährig mit den Themen „Tumorzellkultur“, „Gene silencing“, „Proteomics“ und „Tissue engineering“ und dem themenbezogenen Symposium „Urologische Forschung der DGU“ zur engeren Verflechtung von Praxis und Theorie. Dies soll zu einer nachhal-

tigen Qualitätssteigerung des wissenschaftlichen Arbeitens in der Urologie beitragen. Das Erreichen dieser Ziele erscheint dringend notwendig, da Forschung mehr denn je zur Wahrung der Interessen der Urologen in einem zunehmend schwieriger werdenden, gesundheitspolitischen Umfeld unverzichtbar ist.

#### Schlüsselwörter

Ausbildungsinitiative · Förderung der Kommunikation · Initiierung von Gemeinschaftsprojekten · Kooperation mit Nachbarfächern und -ländern

### Educational initiative of the German Society of Urology for innovative research. Workshops 2009

#### Abstract

The tasks of the Working Group on Urological Research (AuF) of the German Society of Urology (DGU) are to support communication and initiation of joint ventures in German urology and to cooperate with associated subjects and neighboring countries. The annual „wet lab workshops“ needs a space between annual and „wet lab workshops“ on the topics of tumor cell culture, gene silencing, proteomics, and tissue engineering and the use instead of annual topic-related symposium „urological research“, organized and carried out by the AuF as of 2009, serve to achieve a close change to closer inte-

gration of praxis and theory. This should contribute to a lasting quality improvement of the scientific work in urology. Accomplishing these objectives seems urgently necessary to preserve the interests of urologists, because more than ever research has become indispensable in an increasingly difficult environment of health care policy.

#### Keywords

Educational initiative · Support of communication · Initiation of joint projects · Cooperation with associated subjects and neighboring countries

Hier steht eine Anzeige.



sprechender Untersuchungsmethoden, die beispielhaft an Projekten der Klinik, die mit diesen Techniken durchgeführt werden, vorgestellt wurden. Neben der Darstellung von spezifischen Fragen zu einzelnen Techniken gaben die Workshops auch die Gelegenheit zum Erfahrungsaustausch zwischen den Teilnehmern und zur Initiierung von Kooperationen zwischen den Arbeitsgruppen.

Anspruch der Workshops ist Methoden für unterschiedliche Fragestellungen kritisch zu beleuchten und hierdurch die Planung von Projekten unter Einbeziehung entsprechender Techniken zu erleichtern und nicht ein breites Spektrum von Methoden innerhalb von 2,5 Tagen komplett zu erlernen.

Für das Jahr 2010 werden wiederum thematisch entsprechende vier „Wetlab-Workshops“ angeboten, die Untersuchungstechniken als Grundlage zur spezifischen Beantwortung wissenschaftlicher Fragestellungen darstellen (<http://www.dgu-forschung.de/workshops.html>):

1. „Tumorzellkultur“:  
Invasion, Migration und Angiogenese
  - Montag, 15. bis Mittwoch, 17. März 2010
  - Urologische Universitätsklinik, Homburg/Saar
  - Kursleitung: Prof. Dr. rer. nat. Gerhard Unteregger
  - 28 CME-Punkte
2. „Funktionelle Proteinanalytik“:  
Methoden der Proteinbiologie/  
Signaltransduktion
  - Montag, 26. bis Mittwoch, 28. April 2010
  - Urologische Universitätsklinik der TU München
  - Kursleitung: Dr. rer. nat. Roman Nawroth
  - 28 CME-Punkte
3. „Proteomics“:  
Goldstandards und neue Techniken
  - Montag, 11. bis Mittwoch, 13. Oktober 2010
  - Urologische Universitätsklinik, Jena
  - Kursleitung: PD Dr. med. Kerstin Junker
  - 29 CME-Punkte

4. „Tissue engineering“:  
Techniken für die regenerative Medizin
  - Dienstag, 09. bis Donnerstag, 11. November 2010
  - Urologische Universitätsklinik, Tübingen
  - Kursleitung: Prof. Dr. med. Karl-Dietrich Sievert, Dr. rer. nat. Gerhard Feil
  - 26 CME-Punkte

### Korrespondenzadresse

**Prof. Dr. K.-D. Sievert**

Klinik für Urologie,  
Eberhard-Karls-Universität Tübingen,  
Hoppe-Seyler-Straße 3, 72076 Tübingen  
[Karl.Sievert@med.uni-tuebingen.de](mailto:Karl.Sievert@med.uni-tuebingen.de)

**Interessenkonflikt.** Der korrespondierende Autor gibt an, dass kein Interessenkonflikt besteht.