



universität  
wien

# DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

„pH-Regulation als neuer Angriffspunkt von Zytostatika  
in Tumorzellen“

verfasst von

Michaela Ganster

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2015

Studienkennzahl lt. Studienblatt: A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt: Diplomstudium Pharmazie

Betreut von: ao. Univ. Prof. Mag. Dr. Walter Jäger



## **Danksagung**

In erster Linie möchte ich mich bei ao. Univ. Prof. Dr. Walter Jäger für die Ermöglichung dieser Diplomarbeit am Department für Pharmazeutische Chemie in der Abteilung Klinische Pharmazie und Diagnostik bedanken.

Ao. Univ. Prof. Dr. Theresia Thalhammer möchte ich für die Bereitstellung meiner Diplomandenstelle am Institut für Pathophysiologie und Allergieforschung im Allgemeinen Krankenhaus (Wien) danken.

Ein Dankeschön gilt auch Assoc. Prof. Gerhard Hamilton, Ph.D., für seine Unterstützung und umfassende Betreuung.

Ein besonderes Dankeschön geht an Lukas Klameth, MSc, der mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand, für die gute Betreuung.

Ich möchte mich auch beim gesamten Laborteam für die angenehme Zusammenarbeit bedanken.

Darüber hinaus möchte ich mich bei meinen Freunden und bei meiner Familie bedanken, ganz besonders bei meinem Freund für seine Unterstützung und Geduld.

Mein größter Dank gebührt meiner Mutter, denn ohne ihre Liebe und ihr Vertrauen in mich hätte ich es nicht geschafft. Danke!



*Ich widme diese Diplomarbeit meinem Vater*



# Inhaltsverzeichnis

<b>Danksagung</b> .....	<b>III</b>
<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>VII</b>
<b>1 Abstract</b> .....	<b>XI</b>
<b>2 Abkürzungen</b> .....	<b>XIV</b>
<b>3 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>3.1 Ovarien</b> .....	<b>1</b>
<b>3.2 Das Ovarialkarzinom</b> .....	<b>1</b>
3.2.1 Epidemiologie .....	1
3.2.2 Ätiologie .....	3
3.2.2.1 Hypothesen zur Entstehung des Ovarialkarzinoms .....	3
3.2.2.2 Erbfaktoren.....	4
3.2.2.3 Risikofaktoren und protektive Faktoren .....	5
3.2.3 Histologische Klassifikation des Ovarialkarzinoms.....	5
3.2.4 Stadienbestimmung–Staging and Grading .....	9
3.2.5 Diagnostik.....	11
3.2.6 Prognose .....	12
3.2.7 Therapie .....	13
<b>3.3 Lunge</b> .....	<b>14</b>
<b>3.4 Das Bronchialkarzinom</b> .....	<b>15</b>
3.4.1 Epidemiologie.....	15
3.4.2 Ätiologie .....	16
3.4.2.1 Risikofaktoren .....	16
3.4.2.2 Genetische Faktoren .....	17
3.4.2.3 Protektive Faktoren .....	17
3.4.3 Histologische Klassifikation des Bronchialkarzinoms .....	17
3.4.4. Stadienbestimmung.....	19
3.4.5 Diagnostik.....	20
	VII

3.4.6 Prognose.....	22
3.4.7 Therapie.....	22
<b>3.5 Zellmetabolismus .....</b>	<b>25</b>
3.5.1 Hypoxie induzierter Faktor 1 – HIF–1 .....	26
3.5.2 pH-Regulation in Zellen .....	27
3.5.3 Carboanhydrase IX (CAIX) .....	29
3.5.3.1 Carboanhydrase IX in gelöster Form–sCAIX .....	30
<b>4 Zielsetzung .....</b>	<b>31</b>
<b>5 Materialien und Methoden .....</b>	<b>33</b>
<b>5.1 Zellkultur .....</b>	<b>33</b>
5.1.1 Zelllinien .....	33
5.1.1.1 Ovarialkarzinomzelllinien.....	33
5.1.1.2 Lungenkarzinomzelllinien .....	35
5.1.2 Zellkulturbedingungen .....	36
5.1.3 Vorbehandlung der Zellen .....	37
<b>5.2 Isolierung der Proteine.....</b>	<b>38</b>
<b>5.3 Proteinquantifizierung .....</b>	<b>39</b>
5.3.1 Theorie .....	39
5.3.2 Durchführung.....	40
<b>5.4 Western Blot .....</b>	<b>40</b>
5.4.1 Theorie .....	40
5.4.2 Durchführung.....	40
5.4.2.1 Probenvorbereitung.....	42
5.4.2.2 LDS–Page, Lithiumdodecylsulfat–Polyacrylamidgelelektrophorese .....	42
<b>5.5 Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay–ELISA für lösliches CAIX .....</b>	<b>44</b>
5.5.1 Theorie.....	44
5.5.2 Durchführung.....	45
<b>5.6. Chemosensitivitätstest .....</b>	<b>45</b>

5.6.1 Theorie .....	46
5.6.2 Durchführung.....	46
<b>6 Ergebnisse.....</b>	<b>47</b>
<b>6.1 Western Blot Analysen.....</b>	<b>47</b>
6.1.1 CAIX–Western Blot der Ovarialkarzinomzelllinien.....	47
6.1.1.1 CAIX–Western Blot von DFX und DFX+C207A behandelten PA1 und OV90 Zellen .....	47
6.1.1.2 CAIX–Western Blot von DFX und DFX+C207A behandelten A2780 und COV362 Zellen .....	48
6.1.1.3 CAIX–Western Blot von DFX und DFX+C207A behandelten ES2, PEO1 und A2780cis Zellen.....	48
6.1.1.4 CAIX–Western Blot von DFX behandelten OV13 und OV15 Zellen.....	49
6.1.1.5 CAIX–Western Blot von DFX behandelten 16074/4, 8669/17 und 12370/57 Zellen .....	50
6.1.1.6 CAIX–Western Blot von DFX behandelten 13914, 13699 und 13699/18 Zellen.....	51
6.1.1.7 CAIX–Western Blot von Cisplatin behandelten ES2 Zellen.....	51
6.1.1.8 CAIX–Western Blot von Topotecan und Etoposid behandelten ES2 Zellen.....	52
6.1.1.9 CAIX–Western Blot von 10µM 5–Aza–2–Deoxycytidin behandelten ES2, OV90, A2780 und 15233 Zellen .....	53
6.1.1.10 CAIX–Western Blot von 10µM 5–Aza–2–Deoxycytidin behandelten PA1, PEO1, CAOV4 und COV362 Zellen .....	53
6.1.2 CAIX–Western Blot der Bronchialkarzinomzelllinien .....	54
6.1.2.1 CAIX–Western Blot von DFX behandelten H417, DMS153, GLC14 und GLC16 Zellen .....	54
6.1.2.2 CAIX–Western Blot von Topotecan und Etoposid behandelten A549 Zellen .....	55
6.1.2.3 CAIX–Western Blot von 10µM 5–Aza–2–Deoxycytidin behandelten GLC14, GLC16, H417 und DMS153 Zellen .....	56
6.1.2.4 CAIX–Western Blot von 1.25µM und 2.5 µM 5–Aza–2–Deoxycytidin behandelten H417, GLC14 und GLC16 Zellen.....	57
<b>6.2 ELISA des löslichen CAIX (sCAIX) .....</b>	<b>58</b>
6.2.1 ELISA des löslichen CAIX (sCAIX)–DFX behandelte Ovarialkarzinomzelllinien.....	58
6.2.2 ELISA des löslichen CAIX (sCAIX) in Ovarialkarzinompatienten .....	59

<b>6.3 Chemosensitivitätstest .....</b>	<b>60</b>
6.3.1 MTT-Test von Ovarialkarzinomzelllinien .....	60
6.3.1.1 MTT-Test von DFX und Cisplatin behandelten PA1 Zellen.....	60
6.3.1.2 MTT-Test von DFX und Cisplatin behandelten A2780 Zellen .....	61
6.3.2 MTT-Test von SCLC-Zelllinien .....	62
6.3.2.1 MTT-Test von DFX und Cisplatin behandelten NCI-H417 Zellen.....	62
6.3.2.2 MTT-Test von DFX und Etoposid behandelten NCI-H417 Zellen.....	63
6.3.2.3 MTT-Test von DFX und Topotecan behandelten NCI-H417 Zellen.....	64
<b>7 Diskussion .....</b>	<b>66</b>
<b>7.1 Western Blot Analysen.....</b>	<b>66</b>
<b>7.2 ELISA der löslichen Carboanhydrase IX (sCAIX) .....</b>	<b>68</b>
<b>7.3 Chemosensitivitätstest .....</b>	<b>68</b>
<b>8 Tabellen und Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>70</b>
<b>8.1 Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>70</b>
<b>8.2 Tabellen.....</b>	<b>71</b>
<b>9 Literaturverzeichnis .....</b>	<b>72</b>
<b>10 Curriculum Vitae.....</b>	<b>84</b>

## 1 Abstract

*Background:* Ovarian carcinoma and lung cancer count to the five deadliest cancer diseases in women. Because of the fact that the symptoms of both carcinoma types are nonspecific, the diagnosis occurs in advanced stages. Only few cases of ovarian cancer are discovered by gynecological examinations. The diagnosis of lung cancer is established frequently at a disseminated stage and therefore one has to expect a poor prognosis, because prognosis is related to the stage of disease. Former therapeutic approaches unsatisfactory, so new therapy strategies and screening methods have to be found. One promising attempt can be pH-regulation as target, because tumor cells shift their entire energy metabolism under hypoxic conditions from respiration to glycolysis.

*Aim:* The aim of the study was to determine whether various chemotherapeutic agents and inhibitors affect the pattern of gene expression and the protein levels of the pH- regulating proteins, especially carbonic anhydrase IX (CAIX).

*Methods:* Ovarian carcinoma cell lines and SCLC (small cell lung cancer) cell lines were treated with desferrioxamine (DFX), cisplatin, etoposide, topotecan and 5-aza-2-deoxycytidine. Protein levels of CAIX were estimated by using Western Blot, while the effect of inhibitors was analysed in chemosensitivity assays. At last, the modified quantities of soluble CAIX was assessed by using ELISA analysis.

*Results:* Using HIF-1 inductor, DFX, hypoxic conditions could be simulated that could be proved by increased expression of HIF-1, also the effect of individual cytostatics could be assigned by decreased expression of cellular CAIX. Furthermore, in all cases an increase of soluble CAIX was observed. In addition, it was recognized that CAIX expression can't be modulated epigenetic by using 5-aza-2-deoxycytidine, nor be influenced by the CAIX inhibitor, C207A.

*Conclusion:* The expression of carbonic anhydrase IX cannot be modulated epigenetic still influenced by the CAIX inhibitor, nevertheless the effect of cytotoxic drugs has been demonstrated, however, further studies are needed, because it is not yet clear whether the cytostatics lead to a decrease in CAIX-expression or to a spin-off of the cellular enzyme, and thus to an increase in sCAIX.

## **Zusammenfassung**

*Hintergrund:* Das Ovarialkarzinom sowie das Lungenkarzinom gehören neben dem Brust-, Pankreas und dem kolorektalem Karzinom zu den fünf tödlichsten Krebserkrankungen bei Frauen. Die Diagnose erfolgt meist in bereits fortgeschrittenen Stadien, da die Symptome besonders beim Ovarialkarzinom oft unspezifisch sind und nur wenige Fälle durch gynäkologische Untersuchungen entdeckt werden. Die Diagnose eines kleinzelligen Bronchialkarzinoms (SCLC) erfolgt oft erst nachdem es bereits metastasiert ist, dadurch ist die Prognose in der Regel schlecht, da die Prognose in Korrelation mit dem Stadium bei der Diagnose steht. Bisher gibt es keine verlässlichen Screening-Methoden zur Früherkennung dieser Krebserkrankungen, außerdem sind die bisherigen Therapieansätze bedingt erfolgreich. Deswegen ist es dringend notwendig neue Therapieansätze und auch Screening-Methoden zu entwickeln. Ein vielversprechender Ansatz könnte in der pH-Regulation liegen. Tumorzellen stellen ihren gesamten Energiestoffwechsel unter hypoxischen Bedingungen, sodass die oxidative Phosphorylierung blockiert wird und als Folge dessen eine erhöhte glykolytische Rate notwendig ist.

*Zielsetzung:* Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, ob verschiedene Chemotherapeutika einen Einfluss auf die Genexpressionsmuster und die Proteinmengen des pH-regulierenden Proteins, Carboanhydrase IX (CAIX), haben.

*Methoden:* Sowohl die Ovarialkarzinomzelllinien als auch die kleinzelligen Bronchialkarzinomzelllinien (SCLC) wurden mit Desferrioxamin DFX, Cisplatin, Etoposid, Topotecan und 5-Aza-2-Deoxycytidin behandelt. Mittels Western Blot wurde der Proteinspiegel von CAIX bestimmt, die Wirkung der Inhibitoren wurde anhand des Chemosensivitätstests beurteilt und mithilfe der ELISA-Analyse wurden die veränderten Konzentrationen des löslichen CAIX erfasst.

*Resultate:* Mithilfe des HIF-1 Induktors, DFX, konnten hypoxische Bedingungen simuliert werden, was sich durch die gesteigerte Expression des HIF-1 beweisen ließ, außerdem konnte die Wirkung der einzelnen Zytostatika auf die Zelllinien durch die Abnahme der Expression des zellulären CAIX belegt werden, des Weiteren wurde in allen Fällen eine Zunahme des löslichen CAIX beobachtet. Zudem wurde erkannt, dass sich die CAIX-Expression weder epigenetisch mit Hilfe des 5-Aza-2-

Deoxycytidin modulieren lässt, noch durch den CAIX–Inhibitor C207A beeinflussen lässt.

*Schlussfolgerung:* Die Expression der Carboanhydrase IX lässt sich weder epigenetisch modulieren noch durch den CAIX–Inhibitor beeinflussen, dennoch wurde die Wirkung der Zytostatika belegt, allerdings sind weitere Studien erforderlich, denn es ist noch nicht klar, ob die Zytostatika zu einer Abnahme der CAIX–Expression führen oder ob es durch sie zu einer Abspaltung des zellulären Enzyms kommt und somit zu einem Anstieg des sCAIX.

## 2 Abkürzungen

Acetyl CoA	Acetyl Coenzym A
ADR	Adriamycin
AJCC	American Joint Committee on Cancer
Akt	Proteinkinase B
ARID1A	AT-rich interactive domain-containing protein 1A
ATP	Adenosin-Triphosphat
AUC	Area under the curve
BCT	Bikarbonat-Transporter-Familie
BRAF	Protoonkogen B-Raf
BRCA 1, 2	breast cancer antigen 1, 2 <i>Brustkrebs Antigen 1, 2</i>
CA125	cancer antigen 125 <i>Krebs Antigen 125</i>
CA	Carboanhydrase
CAIX	Carboanhydrase 9
Cis	Cisplatin
c-Kit	Protoonkogen
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
COX 2	Cyclooxygenase 2
CT	Computertomographie
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EBUS	Endobronchialer Ultraschall
EGF	Epidermale Growth Factor <i>Epidermaler Wachstumsfaktor</i>
ELISA	Enzyme linked Immunosorbent Assay
ErbB	Epidermal Growth Factor Receptor <i>Epidermaler Wachstumsfaktor Rezeptor</i>
FADH <sub>2</sub>	Flavin-Adenin-Dinukleotid
Fe(II)	zweiwertiges Eisen
FIGO	Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique

GAPDH	Glyzerinaldehyd–3–phosphat–Dehydrogenase
GLUT 1, 3	Glukosetransporter 1, 3
H <sup>+</sup>	Wasserstoff, Proton
H <sub>2</sub> O	Wasser
HCO <sub>3</sub>	Bikarbonat
HER 2	Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 <i>Human Epidermaler Wachstumsfaktor Rezeptor 2</i>
HGSC	high grade serous carcinoma <i>hochgradiges seröses Karzinom</i>
HIF-1	Hypoxie induzierter Faktor 1
HRE	Hypoxie Responsives Element
HSP 72, 90	heat shocking protein 72, 90 <i>Hitze Schock Protein 72, 90</i>
IARC	International Agency for Research on Cancer
IASCL	International Association for the Study of Lung Cancer
KRAS	Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
LGSC	low grade serous carcinoma <i>Niedriggradiges seröses Karzinom</i>
LCNEC	large cell neuroendocrine carcinoma <i>Großzelliges neuroendokrines Karzinom</i>
LDCT	low dose Computertomographie <i>Niedrig dosiertes CT</i>
LDH	Laktatdehydrogenase
MCT 4	Monocarboxylat Transporter 4
MEN 1	Multiple endokrine Neoplasie
MLH 1, 3	mismatch–Reparaturgene; MutL homolog 1, 3
MSH 2, 6	mismatch–Reparaturgene; MutS protein homolog 2, 6
mTOR	mammalian Target of Rapamycin
myc	Onkogen
NAD <sup>+</sup>	Nikotinamid–Adenin–Dinukleotid (oxidierte Form)
NADH	Nikotinamid–Adenin–Dinukleotid
NBC 1-4	Natrium–Bikarbonat–Co–Transporter 1-4

NF-κB	Nuklearfaktor κ B
NHE1	Na <sup>+</sup> -H <sup>+</sup> -Austauscher 1
NSCLC	non–small–cell lung carcinoma <i>nichtkleinzelliges Lungenkarzinom</i>
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
ODDD	O <sub>2</sub> -abhängige Abbau Domäne
p53	Tumorsuppressorgen p53
PBS	Phosphate Buffered Saline <i>Phosphatgepufferte Salzlösung</i>
PCI	prophylactic cranial irradiation <i>prophylaktische kraniale Bestrahlung</i>
PKD 1	Pyruvat–Dehydrogenase–Kinase 1
PET	Positronenemissionstomographie
PHD 1, 2, 3	Prolyl–Hydroxylasen 1, 2, 3
pH <sub>e</sub>	extrazellulärer pH
pH <sub>i</sub>	intrazellulärer pH
PMS 1, 2	mismatch–Reparaturgene; PMS protein homolog 1, 2
RNS	Ribonukleinsäure
PTEN	Tumorsuppressorgen
sCAIX	soluble/lösliche Carboanhydrase 9
SCLC	small–cell lung carcinoma <i>kleinzelliges Lungenkarzinom</i>
TGFBR 2	Transforming growth factor, beta receptor 2
VALSG	Veteran’s Administration Lung Cancer Study Group
V-ATPase	vakuoläre Adenosintriphosphatase
VBN	virtuelles bronchoskopisches Navigationssystem
VEGF	vascular endothelial growth factor <i>vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor</i>
VHL	von Hippel–Lindau

## **3 Einleitung**

### **3.1 Ovarien**

Die Ovarien sind mandelförmige Organe, die zu beiden Seiten an der lateralen Wand des kleinen Beckens liegen. Die Oberfläche des Ovars wird von einem einschichtigen platten bis kubischen Epithel mit Mikrovilli bedeckt. Es handelt sich um das Peritonealepithel. (Junqueira et al., 2004) Darunter befindet sich die Tunica albuginea aus dichtem Bindegewebe, jenes geht in das Stroma über. Das Rindenstroma nimmt den größten Teil des Ovars ein und besteht aus einem zellreichen spinozellulären Bindegewebe, worin die Follikel eingebaut sind. Das Mark besteht aus lockerem Bindegewebe mit zahlreichen Blutgefäßen und Nerven, daneben befinden sich die sogenannten Hiluszellen, Follikel hingegen fehlen im Mark. Das Oberflächenepithel des Ovars, auch Müller–Epithel genannt, ist der Ausgangspunkt für epitheliale Tumore des Ovars. Im Zuge der Ovulation können Epithelzellen unter die Oberfläche geraten und Inklusionszysten bilden, sodass davon abgeleitete Tumoren sich auch im Inneren des Organs entwickeln können. (Lüllmann-Rauch, 2012; Ackermann, 2015)

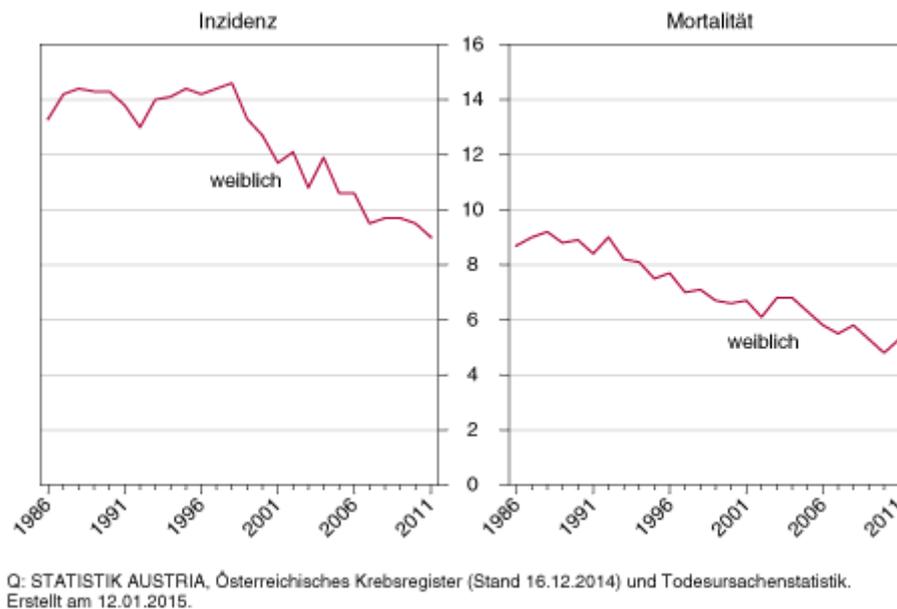
Die Funktionen dieser weiblichen Geschlechtsorgane liegen einerseits in der Bereitstellung von befruchtbaren Eizellen und andererseits in der Produktion der weiblichen Geschlechtshormonen, Östrogen und Progesteron. (Junqueira et al., 2004; Faller et al., 2008; Lüllmann-Rauch, 2012)

### **3.2 Das Ovarialkarzinom**

#### **3.2.1 Epidemiologie**

Das Ovarialkarzinom gehört neben dem Lungen-, Brust-, Pankreas- und kolorektalem Karzinom zu den fünf tödlichsten Krebserkrankungen der Frau und das obwohl diese bösartige Erkrankung nur 3% der Krebsarten beim weiblichen Geschlecht ausmacht. In Österreich steht das Ovarialkarzinom an der achten Stelle aller Krebserkrankungen von denen die weibliche Bevölkerung betroffen ist. An Ovarialkrebs erkrankten 2011 646 Frauen (nach Altersstandardisierung neun von 100.000), 486 starben daran (fünf von 100.000). (Statistik Austria, Krebsinzidenz und Krebsmortalität in Österreich, 2014)

Innerhalb der letzten 10 Jahre sank die altersabhängige Inzidenz um 26% und jene der Sterblichkeit um 21%.



#### Abbildung 1: Bösartige Neubildungen des Eierstockes im Zeitverlauf

Diese Abbildung zeigt die Inzidenz und die Mortalität von Ovarialkarzinom in Österreich zwischen 1986 und 2011. Es lässt sich eine Abnahme der Inzidenz und der Mortalität erkennen. (Statistik Austria, 2015)

Das Durchschnittsalter an diesem Tumor zu erkranken, liegt bei 66 Jahren, wobei auch jüngere Frauen davon betroffen sein können. Ausschlaggebend dafür ist ihre genetische Prädisposition, dennoch wurde belegt, dass die Inzidenz und die Mortalität ab einem Alter von 50 Jahren steigen. (Roett et al., 2009, Statistik Austria, Krebsinzidenz und Krebsmortalität in Österreich, 2014)

Abhängig vom Alter variiert die Prognose, 57% der Frauen unter 65 Jahren leben nach der Diagnose noch weitere 5 Jahre, wohingegen der Prozentsatz bei Frauen über 65 nur mehr bei der Hälfte liegt, nämlich 28%. Insgesamt liegen die 1-, 5-, und 10-Jahres-Überlebensraten für Ovarialkarzinom-Patienten bei 75%, 44%, und 35%. (American Cancer Society–Cancer Facts & Figures, 2014)

Wird das Karzinom noch in der lokalisierten Stufe entdeckt, beträgt die 5-Jahres-Überlebensrate 92%, jedoch werden nur 15% aller Diagnosen in diesem Stadium gestellt. 61% der Fälle werden erst in einem späteren Stadium entdeckt und somit liegt die 5-Jahres-Überlebensrate nur mehr bei 27%. (American Cancer Society–Cancer Facts & Figures, 2014; Ackermann, 2015)

### 3.2.2 Ätiologie

Zum jetzigen Zeitpunkt hat sich noch keine vollständige Klärung bezüglich der Entwicklung eines Ovarialkarzinoms gefunden, neben diversen Hypothesen gibt es auch zahlreiche Risikofaktoren, die eine Entstehung begünstigen können, dazu gehören vor allem die erblich bedingten Faktoren, aber auch der Lebensstil darf nicht außer Acht gelassen werden. (Schorge et al., 2010; Vargas, 2014; Ackermann, 2015)

#### 3.2.2.1 Hypothesen zur Entstehung des Ovarialkarzinoms

**Die Ovulations–Hypothese:** Das Oberflächenepithel macht nur 1% der Gesamtmasse eines Ovars aus, dennoch liegt bei über 90% der Ovarialkarzinome ihr Ursprung darin. Diese Hypothese beruht auf der Belastung des Oberflächenepithels des Ovars durch die wiederholten Rupturen und Reparaturprozesse, die mit jedem ovulatorischen Zyklus einhergehen. Je höher die Gesamtzahl der Ovulationen im Leben einer Frau ist, desto höher ist die Gefahr aufgrund einer Störung des Reparaturmechanismus des Oberflächenepithels ein Karzinom zu entwickeln. Es wurde bewiesen, dass Schwangerschaft, Stillen oder orale Kontrazeptiva das Risiko minimieren, da sie die Ovulation unterdrücken. (Hunn et al., 2012, Montes et al., 2012)

**Die Entzündungshypothese:** Bei dieser Hypothese geht man davon aus, dass es durch physiologische Ovulationen zu Entzündungsprozessen kommt, wobei proinflammatorische Zytokine, die wiederum auf den DNS–Reparaturmechanismus des Oberflächenepithels Einfluss nehmen können, freigesetzt werden. Diese Zytokine sind im epithelalem Ovarialkarzinom deutlich erhöht. Zudem wurde festgestellt, dass eine erhöhte Serumkonzentration von C–reaktivem Protein zu einem anschließend erhöhten Risiko eines Ovarialkarzinoms führt. (Hunn et al., 2012, Montes et al., 2012)

**Die Hormonhypothese:** Das ovarielle Oberflächenepithel exprimiert Rezeptoren für verschiedene Hormone wie das Gonadotropin-Releasing-, das luteinisierende und das follikelstimulierende Hormon, ebenso wie für Östrogen, Androgen und Progesteron. Die Gonadotropin-Hypothese besagt, dass die Exposition gegenüber einer übermäßigen Hormonkonzentration Auslöser einer malignen Transformation des Oberflächenepithels sein kann. Hohe Gonadotropin-Konzentrationen sind charakteristisch bei Menopause, dem polyzystischem Ovarialsyndrom, Behandlungen der Unfruchtbarkeit, niedriger Parität und bei Frauen, die keine oralen Kontrazeptiva nehmen, all diese sind bekannte Risikofaktoren für Ovarialkarzinom. (Levanon et al., 2008) Neben der Gonadotropin–

Hypothese findet sich noch die Androgen/Progesteron–Hypothese, während Progesteron als Schutzfaktor angesehen wird, assoziiert man höhere Konzentrationen von Androgenen mit einer Progression des Ovarialkarzinoms. Die klinischen Ergebnisse und Daten sind nach wie vor umstritten, dennoch werden immer wieder Ergebnisse geliefert, die die Hormonhypothese unterstützen. In zahlreichen Studien ist man zu dem Ergebnis gekommen, dass eine Hormonersatztherapie zu einem ansteigendem Risiko führt, wobei man zwischen einer Östrogentherapie und einer Östrogen–Progesteron–Therapie unterscheidet, da das Risiko bei der Östrogentherapie höher scheint. (Riman et al., 2002; Beral et al., 2007; Choi et al., 2007; Zhou et al., 2008)

**Inklusionszysten–Hypothese:** Inklusionszysten können durch zwei Mechanismen entstehen, erstens kommt es während der Ovulation zu Rupturen des Oberflächenepithels, während diese Verletzungen repariert werden, können Zellen im Cortex eingeschlossen und Inklusionszysten gebildet werden und zweitens können sie durch das Altern der Ovarien entstehen, denn mit zunehmendem Alter wird das Gewebe zerebriform und atrophisch, was wiederum zu Einstülpungen des Epithels und Inklusionszysten führt. Weiters wurde beobachtet, dass Zellen, die in diesen Zysten eingeschlossen sind, eine phänotypische Änderung in Richtung Müller–Epithel ähnlicher Histologie mit anschließender Metaplasie durchmachen und neoplastische Änderungen eingeleitet werden. (Drapkin et al., 2002; Fleming et al., 2006)

### 3.2.2.2 Erbfaktoren

Es ist wissenschaftlich belegt, dass mindestens 10% aller Ovarialkarzinome Folge einer genetischen Prädisposition sind, wohingegen die anderen 80–90% sporadisch auftreten. Zu den drei klinischen Manifestationen der genetischen Prädispositionen gehören *das erblich bedingte Brust– und Ovarialkarzinom–Syndrom, das Lynch–Syndrom, oder ‘hereditäres nicht Polyposis–assoziiertes kolorektales Karzinom* genannt, und zuletzt *das hereditäre ‚sitespezifische‘ Ovarialkarzinom.*

Durch eine Mutation des BRCA1– und BRCA2–Gens kommt es beim erblich bedingtem *Brust– und Ovarialkarzinom–Syndrom* zu einem hohen Risiko an einem Brust– oder Ovarialkarzinom zu erkranken. Auch die Möglichkeit eines Eileiterkarzinoms oder eines primären Bauchfellkarzinoms ist nicht ausgeschlossen. Durch diese Mutation können die Genprodukte nicht mehr ihrer Aufgabe nachgehen und so können sie Zellen nicht mehr vor anormalem Wachstum schützen. Das Risiko einer Karzinomentstehung liegt

zwischen 30–70% bei einer BRCA1 Mutation und zwischen 10–30% bei Frauen mit einer BRCA2 Mutation. Im Vergleich dazu liegt das relative Risiko der Frauen ohne genetischem Defekt bei 1,39%. (Lynch et al., 1993; Mourits et al., 2009; Montes et al., 2012)

Das *hereditäre nicht Polyposis–assoziierte kolorektale Karzinom–Syndrom* wird durch eine Mutation der sogenannten ‚mismatch-Reparaturgenen‘, wie zum Beispiel MLH1, MLH3, MSH2, MSH6, TGFBR2, PMS1 und PMS2 charakterisiert. Patienten mit diesem Syndrom haben ein erhöhtes Risiko für ein Kolonkarzinom, des Weiteren sind 10% aller hereditären Ovarialkarzinome darauf zurückzuführen.

Das *hereditäre ‚sitespezifische‘ Ovarialkarzinom* wird in Verbindung mit einer BRCA1 Mutation gebracht und tritt bei den Ashkenazi Juden zehnmal häufiger auf als bei Frauen anderer Populationen. (Ketabi et al., 2011)

### **3.2.2.3 Risikofaktoren und protektive Faktoren**

Neben den erblichen Risikofaktoren, gibt es noch weitere, die man nicht außer Acht lassen darf. Unter anderem sind Fettsucht und Übergewicht wichtige Faktoren bei der Entstehung und auch bei der Prognose eines Ovarialkarzinoms. Rauchen wird als zusätzlicher Risikofaktor angesehen, da Nikotin und dessen Metabolite in Follikelzellen gefunden wurden. Durch Zigarettenrauch kann es zu einer Änderung des Steroidstoffwechsels kommen, wodurch die Funktionen der Ovarien beeinträchtigt werden. (McLemore et al., 2009; Webb, 2013)

Zu den protektiven Faktoren gehören unter anderem die Anzahl der Schwangerschaften, denn in mehreren Studien wurde belegt, dass kinderlose Frauen einem höheren Risiko ausgesetzt sind, ein Karzinom zu entwickeln als jene, die schwanger waren. Eine Schwangerschaft führt ebenso wie Stillen zur Unterdrückung des Gonadotropins und folglich zu einer Anovulation. In zahlreichen Studien wurde belegt, dass eine langjährige Einnahme von oralen Kontrazeptiva zu einer Risikoverminderung um 30-50% führt. (Hunn et al., 2012; Montes et al., 2012)

### **3.2.3 Histologische Klassifikation des Ovarialkarzinoms**

Das Ovarialkarzinom ist ein Überbegriff für verschiedene Tumore, die im Ovar auftreten können. Sie neigen dazu, aus drei Ursprungsgeweben zu entstehen, 85 bis 95% entwickeln sich aus dem epitheliale Gewebe, 5 bis 8% entstehen aus stromalen und 3

bis 5% aus Keimzellen. Epitheliale Tumore treten primär in einem Alter von über 50 Jahren auf, wohingegen Keimzelltumore hauptsächlich in einem Alter von 15 bis 19 Jahren und auch bei Kindern unter einem Jahr auftreten können. Tumore, die sich aus Stromalen Zellen entwickeln, treten in jeder Altersgruppe auf (Roett et al., 2009)

**Keimzelltumore:** Wie der Name schon vermuten lässt, entsteht dieser Subtyp aus den Keimzellen, die bei der Frau für die Reifung der Eizellen zuständig sind. Die meisten Keimzelltumore sind gutartig und die Prognose der malignen Tumore fällt ziemlich gut aus. Die malignen Tumore lassen sich in vier Subtypen einteilen: Teratom, Dysgerminom, enterodermaler Sinustumor und Chorionkarzinom. (American Cancer Society, 2014)

**Stromatumore:** Stromatumore nehmen mit 1% aller Ovarialkarzinome die seltenste Form ein. Das häufigste Symptom dieses Tumors sind vaginale Blutungen, verursacht durch die Produktion von Östrogen, wobei diese Tumore auch bekannt dafür sind, dass sie ebenso Testosteron sezernieren, was wiederum zu einer Amenorrhoe führt. Die malignen Formen unterteilen sich in Granulosazelltumore, Thekazelltumore und Sertoli-Leydigzelltumore. (American Cancer Society, 2014)

**Epitheliale Tumore:** Die große Mehrheit der Ovarialkarzinome ist auf einen epithelialen Tumor, der zu den tödlichsten gynäkologischen Malignomen zählt, zurückzuführen. Durch molekulargenetische, histopathologische sowie immunhistochemische Analysen werden 5 Haupttypen des epithelialen Tumors unterschieden: *hochgradiges seröses Karzinom*, *niedriggradiges seröses Karzinom*, *muzinöses Karzinom*, *endometrioides Karzinom* und *Klarzell-Karzinom*. Sie machen 98% der Ovarialkarzinome aus. Die histopathologische Unterscheidung ist wichtig, denn sie haben nicht nur verschiedene Zeitspannen, in der sich ein Rezidiv entwickeln kann, sie sprechen auch unterschiedlich auf Chemotherapie und Behandlung an. (Gilks et al., 2009; Mutch et al., 2014)

**Hochgradiges seröses Karzinom (HGSC):** HGSCs entwickeln sich aus intraepithelialen Tumoren, die ihren Ursprung sowohl im Oberflächenepithel als auch in epithelialen Einschlüssen im Eierstock haben können. Sie verfügen über ein breites morphologisches Spektrum, eine auffallend hohe mitotische Teilungsrate und zudem liegen vereinzelte einkernige Riesenzellen vor. Neben einer Mutation des Tumorsuppressorgens p53, die in 80% der HGSCs auftritt, findet man sogenannte *loss of function* Mutationen von BRCA1/2. HGSCs gehören nicht nur zu den häufigsten

epithelialen Tumoren, sondern auch zu den Tödlichsten, was sich auf die späte Entdeckung dieser Tumore zurückführen lässt, meist erst in fortgeschrittenen Stadien, weshalb man auch annimmt, dass sie rasch proliferieren. (Gilks et al., 2009; Vang et al., 2009; Mungenast et al., 2014; Ackermann, 2015)

**Niedriggradiges seröses Karzinom (LGSC):** LGSCs machen weniger als 5% der diagnostizierten Ovarialkarzinome aus. Ihr Ursprung liegt sowohl in gutartigen als auch in Borderline Tumoren. Nach ihrer Manifestation zu invasiven Tumoren besteht die Möglichkeit, dass sie sich zu HGSCs weiterentwickeln. Im Gegensatz zum HGSC kennzeichnen sie sich durch einen langjährigen Krankheitsverlauf mit einer guten Prognose bei frühzeitiger Erkennung. LGSCs unterscheiden sich von den HGSCs in mehreren Kriterien. Mutationen treten hier im BRAF- bzw. KRAS-Gen auf, des Weiteren liegt die mitotische Teilungsrate unter der Rate von HGSCs. In diesen Tumoren findet man eine mikropapilläre Struktur mit häufig auftretenden Psammomkörperchen. Auch die Gleichmäßigkeit der Zellkerne ist ein Hauptkriterium zur Unterscheidung der beiden Tumorarten. (Prat, 2012; Diebold, 2014; Ackermann, 2015)

**Muzinöses Karzinom:** 10 bis 15% aller Ovarialkarzinome sind dem muzinösem Typ zuzuordnen, wobei 80% dieser Tumore gutartig sind. Primäre Tumore beschränken sich auf die Eierstöcke ohne Beteiligung der Ovarialoberfläche oder des Pseudomyxoma peritonei, sie zeichnen sich durch ihre unilaterale Form und einer Größe von über 13cm aus, wohingegen die bilateralen Metastasen einen geringeren Durchmesser aufweisen. Ihr Ursprung ist noch unbekannt, es ist aber wichtig, dass die Tumorzellen denen des Gastrointestinaltraktes bzw. denen der Endocervix ähneln, somit ist eine Differenzierung unumgänglich, da es sich auch um Metastasen ausgehend vom Gastrointestinaltrakt handeln könnte. Muzinöse Tumore sind heterogen und werden in 2 Klassen eingeteilt. Der *Infiltrationstyp* weist eine stromale Invasion in Form von Drüsen, Zellcluster oder vereinzelt Zellen auf, wohingegen der *Expansionstyp* oder auch *sich ausdehnender Tumor* keine stromale Invasion erkennen lässt, aber dennoch Drüsen. Mutationen im KRAS-Gen treten häufig in den frühen Ereignissen der Tumorgenese auf und ein wichtiger Fakt ist auch, dass in über 15% der Fälle ein Anstieg des Wachstumsfaktors HER2 (human epidermal growth factor), festgestellt wurde. (Gilks et al., 2009; Ackermann, 2015)

**Endometrioides Karzinom:** Endometrioides Karzinome sind für 10% der Ovarialkarzinome verantwortlich. Bei ungefähr 40% aller Fälle werden sie mit Endometriose assoziiert, während sie in über 15% der Fälle von einem Endometrium-Karzinom begleitet werden. Sie werden in den meisten Fällen bereits im Stadium I/ II nach FIGO diagnostiziert und treten überwiegend bei peri- und postmenopausalen Frauen auf. Die Struktur setzt sich aus runden oder tubulären Drüsen zusammen, die mit einem nicht mucinhaltigem, geschichteten Epithel ausgekleidet sind. In über 50% der Patienten wurde sogar eine Plattenepithelkarzinom-Differenzierung beobachtet. Zu den häufigsten Mutationen des endometrioiden Karzinoms zählt die Mutation des  $\beta$ -Catenins, einem Zell-Zell-Adhäsion-Gen und des PTEN-Gens, einem Tumorsuppressorgen. (Prat, 2012; Ackermann, 2015)

**Klarzellige Karzinome:** Dieser Subtyp tritt ebenfalls bei 10% der diagnostizierten Ovarialkarzinome auf, wobei es sich hier um den rätselhaftesten Tumor handelt, denn das Vorhandensein von klarzelligen Strukturen allein reicht nicht für die Diagnose aus, da sowohl bei HGSC als auch bei endometrioiden Karzinomen, das Zytoplasma große Vakuolen hat und deshalb klar aussieht. Zu ihren Charakteristika gehören neben mehreren komplexen Papillen, auch hyaline Körperchen und eine Basalmembran, gefüllt mit hyaliner Flüssigkeit, die den Kern der Papillen erweitert. Bei 50% der Betroffenen werden ARID1A Mutationen als genetische Anomalien beobachtet. (Prat, 2012; Ackermann, 2015)

**Gemischt epitheliale Karzinome:** Fälle, die aufgrund ihrer unterschiedlichen Wachstumsmuster nicht eindeutig identifiziert werden können, ordnet man üblicherweise dem hochgradigen serösen Karzinom in Kombination mit anderen Karzinomformen zu. Zu den häufigsten Mischformen zählen die hochgradige seröse/ endometrioides, hochgradige seröse/ klarzellige oder auch hochgradige/ transitionale Form des Ovarialkarzinoms. (Prat, 2012; Ackermann, 2015)

**Brenner/ Übergangskarzinome:** Hierbei handelt es sich um ein schlecht differenziertes Karzinom, das sehr selten auftritt. Seine Struktur besteht aus Papillen, die mit einem mehrschichtigen Epithel ausgekleidet sind, allerdings fehlt die Differenzierung der Drüsen bzw. ein stabiles Wachstumsmuster. Zurzeit gibt es noch keine ausgeprägte Charakterisierung auf molekularer Ebene des Subtyps, dennoch

weiß man, dass im Brenner Karzinom, p53 Anomalien fehlen im Unterschied zu den hochgradig serösen Karzinomen. (Gilks et al., 2009; Ackermann, 2015)

### 3.2.4 Stadienbestimmung–Staging and Grading

Der Hauptzweck der Klassifizierung des Ovarialkarzinoms liegt darin, mithilfe einer Standardterminologie, Patienten miteinander zu vergleichen und sie in prognostische Gruppen einzuteilen. Somit kann eine einheitliche Beurteilung des klinischen Zustands, eine Prognose für den weiteren Verlauf der Erkrankung und ein angemessener Behandlungsplan gewährleistet werden. Die bedeutsamsten Klassifizierungssysteme stammen von der “Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique” (FIGO) und der “American Joint Committee on Cancer” (AJCC=TNM). Die Kategorisierung der Tumore erfolgt über allgemeine Merkmale und Metastasierung.

Das Ovarialkarzinom wird vorwiegend chirurgisch eingestuft, dennoch erfolgt die Prognose basierend auf histologischen und radiologischen Befunden des Tumorzelltyps. (Mungenast, 2014; Mutch et al., 2014; Prat, 2015)

**Tabelle 1: FIGO und TNM Klassifizierungssystem des Ovarialkarzinoms**

FIGO		TNM
	Primärtumor kann nicht beurteilt werden	TX
<b>0</b>	Kein Anhalt für Primärtumor	<b>T0</b>
<b>I</b>	Tumor auf die Ovarien beschränkt	<b>T1</b>
<b>IA</b>	Tumor auf ein Ovar beschränkt, Kapsel intakt, Ovarialoberfläche tumorfrei, negative Spülzytologie	<b>T1a</b>
<b>IB</b>	Befall beider Ovarien, ansonsten wie in Stadium IA	<b>T1b</b>
<b>IC</b>	Tumor befällt ein Ovar oder beide Ovarien	<b>T1c</b>
<b>IC 1</b>	iatrogene Kapselruptur	<b>T1c1</b>
<b>IC 2</b>	Präoperative Kapselruptur	<b>T1c2</b>
<b>IC 3</b>	Maligne Zellen im Aszites oder in der Spülzytologie nachweisbar	<b>T1c3</b>
<b>II</b>	Tumor auf einem oder beiden Ovarien mit zytologisch oder histologisch nachgewiesener Ausbreitung in das kleine Becken oder primäres Peritonealkarzinom	<b>T2</b>
<b>IIA</b>	Ausbreitung und/ oder Tumorimplantate auf Uterus und/oder Tuben	<b>T2a</b>
<b>IIB</b>	Ausbreitung auf weitere intraperitoneale Strukturen im Bereich des kleinen Beckens	<b>T2b</b>

**Tabelle 1: Fortsetzung**

<b>III</b>	Tumor auf einem oder beiden Ovarien mit zytologisch oder histologisch nachgewiesener Ausbreitung außerhalb des kleinen Beckens und/oder retroperitoneale Lymphknotenmetastasen	<b>T3/N1</b>
<b>IIIA</b>	retroperitoneale Lymphknotenmetastasen und/oder mikroskopische Metastasen außerhalb des kleinen Beckens	<b>T3a</b>
<b>IIIA1</b>	Ausschließlich retroperitoneale Lymphknotenmetastasen	<b>T3a/N1</b>
<b>IIIA1i</b>	Metastasen $\leq$ 10mm	
<b>IIIA1ii</b>	Metastasen $>$ 10mm	
<b>IIIA2</b>	mikroskopische extrapelvine Ausbreitung auf das Peritoneum außerhalb des kleinen Beckens mit oder ohne retroperitoneale Lymphknotenmetastasen	
<b>IIIB</b>	makroskopische extrapelvine Ausbreitung auf das Peritoneum außerhalb des kleinen Beckens $\leq$ 2 cm mit oder ohne retroperitoneale Lymphknotenmetastasen; schließt eine Ausbreitung auf die Leberkapsel und die Milz ein	<b>T3b</b>
<b>IIIC</b>	makroskopische extrapelvine Ausbreitung auf das Peritoneum außerhalb des kleinen Beckens $>$ 2 cm mit oder ohne retroperitoneale Lymphknotenmetastasen; schließt eine Ausbreitung auf die Leberkapsel und die Milz ein	<b>T3c/N1</b>
<b>IV</b>	Fernmetastasen mit Ausnahme peritonealer Metastasen	<b>M1</b>
<b>IVA</b>	Pleuraerguss mit positiver Zytologie	<b>M1a</b>
<b>IVB</b>	Parenchymale Metastasen der Leber und/oder der Milz, Metastasen zu außerhalb des Abdomens gelegenen Organen (einschließlich inguinaler Lymphknotenmetastasen und/oder anderer außerhalb des Abdomens gelegener Lymphknotenmetastasen)	<b>M1b</b>

**Hinweis:** Diese Tabelle wurde von <http://wordpress.lellenet.de/?p=393> übernommen

Anhand mikroskopischer Untersuchungen von Gewebeproben ist es möglich den Differenzierungsgrad von Tumorzellen zu bestimmen. Das Grading setzt sich aus 4 Stufen zusammen, wobei G1 den Originalzellen am ähnlichsten ist. Je mehr sich die Tumorzellen von normalen Zellen des Ovars unterscheiden, desto aggressiver und schneller ist das Wachstum des Tumors und desto schlechter fällt auch die Prognose aus. (Sato et al., 2003, Mungenast 2014)

**Tabelle 2: Differenzierungsgrad des Ovarialkarzinoms**

<b>Grading – Differenzierungsgrad</b>	
<b>GX</b>	Differenzierungsgrad kann nicht beurteilt werden
<b>G0</b>	Borderline Malignität
<b>G1</b>	Gut differenziert
<b>G2</b>	Mäßig differenziert
<b>G3-G4</b>	Schlecht differenziert oder undifferenziert

Die einzelnen Grade zeigen wie sehr sich die Tumorzellen von den normalen Zellen unterscheiden.  
(Mungenast, 2014)

### **3.2.5 Diagnostik**

Die Diagnose von Ovarialkarzinomen erweist sich als äußerst schwierig, da die Patientinnen meist unspezifische Symptome zeigen. Durch gynäkologische Untersuchungen wird nur gelegentlich ein Karzinom diagnostiziert und dann befindet sich die betroffene Person meist bereits in einem fortgeschrittenen Stadium. Zu den häufigsten Symptomen gehören Blähungen, Schmerzen im Bereich des Beckens oder des Abdomens, ein schnell eintretendes Völlegefühl, Obstipation, aber auch Diarrhoe, übermäßiger Harndrang, sowie unregelmäßige Menstruation oder Hirsutismus. Das häufigste Anzeichen für Ovarialkarzinom ist ein Anschwellen des Abdomens aufgrund der Flüssigkeitsansammlung. Zurzeit gibt es noch keine effiziente Screening-Methode zur Früherkennung des Ovarialkarzinoms trotz intensiver Bemühung wurden bisher nur minimale Fortschritte erzielt.

Bei Hochrisikopatientinnen, Frauen mit BRCA1/2 und Frauen mit einer positiven Familienanamnese, empfiehlt sich eine regelmäßige Untersuchung des Beckens in Kombination mit einem transvaginalen Ultraschall und einem Bluttest mit dem Tumormarker CA125. (Roett et al., 2009; American Cancer Society, Cancer Facts & Figures, 2014).

**Tumormarker CA125:** CA125 wird aus dem Coelomepithel und dem Müller-Epithel exprimiert, kommt aber nicht im Oberflächenepithel gesunder Ovarien vor. Allerdings ist die Effektivität des CA125 noch nicht bewiesen, da dieser Tumormarker nur bei 25–50% der Patientinnen im Frühstadium erhöht ist und bei fortgeschrittener Erkrankung zeigen 85% der Patientinnen ein erhöhtes CA125-Level. Eine erhöhte Serumkonzentration von CA125 kann unter anderem auch auf Brust-, Lungen- oder Kolonkarzinom hinweisen, sowie auf benigne Erkrankungen wie Endometriose oder

Ovarialzysten. Dennoch kann diese Strategie helfen Frauen mit Symptomen zu bewerten. (Mourits et al., 2009; Ledermann et al., 2013)

**Transvaginaler Ultraschall:** Die Sonographie des Beckens ist ein Bildgebungsverfahren mit dem man die Struktur des Eierstocks untersuchen kann und somit eine Differenzierung zwischen gutartigem Gewebe und malignen Strukturen erstellen kann. Mehrere morphologische Variable werden zur Diagnose eines Karzinoms herangezogen. Neben großen Läsionen, multilokulären Zysten und Aszites gehören auch noch feste papilläre Strukturen und unregelmäßige innere Septierungen dazu. Jedoch kommt es mit dieser Screening-Methode vor allem bei premenopausalen Frauen häufig zu falsch-positiven Ergebnissen, die Spezifität ist bei postmenopausalen Frauen höher, da bei diesen Frauen die Follikelzysten fehlen. Routinemäßig wird auch die Computertomographie eingesetzt um das Ausmaß der Erkrankung festzustellen. Infolge dessen kann der Krankheitsverlauf beobachtet werden, ein CT dient auch als chirurgisches Hilfsmittel. (Mourits et al., 2009; Ledermann et al., 2013)

### 3.2.6 Prognose

Im Falle eines Ovarialkarzinoms ist leider von einer schlechten Prognose auszugehen, da man zum Zeitpunkt der Diagnose überwiegend fortgeschrittene Stadien feststellt und deshalb beträgt die 5-Jahres-Überlebensrate nur 10-20%. (Tingulstad et al., 2003; Du Bois et al., 2009)

Es werden mehrere Faktoren herangezogen um eine Prognose für den Verlauf der Erkrankung zu erstellen; zu ihnen zählen das Alter der Diagnose, das FIGO-Stadium, der Differenzierungsgrad, das Vorhandensein von Aszites, die Histologie sowie das Serum-Level des Tumormarkers CA125. Das Alter ist ein wichtiger Aspekt, denn wie sich gezeigt hat, haben Frauen unter 65 Jahren mit 57% eine doppelt so hohe 5-Jahres-Überlebensrate als Frauen über 65 Jahren, die nur eine Überlebensrate von 28% haben. (Clark et al., 2001; American Cancer Society-Cancer Facts & Figures, 2014)

Die 5-Jahres-Überlebensrate ist auch vom FIGO-Stadium zum Zeitpunkt der Diagnose abhängig, während sie im Stadium I noch zwischen 80-90% und im Stadium II zwischen 60-80% liegt, sinkt sie im Stadium III schon auf 20-25% und im Stadium IV beträgt sie nur 5-10%. (Tingulstad et al., 2003)

Im Vergleich aller Subtypen des Ovarialkarzinoms zeigen sowohl das seröse als auch

das endometrioides Karzinom eine deutlich bessere Prognose als der klarzellige und muzinöse Tumor. ( Du Bois et al., 2009)

### 3.2.7 Therapie

Wie bereits erwähnt geht die Erkrankung an einem Ovarialkarzinom meist mit einer eher ungünstigen Prognose einher, um eine vollständige Genesung oder eine langfristige Überlebensdauer zu gewährleisten, ist nicht nur die Früherkennung des Tumors, sondern auch eine einwandfreie Behandlungsstrategie Voraussetzung. (Timmers et al., 2010)

Chirurgische Therapie: Am Anfang jeder Therapie eines bösartigen Ovarialtumors steht die Laparotomie. Sie muss einerseits zur genauen Revision des Abdomens und andererseits zur möglichst vollständigen Entfernung des gesamten Tumorgewebes durchgeführt werden. (Breckwoldt et al., 2007) Sollte sich die Patientin bereits in einem fortgeschrittenen Stadium befinden, besteht die Notwendigkeit, nicht nur das befallene Gewebe zu entfernen, sondern auch die Eileiter, die Gebärmutter und das befallene Peritoneum sowie paraaortale Lymphknoten. (Breckwoldt et al., 2007)

Chemotherapie: Studien haben gezeigt, dass in frühen Stadien des Ovarialkarzinoms eine Chemotherapie die Gesamtüberlebensrate verlängern kann. Folgende Chemotherapeutika haben sich in der Behandlung des Ovarialkarzinoms besonders bewährt, Cisplatin und Carboplatin, Paclitaxel sowie alkylierende Zytostatika, Doxorubicin und Etoposid. Die Standardtherapie setzt sich aus 6 Zyklen einer intravenösen Gabe von Carboplatin (AUC 6-5) und Paclitaxel (175mg/m<sup>2</sup>) über 3 Stunden alle 3 Wochen zusammen. Mit dieser *First Line Therapie* verbindet man die höchste Wirksamkeit plus erträgliche Nebenwirkungen, zudem ist dieses Verfahren weniger neurotoxisch und nierenschädigend als eine Cisplatin/Paclitaxel-Kombination. Bei einer Unverträglichkeit gegenüber Paclitaxel gibt es die Alternative aus Carboplatin und Docetaxel, sowie eine Kombination aus pegyliertem liposomalen Doxorubicin und Carboplatin. (Breckwoldt et al., 2007; Ledermann et al., 2013)

Obwohl mit dieser Standardtherapie eine solide Grundlage im Kampf gegen den Krebs geschaffen wurde, kommt es bei bis zu 80% der Patienten mit fortgeschrittenem Karzinom innerhalb der ersten 3 Jahre zu einem Rezidiv des Tumors.

Man unterscheidet hierbei zwischen *Platin-sensitiven* und *Platin-resistenten* Patienten.

Rückfälle, die innerhalb von 6 Monaten nach der letzten Platingabe auftreten, werden als *Platin-resistente Rezidive* bezeichnet, in diesem Fall werden neben Anthrazyklinen, Taxane, Etoposid und Gemcitabin als Monotherapien zur Behandlung eingesetzt. Bei *Platin-sensitiven Patienten* hat sich gezeigt, dass eine Behandlung mit Platin-Kombinationen effektiver ist als eine Monotherapie mit Platin, denn dadurch sinkt nicht nur das Mortalitätsrisiko, sondern auch das Progressionsrisiko. (Raja et al., 2013; Shawky et al., 2014; National Cancer Institute, 2015)

Ein weiterer Ansatzpunkt in der Therapie des Ovarialkarzinoms ist die Kombination aus Chemotherapie und Bevacizumab, dabei handelt es sich um einen rekombinanten humanisierten, monoklonalen Antikörper, der die Bindung von VEGF (vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor) an dessen Rezeptor hemmt. Dadurch wird die Angiogenese des Tumors gebremst. Dieser monoklonale Antikörper wird nicht nur in der Therapie des Ovarialkarzinoms eingesetzt, sondern auch bei metastasierendem Brustkrebs, Glioblastom, bei Nierenzell- und fortgeschrittenem Kolorektalkarzinom sowie beim nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom. (Aravantinos et al., 2014)

### 3.3 Lunge

Die Lunge ist ein paariges Organ im Brustraum, das aus dem rechten und dem linken Lungenflügel besteht, nach unten hin grenzt sie an das Zwerchfell. Das Lungengewebe lässt sich in Lungenlappen, -segmente, -läppchen und Aszini gliedern. Während der rechte Lungenflügel 3 Lungenlappen besitzt, zählt man im linken Flügel nur 2 Lungenlappen. Das Lungenfell, *Pleura pulmonalis*, überzieht die Lungenflügel und grenzt an das Rippenfell, *Pleura parietalis*, das die Brustwand überzieht. Zwischen Lungen- und Rippenfell gibt es einen kapillaren mit wenig Flüssigkeit gefüllten Spalt, der sogenannte Pleuraspalt, in dem Unterdruck herrscht. Ohne ihn würden die Lungenflügel in sich zusammenfallen und das Atmen wäre nicht möglich.

Die Lungensegmente werden durch Bindungsgewebe voneinander abgegrenzt und sind funktionell wichtig für die Lunge, da sie aufgrund ihrer unabhängigen Funktion ohne größere Komplikationen operativ entfernt werden können. (Faller et al., 2008; Aumüller et al., 2014)

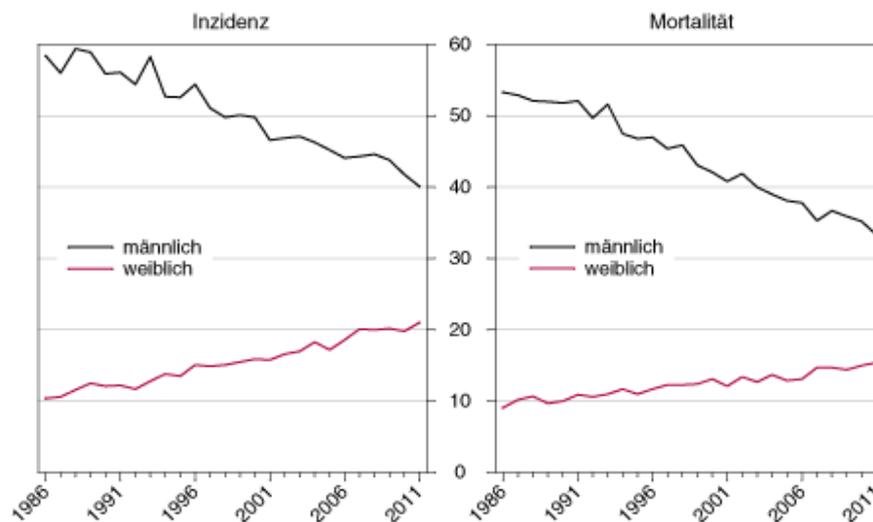
Die Lunge ist für zwei wesentliche Funktionen verantwortlich, einerseits für die Atmung und andererseits für die Abwehr von Krankheitserregern, die über die Luft aufgenommen

werden. Weitere Funktionen der Lunge sind die Synthese und Sekretion von Surfactant, der die epitheliale Oberfläche des Respirationstrakts bedeckt und somit das Kollabieren der Alveolen während der Atmung verhindert, sowie die mukoziliäre Reinigung und die neuroendokrine Signalweitergabe. (Broaddus et al., 2010; Melbourne et al., 2015)

### 3.4 Das Bronchialkarzinom

#### 3.4.1 Epidemiologie

Lungenkrebs ist weltweit die häufigste Krebserkrankung in Bezug auf Inzidenz und Mortalität seit 1985. 2011 erkrankten in Österreich 2.577 Männer und 1.553 Frauen an Lungenkrebs, somit ist das Bronchialkarzinom die zweithäufigste Krebserkrankung und die häufigste Krebstodesursache beim Mann. Bei Frauen steht es an dritter Stelle der Tumorerkrankungen und der Krebstodesursachen, besonders für Frauen hat sich die Lage in den letzten Jahren noch verschlechtert, da es zu einem Anstieg der Inzidenzrate um 25% kam und die Sterberate erhöhte sich um 27%, wohingegen diese Werte bei den Männern gesunken sind. (Statistik Austria, Krebsinzidenz und Krebsmortalität in Österreich, 2014)



Q: STATISTIK AUSTRIA, Österreichisches Krebsregister (Stand 16.12.2014) und Todesursachenstatistik. Erstellt am 12.01.2015.

#### Abbildung 2: Bösartige Neubildungen der Lunge im Zeitverlauf.

Diese Abbildung zeigt die Inzidenz und die Mortalität des Bronchialkarzinoms in Österreich zwischen 1986 und 2011. Während sich beim männlichen Geschlecht eine Abnahme der Inzidenz und Mortalität zeigt, kommt es bei Frauen zu einem Anstieg. (Statistik Austria, 2015)

Zum Lebenszeit–Krebsrisiko kann gesagt werden, dass bei 6.6% der Frauen und Männer im Laufe ihres Lebens Tumore der Lunge beziehungsweise der Bronchien diagnostiziert werden. Das Durchschnittsalter der Diagnose liegt zwischen 65-74 Jahren und nur 17.4% der Patienten leben nach einer Diagnose länger als 5 Jahre. (National Cancer Institute, 2015)

### **3.4.2 Ätiologie**

Das Bronchialkarzinom entsteht aus dem respiratorischen Epithelium, wobei zahlreiche Risikofaktoren die Entstehung eines Tumors begünstigen, daneben wird aber immer wieder von protektiven Faktoren berichtet, die eine gewisse Schutzfunktion gegenüber dem Entstehen eines Tumors einnehmen. (Dela Cruz et al., 2011)

#### **3.4.2.1 Risikofaktoren**

Tabakkonsum: Das Rauchen von Tabak in Form von Zigaretten ist der Hauptgrund für das Entstehen eines Bronchialkarzinoms. Studien haben gezeigt, dass 85–90% der Lungenkrebsfälle auf den Konsum von Tabakwaren zurückzuführen sind. Das Risiko steigt mit der Dauer des Rauchens und der Anzahl der Zigaretten, die pro Tag geraucht werden, an, da die meisten Inhaltsstoffe von Tabak wie aromatische Kohlenwasserstoffe, N–Nitrosamine, aromatische Amine und andere Substanzen kanzerogen wirken. (Dela Cruz et al., 2011; Okamoto et al., 2014)

Berufsbedingte Risikofaktoren: Seit den 50iger Jahren gibt es Berichte über eine berufsbedingte Entwicklung von Lungenkrebs. Die Internationale Agentur für Krebsforschung (IARC) hat eine Liste mit den angewandten Karzinogenen erstellt, zu den wichtigsten gehören Radon, Asbest, Chrom und Arsen, feinkristalline Kieselsäure, organische Chemikalien, polyzyklische aromatische Wasserstoffe und Schwermetalle. Besonders gefährdet sind die Berufsklassen Dachdecker, Straßenarbeiter, Lackierer und Schweißer, wobei es zusätzlich noch einen Synergismus mit Tabakkonsum gibt. Weitere Risikofaktoren sind Passivrauchen, Strahlung und auch die Luftverschmutzung. (Travis et al., 2004; American Cancer Society–Cancer Facts & Figures, 2014)

### 3.4.2.2 Genetische Faktoren

Neben äußeren Faktoren gibt es allerdings noch die genetischen Faktoren, die man bei der Entstehung eines Bronchialkarzinoms nicht außer Acht lassen darf. Studien haben gezeigt, dass es einen Zusammenhang zwischen Lungenkrebs und den seltenen Krebsyndromen wie dem *Bloom– und dem Werner Syndrom* gibt, die beide zu den Chromosomenbruch–Syndromen gehören. (Dela Cruz et al., 2011)

Ein weiteres Syndrom sollte nicht unerwähnt bleiben, das sogenannte *Wermer–Syndrom oder auch multiple endokrine Neoplasie Typ 1, MEN1*. Es handelt sich um eine autosomal dominant vererbte Erkrankung, die durch Keimbahnmutationen im MEN1–Gen verursacht wird. (Pieterman et al., 2014) Durch seine variierenden Kombinationen kann es zu Thymus–, Gastrin– und duodeno–pankreatischen neuroendokrinen Tumoren sowie zu neuroendokrinen Tumoren in der Lunge führen.

### 3.4.2.3 Protektive Faktoren

Immer wieder wird berichtet, dass auch die Ernährung eine wichtige Rolle in der Entstehung von Krebs spielt, so wurde eine niedrige Serumkonzentration von Antioxidantien, wie dem Vitamin A und C, mit Lungenkrebs assoziiert. Dem  $\beta$ –Carotin wird die größte protektive Wirkung gegenüber Lungenkrebs zugeordnet, dahinter liegen Vitamin C und  $\alpha$ –Tocopherol mit ihrer Schutzwirkung. Jedoch gibt es widersprüchliche Ergebnisse in Bezug auf die Supplementierung dieser Schutzfaktoren. (Dela Cruz et al., 2011)

### 3.4.3 Histologische Klassifikation des Bronchialkarzinoms

Pulmonale neuroendokrine Tumore teilen sich neben morphologischen und immunhistochemischen auch molekulare und strukturelle Merkmale und Eigenschaften. Die Hauptkategorien der neuroendokrinen Tumore sind das *kleinzellige Karzinom (SCLC)*, *großzellige neuroendokrine Karzinom (LCNEC)*, *typische Karzinoide und atypische Karzinoide*. Die größten Unterschiede neben Mitoserate, Nekrose oder morphologischen Merkmalen liegen in ihrer Zellgröße, dem Zytoplasmaanteil und der Chromatinstruktur.

Lungenkarzinome, die zwar keine neuroendokrinen morphologische Merkmale zeigen, dafür aber immunhistochemische und ultrastrukturelle neuroendokrine Differenzierung, werden unter dem Begriff *nicht–kleinzellige Lungenkarzinome (NSCLC)*

zusammengefasst und in folgende Subtypen eingeteilt, dem großzelligen Karzinom, dem Adenokarzinom und dem Plattenepithelkarzinom. (Beadsmoore et al., 2003; Travis et al., 2004)

### **Das kleinzellige Lungenkarzinom–SCLC:**

Das kleinzelligen Lungenkarzinom kann sich aus den Epithelzellen mit neuroendokrinen Funktionen entwickeln, wohingegen das nicht–kleinzellige Karzinom aus den bronchialen oder Alveolarepithelzellen entstehen kann. Es handelt sich um das häufigste endokrine Lungenkarzinom und macht 15–20% der invasiven Bronchialkarzinome aus, das vor allem durch Rauchen entsteht. (Yokota et al., 2004; Beasley, 2008; Lekic et al., 2012; Swarts et al., 2012)

Dieser maligne Tumor besteht, wie der Name schon vermuten lässt, aus kleinen Zellen mit schlecht definierten Zellgrenzen, wenig Zytoplasma, feinkörnigem Kernchromatin und unauffälligen Nucleoli. Weitere Merkmale sind die hohe mitotische Teilungsrate und die umfangreiche Nekrose. Zu den molekulargenetischen Eigenschaften gehören unter anderem die, durch Rauchen verursachten, p53 Mutationen und Upregulationen, sowie die Deletionen auf folgenden Chromosomen: 3p, 5q, 10q, 13q und 17p, und die Downregulation von E–Cadherin. (Balsara et al., 2002; Travis et al., 2004; Swarts et al., 2012) In 90% der Fälle kommt es bei einem kleinzelligen Lungenkarzinom zur Inaktivierung von p53 und den Retinoblastomgenen. Die wesentlichen molekulargenetischen Unterschiede zwischen SCLC und LCNEC liegen in den Ras–Gen Mutationen und der erhöhten COX–2 Expression in den NSCLC, in den SCLC kommt es zur Amplifikation von myc und zur Methylierung von Caspase 8, einem Schlüsselenzym in der Apoptose. (Johnson et al., 1987; Hida et al., 1998; Travis et al., 2004)

### **Nicht–kleinzellige Karzinome–NSCLC:**

Adenokarzinom: Das Adenokarzinom ist einschließlich der bronchioloalveolären Tumore für 31% aller Fälle von Bronchialkarzinom verantwortlich. Diese peripheren Tumore sind nicht größer als 4cm und unterscheiden sich durch ihre Differenzierung der Drüsen, ihrer Mucinproduktion sowie dem (mikro-) papillären Wachstumsmuster von den anderen Tumoren. (Beadsmoore et al., 2003; Sousa et al., 2015)

Plattenepithelkarzinom: Diese Art von Karzinom liegt bei 20–30% der Patienten mit Lungenkrebs vor, entsteht bevorzugt im Hauptbronchus mit einem Durchmesser von über 4cm, neigt zur interzellulären Brückenbildung, schuppenförmiger Perlenbildung und Verhornung einzelner Zellen. Durch Anomalien des ErbB–Rezeptors kommt es zu einer deregulierten Signalübertragung, daraufhin zu einer unkontrollierten Proliferation und zu einer erleichterten Metastasierung. In 43–89% der nicht–kleinzelligen Karzinome wurde eine Überexpression des EGF beobachtet. (Travis et al., 2004; Bethune et al., 2010)

Sollte es zu einer gemischten Differenzierung aus Adeno– und Plattenepithelkarzinomen kommen, spricht man von einem adenosquamösen Karzinom, das in 2% aller Fälle auftritt und oft in Zusammenhang mit Fibrose und parenchymalen Narben steht. (www.atsjournal.org, 1997; Beadsmoore et al., 2003)

Großzelliges Karzinom: Zu den Charakteristika zählen hier nicht nur eine große periphere Masse und die schlechte Differenzierung, sondern auch das schnelle Wachstum und die frühe Metastasierung, sowie eine stark variierende Kernform und eine irreguläre Chromatinstruktur. Sie sind für 9% aller Lungenkrebsfälle verantwortlich, im Vergleich dazu sind die großzelligen neuroendokrinen Karzinome (LCNEC) für 3% aller Fälle die Ursache. Dieser Subtyp ist vor allem in der Lungenperipherie zu finden, was den Vorteil ergibt, dass dieses Karzinom sowohl durch transthorakale Feinnadelpunktion als auch durch eine Bronchoskopie zugänglich ist. (Beadsmoore et al., 2003; Travis et al., 2004; Li et al., 2015)

#### **3.4.4. Stadienbestimmung**

Wie beim Ovarialkarzinom hat das *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) ein Klassifizierungssystem für Lungenkrebs entwickelt. Wesentlich ist es bei Verdacht auf Lungenkrebs eine Behandlungsstrategie durch histologische Proben einzuleiten, wobei das Staging nicht nur wichtig ist um eine geeignete Behandlung zu entwickeln, sondern auch für die Prognose und den weiteren Verlauf der Erkrankung. Zu den Referenzstandards zählen der Primärtumor (T), die regionalen Lymphknoten (N), und die Metastasen (M). Die TNM–Klassifizierung gilt für die *kleinzelligen* und die *nicht-kleinzelligen Karzinome*. Außerdem gibt es für das *kleinzellige Karzinom* noch 2 weitere, vereinfachte Klassifizierungen; die *Veteran’s Administration Lung Cancer Study Group* (VALSG) hat vorgeschlagen, dass man zum Zeitpunkt der Diagnose das SCLC

zunächst in das *lokal begrenzte Stadium*, das heißt der Tumor liegt noch innerhalb des Thorax, und in das *ausgedehnte Stadium*, der Tumor wächst bereits außerhalb des Thorax, ordnet. Diese Einteilung findet vor allem in der Praxis Anwendung.

Eine weitere Klassifizierungsmöglichkeit erfolgt anhand der IASLC-Klassifikation (*The International Association for the Study of Lung Cancer*), demnach wird ein SCLC in 3 Kategorien eingeteilt. (Stuart-Harris et al., 1992; Lekic et al., 2012)

Kategorie 1: Kleinzelliges Karzinom

Kategorie 2: Mischung aus kleinzelligem und großzelligem Karzinom

Kategorie 3: Kombiniertes kleinzelliges Karzinom

Zudem hat die IASCL zusätzlich ein neues Stagingssystem entwickelt um die Patienten in einzelne Stadien einzuteilen. (Detterbeck et al., 2009)

**Tabelle 3: TNM-Elemente mit Stadieneinteilung**

Stadien	T	N	M
Ia	T1a,b	N0	M0
Ib	T2a	N0	M0
IIa	T1a,b	N1	M0
	T2a	N1	M0
	T2b	N0	M0
IIb	T2b	N1	M0
	T3	N0	M0
IIIa	T1-3	N2	M0
	T3	N1	M0
	T4	N0,1	M0
IIIb	T4	N2	M0
	T1-4	N3	M0
IV	T	N	M1a,b

Hinweis: Diese Tabelle wurde von Detterbeck et al., 2009 übernommen.

### 3.4.5 Diagnostik

Trotz aller Bemühungen konnte man bisher noch keine Untersuchungsmethode als Früherkennungsmaßnahme etablieren. Eine frühzeitige Erkennung von Lungenkrebs gestaltet sich als schwierig, da die Patienten die Symptome zunächst nicht als beunruhigend ansehen. Patienten mit Lungenkrebs zeigen progressive Kurzatmigkeit, Husten, Brustschmerz/Brustenge, Heiserkeit oder den Verlust der Stimme, Bluthusten. (Travis et al, 2004) Man könnte diese Symptome mit einer Infektion verwechseln, deshalb ist es besonders wichtig einen Arzt aufzusuchen und ein Thorax-Röntgen

durchführen zu lassen, wenn es zu einem anhaltenden Husten bzw. sich die Art des Hustens ändert. Vor allem gilt das für Raucher und Personen, die über 40 Jahre sind. (www.atsjournal.org, 1997; Statistik Austria, Krebsinzidenz und Krebsmortalität in Österreich, 2014)

**Thorax-Röntgen:** Die meisten Fälle von Lungenkrebs werden mithilfe eines CT festgestellt, dennoch lassen sich Lungenknoten auch mittels Röntgen erfassen. Sollte die Verkalkung des Knoten ein diffuses, zentrales, Popcorn-ähnliches Muster aufweisen, kann man von einem gutartigen Knötchen ausgehen, wenn es sich bei den Verkalkungsmustern um getüpfelte und exzentrische Formen handelt, sind weitere Untersuchungen zwingend notwendig. (Gould et al., 2013)

**Thorax CT-Scan:** Bei Hochrisikopatienten wird die sogenannte LDCT-Methode (low dose CT) angewandt, eine niedrig dosierte Computertomographie. Der gesamte Brustkorb des Patienten wird gescannt, während dieser den Atem für einige Sekunden anhält. Mithilfe mehrerer Röntgenquellen und einer Reihe von Detektoren lassen sich die erhaltenen Informationen in mehreren Querschnitten der Lunge erfassen. Durch ein CT erhält man wichtige Informationen über Lage, Form und Ränder des Knotens, sowie über eine Lymphadenopathie, Läsionen und Invasionen der Brustwand. Daneben werden noch zusätzliche Auswertungen benötigt um das Vorhandensein eines Lungentumors zu bestätigen. (Gould et al., 2013; Richards et al., 2014)

**PET-Positronenemissionstomographie:** Das 18-Fluor-2-Desoxyglukose-PET gehört zu den neueren Bildgebungsverfahren. Die Kombination aus CT und PET ermöglicht genaue Informationen über den Tumor, die lokalen Lymphknoten und die Metastasierung. Mittels PET ist auch eine akkurate Abgrenzung des Tumors möglich, somit wird verhindert, dass es zu einer übermäßigen Strahlenbelastung des gesunden Gewebes kommt. (Ulger et al., 2015)

**Bronchoskopie und Biopsie:** Bis vor kurzem spielte die Bronchoskopie noch eine untergeordnete Rolle in der Diagnostik von Lungenkrebs. Mehrere Studien haben belegt, dass es zu starken Schwankungen in der Empfindlichkeit bei der, mit Fluoroskopie durchgeführten, Bronchoskopie plus transbronchialer Biopsie gekommen ist. Zu den neueren Verfahrenstechniken gehören Radial EBUS (Endobronchialer Ultraschall) und VBN (virtuelles bronchoskopisches Navigationssystem), dadurch kommt es zu einer Erleichterung der Probennahme kleinere Lungenknoten, einer

verbesserten Diagnose und einer verkürzten Untersuchungszeit. (Gould et al., 2013; Asano et al., 2015)

### **3.4.6 Prognose**

Lungenkrebs gehört zu den prognostisch ungünstigen Tumoren, was sich in einer niedrigen relativen 5–Jahres–Überlebensrate von etwa 22% bei Frauen und 16% bei Männern ausdrückt. (Statistik Austria, Krebsinzidenz und Krebsmortalität in Österreich, 2014) Im Vergleich zu anderen Krebserkrankungen gibt es kaum Verbesserungen der Überlebensdauer. Natürlich spielt das Alter bei der Diagnose eine wichtige Rolle, denn Patienten, die jünger als 45 Jahre sind, haben mit einer 32%igen Überlebensrate einen Vorteil gegenüber Patienten, die bei der Diagnosestellung älter als 75 Jahre sind, denn hier beträgt die relative Überlebensrate nur 10%. Angesichts des aggressiven Wachstums des kleinzelligen Karzinoms liegt die mittlere Überlebensdauer hier nur zwischen 6 und 10 Monaten und ohne Behandlung liegen die Überlebensraten bei max. 4 Monaten. Die wenigen Patienten, die nach ihrer Diagnose noch 5 Jahre und länger leben, müssen mit sekundären Lungenerkrankungen rechnen. Die Metastasierung des SCLC spielt auch noch eine entscheidende Rolle in der Prognose, denn sollte es bereits Metastasen in der Leber oder im Knochenmark geben, verschlechtert sich die Prognose weiter, bei Hirnmetastasen ist die Prognose allerdings mit der eines eingeschränkten Stadiums gleichzusetzen. Bei 70% der Patienten liegt bereits das ausgedehnte Stadium von SCLC vor, wenn sie ihre Diagnose erhalten. Diese Patienten werden als unheilbar eingestuft und ihre mediane Überlebensdauer liegt bei 9–10 Monaten. Im Gegensatz dazu liegt die Überlebensdauer der Patienten mit lokal begrenzten Tumoren bei 18 Monaten und sie gelten als heilbar. (Beadsmoore et al., 2003; Lekic et al., 2012)

### **3.4.7 Therapie**

Chirurgische Therapie: Patienten in einem frühen Stadium (Ia–IIIa) werden üblicherweise einer Operation unterzogen, die im Allgemeinen aus einer Lobektomie, Bilobektomie oder einer Pneumonektomie besteht. Zusätzlich werden die Patienten einer adjuvanten Therapie unterzogen, da es eine hohe Inzidenz für maligne Sekundärerkrankungen im Bereich des Halses, der Speiseröhre und Lungen gibt.

Strahlentherapie: Die Strahlentherapie gehört zur Basistherapie bei SCLC und NSCLC. Bei Patienten, die sich noch in frühen Stadien der Erkrankung befinden und bei denen keine Operation geplant ist, wird mit der stereotaktischen Strahlentherapie vorgegangen, in lokal fortgeschrittenen Fällen wird die radikale Strahlentherapie oder die Radiochemotherapie eingesetzt, vor allem bei Patienten im Stadium IIIb und IV. Außerdem ist die Strahlentherapie auch ein Teil der Palliativbehandlung, im Falle einer Ausbreitung des Tumors und wenn eine radikale Behandlung nicht durchgeführt werden kann. (Maciejczyk et al., 2014)

Chemotherapie: SCLC gilt als sehr empfindlich gegenüber Strahlentherapie und Chemotherapie und dennoch liegt hier eine schlechte Prognose vor, Grund dafür ist die schnelle Resistenzentwicklung.

#### Therapie bei Patienten mit *lokal begrenztem kleinzelligen Karzinom*

Die Standardchemotherapie bei Patienten mit begrenztem SCLC setzt sich aus Etoposid und Cisplatin zusammen mit einer gleichzeitigen thorakalen Strahlentherapie und einer anschließenden kranialen Bestrahlung zur Prophylaxe. Internationale Richtlinien empfehlen eine Behandlung mit 4–6 Zyklen der Chemotherapie. Des Weiteren hat sich herausgestellt, dass eine Kombination aus Chemotherapie mit früher Strahlentherapie im Vergleich zu einer sequentiellen Strahlentherapie bei Patienten im Stadium I–III einen Anstieg der 5–Jahres–Überlebensrate von 15% auf 25% ergab. Die Kombination aus Irinotecan plus Cisplatin gilt vor allem in Ostasien als eine weitere akzeptierte Standardtherapie, da sie in etwa dieselbe Effektivität zeigt wie Etoposid plus Cisplatin. (Califano et al., 2012; Lekic et al., 2012; Kalemkerian, 2014)

In Norwegen wurde eine Studie durchgeführt zum Vergleich der Etoposid/ Cisplatin–Therapie mit einer Therapie aus Cyclophosphamid, Epirubicin und Etoposid. Die mediane Überlebensrate betrug 10.2 Monate für die Standardtherapie und 7.8 Monate für die Cyclophosphamid–Gruppe und die 2–Jahres–Überlebensrate liegt bei 14% bzw. 6%. Weitere Studien untersuchten die Unterschiede zwischen Doxorubicin– und Platin–basierte Chemotherapie, in den Niederlanden verglich man Paclitaxel und Carboplatin mit Doxorubicin, Etoposid und Cyclophosphamid. In all diesen Studien waren die Ansprechraten sowie das progressionsfreie Intervall ähnlich, Unterschiede gab es lediglich in den Nebenwirkungen wie Leukozytopenie und febriler Neutropenie. (Baka et al., 2008; Jett et al., 2013)

## Therapie bei Patienten mit *ausgedehntem kleinzelligen* Karzinom

Patienten, bei denen der Lungenkrebs weit vorangeschritten ist, dient die Strahlentherapie nur noch zur Linderung ihrer Symptome und hat keinen Effekt mehr auf die Überlebensrate. In diesem Fall gilt die prophylaktische kraniale Bestrahlung, auch PCI genannt, als Standardtherapie um einer Metastasenbildung im Gehirn entgegenzuwirken. Studien haben gezeigt, dass sich mit dieser Methode die 1–Jahres–Überlebensrate verdoppelt hat. (Slotman et al., 2009; Califano et al., 2012)

Das Hauptproblem in den fortgeschrittenen Stadien liegt in der intrathorakalen Tumorkontrolle, da die Mehrheit der Patienten nach Abschluss der Chemotherapie von einer Progression der Erkrankung im Thorax betroffen sind. Patienten mit einem Rezidiv des Tumors können in die folgenden 2 Kategorien eingeteilt werden und zwar einerseits in die *refraktäre/ resistente Krankheit*, das heißt es handelt sich hier um eine primäre Progression oder ein Rezidiv, das innerhalb der ersten 3 Monate der Initialtherapie auftritt und andererseits in die *rezidivierende/sensitive Erkrankung*, hier tritt ein Rezidiv erst nach über 3 Monaten der Initialtherapie auf. Die Ansprechrate auf eine *Second Line Therapie* liegt in der refraktären Gruppe weit unter der der rezidivierenden Gruppe. Mögliche Wirkstoffe, die als *SecondLine Therapie* bereits ihre Aktivität bewiesen haben, sind unter anderem Topotecan, Paclitaxel, Docetaxel, ebenso wie Vinorelbin oder auch das oral einzunehmende Etoposid und Gemcitabin. In der Literatur wird ein neuer vielversprechender Wirkstoff namens Amrubicin, ein Anthracyclin beschrieben. In diesen Studien konnte durch den Vergleich von Amrubicin mit Topotecan als *Second Line Therapie* eine höhere Ansprechrate bewiesen werden. Amrubicin erzielt in der refraktären/resistenten Gruppe eine Ansprechrate von 17% und in der rezidivierenden/sensitiven Kategorie 53%, wohingegen Topotecan nur 0% bzw. 21% erreicht. (Jett et al., 2013)

### 3.5 Zellmetabolismus

Die Hauptenergiequelle der Zellen ist Glukose, die unter normalen physiologischen Bedingungen über Glykolyse und oxidative Phosphorylierung in mehreren Schritten zu Pyruvat umgewandelt wird. Aus einem Molekül Glukose entstehen insgesamt 2 Moleküle Pyruvat, 2 ATP–Adenosintriphosphat, 2 Protonen ( $H^+$ ), 2 NADH–Nikotinamid–adenin–dinukleotid–phosphat und 2 Moleküle Wasser ( $H_2O$ ).

Unter aeroben Bedingungen tritt Pyruvat in der Regel in die Mitochondrien ein und wird im Krebs-Zyklus zu  $CO_2$  und  $H_2O$  metabolisiert unter der Gewinnung von 38 Mol ATP pro Mol Glukose. (Fang et al., 2008) Während des Krebs–Zyklus wird auch Acetyl–CoA oxidiert und dabei entstehen 3 Moleküle NADH sowie 1 Molekül  $FADH_2$ –Flavin–adenin–dinukleotid. Die Elektronen dieser Co–Enzyme durchlaufen die sogenannte Elektronentransportkette, die sich aus den Komplexen I–IV, Ubichinon und Cytochrom C zusammensetzen. Beim Transport der Elektronen in den Intermembranraum kommt es zum Ausstrom von Protonen und das wiederum erzeugt einen elektrochemischen Gradienten. ATP wird über die ATP–Synthase erzeugt, wenn die Protonen zurück in den Intermembranraum wandern.

Unter anaeroben Bedingungen wird das Pyruvat zu Lactat reduziert um oxidiertes  $NAD^+$  zu regenerieren, dabei entstehen allerdings nur 2 Mol ATP. (Rich, 2003; Gatenby et al., 2004; Fang et al., 2008; Klameth, 2013; Ackermann, 2015)

Anaerobe Bedingungen sind vor allem in Tumorzellen zu finden, hier kommt es zu einer gesteigerten Glykolyse, die auch unter normoxischen Bedingungen bestehen bleibt, dieses Phänomen wurde nach seinem Entdecker, Otto Warburg, benannt. Die meisten Tumore befinden sich allerdings unter hypoxischen Bedingungen und sind somit auf eine hohe glykolytische Rate angewiesen um ihr Überleben und ihr Wachstum zu sichern. Diese hypoxischen Bedingungen führen in den Tumorzellen zu einer Resistenzentwicklung gegenüber Radio– und Chemotherapie sowie zu einer Abnahme der Chemosensitivität in den Tumorzellen. (Wartenberg et al., 2003; Bartrons et al., 2007; Fang et al., 2008; Klameth, 2013; Ackermann, 2015)

Invasive Tumorzellen erwerben verschiedene adaptive Merkmale, einschließlich der Selbstversorgung in Wachstumssignalen, Umgehung der Apoptose und erhöhtes Replikationspotential. (Webb et al., 2011) Zu diesen Merkmalen gehört auch eine dysregulierte pH–Regulation, die in den meisten Tumoren, unabhängig von ihrem

genetischen Hintergrund oder dem Entstehungsort zu finden ist. Während der intrazelluläre pH-Wert ( $pH_i$ ) in gesunden Zellen in einem Bereich von 7.2 liegt und damit niedriger ist als der extrazelluläre pH ( $pH_e$ ) mit 7.4, liegt der  $pH_i$  in Tumorzellen bei über 7.4 und der  $pH_e$  ist hier mit 6.7–7.1 niedriger als der intrazelluläre Wert. Durch den umgekehrten pH-Gradienten wird nicht nur die Zellproliferation erleichtert und die Apoptose umgangen, sondern dadurch werden auch die säureaktivierten Proteasen stimuliert, was wiederum zu einer erleichterten Tumorzellinvasion und Verbreitung der Zellen führt. (Webb et al., 2011; Ackermann, 2015)

### 3.5.1 Hypoxie induzierter Faktor 1 – HIF-1

Der Hypoxie induzierte Faktor 1 gehört der Gruppe von Tumorsuppressorgenen und Onkogenen an, die einen großen Einfluss auf den Zellmetabolismus haben. Neben HIF-1 gehören noch der epidermale Wachstumsfaktor (EGF), das Tumorsuppressorgen p53, mTOR (mammalian Target of Rapamycin), KRAS (Kirsten rat sarcoma viral oncogene homlog), myc, Akt und der Nuclear Faktor  $\kappa$ -B (NF- $\kappa$ B) dazu. (Levine et al., 2010; Klameth, 2015)

HIF-1 ist ein Transkriptionsfaktor, der für die Regulation des Mangels an der  $O_2$ -Versorgung in den Zellen verantwortlich ist. Molekularer  $O_2$  wird in den Zellen für wichtige Stoffwechselprozesse benötigt, da der  $O_2$  als Elektronenakzeptor während der ATP-Bildung dient. (Mohamed et al., 2004)

HIF-1 ist ein Heterodimer aus basischen Helix-Loop-Helix-Proteinen PAS, HIF-1 $\alpha$  und HIF-1 $\beta$ , das eine kritische Rolle in einer Vielzahl von Reaktionen auf eine Hypoxie spielt. Diese umfassen die Regulation von Genen in der Angiogenese, Erythropoese, den Energiestoffwechsel, den Eisenstoffwechsel, vasomotorische Kontrolle, Entzündung, Gewebematrixmetabolismus und Entscheidungen zum Überleben von Zellen. (Cockman et al., 2000) Die alpha-Untereinheit wird abhängig von der  $O_2$ -Konzentration in den Zellen exprimiert, wohingegen die Expression der beta-Untereinheit konstitutiv reguliert wird. Die Expression der alpha-Untereinheit wird über die Aktivität der sauerstoffabhängigen Prolyl-Hydroxylasen, PHD1, PHD2 und PHD3, gesteuert. Unter normoxischen Bedingungen katalysieren die PHDs die Fe(II)-abhängige Hydroxylierung der spezifischen Prolyl-Reste innerhalb der sogenannten  $O_2$ -abhängigen Abbau-Domäne (ODD) im HIF-1 $\alpha$ . Sobald die Hydroxylierung durchgeführt wurde, bindet das *von Hippel-Lindau Tumorsuppressor-Protein* (VHL) an

die alpha-Untereinheit und daraufhin kommt es zur Ubiquitinierung und zum proteasomalen Abbau von HIF-1.

Bei Hypoxie nimmt die Aktivität der Prolyl-Hydroxylasen ab und die alpha-Untereinheiten werden stabilisiert, translozieren zum Kern und bilden mit der beta-Untereinheit ein Heterodimer. Dieses erkennt das Hypoxie-Response-Element (HRE) im Promotor von über 60 identifizierten Genen und induziert die Expression dieser Gene. Zu ihnen zählen unter anderem der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor (VEGF), die Glucose-Transporter 1 und 3 (GLUT1 und GLUT3), die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), der Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Austauscher 1 (NHE1), der Monocarboxylat-Transporter 4 (MCT4), die Lactatdehydrogenase (LDH), die Carbonanhydrasen IX und XII und die Pyruvat-Dehydrogenase-Kinase1 (PDK1). (Semenza, 2002; Semenza 2003; Dehne et al., 2009; Klameth, 2013; Ackermann, 2015)

Durch die Induktion von Pyruvat-Dehydrogenase-Kinase1 (PDK1) wird dieses aktiviert, woraufhin es zur Phosphorylierung der Pyruvat-Dehydrogenase E1 $\alpha$ -Untereinheit und damit zur Inaktivierung des Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex kommt. Pyruvat kann nicht mehr zu Acetyl-Coenzym umgewandelt werden, was zur Folge hat, dass der Pyruvatstoffwechsel via Krebszyklus gehemmt wird. (Kim et al., 2006)

### **3.5.2 pH-Regulation in Zellen**

Die pH-Regulation in den Zellen spielt eine wichtige Rolle in vielen zellulären Vorgängen, denn sie hat nicht nur für die Zellproliferation, Invasion und Metastasierung eine große Bedeutung, sondern spielt auch in der Resistenz gegen Chemotherapeutika und in der Apoptose eine beachtliche Rolle. Der intrazelluläre pH-Wert wird über die beiden Komponenten, CO<sub>2</sub> und Laktat, kontrolliert, die sowohl über aerobe als auch über anaerobe Zellatmung gewonnen werden. Im Gegensatz dazu ist der extrazelluläre pH-Wert von den Kohlensäurepuffer-Komponenten, CO<sub>2</sub> und HCO<sub>3</sub>, abhängig. Ihre Konzentrationen werden über den CO<sub>2</sub>-Partialdruck und die Bikarbonatkonzentration durch Nieren und Lunge reguliert. Die intra- und extrazellulären pH-Werte in den normalen Zellen unterscheiden sich von denen in Tumorzellen, so liegt in normalen Zellen der pH<sub>i</sub> bei 7.2 und der pH<sub>e</sub> bei 7.4, wohingegen der pH<sub>i</sub> in Tumorzellen bei  $\geq$  7.4 und der pH<sub>e</sub> zwischen 6.7 und 7.1 liegt. (Izumi et al., 2003; Swietach et al., 2007; Webb et al., 2011; Ackermann, 2015)

Im Allgemeinen, regulieren Tumorzellen die Glykolyse hinauf und wachsen in einer hypoxischen Mikroumgebung. Hochproliferative Krebszellen produzieren große Mengen an metabolischen Säuren, die über Glykolyse, Glucose-Verwertung, Laktatproduktion und Protonenefflux generiert werden, wodurch sie über zelluläre Azidose die Apoptose verhindern. (Izumi et al., 2003) Die pH-Regulation basiert auf 4 Hauptregulatoren, zu ihnen zählen die Protonen-Pumpen, die Bikarbonat-Transporter-Familie (BCT), die Monocarboxylat-Transporter-Familie (MCT) und die Natrium-Protonen-Austauscher-Familie (NHE).

Die vakuoläre Protonenpumpe (V-ATPase) pumpt Protonen aus dem Zytoplasma in das Lumen der Vakuole oder in den extrazellulären Raum unter Verwendung von Energie, die durch ATP-Hydrolase erzeugt wird.

Die Familie der Monocarboxylat-Transporter (MCT) ist für den Transport der beiden Monocarboxylate, Milchsäure und Pyruvat, durch die Plasmamembran zuständig. Dieser Transport ist an einen Protonentransport gekoppelt.

Der  $\text{Na}^+$ - $\text{H}^+$ -Austauscher (NHE1) ist ein integrales Membran-Transporter-Protein, das über Hormone, diverse Wachstumsfaktoren, sowie einem sauren  $\text{pH}_e$  und Hypoxie aktiviert werden kann und zum Einstrom von Natrium in die Zelle bei gleichzeitigem Ausstrom von Wasserstoff aus der Zelle führt.

Die Natrium-Bikarbonat-Co-Transporter (NBC 1-4) sind für den Transport von Bikarbonat aus dem Blut in die Zellen verantwortlich, NBC 2 und 3 sind an der zellulären pH-Regulation beteiligt. (Halestrap et al., 1999; Izumi et al., 2003; Reshkin et al., 2013; Ackermann, 2015)

In Tumorzellen kommt es zu einer erhöhten Expression bzw. zu einer gesteigerten Aktivität von  $\text{H}^+$ -ATPasen, NHE1, sowie von MCT1 und MCT4. Diese erhöhte Expression führt zu einem Vorteil der Tumorzellen, da diese Transporter eine hohe Affinität für Milchsäure zeigen und die Tumorzellen zusätzlich noch die Fähigkeit besitzen Pyruvat in Milchsäure umzuwandeln. Zusätzlich wird in den Tumorzellen eine erhöhte Aktivität von den Carboanhydrasen IX und XII beobachtet, die aufgrund ihrer extrazellulären Domäne die Hydratation von  $\text{CO}_2$  in  $\text{HCO}_3^-$  und  $\text{H}^+$  beschleunigen. (Webb et al., 2011)

### 3.5.3 Carboanhydrase IX (CAIX)

Die Carboanhydrase IX ist ein transmembranes dimeres Zink-Metalloenzym, das den  $\alpha$ -Carboanhydrasen angehört. Insgesamt gibt es 16 Isoformen, die man aufgrund ihrer unterschiedlichen katalytischen Aktivität und der subzellulären Lokalisation in 3 Klassen einteilt:

- die membrangebundenen (CAIV, CAIX, CAXII, CAXIV, CAXV)
- die zytosolischen (CAI, CAII, CAIII, CAVII, CAXIII)
- die mitochondrialen Isoenzyme (CAVA und CAVB).

Des Weiteren gibt es noch 2 Gruppen der CA, die sezernierten Carboanhydrasen mit CAVI als einzigen Vertreter und CAVIII, CAX und CAXI gehören zu den Isoenzymen, die Carboanhydrase-related Proteine genannt werden, da sie eine akatalytische Domäne besitzen. (Neri et al., 2011; Klameth, 2013; Moeker et al., 2014)

CAIX ist ein Protein aus 466 Aminosäuren mit einer Proteoglykan-Struktur am N-Terminus, einem kurzen intrazellulären C-Terminus und zusätzlich findet man ein hydrophobes Signalpeptid, eine extrazelluläre, katalytischen Domäne und ein hydrophobes transmembranes Segment.

Die Rollen des C-Terminus und der Proteoglykan-Struktur sind noch unklar, dennoch haben neue Erkenntnisse gezeigt, dass der intrazelluläre Terminus ein Target für die Phosphorylierung ist, was nicht nur für die Signalweiterleitung wichtig wäre, sondern auch für die Interaktion mit anderen Bikarbonattransporter, wohingegen die Proteoglykan-Struktur als Ziel der Zelladhäsion angesehen wird. (Svastova et al., 2003; Dorai et al., 2005; Swietach et al., 2007)

Die Funktion der Carboanhydrase IX liegt, wie schon zuvor erwähnt, in der reversiblen Hydratation von  $\text{CO}_2$  in  $\text{HCO}_3^-$  und  $\text{H}^+$ , einem wichtigen Prozess im zellulären Puffersystem. CAIX ist an verschiedenen physiologischen Vorgängen beteiligt, wie z.B. der Atmung, der Knochenresorption und Verkalkung, aber auch an der Lipogenese, der Glukoneogenese sowie an der Elektrolyt-Sekretion und dem Säure-Basen-Haushalt. CAIX liegt im gesunden Gewebe nur in geringer Konzentration vor, eine hohe Expression liegt nur im Duodenum, Jejunum und Ileum vor. Die Expression von CAIX ist besonders in soliden Tumorzellen hochreguliert, wobei erwähnt werden muss, dass die Expression erst unter hypoxischen Bedingungen hoch ist und nicht schon bei Normoxie. (Supuran, 2008; Neri et al., 2011; McDonald et al., 2012)

Der CAIX-Promotor enthält ein Hypoxie-Responsives Element (HRE), das unmittelbar

über dem Transkriptions–Startpunkt liegt und das HIF–1 $\alpha$  bindet. Tatsächlich ist HIF–1 $\alpha$  der exklusive Regulator der CAIX–Aktivität, im Gegensatz zu den zahlreichen Hypoxie–induzierten Genen und CAIX ist oft das am stärksten hochregulierte Gen als Antwort auf Hypoxie in menschlichen Krebszellen. (McDonald et al., 2012)

CAIX wurde erstmals in HeLa–Zellen, die von einem Gebärmutterhalstumor abgeleitet wurden, entdeckt und zwar sowohl als Plasmamembran– als auch als nukleares Protein. (Opavsky et al., 1996) Aufgrund der erhöhten Expression von CAIX in vielen Krebserkrankungen, die Lunge, Brust, Kolon, Blase, Gebärmutterhals und Ovarien einschließen, ist dieses Enzym als diagnostischer Marker geeignet. Außerdem steht die erhöhte Expression im Zusammenhang mit der Prognose dieser Erkrankungen und lässt auf eine schlechte Prognose schließen. (McDonald et al., 2012; Gieling et al., 2013; Ackermann, 2015)

### **3.5.3.1 Carboanhydrase IX in gelöster Form–sCAIX**

Neben dem membrangebundenen Isoenzym der Carboanhydrase IX gibt es noch die gelöste Form, die sich im Serum nachweisen lässt. Durch proteolytische Spaltung des extrazellulären Teils von den transmembranären und intrazellulären Sequenzen, wird sCAIX freigesetzt. Es trägt wie das membrangebundene CAIX eine Proteoglykan– und eine Carboanhydrase–Domäne.

Diese Isoform könnte ein wichtiger Marker für die Therapie von Tumoren werden, da es wesentlich einfacher ist Serumproben, während des Krankheitsverlaufs zu entnehmen als Gewebeproben, die man üblicherweise nur zu Beginn einer Therapie zu Beurteilungszwecken entnimmt. Zum jetzigen Zeitpunkt liegen nur wenige Informationen über sCAIX vor und es hat sich gezeigt, dass die Serumwerte als Tumormarker im Vergleich zum bekannten CA125–Marker kaum Relevanz auf die Prognose haben. (Zavada et al., 2003; Woelber et al., 2010; Ackermann, 2015)

## 4 Zielsetzung

Das Ovarialkarzinom und das Lungenkarzinom gehören neben dem Brust-, Pankreas- und kolorektalem Karzinom zu den fünf tödlichsten Krebserkrankungen bei Frauen. Die Diagnose erfolgt bei diesen Tumorerkrankungen meist in bereits fortgeschrittenen Stadien, da die Symptome sowohl beim Ovarialkarzinom als auch beim Bronchialkarzinom eher unspezifisch sind.

Nur selten wird ein Ovarialkarzinom durch gynäkologische Untersuchungen frühzeitig erkannt, ebenso erfolgt Diagnose eines kleinzelligen Bronchialkarzinoms (SCLC) oft erst nachdem es bereits zu einer Metastasierung gekommen ist, infolge dessen muss man in der Regel von einer schlechten Prognose ausgehen, da sie in Korrelation mit dem Stadium der Tumorerkrankung steht. Dieser Zusammenhang lässt sich durch eine relativ niedrige 5-Jahres-Überlebensrate hervorheben, denn bei beiden Karzinomerkrankungen liegt sie nur in einem Bereich von 15%-20%.

Die bisherigen Diagnosemaßnahmen sowie bekannte Therapieansätze liefern keine befriedigenden Ergebnisse, deswegen ist es nicht nur wichtig neue Screening-Methoden für eine frühzeitige Erkennung von Tumorzellen zu entwickeln, sondern neue Therapieansätze sind dringend notwendig.

Ein neuer Ansatz könnte das Eingreifen in die pH-Regulation der Zellen sein, eines der wichtigsten Merkmale von Tumorzellen ist ihr dysregulierter pH-Wert und der daraus resultierende pH-Gradient aufgrund einer Änderung im Zellmetabolismus, die von hypoxischen Bedingungen begleitet wird. Unter diesen hypoxischen Bedingungen sind die Tumorzellen auf hohe glykolytische Raten angewiesen um ihr Überleben und ihr Wachstum zu sichern. Durch den Mangel an Sauerstoff wird nicht nur der Hypoxie induzierte Faktor HIF-1 aktiviert, es wird zusätzlich noch die oxidative Phosphorylierung blockiert. Die Energiegewinnung erfolgt nun über die Sauerstoff-unabhängige Glykolyse, allerdings werden nur 2 Mol ATP pro Mol Glukose gewonnen im Vergleich zur oxidativen Phosphorylierung, bei der 38 Mol ATP pro Mol Glukose gewonnen werden.

HIF-1 induziert die Expression von über 60 Genen, zu ihnen zählen auch die wichtigsten pH-Regulatoren, der Monocarboxylat Transporter 4 (MCT4), der Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> Austauscher 1 (NHE1) und die Carboanhydrase IX (CAIX). MCT4 hat die Aufgabe Pyruvat und Laktat mit Protonen aus der Zelle zu transportieren, NHE1 befördert einerseits Natriumionen in die Zelle und andererseits Protonen aus der Zelle und die

Funktion von CAIX liegt in der reversiblen Hydratation von  $\text{CO}_2$  in  $\text{HCO}_3^-$  und  $\text{H}^+$ . All diese Mechanismen führen zu einer Stabilisierung des umgekehrten pH-Gradienten, woraufhin die Zellproliferation erleichtert und die Apoptose umgangen wird. Außerdem kommt es durch die hypoxischen Bedingungen zu einer Resistenzentwicklung gegenüber den bisherigen Therapiemaßnahmen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, ob verschiedene Chemotherapeutika einen Einfluss auf die Genexpressionsmuster und die Proteinmengen des pH-regulierenden Proteins, Carboanhydrase IX, haben.

Die Ovarialkarzinomzelllinien wurden mit den Zytostatika Cisplatin, Etoposid, und Topotecan, mit DFX (induziert HIF-1 und simuliert Hypoxie) und mit 5-Aza-2-Deoxycytidin (ein epigenetischer Modifier, der die DNA-Methyltransferase inhibiert) behandelt.

Die SCLC-Zelllinien wurden ebenfalls mit den oben genannten Zytostatika sowie mit DFX und 5-Aza-2-Deoxycytidin behandelt.

Mittels Western-Blot wurde der Proteinspiegel von CAIX bestimmt, während die Wirkung der Inhibitoren anhand des Chemosensivitätstests und mithilfe der ELISA-Analyse beurteilt wurde.

Für die Entwicklung neuer Zytostatika ist es wichtig, nicht nur die pH-Regulation in Tumorzellen zu verstehen, sondern auch das Verhalten der pH-regulierenden Proteine gegenüber diversen Chemotherapeutika, es könnte sich um einen vielversprechenden Ansatz für neue Behandlungsstrategien handeln.

## 5 Materialien und Methoden

### 5.1 Zellkultur

#### 5.1.1 Zelllinien

##### 5.1.1.1 Ovarialkarzinomzelllinien

**A 2780** ist eine Zelllinie, die aus dem Gewebe eines unbehandelten Patienten entnommen und etabliert wurde und die als Grundlage für die Cisplatin-resistente Zelllinie A 2780cis und für die Adriamycin-resistente Zelllinie A 2780ADR dient. (PHE-Culture Collections)

**PA 1** wurde von Teratokarzinomzellen abgeleitet und durch die Kultivierung von Asziteszellen etabliert. Die 12jährige Patientin ist an einem rezidiven malignen Eierstockteratom erkrankt. (Zeuthen et al., 1980)

**OV 90** Die Zellen für diese Zelllinie wurden einer 64jährigen Patientin, die an einem malignen papillären serösen Adenomkarzinom Stadium IIIC, Grad 3 erkrankt ist, aus dem Eierstock entnommen. (ATCC)

**COV 362** Diese epitheliale endometrioide Ovarialkarzinomzelllinie wurde aus einem Pleuraerguss etabliert. (PHE-Culture Collections)

**A 2780cis** Diese Cisplatin-resistente Zelllinie wurde durch die chronische Exposition der Parenteral-Cisplatin-sensitiven Zelllinie A2780 mit steigender Konzentration von Cisplatin entwickelt. A2780cis ist kreuzresistent gegen Melphalan, Adriamycin und gegen Bestrahlung. (PHE-Culture Collections)

**PEO1** ist eine adhärente Zelllinie aus einem malignen Erguss des peritonealen Aszites einer Patientin mit einem schlecht differenzierten serösen Adenokarzinom. (Langdon et al., 1988; PHE-Culture Collections)

**ES 2** Ursprung dieser Zelllinie ist ein Klarzellkarzinom einer 47 Jahre alten Patientin; die Zellen weisen eine geringe bis mäßige Resistenz gegenüber diverse Chemotherapeutika wie Doxorubicin, Cisplatin,

Etoposid und Carmustin auf. (ATCC)

- OV 13** Diese Zellen wurden zu einer Zelllinie etabliert bevor sich die Patientin einer Chemotherapie unterzogen hat.
- OV 15** Diese Zelllinie wurden der obigen Patientin nach ihrer Chemotherapie entnommen und etabliert.
- CaOV4** Einer 45jährigen Frau mit Adenokarzinom wurden Zellen entnommen und zu dieser Zelllinie etabliert. (ATCC)
- 15233** Diese Zelllinie stammt aus dem Aszites einer 33jährigen Patientin mit hochgradigem serösem Karzinom. Die neoadjuvante Therapie setzte sich aus 3 Zyklen Carboplatin und Paclitaxel zusammen. Die adjuvante Therapie bestand aus insgesamt 8 Zyklen mit derselben Wirkstoffzusammensetzung. (Kreuzinger et al., 2015)
- 13914** Die 66jährige Patientin, aus deren Aszites die Zellen für diese Zelllinie etabliert wurden, wurde einer neoadjuvanten Therapie aus Carboplatin und Paclitaxel unterzogen, danach folgten weitere 6 Zyklen mit derselben Kombination. (Kreuzinger et al., 2015)
- 13699** Einer 53jährigen Frau wurden Zellen aus dem Aszites entnommen und zu dieser Zelllinie etabliert, auch sie hat die Diagnose eines hochgradigen serösen Karzinoms. In diesem Fall setzt sich die Behandlung aus 6 Zyklen Carboplatin/ Paclitaxel zusammen. Eine neoadjuvante Therapie fand nicht statt. (Kreuzinger et al., 2015)
- 13699/18** Dies ist die 18. Passage der obigen Zelllinie.
- 12370/57** Es handelt sich um die 57. Passage der Zelllinie; der 67jährigen Patientin mit hochgradigem serösem Ovarialkarzinom wurden aus dem Aszites Zellen entnommen. Die neoadjuvante Therapie erfolgte durch 3 Zyklen Carboplatin/ Paclitaxel und die adjuvante Therapie durch 6+1 Zyklen aus einer Kombination von Carboplatin/ Paclitaxel und Cisplatin/ Gemcitabin. (Kreuzinger et al., 2015)

**16074/4** Es ist die 4. Passage der Zelllinie, die aus Zellen des Aszites etabliert wurden.

**8669/17** Die Zellen wurden aus dem Aszites entnommen, zu dieser Zelllinie etabliert und die 17. Passage zur weiteren Analyse verwendet.

#### **5.1.1.2 Lungenkarzinomzelllinien**

**NCI-H417** diese aggressive Variante der kleinzelligen Lungenkarzinom-Zelllinien wurde einer Patientin entnommen, die keine vorherige Therapie erhielt. Diese Zelllinie ist therapierefraktär. (Klameth, 2013)

**DMS 153** Etabliert wurde die Linie aus metastasierenden Zellen des Lebergewebes, das bei der Autopsie eines 44jährigen männlichen Patienten, der an einem kleinzelligen Lungenkarzinom erkrankte, entnommen wurde. Er erhielt eine Behandlung mit Methotrexat und Cytosan. (ATCC)

**GLC 14 und GLC 16** Diese beiden Zelllinien wurden aus einem Tumor einer 55jährigen Frau mit kleinzelligem Bronchialkarzinom entnommen. (Berendsen et al., 1988)

**GLC 14** entstammt aus der Biopsie eines supraklavikularen Knotens zum Zeitpunkt der Diagnose. Der Tumor zeigte eine vollständige Antwort auf 5 Zyklen der CDE-Therapie: Cyclophosphamid, Doxorubicin, Etoposid.

**GLC 16** Nach Wiederauftreten des Tumors wurden 4 weitere Zyklen der CDE-Therapie durchgeführt, nach dem vierten Zyklus hat man die Therapie auf Bitte der Patientin abgebrochen. Diese Zelllinie entstammt aus der Biopsie des Lingulasegmentes.

### 5.1.2 Zellkulturbedingungen

- 25cm<sup>2</sup> und 75cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen (TPP, Trasadingen, CH)
- 10ml und 25ml Pipetten (Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, GER)
- RPMI-1640 Medium mit L-Glutamin plus Natriumbicarbonat R8758 (SIGMA-ALDRICH, Buchs, CH)
- Calcium- und Magnesiumfreies 1x PBS ( Phosphate buffered saline)
- Filterspitzen (Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, GER)
- Pasteurpipetten (SIGMA-ALDRICH, Buchs, CH)
- 15ml Zentrifugenröhrchen (TPP, Trasadingen, CH)
- Hettich Rotante Zentrifuge (Hettich Bäch, CH)
- Laminar flow (Thermo Fisher Scientific, Asheville, US)
- Heraeus cytoperm 2 Inkubator (Thermo Fisher Scientific, Asheville, US)
- Olympus CK2 invertiertes Mikroskop mit Phasenkontrast (Spach Optics, Rochester, NY)
- Fötale Bovines Serum-FBS Superior (Biochrom AG Biotechnologie, Berlin, GER)
- 10x Trypsin-EDTA Lösung Nr. 59418 (SIGMA-ALDRICH, Buchs, CH)
- Ethanol (EtOH) (AnalaR NORMAPUR, West Sussex, UK)
- Penicillin-Streptomycin P4083 (SIGMA-ALDRICH, Buchs, CH)
- Cisplatin und Etoposid (SIGMA-ALDRICH, Buchs, CH)
- Topotecan (GlaxoSmithKline plc., London, UK)
- CA IX Inhibitor C207A (erhalten von Prof. Claudiu T. Supuran, Firenze, ITA)

Zunächst werden alle Reagenzien und Medien auf Raumtemperatur erwärmt, der Laminar Flow wird mit 70%igen Ethanol sterilisiert und zum Zellmedium RPMI-1640 werden 10% FBS, 50µg/ml Streptomycin, 100µg/ml Neomycin und 50 Einheiten Penicillin/ml gegeben. Jeden 2. Tag werden die Zelldichte und die Konfluenz der Zellen mithilfe des Mikroskops bestimmt. Das Medium der adhären Zellen wird abgesaugt und die Zellen werden mit 1x PBS gewaschen, nach dessen Entfernung wird 1x Trypsin hinzugefügt, danach wird für 4 Minuten bei 37°C inkubiert bis sich alle Zellen ablösen. Die Zellsuspension wird anschließend 3 Minuten bei 450g zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen mit einer angemessenen Menge des Mediums verdünnt. Ein Drittel dieser Zellen wird in eine neue Kulturflasche mit 6ml Medium überführt und bei

37°C mit 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Um die Zellsuspension aufrechtzuerhalten wird ein Teil der Zellmediumsuspension in eine neue Kulturflasche gegeben und frisches Medium hinzugefügt. Die übrigen adhären Zellen werden mit 1x PBS und 1x Trypsin gewaschen und in ein Zentrifugenröhrchen, indem bereits die semi-adhären Zellen übergeführt worden sind, gegeben. Danach inkubiert man bei 37°C und fügt sie zu der Zellmediumsuspension hinzu, um sie wie die adhären Zellen zu behandeln. (Klameth, 2013; Ackermann, 2015)

### **5.1.3 Vorbehandlung der Zellen**

Die Zellen werden mit verschiedenen Wirkstoffen, wie Zytostatika und Inhibitoren in Sixwell-Gewebekulturplatten behandelt um anschließend durch RNS- und Proteinisolation deren Einfluss auf die Genexpression und Proteinebene in den Zellen zu analysieren.

#### **Desferrioxamin-DFX**

Dieser Eisenchelator simuliert der Zelle Hypoxiebedingungen, täuscht also den Sauerstoffsensoren und inhibiert die Hydroxylasen, die die  $\alpha$ -Einheiten von HIF, den Hypoxie-induzierenden Faktor, markieren und zum Abbau von HIF führen würden.

#### **C207A**

Dieses positiv geladene Sulfonamid inhibiert die Zink-bindende Seite der katalytischen Domäne der Carboanhydrase IX.

#### **Cisplatin**

Das Zytostatikum zählt zu den bifunktionellen Alkylantien, die durch Quervernetzung von DNS-Strängen zu Interstrang- und Intrastrangbrückenbildungen führen und damit letale Läsionen auslösen. Die Mitose, DNS-Reparaturmechanismen sowie die Aktivität der Telomerase werden verhindert und als Folge dessen kommt es zur Einleitung der Apoptose. (Aktories et al., 2009)

#### **Etoposid**

Das Glykosid des Podophyltoxins hemmt die Topoisomerase II, daraufhin kommt es zu Einzel- und Doppelstrangbrüchen der DNS und im weiteren Schritt wird die Apoptose eingeleitet. (Aktories et al., 2009)

## **Topotecan**

bindet an den Topoisomerase I–DNS–Komplex nach Spaltung der DNS, diese kann daraufhin nicht mehr zusammengefügt werden, somit wird die DNS Replikation gehemmt und ein Doppelstrangbruch tritt auf. (Aktories et al., 2009)

## **5-Aza-2-Deoxycytidin**

ist ein epigenetischer Modifizierer, der die DNS–Methyltransferase inhibiert, was zu einer Demethylierung der DNS und zu einer Genaktivierung durch das Remodelling des geöffneten Chromatins führt. Die Gene werden synergistisch wieder reaktiviert, wenn die Demethylierung mit der Histon Hyperacetylierung kombiniert ist. (Sigma-Aldrich)

## **5.2 Isolierung der Proteine**

- Sixwell–Platte
- Radio–Immunoprecipitation Assay (RIPA)–Puffer

SDS	0.1%
TRIS	25mM
NaCl	150mM
Natriumdeoxycholat	1%
Nonidet P-40 substitute – NP – 40 (SIGMA – Aldrich, Buchs, CH)	1%
- Proteaseinhibitor für die Verwendung mit Säugetierzellen und Gewebeextrakten (SIGMA–Aldrich, Buchs, CH)
- Zellschaber – cell scrapers (TPP, Trasadingen, CH)
- Diverse Pipetten (Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, GER)
- Eppendorf–Epruvetten 1,5ml (Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, GER)
- Insulinspritzen 30G Nadel (Insumed, Artsana, Grandate, IT)
- Thermomixer comfort (Eppendorf AG, Hamburg, GER)
- Zentrifuge 5415R (Eppendorf AG, Hamburg, GER)
- Zentrifugenröhrchen, 15ml (TPP, Trasadingen, CH)

Für die Isolierung der Proteine wird zunächst der Überstand des Nährmediums abgesaugt und anschließend werden in jedes Well 100µl RIPA–Puffer und 1µl

Proteaseinhibitor pipettiert, nach kurzem Warten schabt man die Zellen mit einem Zellschaber ab und überführt sie in Eppendorf–Epprouvetten.

Die Zellen werden nicht nur chemisch aufgebrochen, sondern auch mechanisch mit Insulinspritzen. Danach werden die Epprouvetten bei 4°C und 1400rpm 30 Minuten lang geschüttelt und anschließend in einer Zentrifuge, die ebenfalls auf 4°C gekühlt ist, zentrifugiert für die Dauer von 10 Minuten und bei 10.000g.

Im nächsten Schritt entfernt man das entstandene Pellet, das aus unlöslichen Zellmaterial besteht und lagert die Proben über Nacht bei -20°C. (Klameth, 2013; Ackermann, 2015)

### 5.3 Proteinquantifizierung

- 96well Platte (Nunc, Roskilde, DK)
- BCA Protein Assay Reagent A (Thermo Fisher Scientific, Asheville, US)
- BCA Protein Assay Reagent B (Thermo Fisher Scientific, Asheville, US)
- Dispenserspitze – Biozym Ritips professional 10ml (Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, GER)
- Heraeus cytoperm 2 Inkubator (Thermo Fisher Scientific, Asheville, US)
- Infinite M200 Pro (Tecan Group Ltd. Männedorf, CH)
- BSA–Albumin (PAN Biotech, Aidenbach, GER)

#### 5.3.1 Theorie

Die Proteinquantifizierung wird mittels BCA–Reaktion (Bicinchoninic acid assay) durchgeführt, es handelt sich hierbei um eine modifizierte Lowry–Methode, die es ermöglicht, Proteinkonzentrationen im Bereich von 0.5µg/ml bis 1.5mg/ml zu bestimmen. Die benötigten BCA Protein Assay Reagenzien A und B enthalten Natriumkarbonat, Natriumbikarbonat, Pierce® BCA Detektion–Reagens und Natriumtartrat in 0.1N Natriumhydroxid, sowie Kupfersulfatpentahydrat.

Die zweiwertigen Kupferionen werden durch die Proteine zu einwertigen Kupferionen reduziert und geben mit der Bicinchoninsäure einen violetten Farbstoff.

In Abhängigkeit der Proteinkonzentration kommt es zu einem mehr oder weniger intensiven Farbumschlag von grün nach violett. Die Absorption des violetten Farbstoffes wird bei einer Wellenlänge von 562nm vermessen. (Thermo Scientific)

### 5.3.2 Durchführung

In eine 96well Platte kommen je 25µl des BSA–Albumin–Standards in bekannten Konzentrationen, beginnend bei 3µg/µl bis 0.05µg/µl. Als Blank wird bidestilliertes Wasser verwendet.

Die Proteinproben werden verdünnt (1Teil Protein+4Teile H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>) und ebenfalls zu je 25µl in die einzelnen Wells pipettiert, sowohl von den Standards als auch von den Proben werden Doppelbestimmungen durchgeführt.

Anschließend wird eine Lösung der BCA Protein Assay Reagenzien A und B in einem Verhältnis von 50:1 vorbereitet und in jedes Well wird mithilfe einer Dispenserspitze 200µl von dieser Lösung hinzugefügt. Die Platte wird bei 37°C inkubiert und nach 30 Minuten wird die Absorption der Proteine mit dem Infinite M200 Pro gemessen. (Klameth, 2013; Ackermann, 2015)

## 5.4 Western Blot

### 5.4.1 Theorie

Western Blot ist eine wichtige Technik, die vor allem in der Zell– und Mikrobiologie angewandt wird. Mit dieser Technik kann man spezifische Proteine aus einem komplexen Proteingemisch, das zuvor aus Zellen extrahiert wurde, identifizieren.

Zunächst werden die Proteine nach ihrer Größe aufgetrennt, danach auf eine Trägermembran übertragen und anschließend werden die Zielproteine mit primären und sekundären Antikörper markiert um sie sichtbar zu machen. (Mahmood et al., 2012)

### 5.4.2 Durchführung

- 4x Laemmli Sample Buffer\* (Bio-Rad Laboratories Inc., California, US)
  - 44.4% (v/v) Glyzerin
  - 227.8 mM TRIS–HCl ph = 6.8
  - 4.4 % LDS
  - 0.02% Bromphenolblau
  - 20% β–Mercaptoethanol frisch vor jedem Gebrauch hinzugefügt
- \*BIO–RAD Laboratories, Inc. 2000 Alfred Nobel Drive, Hercules, CA 94547 USA
- PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts,US)

- Thermomixer comfort (Eppendorf AG, Hamburg, D)
- Mini-Protean TGX Precast Gels (Bio-Rad Laboratories Inc., California, US)
- Mini-Protean Tetra Cell (Bio-Rad Laboratories Inc., California, US)
- Trans-Blot Turbo Transfer Pack, Mini format, 0,2µm PVDF (Bio-Rad Laboratories Inc., California, US)
- Trans-Blot Turbo Transfer System (Bio-Rad Laboratories Inc., California, US)
- 10x Laemmli Puffer

SDS	10g
TRIS	30g
Glyzerin	144g
H <sub>2</sub> O bidest	ad 1l

- Fixmilch Instant, sofortlösliches Magermilchpulver (Maresi, Wien, AT)
- Anti-h/m/rHIF-1α Purified Goat 1:400 (R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, US)
- Donkey Anti Goat IgG HRP 1:2000 (Santa Cruz Biotechnology)
- pAB anti-Carbonic Anhydrase IX Antibody 1:6000 (Novus Biologicals, Littelton, US)
- Goat anti rabbit IgG-HRP 1:2000 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, US)
- HSP 90
- Roto-Shake Genie (Scientific Industries, Bohemia, NY)
- 10x PBS-Phosphate buffered saline-Phosphatgepufferte Salzlösung

Kaliumdihydrogenphosphat	2g
Natriumchlorid	80g
Kaliumchlorid	2g
Dinatriumhydrogenphosphat	14,4g

Nach Lösen der einzelnen Komponenten in einem Liter bidestilliertem Wasser wurde der pH des Puffers auf 7,4 eingestellt.

- Calcium- und Magnesiumfreies 1x PBS
- Tween 20 für die Elektrophorese (SIGMA-ALDRICH, Buchs, CH)
- Immun-Star Western C Kit (Bio-Rad Laboratories Inc., California, US)
- VersaDoc 4000MP Imaging System (Bio-Rad Laboratories Inc., California, US)
- Software Imagelab and Quantity One (Bio-Rad Laboratories Inc., California, US)

#### **5.4.2.1 Probenvorbereitung**

Die Proteine werden nach der Quantifizierung mit dem 4x Laemmli Sample Puffer plus  $\beta$ -Mercaptoethanol vermischt, im Verhältnis 3:1. Der Puffer enthält Lithiumdodecylsulfat-LDS, ein anionisches Detergens, das an die Proteine bindet und zu ihrer Denaturierung führt. Es verhindert den Abbau der Proteine während des Erhitzens und stabilisiert ihren pH-Wert während der Elektrophorese. Die Proteine sind somit negativ geladen und wandern zur Anode.

Nach Zugabe des Puffers werden die Proteine bei 70°C für 10 Minuten erhitzt, somit werden die Wasserstoffbrücken gespalten, die Proteine entfalten sich und liegen in ihrer Primärstruktur vor und durch das  $\beta$ -Mercaptoethanol werden zusätzlich noch die Disulfidbrücken gespalten. (Klameth, 2013; Ackermann, 2015)

#### **5.4.2.2 LDS-Page, Lithiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese**

Zunächst wird das Gel vorbereitet, man wäscht es mit bidestilliertem Wasser, entfernt den Kamm und den grünen Streifen, danach stellt man die Gelkassette in die Mini-Protean Tetra Cell, füllt mit dem 1x Laemmli Puffer auf, dieser wird zuvor aus einem Teil 10x Laemmli Puffer und 9 Teilen bidestilliertem Wasser hergestellt, und entfernt mögliche Luftblasen aus den Taschen. Nun werden 22 $\mu$ l der Proben und 5 $\mu$ l des PageRuler Prestained Protein Ladder in die Taschen des Precast Gels pipettiert, freie Taschen werden mit 5 $\mu$ l des Sample Puffers gefüllt. Danach lässt man das Gel bei 250V 20 Minuten laufen. (Klameth, 2013; Ackermann, 2015)

Nach dem Lauf wird die Gelkassette wieder mit bidestilliertem Wasser gewaschen und vorsichtig auf den Seiten aufgebrochen.

In die Kassette des Trans-Blot Turbo Transfer Systems kommt nun die Membran mit der Unterseite des Transfer Packs, das Gel wird auf die Membran positioniert und darauf wird die Oberseite gelegt und vorhandene Luftblasen werden entfernt. Das Programm „Mixed Molecular Weight“ wird gestartet. Bei konstanten 1,3A und 25V erfolgt innerhalb von 7 Minuten die Übertragung der Proteine auf die Trägermembran. Die Proteine binden an die Membran durch Wasserstoffbrücken und hydrophobe Interaktionen. (Klameth, 2013; Ackermann, 2015)

Nach dem Transfer wird die Membran in eine 0.3% Magermilch–PBS–0.05% Tween–Lösung getaucht und für 30 Minuten am Roto-Shake Genie geschüttelt. Dieser Schritt ist notwendig um alle unspezifischen Bindungsstellen auf der Membran zu blockieren, da diese andernfalls starke Hintergrundsignale geben würden.

Die Antikörper, die für die spezifischen Nachweise der Proteine vorgesehen sind, werden in einem Mix aus PBS–0.05% Tween und der 0.3% Magermilch–PBS–0.05% Tween–Lösung gelöst. (Klameth, 2013; Ackermann, 2015)

Die Membran wird in ein Plastischälchen gegeben und mit dem Primär–Antikörper, Anti–h/m/rHIF–1 $\alpha$  Purified Goat, 80 Minuten zugedeckt geschüttelt, danach wäscht man sie dreimal je 5 Minuten mit PBS–0.05% Tween. Anschließend gibt man den Sekundär–Antikörper, Donkey Anti Goat IgG HRP, auf die Membran und lässt erneut 60 Minuten schütteln. Nun wäscht man die Membran zweimal mit PBS–0.05% Tween und einmal mit PBS, wiederum je 5 Minuten. Nachdem man die Membran gut abgetupft hat, lässt man das Substrat, bestehend aus den beiden Substanzen des Immun–Star Western C Kit, die im Verhältnis 1:1 gemischt werden, 2 Minuten auf der Membran einwirken.

Die Proteine werden mithilfe des VersaDoc 4000MP Imaging Systems detektiert und aufgrund der Intensität ihres Chemilumineszenz–Signals werden sie sichtbar gemacht.

Um die Antikörper–Bindungen aufzubrechen, lässt man die Membran für 15 Minuten in einer 30%igen Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) einwirken und wäscht sie anschließend wieder mit PBS–0.05% Tween. (Klameth, 2013; Ackermann, 2015)

Nun wird die Membran 60 Minuten in der pAB anti–Carbonic Anhydrase IX Antikörper–Lösung geschüttelt, dreimal 5 Minuten mit PBS–0.05% Tween gewaschen und als Sekundär–Antikörper wird Goat anti rabbit IgG–HRP verwendet. Vor der Detektion des CAIX–Enzyms wäscht man zweimal mit PBS–0.05% Tween und einmal mit PBS je 5 Minuten, danach lässt man das Substrat 2 Minuten einwirken.

Das *housekeeping gene* muss im Anschluss detektiert werden um die unterschiedlichen Banden der Proteine vergleichen zu können und um die Menge des geladenen Proteins zu kontrollieren.

Als *housekeeping gene* wird in diesem Fall HSP 90 verwendet, da es mit seiner Größe von 90kDa sowohl vom HIF–1 $\alpha$  mit einer Größe von 100–120kDa, als auch vom CAIX–Enzym mit einer Größe zwischen 50–55kDa unterschieden werden kann. (Klameth, 2013; Ackermann, 2015)

## 5.5 Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay–ELISA für lösliches CAIX

- Human Carbonic Anhydrase IX Quantikine ELISA Kit (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)
- Filterspitzen (Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, GER)
- Pipetten 10ml und 25ml (Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, GER)
- 15ml Zentrifugenröhrchen (TPP, Trasadingen, CH)
- Hettich Rotante Zentrifuge (Hettich Bäch, CH)
- Microplate shaker (Scientific Industries, Bohemia, New York, USA)
- Infinite M200 Pro (Tecan Group Ltd. Männedorf, CH)

### 5.5.1 Theorie

Enzyme linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) ist eine auf Antikörper basierende Nachweismethode für Antigene in Lösungen und Flüssigkeiten. Nicht nur in der Forschung wird diese Methode zur Detektion von Analyten bevorzugt, sondern auch in der klinischen Diagnostik. Man unterscheidet zwischen direktem, indirektem und Sandwich–ELISA, wobei das Sandwich–ELISA sensitiver ist als das direkte.

Beim direktem ELISA bindet das Antigen der Probe an eine feste Oberfläche wie dem Boden einer Mikrotiterplatte, bei der indirekten Variante bindet das Antigen an einen Antikörper, der wiederum an eine feste Phase gekoppelt ist.

Alle anderen Bindungsstellen werden mit einem nicht–reagierenden Protein wie Albumin blockiert und nach einigen Waschsritten, durch die ungebundene Substanzen entfernt werden, wird ein zweiter Antikörper, der mit einem Enzym gekoppelt ist, hinzugefügt. Dieser bindet ebenfalls an das Antigen, aber an ein anderes Epitop. Wiederum werden mehrere Waschsritte durchgeführt und anschließend wird ein Substrat zu der Probe hinzugegeben.

In den meisten Fällen katalysieren die Enzyme eine Farbreaktion in der Probe, andere Möglichkeiten wären Fluoreszenz oder elektrochemische Signale.

Die Intensität der Farbänderung ist abhängig von der Menge an Antigen, die in der Probe vorhanden ist, messbar ist die Absorption. ( Klameth, 2013; Ackermann, 2015)

### 5.5.2 Durchführung

Nach Anleitung des Kits werden zunächst alle Reagentien, die für den solublen Carboanhydrase IX–ELISA benötigt werden, verdünnt und gelöst.

Die Zellmedien werden in entsprechende Zentrifugenröhrchen überführt und für 4 Minuten bei 450g zentrifugiert, die Überstände sind nun die entsprechenden Proben.

Es werden Doppelbestimmungen durchgeführt, zunächst werden in jedes Well 50µl des RD1–21 Assay Diluenten pipettiert, danach 100µl der Proben und zuletzt der Standard. Man lässt die Mikrotiterplatte 2 Stunden bei Raumtemperatur am Shaker bei 500rpm inkubieren. Die Lösung wird verworfen und es wird viermal mit 400 µl Waschpuffer gewaschen. Danach fügt man pro Well 200µl des Carboanhydrase IX Konjugates hinzu und inkubiert für weitere 2 Stunden am Shaker bei 500rpm. Es folgen weitere 4 Waschschritte bevor man 200µl des Substrates in jedes Well zugibt. Die Inkubationszeit beträgt 30 Minuten unter Lichtausschluss. Im Anschluss daran werden pro Well 50µl der Stopp–Lösung pipettiert und es kommt zu einem Farbumschlag von blau nach gelb. Die Intensität der Farbänderung hängt von der Menge des löslichen CAIX in den Proben ab. Bei einer Wellenlänge von 450nm wird die Intensität der gelben Farbe vermessen, wobei das pure Medium in einem weiteren Well als Blank dient. (Klameth, 2013; Ackermann, 2015)

### 5.6. Chemosensitivitätstest

- 96–well Platte (Greiner, Kremsmünster, Austria)
- Cisplatin, Etoposid (SIGMA-ALDRICH, Buchs, CH)
- Topotecan (GlaxoSmithKline plc., London, UK)
- Heraeus cytoperm 2 Inkubator (Thermo Fisher Scientific, Asheville, US)
- EZ4U (Biomedica, Wien, Austria)
- Lyophilisierte Substrate
- Aktivator, gebrauchsfertig
- Infinite M200 Pro (Tecan Group Ltd. Männedorf, CH)
- Filterspitzen (Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, GER)

### 5.6.1 Theorie

Im Allgemeinen werden Proliferationstests zur Analyse von Wachstumsfaktoren, Nährstoffen, Zytokinen, zytotoxischen Substanzen sowie Chemotherapeutika genutzt. Der Chemosensitivitätstest ermöglicht es die Wirksamkeit von Chemotherapeutika sowie das Ansprechen von Tumorzellen auf diese Therapien in einzelnen Patienten vorherzusagen.

Diese Methode beruht auf der Umwandlung von farblosen bis schwach gefärbten Tetrazoliumsalzen in ihre intensiv gefärbte Formazanderivate. Diese Reduktion kann aber nur von intakten Mitochondrien durchgeführt werden, da diese nach Absterben der Zellen innerhalb von Minuten inaktiviert werden und somit erhält man eine gute Unterscheidungsmöglichkeit zwischen lebenden und abgetöteten Zellen. (Mosmann, 1983)

### 5.6.2 Durchführung

Zunächst werden pro Well einer Mikrotiterplatte  $1 \cdot 10^4$  Zellen in 100µl Medium gesetzt und Cisplatin sowie die anderen Zytostatika werden in weitere 100µl Medium gelöst.

Cisplatin ist in einer physiologischen Kochsalzlösung gelöst und wird in zweifachen Schritten verdünnt, begonnen wird mit einer Konzentration von 10µM und beendet wird bei 0.02µM. Das verwendete DFX wird in folgenden Konzentrationen hinzugefügt, 0µM, 100µM, 200µM und 400µM. Nun inkubiert man die Proben 4 Tage lang bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. Nach diesen 4 Tagen wird das Substrat des EZ4 U Kit in 2.5ml der Aktivator-Lösung gelöst und auf eine Temperatur von 37°C erwärmt, anschließend werden 20µl der bereiteten Substratlösung in jedes Well pipettiert und die Platte wird nochmals bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> 4 Stunden inkubiert. (Klameth, 2013; Ackermann, 2015)

Während dieser Zeit ist es den Mitochondrien der lebenden Zellen möglich das farblose Tetrazolium in sein intensivgefärbtes Derivat Formazan zu reduzieren. Die Mitochondrien der abgetöteten Zellen werden wenige Minuten nach dem Zelltod inaktiviert.

Nach 4 Stunden wird mithilfe eines Mikroplatten-Readers die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 450nm bestimmt, um die Überlebensrate der Zellen nach der Behandlung zu bestimmen. Als Blank wird eine leeres Well benutzt und für die 100%-Proliferation nimmt man unbehandelte Zellen in Medium. (Klameth, 2013; Ackermann, 2015)

## 6 Ergebnisse

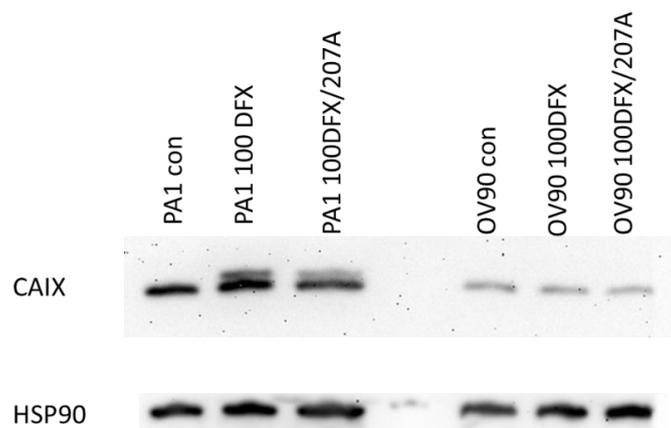
### 6.1 Western Blot Analysen

#### 6.1.1 CAIX–Western Blot der Ovarialkarzinomzelllinien

Mithilfe des Western Blot wurde die Menge des CAIX–Proteins in den Karzinomzelllinien bestimmt, nachdem sie mit diversen Zytostatika und Inhibitoren behandelt wurden. Als *housekeeping gene* wurde HSP90 verwendet, da es aufgrund seiner Größe gut von der Carboanhydrase IX zu unterscheiden ist. In allen durchgeführten Blots liegen die Banden von CAIX im erwarteten Bereich zwischen 50–55kDa vor.

##### 6.1.1.1 CAIX–Western Blot von DFX und DFX+C207A behandelten PA1 und OV90 Zellen

Die Zelllinien PA1 und OV90 wurden sowohl mit 100µmolar DFX als auch mit 100µmolar DFX+100µg C207A behandelt.



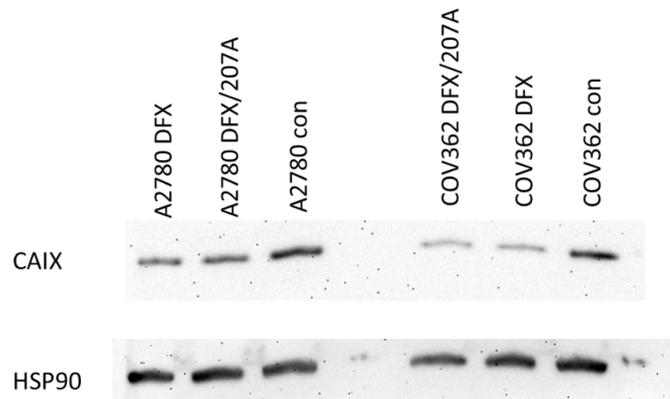
**Abbildung 3: CAIX-Western Blot von DFX und DFX+C207A behandelten PA1 und OV90 Zellen**

**PA1:** hier zeigt sich ein Anstieg von CAIX in den mit DFX behandelten Zellen, was durch eine zusätzliche Bande noch verstärkt wird, auch die mit DFX+C207A behandelten Zellen lassen eine zusätzliche Bande erkennen

**OV90:** in diesem Fall zeigt sich keine nennenswerte Änderung des CAIX

### 6.1.1.2 CAIX–Western Blot von DFX und DFX+C207A behandelten A2780 und COV362 Zellen

Dieser CAIX–Western Blot zeigt die Zelllinien A2780 und COV362, nach einer Behandlung mit 100µmolar DFX und mit 100µmolar DFX+100µg C207A.



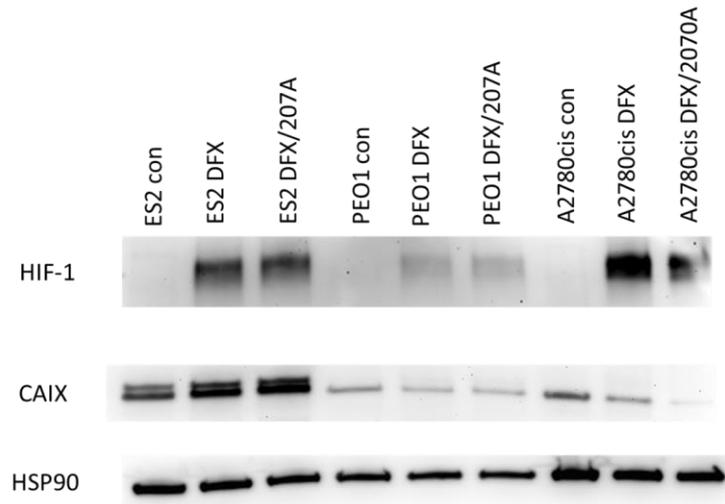
**Abbildung 4: CAIX-Western Blot von DFX und DFX+C207A behandelten A2780 und COV362 Zellen**

**A2780:** hier kommt es zu einer Abschwächung der Carboanhydrase IX

**COV362:** es lässt sich eine deutliche Reduktion der Bandenintensität der behandelten Zellen erkennen im Vergleich zur Kontrolle

### 6.1.1.3 CAIX–Western Blot von DFX und DFX+C207A behandelten ES2, PEO1 und A2780cis Zellen

CAIX–Western Blot der Zelllinien ES2, PEO1, A2780cis, nachdem sie mit 100µmolar DFX und mit 100µmolar DFX+100µg C207A behandelt wurden.



**Abbildung 5: CAIX-Western Blot von DFX und DFX+C207A behandelten ES2, PEO1 und A2780cis Zellen**

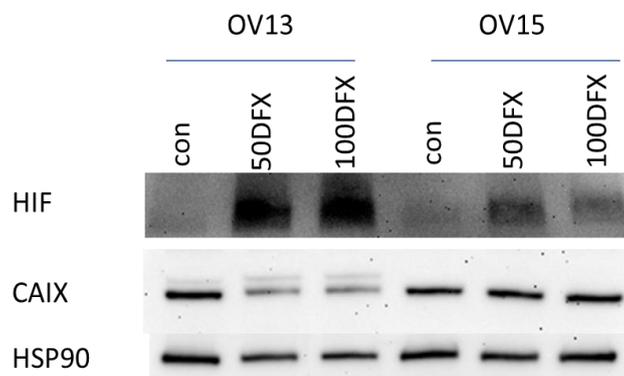
**ES2:** in diesem Fall steigt die Intensität der CAIX-Banden in den behandelten Zellen an, die Induktion von HIF-1 ist auch deutlich zu sehen

**PEO1:** hier scheint CAIX eher abzunehmen, obwohl man durch HIF-1 die Wirkung von DFX erkennen kann

**A2780cis:** die CAIX-Bande in der Kontrolle scheint deutlich intensiver zu sein als in den Proben

#### 6.1.1.4 CAIX-Western Blot von DFX behandelten OV13 und OV15 Zellen

Die Zelllinien OV13 und OV15 wurden mit 50µmolar DFX sowie mit 100µmolar DFX versetzt.



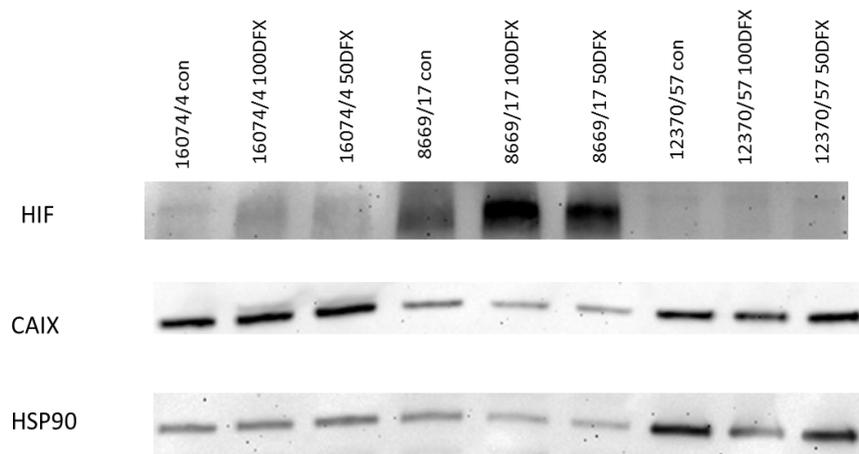
**Abbildung 6: CAIX-Western Blot von DFX behandelten OV13 und OV15 Zellen**

**OV13:** in diesem Fall zeigt sich eine deutliche Abnahme der Intensität der CAIX–Banden, die Banden von HIF–1 zeigen eine starke Induktion des Hypoxie induzierten Faktors

**OV15:** alle 3 Banden der Carboanhydrase IX scheinen die gleiche Intensität aufzuweisen

### 6.1.1.5 CAIX–Western Blot von DFX behandelten 16074/4, 8669/17 und 12370/57 Zellen

Die Zelllinien aus dem Aszites 16074/4, 8669/17 und 12370/57 wurden mit 50µmolar DFX und mit 100µmolar DFX behandelt.



**Abbildung 7: CAIX-Western Blot von DFX behandelten 16074/4, 8669/17 und 12370/57 Zellen**

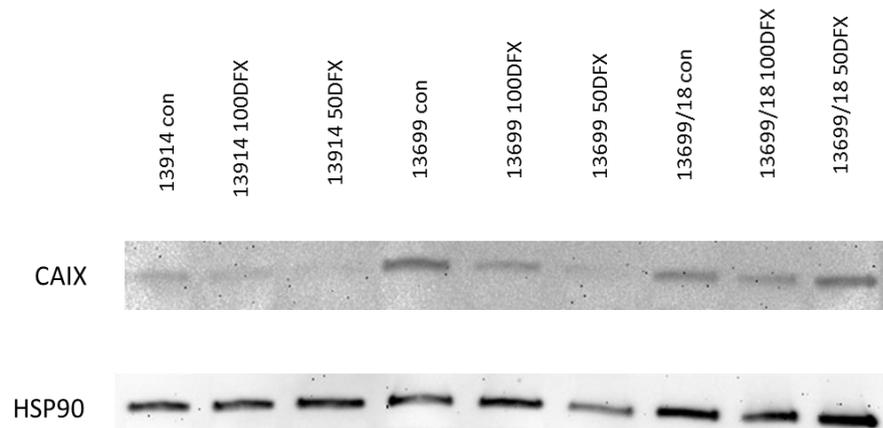
**16074/4:** hier erkennt man leichte zusätzliche Banden über der eigentlichen CAIX–Bande, die Intensität der ursprünglichen Bande hat sich kaum verändert

**8669/17:** es kommt zu einer leichten Abschwächung des CAIX–Signales, obwohl sich eine HIF–1 Induktion erkennen lässt

**12370/57:** die mit 100µmolar DFX behandelten Zellen zeigen eine ganz leichte Abschwächung von CAIX, auffallend ist hier, dass auch die HSP90–Bande deutlich schwächer ist

### 6.1.1.6 CAIX–Western Blot von DFX behandelten 13914, 13699 und 13699/18 Zellen

CAIX–Western Blot der Zelllinien aus dem Aszites 13914, 13699 und 13699/18 nach einer Behandlung mit 50µmolar DFX bzw. mit 100µmolar DFX



**Abbildung 8: CAIX-Western Blot von DFX behandelten 13914, 13699 und 13699/18 Zellen**

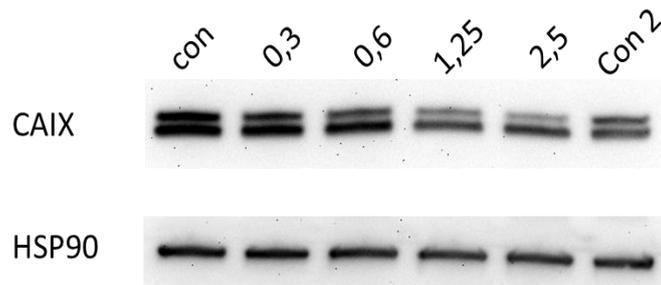
**13914:** in diesem Fall erkennt man die Banden kaum, wobei die Kontrolle noch am stärksten zu sein scheint

**13699:** auch hier hat die Kontrollbande die stärkste Intensität und CAIX nimmt am deutlichsten in den mit 50µmolar DFX behandelten Zellen ab, wobei hier auch das *housekeeping gene* am schwächsten ist im Vergleich zu seinen anderen Banden

**13699/18:** die CAIX–Bande in den mit 100µmolar DFX behandelten Zellen ist am schwächsten, die beiden anderen Banden scheinen annähernd die gleiche Intensität aufzuweisen

### 6.1.1.7 CAIX–Western Blot von Cisplatin behandelten ES2 Zellen

Die Zelllinie ES2 wurde mit ansteigenden Konzentrationen von Cisplatin beginnend bei 0.3µmolar bis zu 2.5 µmolar versetzt.

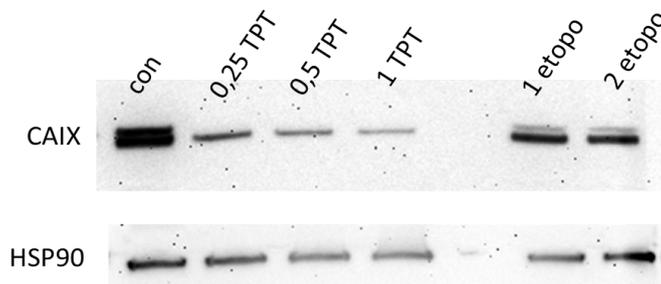


**Abbildung 9: CAIX-Western Blot von Cisplatin behandelten ES2 Zellen**

Hier scheint die CAIX-Konzentration mit steigender Cisplatinkonzentration abzunehmen.

#### **6.1.1.8 CAIX–Western Blot von Topotecan und Etoposid behandelten ES2 Zellen**

CAIX–Western Blot der Zelllinie ES2 nach einer Behandlung mit Topotecan (TPT) bzw. Etoposid (etopo)



**Abbildung 10: CAIX-Western Blot von Topotecan und Etoposid behandelten Zellen**

Im Vergleich zur Kontrolle nimmt die Konzentration von CAIX in den mit Topotecan behandelten Zellen deutlich ab, auch in den Zellen, die einer Etoposid–Behandlung unterzogen wurden, zeigt sich eine Abnahme von CAIX, wobei hier auch die Banden des HSP90 schwächer werden.

### 6.1.1.9 CAIX–Western Blot von 10µM 5–Aza–2–Deoxycytidin behandelten ES2, OV90, A2780 und 15233 Zellen

Die Zelllinien ES2, OV90, A2780 und 15233 nach einer Behandlung mit 10µM 5-Aza-2-Deoxycytidin (Aza)

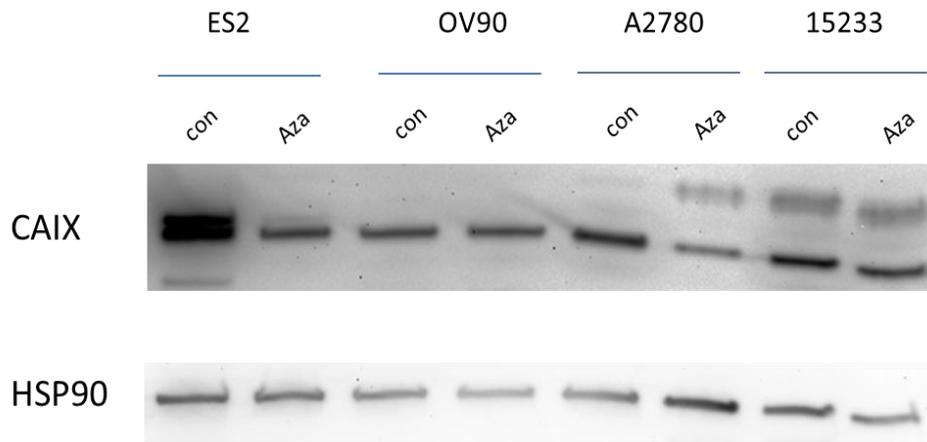


Abbildung 11: CAIX–Western Blot von 10µM 5-Aza-2-Deoxycytidin behandelten ES2, OV90, A2780 und 15233 Zellen

**ES2:** die Banden von CAIX zeigen eine deutliche Abnahme in ihrer Intensität

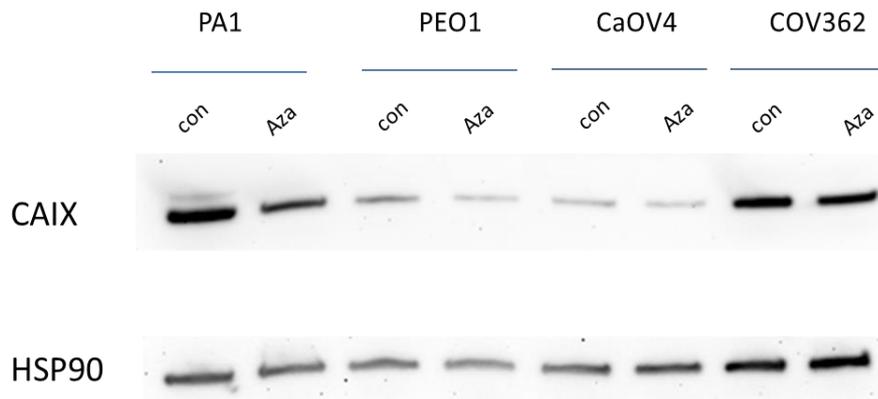
**OV90:** in diesem Fall zeigt sich kein Unterschied zur Kontrolle

**A2780:** auch hier erkennt man die Abnahme der Menge an Carboanhydrase IX

**15233:** die CAIX–Bande zeigt eine geringe Abschwächung ihrer Intensität

### 6.1.1.10 CAIX–Western Blot von 10µM 5–Aza–2–Deoxycytidin behandelten PA1, PEO1, CAOV4 und COV362 Zellen

CAIX–Western Blot von PA1, PEO1, CaOV4 und COV362 nach einer Behandlung mit 10µM 5-Aza-2-Deoxycytidin (Aza)



**Abbildung 12: CAIX-Western Blot von 10 $\mu$ M 5-Aza-2-Deoxycytidin behandelten PA1, PEO1, CAO4 und COV362 Zellen**

**PA1:** es ist zu einer Abnahme von CAIX gekommen

**PEO1:** auch hier lässt sich eine leichte Reduktion des CAIX erkennen

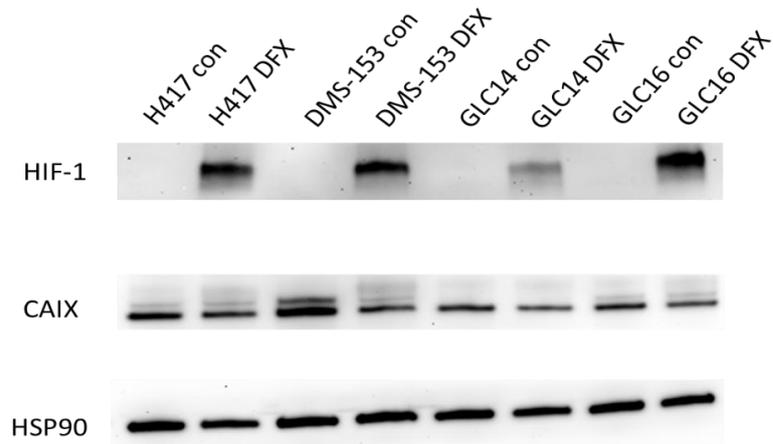
**CaOV4:** hier scheint es keine nennenswerte Veränderung zu geben

**COV362:** die Konzentration des CAIX hat sich im Vergleich zur Kontrolle nicht verändert

## 6.1.2 CAIX–Western Blot der Bronchialkarzinomzelllinien

### 6.1.2.1 CAIX–Western Blot von DFX behandelten H417, DMS153, GLC14 und GLC16 Zellen

CAIX–Western Blot der Zelllinien H417, DMS153, GLC14 und GLC16 nach einer Behandlung mit 100 $\mu$ molar DFX



**Abbildung 13: CAIX-Western Blot von DFX behandelten H417, DMS153, GLC14 und GLC16 Zellen**

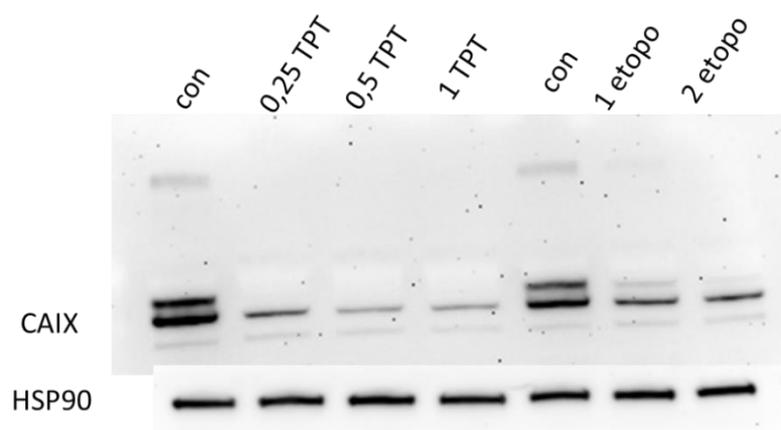
**H417:** hier treten zusätzliche Banden über der ursprünglichen Bande von CAIX auf, die Hauptbande scheint minimal abgeschwächt zu sein

**DMS153:** in diesem Fall hat CAIX deutlich abgenommen, dennoch gibt es auch hier weitere Banden

**GLC14 und GLC16:** auch hier zeigen sich leichte Abschwächungen von CAIX

### 6.1.2.2 CAIX–Western Blot von Topotecan und Etoposid behandelten A549 Zellen

Die Zelllinie A549 wurde mit Topotecan (TPT) bzw. Etoposid (etopo) behandelt.



**Abbildung 14: CAIX-Western Blot von Topotecan und Etoposid behandelten A549 Zellen**

Die beiden Zytostatika führen zu einer deutlichen Abnahme der Carboanhydrase IX in den Zellen.

### 6.1.2.3 CAIX–Western Blot von 10µM 5–Aza–2–Deoxycytidin behandelten GLC14, GLC16, H417 und DMS153 Zellen

CAIX–Western Blot der Zelllinien GLC 14, GLC16, H417 und DMS 153 nach einer Behandlung mit 10µM 5-Aza-2-Deoxycytidin (Aza)

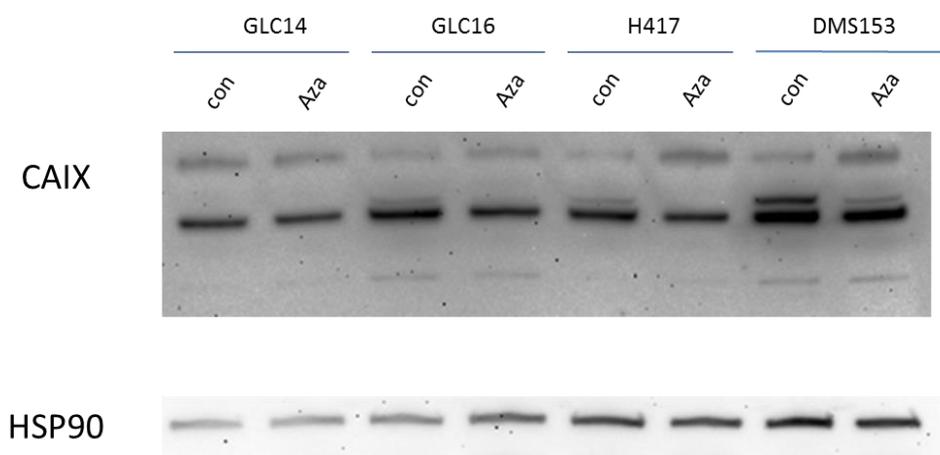


Abbildung 15: CAIX-Western Blot von 10µM 5-Aza-2-Deoxycytidin behandelten GLC14, GLC16, H417 und DMS153 Zellen

**GLC14:** hier zeigt sich kaum eine Veränderung der Bandenintensität

**GLC16:** die Bande des CAIX zeigt eine leichte Abnahme der Proteinmenge

**H417:** auch hier kommt es zu einer Reduktion von CAIX

**DMS153:** in diesem Fall ist die ursprüngliche Bande von CAIX unverändert, nur die zusätzliche Bande darüber hat leicht abgenommen

#### 6.1.2.4 CAIX–Western Blot von 1.25µM und 2.5 µM 5–Aza–2–Deoxycytidin behandelten H417, GLC14 und GLC16 Zellen

CAIX–Western Blot der Zelllinien H417, GLC 14 und GLC16 nach einer Behandlung mit 1.25µM und mit 2.5µM 5-Aza-2-Deoxycytidin

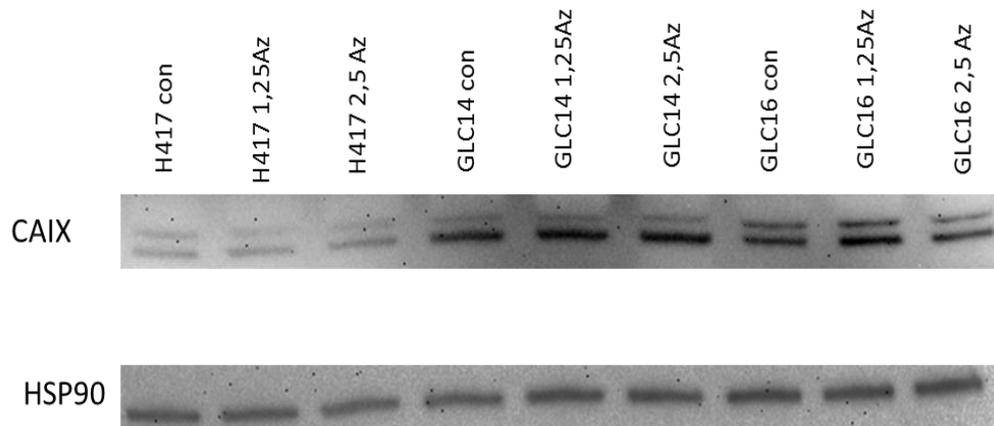


Abbildung 16: CAIX-Western Blot von 1.25µM und 2.5 µM 5-Aza-2-Deoxycytidin behandelten H417, GLC14 und GLC16 Zellen

**H417:** hier bleibt die Menge an CAIX unverändert

**GLC14:** auch in diesem Fall kommt es zu keinem nennenswerten Unterschied

**GLC16:** die Konzentration von CAIX scheint in den mit 1.25µM 5-Aza-2-Deoxycytidin behandelten Zellen zugenommen zu haben

## 6.2 ELISA des löslichen CAIX (sCAIX)

Nach der Inkubation der Zelllinien mit DFX werden die Gewebekulturmedien, in denen sich die Zellen befinden, bei 450g zentrifugiert, dabei kommt es zur Trennung des Zellmediums von den Zellen. Ein Aliquot des Überstandes dient als Probe und die darin enthaltene Konzentration von sCAIX wird mithilfe von ELISA bestimmt.

### 6.2.1 ELISA des löslichen CAIX (sCAIX) – DFX behandelte Ovarialkarzinomzelllinien

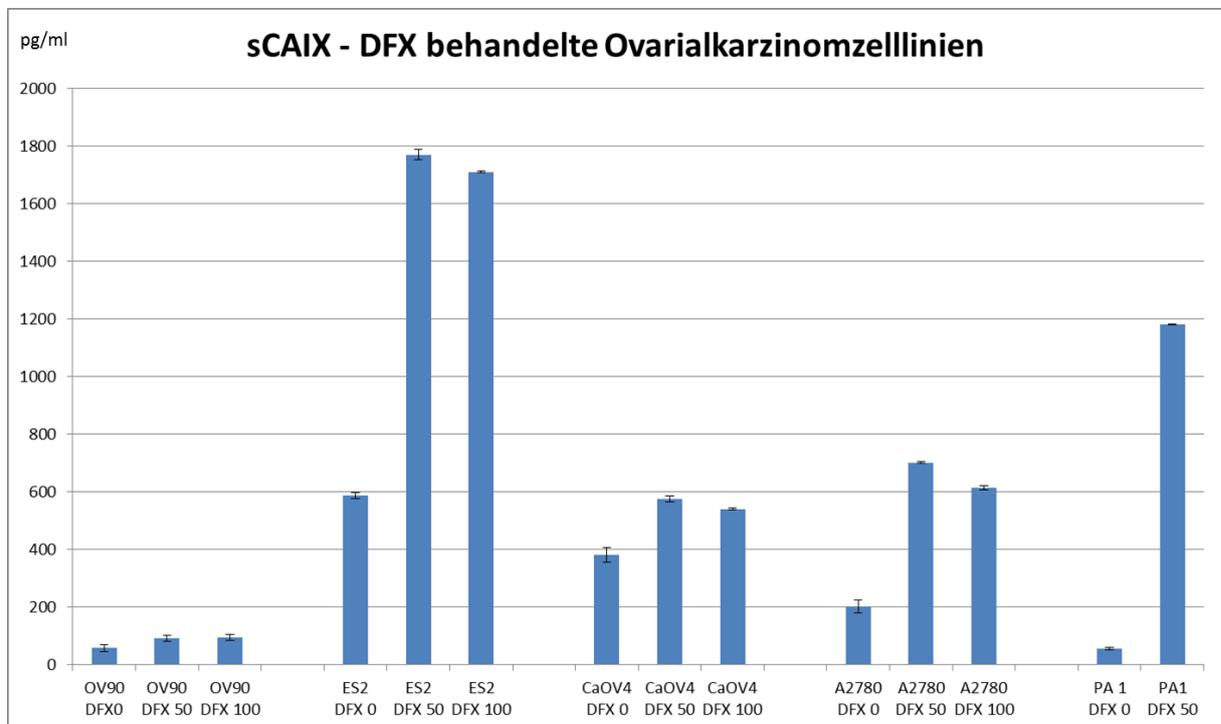


Abbildung 17: sCAIX Konzentration der mit DFX behandelten Ovarialkarzinomzelllinien

Dieses Diagramm verdeutlicht die Unterschiede der sCAIX-Konzentrationen, die in den Zellmedien der Zelllinien nach einer Behandlung mit DFX zu finden sind; die Konzentration des löslichen CAIX steigt in jedem Fall an. Die Zelllinien ES2 und PA1 sind Paradebeispiele dafür, durch die Inkubation mit DFX schießen die Konzentrationen von sCAIX in die Höhe, auch CaOV4 und A2780 lassen einen deutlichen Anstieg von sCAIX erkennen, die OV90-Linie jedoch zeigt nur einen minimalen Konzentrationsanstieg.

## 6.2.2 ELISA des löslichen CAIX (sCAIX) in Ovarialkarzinompatienten

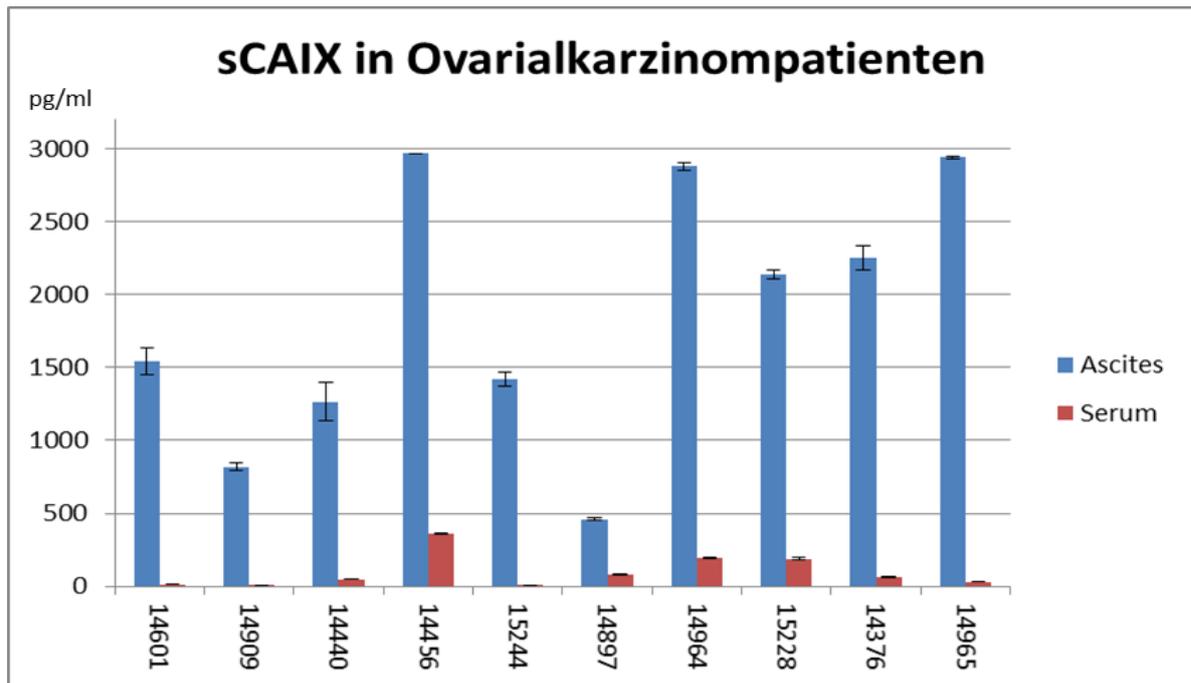


Abbildung 18: sCAIX Konzentration in Ovarialkarzinompatienten

Mithilfe dieses Diagramms erkennt man deutlich wie groß der Unterschied der sCAIX-Konzentration im Aszites ist gegenüber der im Serum. In allen Zelllinien steigt die sCAIX Konzentration im Aszites um ein vielfaches an. Kim et al. (2006) belegten in ihrer Arbeit, dass im Aszites von Ovarialkarzinomen hypoxische Bedingungen vorliegen. Ihre Messungen haben folgende Durchschnittswerte im Aszites ergeben, der  $O_2$ -Partialdrucks von 45.65mmHg liegt deutlich unter dem Normalwert von 75–100mmHg, der Sauerstoffgehalt von 2.52 ist minimal im Vergleich zu seinem Sollwert von 15% bis 23%. Während es zu einer signifikanten Reduktion dieser Sauerstoffwerte kommt, ist der  $CO_2$ -Partialdrucks mit 42.77mmHg leicht erhöht.

### 6.3 Chemosensitivitätstest

Zur Untersuchung der Zellvitalität wurden zunächst  $1 \cdot 10^4$  Zellen der nachfolgenden Zelllinien mit einer Kombination aus DFX und diverser Zytostatika versetzt. Zum Vergleich des Zellüberlebens wurden zu einer konstanten Konzentration von DFX ( $0 \mu\text{M}$ ,  $100 \mu\text{M}$ ,  $200 \mu\text{M}$  und  $400 \mu\text{M}$ ) und zum anderen schrittweise Verdünnungen von den einzelnen Chemotherapeutika, beginnend bei  $10 \mu\text{M}$  bis hin zu  $0.02 \mu\text{M}$ , verwendet. Nachdem die Zellen 4 Tage bei  $37^\circ\text{C}$  und  $5\% \text{CO}_2$  inkubiert wurden, hat man die Anzahl der lebenden Zellen mithilfe des EZ4U Kit bestimmt. Die Kontrolle wurde mit den gleichen Parametern inkubiert und überprüft, jedoch ohne einen Zusatz jeglicher Zytostatika oder DFX.

#### 6.3.1 MTT-Test von Ovarialkarzinomzelllinien

##### 6.3.1.1 MTT-Test von DFX und Cisplatin behandelten PA1 Zellen

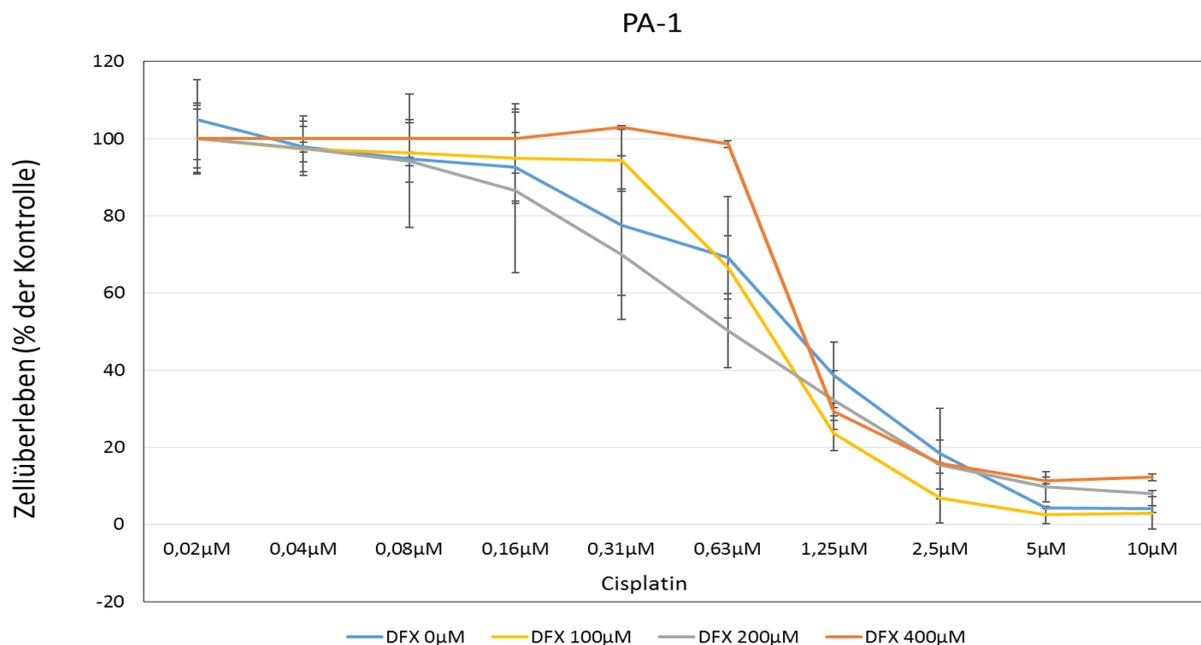


Abbildung 19: MTT-Test von DFX und Cisplatin behandelten PA1 Zellen

Die Wirkung von Cisplatin auf PA1 Zellen lässt sich erst ab einer Konzentration von  $0.31 \mu\text{M}$  erkennen, wobei dazugesagt werden muss nur in Kombination mit  $200 \mu\text{M}$  DFX und ohne DFX. Erst ab einer Konzentration von  $1.25 \mu\text{M}$  sinkt das Zellüberleben unter 40%. Die effektivste Kombination ist in diesem Fall  $100 \mu\text{M}$  DFX plus  $5 \mu\text{M}$  Cisplatin,

denn da befindet sich die Anzahl der überlebenden Zellen knapp über 0%, wohingegen die Kombination von 400µM DFX und Cisplatin die geringste Wirkung auf PA1 Zellen zeigt, denn bis 0.63µM Cisplatin gibt es keine Reaktion der Zellen.

### 6.3.1.2 MTT-Test von DFX und Cisplatin behandelten A2780 Zellen

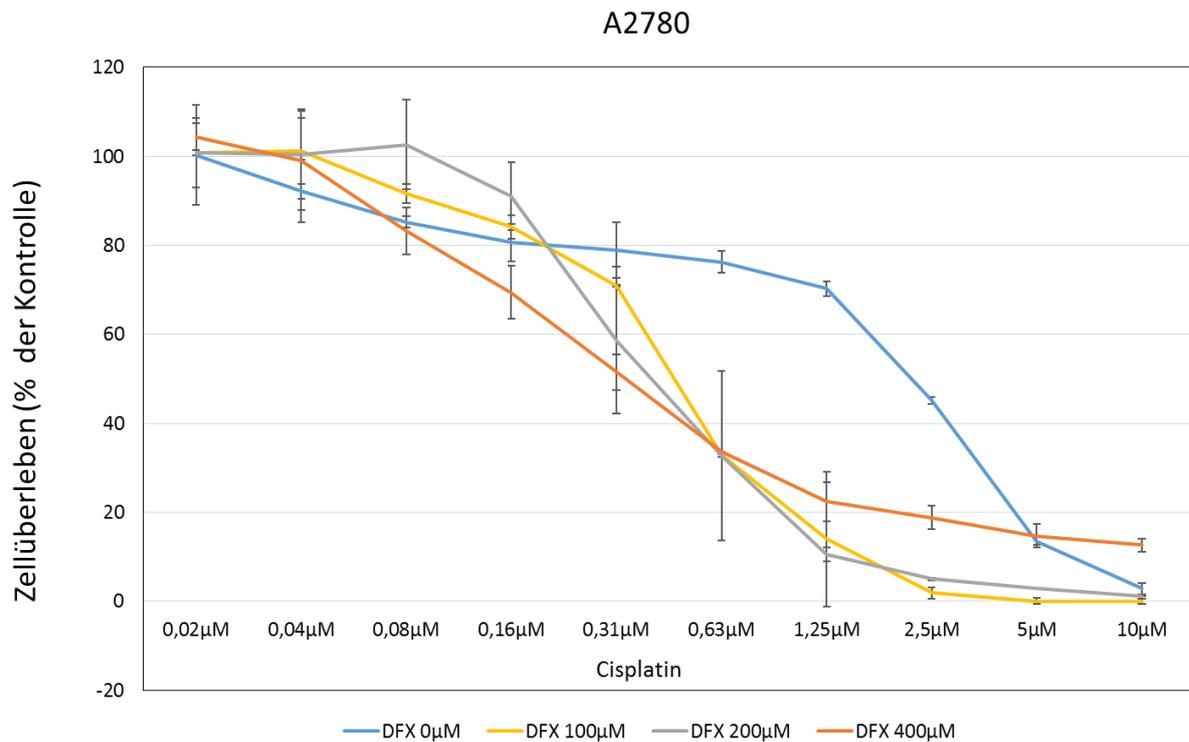
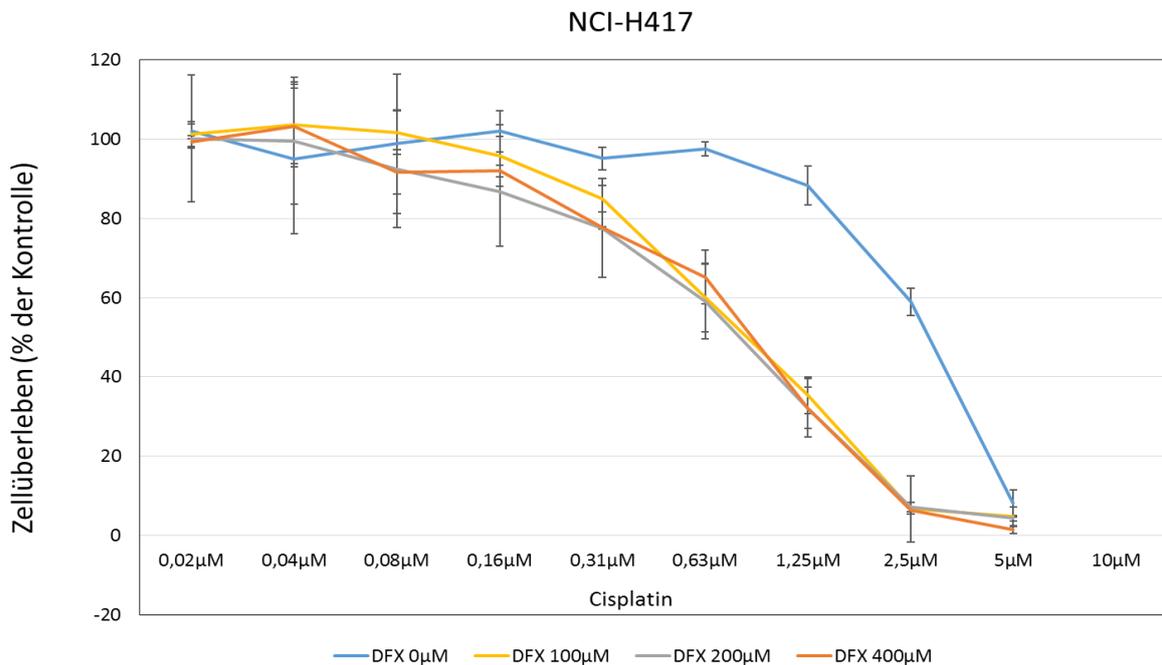


Abbildung 20: MTT-Test von DFX und Cisplatin behandelten A2780 Zellen

Bis zu einer Konzentration von 0.08µM Cisplatin gibt es in allen Gruppen noch eine Überlebensrate von 80%, danach scheint das Zytostatikum langsam eine Wirkung auf die Zellen zu haben, die Kombination aus DFX und Cisplatin scheint gegenüber der Monotherapie von Cisplatin einen stärkeren Effekt zu haben, da selbst bei 1.25µM Cisplatin allein noch ca. 70% der Zellen überlebt haben. Ab einer Konzentration von 2.5µM Cisplatin liegt das Zellüberleben nur mehr knapp über 0% mit Ausnahme der Zellen, die mit Cisplatin und 400µM DFX versetzt wurden, hier liegt das Überleben noch bei ca. 10%.

## 6.3.2 MTT-Test von SCLC-Zelllinien

### 6.3.2.1 MTT-Test von DFX und Cisplatin behandelten NCI-H417 Zellen

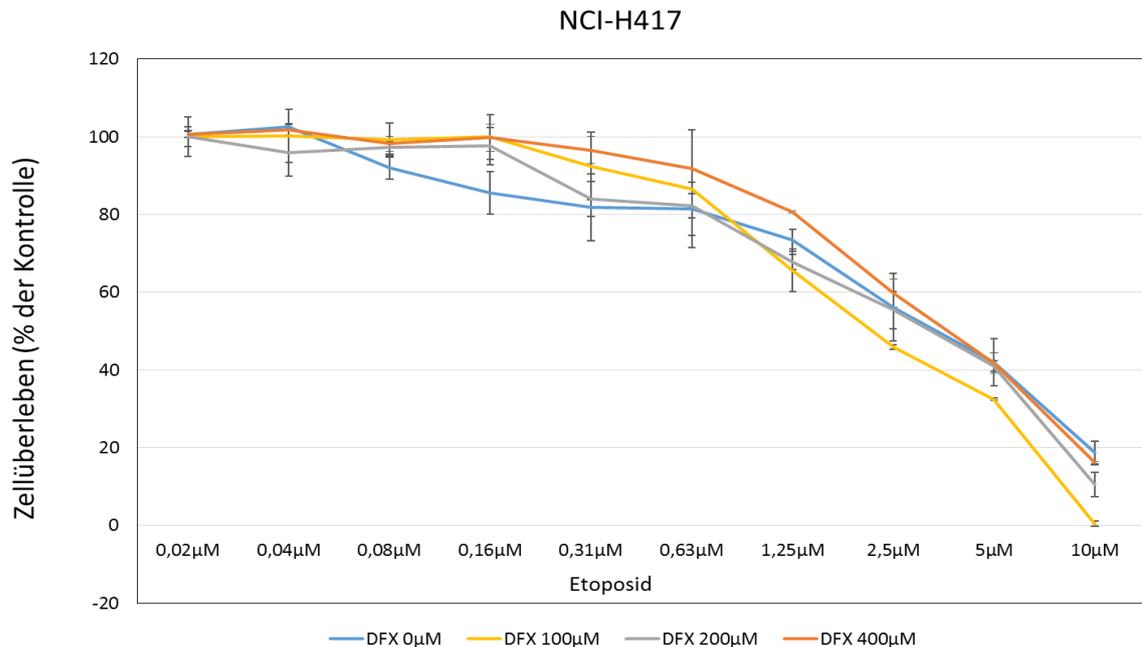


**Abbildung 21: MTT-Test von DFX und Cisplatin behandelten NCI-H417 Zellen**

Bei den mit Cisplatin behandelten Zellen ohne einen Zusatz von DFX gibt es das größte Zellüberleben, 60% der Zellen überleben den Zusatz von 2,5µM Cisplatin.

Zellen, die mit Cisplatin und DFX versetzt wurden, sterben ab einer Konzentration von 0,16µM kontinuierlich ab, die Konzentration von 0,63µM Cisplatin überleben noch 60% der Zellen, bei 2,5µM leben weniger als 10% von ihnen und bei 5µM liegt die Überlebensrate praktisch bei 0%.

### 6.3.2.2 MTT-Test von DFX und Etoposid behandelten NCI-H417 Zellen



**Abbildung 22: MTT-Test von DFX und Etoposid behandelten NCI-H417 Zellen**

Die NCI-H417 Zellen reagieren so gut wie kaum auf den Zusatz von 0.02µM Etoposid, erst bei einer Konzentration von 0.31µM kommt es zu einer Reduktion der Zellzahl und da vor allem bei den Zellen, die keinem DFX ausgesetzt waren, gefolgt von denen, die 200µM DFX erhielten. Die Konzentration von 5µM führt zu einem Zellüberleben von 40% und darunter, bei der höchsten Konzentration von Etoposid, 10µM, liegt das Zellüberleben unter 20%, wobei in diesem Fall kaum eine Zelle den Zusatz 100µM DFX überlebt hat.

### 6.3.2.3 MTT-Test von DFX und Topotecan behandelten NCI-H417 Zellen

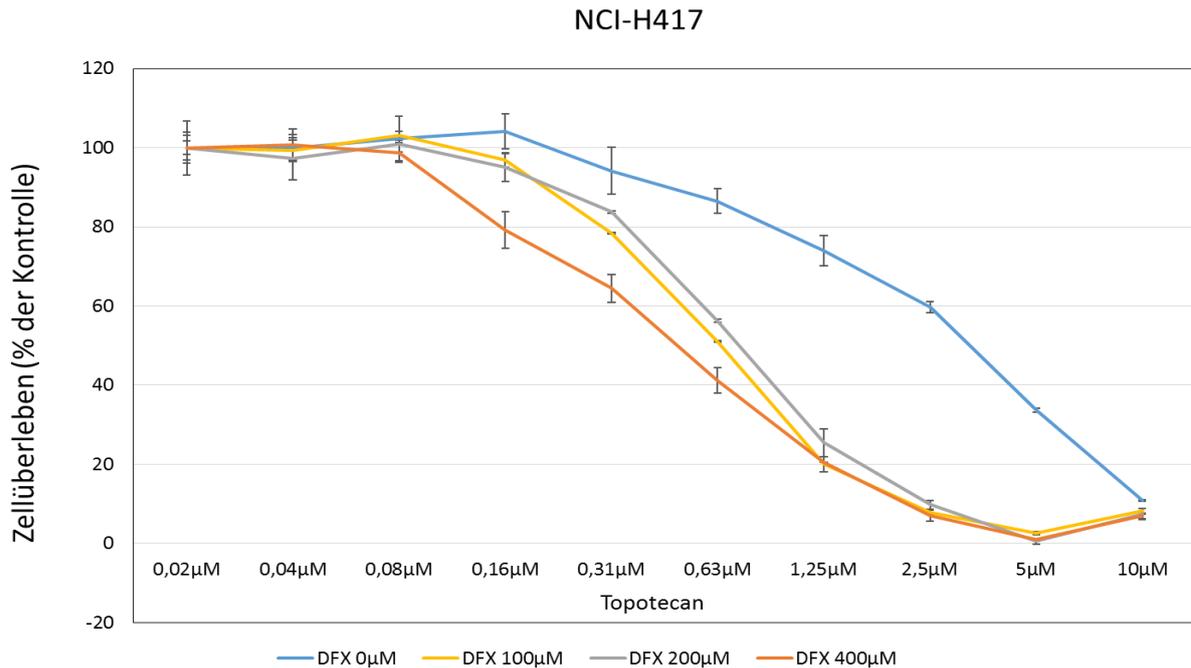


Abbildung 23: MTT-Test von DFX und Topotecan behandelten NCI-H417 Zellen

Auch hier hat Topotecan in den niedrigsten Konzentrationen keine Wirkung auf die Zellen, erst ab einer Konzentration von 0,16µM nimmt das Zellüberleben ab, wobei sich hier ein deutlicher Unterschied in den DFX-Konzentrationen zeigt, denn 400µM DFX hat hier den größten Einfluss. Bei 1,25µM Topotecan liegt das Zellüberleben nur mehr bei knapp über 20%, interessant ist hier, dass man bei einer Konzentration von 5µM Topotecan praktisch kein Überleben sieht, aber dafür bei 10µM, denn hier zeigt sich ein Zellüberleben von 10%.

In diesem Fall kann man den Synergismus von Topotecan und DFX deutlich erkennen, da die Zellen ohne einen Zusatz von DFX ein erkennbares Zellüberleben im Vergleich zu den anderen haben, das wird durch das Zellüberleben bei 1,25µM Topotecan besonders veranschaulicht, da noch über 70% der Zellen ohne DFX leben.

**Tabelle 4: Toxizitätswerte**

	<b>Prozentanteil</b>	<b>SD</b>
<b>PA1</b>	30.59%	6.44
<b>A2780</b>	23.52%	0.82
<b>OV90</b>	26.91%	8.94.
<b>ES2</b>	30.33%	5.69
<b>13363</b>	8.16%	6.7
<b>A549</b>	21.15%	7.42

Diese Tabelle zeigt den Prozentanteil um den die Zellen mehr sterben, wenn sie mit 400µM DFX behandelt werden.

Mithilfe der Tabelle lässt sich die Wirkung von 400µM DFX gut darstellen, da bei allen Zelllinien mit Ausnahme von 13363 die Sterblichkeit der Zellen um mehr als 20% steigt.

## 7 Diskussion

In dieser Arbeit wurde die Wirkung von Desferrioxamin (DFX), einem Eisenchelator, der in den Zellen einen hypoxieähnlichen Zustand simuliert und über die Aktivierung von HIF-1 zu einer Induktion der Carboanhydrase IX (CAIX) führt, sowie die Wirkung diverser Chemotherapeutika auf die Genexpressionsmuster und die Proteinmengen der zellulären und der löslichen Carboanhydrase IX untersucht.

### 7.1 Western Blot Analysen

Die Behandlung von den in Kapitel 5.1.1.1 angeführten Ovarialkarzinomzellen mit dem HIF-1 Induktor, DFX, zeigte unterschiedliche Effekte auf das zelluläre CAIX; während bei PA1-Zellen die Menge des Enzyms anstieg, gab es keine Änderung der schwachen Proteinexpression in OV90-Zellen und in den Zelllinien A2780 und COV362 nahm die CAIX-Expression ab. Die Linien ES2, PEO1 und A2780cis weisen nach der Exposition mit DFX eine hochsignifikante Induktion von HIF-1 auf, wobei es in den ES-Zellen zu einer Zunahme der Carboanhydrase IX gekommen ist, im Gegensatz dazu zeigte sich in den Zelllinien PEO1 und A2780cis eine Abnahme der schwachen CAIX-Expression. Durch die Frage, ob der CAIX-Inhibitor C207A zu einer Modulation der Genexpression führt, da sich manchmal eine Internalisierung oder Sekretion des Bindungspartners zeigte, wurden die Zelllinien zusätzlich mit C207A behandelt, jedoch wurde kein Einfluss auf die Expression dieser Carboanhydrase beobachtet.

Zwei weitere Ovarialkarzinomlinien, OV13 und OV15, reagierten auf die Inkubation mit DFX mit einer Abnahme, bzw. unveränderter Expression von CAIX. Auch aus dem Aszites gewonnene Ovarialkarzinomzelllinien wurden untersucht, wobei sich nur in einem Fall eine leichte Zunahme der CAIX-Expression zeigte, in den anderen Fällen führte die Behandlung zu einer Abschwächung.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Ovariallinien sehr unterschiedlich auf die Behandlung mit DFX reagierten, eine Korrelation mit der Induktion von HIF-1 wurde nicht beobachtet.

Die ES2 Zelllinie, die stark CAIX exprimierte, wies nach einer Behandlung mit höheren Konzentrationen von Cisplatin eine Reduktion dieses Antigens auf, ebenso wie nach der Exposition der Zellen mit den Chemotherapeutika Topotecan bzw. Etoposid. Daraus

kann man erschließen, dass die Abnahme der Zellteilung nach einer Zytostatikabehandlung zur Abnahme der Expression der Carboanhydrase IX führt.

In weiteren Ansätzen wurde versucht die Expression des CAIX durch eine Behandlung der Zelllinien mittels 5-Aza-2-Deoxycytidin zu modulieren. Dieser Wirkstoff führt zu einer Hypomethylierung der DNS und ist in der Lage Gene, deren Expression epigenetisch unterdrückt wurde, zu reaktivieren. In allen untersuchten Fällen kam es entweder zu einer leichten Abnahme des CAIX oder zu keiner wesentlichen Änderung. Dieses Resultat bedeutet, dass die Carboanhydrase IX nicht epigenetisch moduliert wird, woraufhin die Abnahme der Konzentration auf eine toxische Wirkung des 5-Aza-2-Deoxycytidin zurückzuführen ist.

Bei den Bronchialkarzinomlinien führte die Behandlung der Zellen mit DFX zu einer deutlichen Induktion des HIF-1. In allen Zelllinien mit Ausnahme von den H417-Zellen, hier zeigten sich zusätzlichen CAIX-Banden, wurde eine Abnahme des zellulären CAIX beobachtet.

Wie bei den Ovariakarzinomlinien führte eine Vorbehandlung der NSCLC-Zelllinie A549 mit Topotecan bzw. Etoposid zu einer starken Reduktion der Carboanhydrase IX. Ebenso fehlte bei der Behandlung der Zellen mit 10µM oder geringerer Konzentrationen von 5-Aza-2-Deoxycytidin eine signifikante Zunahme des CAIX. A549-Zellen weisen in der Kontrolle eine markante Doppelbande des CAIX auf.

In diesem Stadium ist noch unklar, ob die Behandlung mit den genannten Wirkstoffen zu einer Abnahme der Expression des zellulären CAIX führt oder ob es dadurch zu einer Steigerung der Abspaltung des Enzyms von der Zelloberfläche kommt und die Menge des extrazellulären löslichen CAIX dadurch zunimmt. Die Carboanhydrase IX sollte ja durch die Auslösung eines hypoxieähnlichen Zustandes in den Zellen, der mithilfe von DFX simuliert wird, vermehrt exprimiert werden. Die gesteigerte Expression des HIF-1 beweist die vermutete Reaktion auf DFX, die dabei zu beobachtende Abnahme des zellulären CAIX ist mit hoher Wahrscheinlichkeit durch die Freisetzung der Carboanhydrase IX aus der Zellmembran zu erklären.

In einigen Fällen kommt es zu zusätzlichen Banden mit höherem Molekulargewicht bei den CAIX-Blots, der Grund für diese Doppelbanden ist noch unklar. Li et al. (2009)

beobachteten bereits Doppelbanden, wobei die obere Bande als Duplett bei 58kDa und die untere Bande als Einzelprotein bei 54kDa aufschien, dies stimmte mit den bereits veröffentlichten Daten zu CAIX überein. In den von ihnen untersuchten Zelllinien reagierten nur die obere Doppelbande auf DFX und Hypoxie.

## **7.2 ELISA der löslichen Carboanhydrase IX (sCAIX)**

Das ELISA Assay von sCAIX in den mit DFX behandelten Zelllinien zeigt, dass die Menge an löslichem CAIX im Überstand deutlich erhöht ist, das lässt darauf schließen, dass die Abnahme der CAIX-Konzentration in den Western Blots nach den diversen Behandlungen aufgrund der Abspaltung des Enzyms von der Zelloberfläche zustande kommt. Die beiden Klarzellkarzinomzelllinien ES2 und PA1 zeigen hier die höchsten Konzentrationen von sCAIX.

Zusätzliche wurde die Menge des löslichen CAIX (sCAIX) in der Aszitesflüssigkeit von 10 Ovarialkarzinompatientinnen mittels ELISA gemessen. Diese Flüssigkeitsansammlung im Peritoneum bei fortgeschrittenem Ovarialkarzinom weist einen signifikant niedrigeren Sauerstoffgehalt auf, wie auch schon Kim et al., 2006 bewiesen. Damit übereinstimmend wurden in allen Proben sehr hohe Konzentrationen von solublen CAIX gefunden. Die Carboanhydrase IX scheint aber keinen wesentlichen Einfluss auf den pH-Wert im Aszites zu haben, da die Proben einen Wert im physiologischen Bereich von 7.2–7.4 zeigen. Die Menge des solublen CAIX im Plasma korreliert nicht mit der Konzentration im Aszites, Grund dafür ist zu diesem Zeitpunkt noch nicht bekannt.

## **7.3 Chemosensitivitätstest**

Der zytotoxische Effekt des DFX auf die Zelllinien wurden in MTT-Tests gemessen und lag für die verwendeten Linien bei 400µM DFX unter 30.59%.

In der PA1-Ovarialkarzinomzelllinie weist die Kombination von Cisplatin mit DFX nur einen geringen synergistischen Effekt auf, auch in den A2780-Zellen zeigt diese Kombination nur einen minimalen Synergismus.

Bei der Bronchialkarzinomzelllinie H417 ergibt sich ein synergistischer Effekt mit DFX nur bei sehr hohen Konzentrationen von Cisplatin bzw. Topotecan. Die Kombination von Etoposid und DFX lässt bezüglich einem Synergismus eher zu wünschen übrig.

Aufgrund dieser Daten und Ergebnisse ist es unumgänglich weitere Studien durchzuführen, da die Genexpression von CAIX durch DFX und der Zytostatika beeinflusst wird. Es ist auch sehr interessant, dass das zelluläre CAIX abgebaut wird und daraufhin die sCAIX-Konzentration ansteigt, wie man ja mithilfe der Western Blots und der anschließenden ELISA Assays sehen konnte. Die pH-Regulation als neuer Angriffspunkt von Zytostatika ist ein vielversprechender Ansatz, der weiter verfolgt werden sollte.

## 8 Tabellen und Abbildungsverzeichnis

### 8.1 Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Bösartige Neubildungen des Eierstockes im Zeitverlauf.....	<b>2</b>
<b>Abbildung 2:</b> Bösartige Neubildungen der Lunge im Zeitverlauf.....	<b>15</b>
<b>Abbildung 3:</b> CAIX-Western Blot von DFX und DFX+C207A behandelten PA1 und OV90 Zellen .....	<b>47</b>
<b>Abbildung 4:</b> CAIX-Western Blot von DFX und DFX+C207A behandelten A2780 und COV362 Zellen.....	<b>48</b>
<b>Abbildung 5:</b> CAIX-Western Blot von DFX und DFX+C207A behandelten ES2, PEO1 und A2780cis Zellen.....	<b>49</b>
<b>Abbildung 6:</b> CAIX-Western Blot von DFX behandelten OV13 und OV15 Zellen .....	<b>49</b>
<b>Abbildung 7:</b> CAIX-Western Blot von DFX behandelten 16074/4, 8669/17 und 12370/57 Zellen .....	<b>50</b>
<b>Abbildung 8:</b> CAIX-Western Blot von DFX behandelten 13914, 13699 und 13699/18 Zellen	<b>51</b>
<b>Abbildung 9:</b> CAIX-Western Blot von Cisplatin behandelten ES2 Zellen .....	<b>52</b>
<b>Abbildung 10:</b> CAIX-Western Blot von Topotecan und Etoposid behandelten Zellen.....	<b>52</b>
<b>Abbildung 11:</b> CAIX-Western Blot von 10µM 5-Aza-2-Deoxycytidin behandelten ES2, OV90, A2780 und 15233 Zellen .....	<b>53</b>
<b>Abbildung 12:</b> CAIX-Western Blot von 10µM 5-Aza-2-Deoxycytidin behandelten PA1, PEO1, CAOV4 und COV362 Zellen.....	<b>54</b>
<b>Abbildung 13:</b> CAIX-Western Blot von DFX behandelten H417, DMS153, GLC14 und GLC16 Zellen .....	<b>55</b>
<b>Abbildung 14:</b> CAIX-Western Blot von Topotecan und Etoposid behandelten A549 Zellen.....	<b>55</b>
<b>Abbildung 15:</b> CAIX-Western Blot von 10µM 5-Aza-2-Deoxycytidin behandelten GLC14, GLC16, H417 und DMS153 Zellen .....	<b>56</b>
<b>Abbildung 16:</b> CAIX-Western Blot von 1.25µM und 2.5 µM 5-Aza-2-Deoxycytidin behandelten H417, GLC14 und GLC16 Zellen.....	<b>57</b>

<b>Abbildung 17:</b> sCAIX Konzentration der mit DFX behandelten Ovarialkarzinomzelllinien .....	<b>58</b>
<b>Abbildung 18:</b> sCAIX Konzentration in Ovarialkarzinompatienten .....	<b>59</b>
<b>Abbildung 19:</b> MTT-Test von DFX und Cisplatin behandelten PA1 Zellen .....	<b>60</b>
<b>Abbildung 20:</b> MTT-Test von DFX und Cisplatin behandelten A2780 Zellen .....	<b>61</b>
<b>Abbildung 21:</b> MTT-Test von DFX und Cisplatin behandelten NCI-H417 Zellen .....	<b>62</b>
<b>Abbildung 22:</b> MTT-Test von DFX und Etoposid behandelten NCI-H417 Zellen .....	<b>63</b>
<b>Abbildung 23:</b> MTT-Test von DFX und Topotecan behandelten NCI-H417 Zellen .....	<b>64</b>

## **8.2 Tabellen**

<b>Tabelle 1:</b> FIGO und TNM Klassifizierungssystem des Ovarialkarzinoms .....	<b>9</b>
<b>Tabelle 2:</b> Differenzierungsgrad des Ovarialkarzinoms .....	<b>11</b>
<b>Tabelle 3:</b> TNM–Elemente mit Stadieneinteilung .....	<b>20</b>
<b>Tabelle 4:</b> Toxizitätswerte .....	<b>65</b>

## 9 Literaturverzeichnis

ACKERMANN, I., 2015. Biological significance of Carbonic Anhydrase IX in ovarian cancer. (Unveröffentlichte Diplomarbeit) Universität Wien, Wien, Österreich.

AKTORIES, K., FÖRSTERMANN, U., HOFMANN, F., & STARKE, K., 2009. Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, 10. Auflage, Elsevier Urban & Fischer, München, S. 945-956.

AMERICAN CANCER SOCIETY,  
[www.cancer.org/research/cancerfactsstatistics/cancerfactsfigures2014/](http://www.cancer.org/research/cancerfactsstatistics/cancerfactsfigures2014/)  
[www.cancer.org/acs/groups/content/@research/documents/webcontent/acspc-042151.pdf](http://www.cancer.org/acs/groups/content/@research/documents/webcontent/acspc-042151.pdf)  
[www.cancer.org/acs/groups/cid/documents/webcontent/003130-pdf.pdf](http://www.cancer.org/acs/groups/cid/documents/webcontent/003130-pdf.pdf) (21.04.2015)

AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION–ATCC  
[www.lgcstandards-atcc.org](http://www.lgcstandards-atcc.org)

ARAVANTINOS, G., & PECTASIDES, D., 2014. Bevacizumab in combination with chemotherapy for the treatment of advanced ovarian cancer: a systematic review. *Journal of Ovarian Research*, 7(57), 1-13.

ASANO, F., SHINAGAWA, N., ISHIDA, T., TSUZUKU, A., TACHIYAMA, M., KANAZAWA, K., YAMADA, N., OIZUMI, S., & MORIYA, H., 2015. Virtual Bronchoscopic Navigation Improves the Diagnostic Yield of Radial-Endobronchial Ultrasound for Peripheral Pulmonary Lesions with Involved Bronchi on CT. *Internal Medicine*, 54(9), 1021-5.

AUMÜLLER, G., AUST, G., ENGELE, J., KIRSCH, J., MAIO, G., MAYERHFER, A., MENSE, S., REIßIG, D., SALVETTER, J., SCHMIDT, W., SCHMITZ, F., SCHULTE, E., SPANEL-BOROWSKI, K., WENNEMUTH, G., WOLFF, W., WURZINGER, L. J., ZILCH, H.-G., 2014. *Duale Reihe Anatomie*, 3. Auflage, Thieme Verlag Stuttgart, 550-552.

BAKA, S., CALIFANO, R., FERRALDESCHI, R., ASCHROFT, L., THATCHER, N., TAYLOR, P., FAIVRE-FINN, C., BLACKHALL, F., & LORIGAN, P., 2008. Phase III randomised trial of doxorubicin-based chemotherapy compared with platinum-based chemotherapy in small-cell lung cancer. *British Journal of Cancer*, 99, 442-447.

BALSARA, B. R., & TESTA, J. R., 2002. Chromosomal imbalances in human lung cancer. *Oncogene*, 21(45), 6877-83.

BARTRONS, R., & CARO, J., 2007. Hypoxia, glucose metabolism and the Warburg's effect. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 39(3), 223-9.

BEADSMOORE, C. J., & SCREATON, N. J., 2003. Classification, staging and prognosis of lung cancer. *European Journal of Radiology*, 45(1), 8-17.

BEASLEY, M. B., 2008. Pulmonary neuroendocrine tumours and proliferations: a review and update. *Diagnostic Histopathology*, 14(10), 465-473.

BERAL, V., BULL, D., GREEN, J., & REEVES, G., 2007. Ovarian cancer and hormone replacement therapy in the Million Women Study. *The Lancet*, 369(9574), 1703-10.

BERENDSEN, H. H., DE LEIJ, L., DE VRIES, E. G. E., MESANDER, G., MULDER, N. H., DE JONG, B., BUYS, C. H. C. M., POSTMUS, P. E., POPPEMA, S., SLUITER, H. J., & THE, H. T., 1988. Characterization of Three Small Cell Lung Cancer Cell Lines Established from One Patient during Longitudinal Follow-up. *Cancer Research*, 48, 6891-6899.

BETHUNE, G., BETHUNE, D., RIDGWAY, N., & XU, Z., 2010. Epidermal growth factor receptor (EGFR) in lung cancer: an overview and update. *Journal of Thoracic Disease*, 2(1), 48-51.

BRECKWOLDT, M., KAUFMANN, M., PFLEIDERER, A., 2007. *Geburtshilfe und Gynäkologie*, 5. Auflage, Georg Thieme Verlag Stuttgart, S. 228-229

BROADDUS, V. C., MASON, R. J., ERNST, J. D., KING JR., T. E., LAZARUS, S. C., MURRAY, J. F., NADEL, J. A., SLUTSKY, A. S., & GOTWAY, M. B., 2010. *Murray & Nadel's Textbook of Respiratory Medicine*, Part 1, Section A: Anatomy and Development of the Respiratory Tract. S. 3-24.

CALIFANO, R., ABIDIN, A. Z., PECK, R., FAIVRE-FINN, C., & LORIGAN, P., 2012. Management of Small Cell Lung Cancer, Recent Developments for Optimal Care. *Drugs*, 72(4), 471-90.

CHOI, J.-H., WONG, A. S. T., HUANG H.-F., & LEUNG, P.C.K., 2007. Gonadotropins and Ovarian Cancer. *Endocrine Reviews* 28(4), 440-461.

CLARK, T. G., STEWART, M. E., ALTMAN, D. G., GABRA, H., & SMYTH, J. F., 2001. A prognostic model for ovarian cancer. *British Journal of Cancer*, 85(7), 944–952.

COCKMAN, M. E., MASSON, N., MOLE, D. R., JAAKKOLA, P., CHANG, G.-W., CLIFFORD, S. C., MAHER, E. R., PUGH, C. W., RATCLIFFE, P. J., & MAXWELL, P. H., 2000. Hypoxia Inducible Factor- $\alpha$  Binding and Ubiquitylation by the von Hippel-Lindau Tumor Suppressor Protein. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(33), 25733–25741.

DEHNE, N. & BRÜNE, B., 2009. HIF-1 in the inflammatory microenvironment. *Experimental Cell Research*, 315(11), 1791-1797.

DELA CRUZ, C. S., TANOUE, L. T. & MATTHAY, R. A., 2011. Lung cancer: Epidemiology, Etiology, and Prevention. *Clinics in Chest Medicine*, 32(4), 1-61.

DETTERBECK, F. C., BOFFA, D. J., & TANOUE, L. T., 2009. The New Lung Cancer Staging System. *Chest Journal*, 136(1), 260-271.

DIEBOLD, J., 2014. Seröse Tumoren des Ovars. *Der Pathologe*, 35(4), 314-321.

DORAI, T., SAWCZUK, I. S., PASTOREK, J., WIERNIK, P. H., & DUTCHER, J. P., 2005. The role of carbonic anhydrase IX overexpression in kidney cancer. *European Journal of Cancer*, 41, 2935-2947.

DRAPKIN, R., & HECHT, J., 2002. The origins of ovarian cancer: hurdles and progress. *The Women's Oncology Review*, 2, 261-68.

DU BOIS, A., REUSS, A., PUJADE-LAURINE, E., HARTER, P., RAY-COQUARD, I. & PFISTERER, J., 2009. Role of surgical outcome as prognostic factor in advanced epithelial ovarian cancer: A combined exploratory analysis of 3 prospectively randomized phase 3 multicenter trials, by the Arbeitsgemeinschaft Gynaekologische Onkologie Studiengruppe Ovarialkarzinom (AGO-OVAR) and the Groupe d'Investigateurs Nationaux Pour les Etudes des Cancers de l'Ovaire (GINECO). *Cancer*, 115(6), 1234-44.

FALLER, A., & SCHÜNKE, M., 2008. *Der Körper des Menschen – Einführung in Bau und Funktion*. 15. Auflage, Thieme Verlag, Stuttgart, S. 545-547

FANG, J. S., GILLIES, R. D., & GATENBY, R. A., 2008. Adaptation to hypoxia and acidosis in carcinogenesis and tumor progression. *Seminars in Cancer Biology*, 18(5), 330–337.

FLEMING, J. S., BEAUGIE, C. R., HAVIV, I., CHENEVIX-TRENCH, G., & TAN, O. L., 2006. Incessant ovulation, inflammation and epithelial ovarian carcinogenesis: Revisiting old hypotheses. *Molecular and Cellular Endocrinology* 247(1-2), 4-21.

GATENBY, R. A., & GILLIES, R. J., 2004. Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nature Reviews Cancer*, 4, 891–899.

GIELING, R. C., & WILLIAMS, K. J., 2013. Carbonic anhydrase IX as a target for metastatic disease. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 21(6), 1470-1476.

GILKS, C. B. & PRAT, J., 2009. Ovarian carcinoma pathology and genetics: recent advances. *Human Pathology*, 40(9), 1213-23.

GOULD, M. K., DONINGTON, J., LYNCH, W. R., MAZZONE, P. J., MIDTHUN, D. E., NAIDICH, D. P., & WIENER, R. S., 2013. Evaluation of Individuals With Pulmonary Nodules: When Is It Lung Cancer? Diagnosis and Management of Lung Cancer, 3rd ed: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines. *Chest Journal*, 143(5), 93-120.

HALESTRAP, A. P., & PRICE, N. T., 1999. The proton-linked monocarboxylate transporter (MCT) family: structure, function and regulation. *Biochemical Journal*, 343(2), 281-299.

HIDA, T., YATABE, Y., ACHIWA, H., MURAMATSU, H., KOZAKI, K., NAKAMURA, S., OGAWA, M., MITSUDOMI, T., SUGIURA, T., & TAKAHASHI, T., 1998. Increased Expression of Cyclooxygenase 2 Occurs Frequently in Human Lung Cancers, Specifically in Adenocarcinomas. *Cancer Research*, 58(17), 3761-3764.

HUNN, J., & RODRIGUEZ, G. C., 2012. Ovarian Cancer: Etiology, Risk Factors, and Epidemiology. *Clinical Obstetrics and Gynecology*, 55(1), 3-23.

IZUMI, H., TORIGOE, T., ISHIGUCHI, H., URAMOTO, H., YOSHIDA, Y., TANABE, M., ISE, T., MURAKAMI, T., YOSHIDA, T., NOMOTO, M., & KOHNO, K., 2003. Cellular pH regulators: potentially promising molecular targets for cancer chemotherapy. *Cancer Treatment Reviews*, 29(6), 541-549.

JETT, J. R., SCHILD, S. E., KESLER, K. A., & KALEMKERIAN, G. P., 2013. Treatment of Small Cell Lung Cancer: Diagnosis and Management of Lung Cancer, 3rd ed: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines. *Chest Journal*, 143(5), 400-419.

JOHNSON, B. E., IHDE, D. C., MAKUCH, R. W., GAZDAR, A. F., CARNEY, D. N., OIE, H., RUSSELL, E., NAU, M. M. & MINNA, J. D., 1987. Myc Family Oncogene Amplification in Tumor Cell Lines Established from Small Cell Lung Cancer Patients and Its Relationship to Clinical Status and Course. *The Journal of Clinical Investigation*, 79(6), 1629-1634.

JUNQUEIRA, L. C., & CARNEIRO, J., 2004. *Histologie*, 6. Edition, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, S.579-593.

KALEMKERIAN, G. P., 2014. Chemotherapy for small-cell lung cancer. *The Lancet*, 15(1), 13-14.

KETABI, Z., BARTUMA, K., BERNSTEIN, I., MALANDER, S., GRÖNBERG, H., BJÖRCK, E., HOLCK, S., & NILBERT, M., 2011. Ovarian cancer linked to lynch syndrome typically presents as early-onset, non-serous epithelial tumors. *Gynecologic Oncology*, 121(3), 462-5.

KIM, J., TCHERNYSHYOV, I., SEMENZA, G. L., & DANG, C. V., 2006. HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: A metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell metabolism*, 3(3), 177-185.

KIM, K.-S., SENGUPTA, S., BERK, M., KWAK, Y.-G., ESCOBAR, P. F., BELINSON, J., MOK, S. C., & XU, Y., 2006. Hypoxia Enhances Lysophosphatidic Acid Responsiveness in Ovarian Cancer Cells and Lysophosphatidic Acid Induces Ovarian Tumor Metastasis In vivo. *Cancer Research*, 66(16), 7983-7990.

KLAMETH, L., 2013. Modulation of regulators of cellular pH in Small Cell Lung Cancer cells by chemotherapeutic drugs (Unveröffentlichte Masterarbeit). Universität Wien, Wien, Österreich.

KREUZINGER, C., GAMPERL, M., WOLF, A., HEINZE, G., GEROLDINGER, A., LAMBRECHTS, D., BOECKX, B., SMEETS, D., HORVAT, R., AUST, S., HAMILTON, G., ZEILLINGER, R. & CASTILLO-TONG, D. C., 2015. Molecular characterization of 7 new established cell lines from high grade serous ovarian cancer. *Cancer Letters*, 362(2), 218-228.

LANGDON, S. P., LAWRIE, S. S., HAY, F. G., HAWKES, M. M., MCDONALD, A., HAYWARD, I. P., SCHOL, D. J., HILGERS, J., LEONARD, R. C. F., & SMYTH, J. F., 1988. Characterization

and properties of nine human ovarian adenocarcinoma cell lines. *Cancer Research*, 48(21), 6166-6172.

LEDERMANN, J. A., RAJA, F. A., FOTOPOULOU, C., GONZALEZ-MARTIN, A., COLOMBO, N. & SESSA, C., 2013. Newly diagnosed and relapsed epithelial ovarian carcinoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*, 24(6), 24-32.

LEKIC, M., KOVAC, V., TRILLER, N., KNEZ, L., SADIKOV, A. & CUFER, T., 2012. Outcome of small cell lung cancer (SCLC) patients with brain metastases in a routine clinical setting. *Radiology and Oncology*, 46(1), 54-59.

LEVANON, K., CRUM, C., & DRAPKIN, R., 2008. New Insights into the Pathogenesis of Serous Ovarian Cancer and Its Clinical Impact. *Journal of Clinical Oncology*, 26(32), 5284-93.

LEVINE, A.J., & PUZIO-KUTER, A. M., 2010. The Control of the Metabolic Switch in Cancers by Oncogenes and Tumor Suppressor Genes. *Science*, 330(6009), 1340-4.

LI, Y., SUN, B., ZHAO, X., ZHANG, D., WANG, X., ZHU, D., YANG, Z., QIU, Z., & BAN, X., 2015. Subpopulations of uPAR+ contribute to vasculogenic mimicry and metastasis in large cell lung cancer. *Experimental and Molecular Pathology*, 98(2), 136-144.

LI, Y., WANG, H., OOSTERWIJK, E., SELMAN, Y., MIRA, J. C., MEDRANO, T., SHIVERICK, K. T., & FROST S. C., 2009. Antibody-Specific Detection of CAIX in Breast and Prostate Cancers. *Biochemical and biophysical research communications*, 386(3), 488-492.

LÜLLMANN-RAUCH, R., 2012. Taschenlehrbuch Histologie, 4.Auflage, Thieme Verlag Stuttgart, S. 510-512.

LYNCH, H. T., WATSON, P., LYNCH, J. F., CONWAY, T. A., & FILI, M., 1993. Hereditary Ovarian Cancer: Heterogeneity in Age at Onset. *Cancer*, 71(2), 573-81.

MACIEJCZYK, A., SKRZYPCZYNSKA, I., & JANISZEWSKA, M., 2014. Lung cancer. Radiotherapy in lung cancer: Actual methods and future trends. *Reports of Practical Oncology and Radiotherapy*, 19(6), 353-360.

MAHMOOD, T., & YANG, P.-C., 2012, Western Blot: Technique, Theory, and Trouble Shooting, North American Journal of Medical Sciences, 4(9), 429-434.

MCDONALD, P. C., WINUM, J.-Y., SUPURAN, C. T., & DEDHAR, S., 2012. Recent Developments in Targeting Carbonic Anhydrase IX for Cancer Therapeutics. *Oncotarget*, 3(1), 84-97.

MCLEMORE, M. R., MIASKOWSKI, C., AOUIZERAT, B. E., CHEN, L., & DODD, M. J., 2009. Epidemiological and Genetic Factors Associated with Ovarian Cancer. *Cancer Nursing*, 32(4), 281-290.

MELBOURNE, J., CLANCY, A., SEIFFERT, J., SKEPPER, J., TETLEY, T. D., SHAFFER, M. S. P., PORTER, A., 2015. An investigation of the carbon nanotube–Lipid interface and its impact upon pulmonary surfactant lipid function. *Biomaterials*, 55, 24-32.

MOEKER, J., MAHON, B. P., BORNAGHI, L. F., VULLO, D., SUPURAN, C. T., MCKENNA, R., & POULSEN, S.-A., 2014. Structural Insights into Carbonic Anhydrase IX Isoform Specificity of Carbohydrate-Based Sulfamates. *Journal of Medicinal Chemistry*, 57(20), 8635-8645.

MOHAMED, K. M., LE, A., DUONG, H., WU, Y., ZHANG, Q., & MESSADI, D. V., 2004. Correlation between VEGF and HIF-1 $\alpha$  expression in human oral squamous cell carcinoma. *Experimental and Molecular Pathology*, 76(2), 143-152.

MONTES, A. F., GOMEZ, J. G., VIEJO, M. N., BERMEJO, M. A., URRUTIA, S. A., & MATA, J. G., 2012. Epidemiology and Etiology of Ovarian Cancer, *Ovarian Cancer - Basic Science Perspective*, Dr. Samir Farghaly (Ed.), ISBN: 978-953-307-812-0, InTech, Available from: <http://www.intechopen.com/books/ovarian-cancer-basic-science-perspective/epidemiology-and-etiology-of-ovarian-cancer> (02.06.2015)

MOSMANN, T., 1983. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays, *Journal of Immunological Methods*, 65, 55-63.

MOURITS, M. J., & DE BOCK, G. H., 2009. Managing hereditary ovarian cancer. *Maturitas* 64(3), 172-176.

MUNGENAST, F., 2014. Relevance of estrogen activating STS, inactivating SULT1E1 and ER- $\alpha$  in patients with advanced ovarian cancer, Masterarbeit, Universität Wien, Wien, Österreich

MUNGENAST, F., & THALHAMMER, T., 2014. Estrogen biosynthesis and action in ovarian cancer. *Frontiers in Endocrinology*, 5(192), 1-12.

MUTCH, D. G., & PRAT, J., 2014. 2014 FIGO staging for ovarian, fallopian tube and peritoneal cancer. *Gynecologic Oncology*, 133(3), 401-404.

NATIONAL CANCER INSTITUTE:

[www.cancer.gov/types/ovarian/hp/ovarian-epithelial-treatment-pdq#link/\\_339\\_toc](http://www.cancer.gov/types/ovarian/hp/ovarian-epithelial-treatment-pdq#link/_339_toc) (18.05.2015)

<http://seer.cancer.gov/statfacts/html/lungb.html> (04.05.2015)

NERI, D.; & SUPURAN, C. T., 2011. Interfering with pH regulation in tumours as a therapeutic strategy. *Nature Reviews*, 10, 767-777.

OKAMOTO, T., SUZUKI, Y., FUJISHITA, T., KITAHARA, H., SHIMAMATSU, S., KOHNO, M., MORODOMI, Y., KAWANO, D., & MAEHARA, Y., 2014. The prognostic impact of the amount of tobacco smoking in non-small cell lung cancer—Differences between adenocarcinoma and squamous cell carcinoma. *Lung cancer*, 85(2), 125-130.

OPAVSKY, R., PASTOREKOVA, S., ZELNIK, V., GIBADULINOVA, A., STANBRIDGE, E. J., ZAVADA, J., KETTMANN, R., & PASTOREK, J., 1996. Human MN/CA9 gene, a novel member of the carbonic anhydrase family: structure and exon to protein domain relationships. *Genomics*, 33(3), 480–487.

PIETERMAN, C. R. C., CONEMANS, E. B., DREIJERINK, K. M. A., DE LAAT, J. M., TIMMERS, M. TH. M., VRIENS, M. R., & VALK, G. D., 2014. Thoracic and duodenopancreatic neuroendocrine tumors in multiple endocrine neoplasia type 1: natural history and function of menin in tumorigenesis. *Endocrine-related cancer*, 21(3), 121-142.

PRAT, J., 2012. Ovarian carcinomas: five distinct diseases with different origins, genetic alterations, and clinicopathological features. *Virchows Archiv*, 460(3), 237-49.

PRAT, J., 2015. Ovarian, fallopian tube and peritoneal cancer staging: Rationale and explanation of new FIGO staging 2013. *Best Practice & Clinical Obstetrics and Gynaecology*, 1-12.

PUBLIC HEALTH ENGLAND CULTURE COLLECTIONS

[www.phe-culturecollections.org.uk/products/celllines/generalcell/](http://www.phe-culturecollections.org.uk/products/celllines/generalcell/)

RAJA, F. A., COUNSELL, N., COLOMBO, N., PFISTERER, J., DU BOIS, A., PARMAR, M. K., VERGOTE, I. B., GONZALEZ-MARTIN, A., ALBERTS, D. S., PLANTE, M., TORRI, V., & LEDERMANN, J. A., 2013. Platinum versus platinum-combination chemotherapy in platinum-sensitive recurrent ovarian cancer: a meta-analysis using individual patient data. *Annals of Oncology*, 24(12), 3028-3034.

RESHKIN, S. J., CARDONE, R. A., & HARGUINDEY, S., 2013. Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> Exchanger, pH Regulation and Cancer. *Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery*, 8(1), 85-99.

RICH, P. R., 2003. The molecular machinery of Keilin's respiratory chain. *Biochemical Society Transactions*, 31(6), 1095-1105.

RICHARDS, T. B., WHITE, M. C., & CARABALLO, R. S., 2014. Lung Cancer Screening with Low-Dose Computed Tomography for Primary Care Providers. *Prim Care: Clinics in Office Practice*, 41(2), 307-330.

RIMAN, T., DICKMAN, P. W., NILSSON, S., CORREIA, N., NORDLINDER, H., MAGNUSSON, C. M., WEIDERPASS, E., & PERSSON, I. R., 2002. Hormone Replacement Therapy and the Risk of Invasive Epithelial Ovarian Cancer in Swedish Women. *Journal of the National Cancer Institute*, 94(7), 497-504.

ROETT M. A., & EVANS P., 2009. Ovarian Cancer: An Overview. *American Family Physician*, 80(6), 609-616.

SATO, Y., SHIMAMOTO, T., AMADA, S., ASADA, Y., & HAYASHI, T., 2003. Prognostic value of histologic grading of ovarian carcinomas. *International Journal of Gynecological Pathology*, 22(1), 52-6.

SCHORGE, J. O., MODESITT, S. C., COLEMAN, R. L., COHN, D. E., KAUFF, N. D., DUSKA, L. R. & HERZOG, T. J., 2010. SGO White Paper on Ovarian Cancer: Etiology, Screening and Surveillance. *Gynecologic Oncology*, 119(1), 7-17.

SEMENZA, G. L., 2002. HIF-1 and tumor progression: pathophysiology and therapeutics. *Trends in Molecular Medicine*, 8(4), 62-67.

SEMENZA, G. L., 2003. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*, 3, 721-732.

SHAWKY, H., TAWFIK, H. & HEWIDY, M., 2014. Weekly dose-dense paclitaxel and carboplatin in recurrent ovarian carcinoma: A phase II trial. *Journal of the Egyptian National Cancer Institute*, 26(3), 139-145.

SIGMA-ALDRICH:

<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/a3656?lang=de&region=AT>

SLOTMAN, B. J., MAUER, M. E., BOTTOMLEY, A., FAIVRE-FINN, C., KRAMER, G. W. P. M., RANKIN, E. M., SNEE, M., HATTON, M., POSTMUS, P. E., COLLETTE, L., & SENAN, S., 2009. Prophylactic Cranial Irradiation in Extensive Disease Small-Cell Lung Cancer: Short-Term Health-Related Quality of Life and Patient Reported Symptoms—Results of an International Phase III Randomized Controlled Trial by the EORTC Radiation Oncology and Lung Cancer Groups. *Journal of Clinical Oncology*, 27(1), 78-84.

SOUSA V., RODRIGUES, C., SILVA, M., ALARCAO, A. M., & CARVALHO, L., 2015. Lung adenocarcinoma: Sustained subtyping with immunohistochemistry and EGFR, HER2 and KRAS mutational status. *Revista Portuguesa de Pneumologia*. 21(3), 113-125.

STATISTIK AUSTRIA, 2014

Krebsinzidenz und Krebsmortalität in Österreich 2014:

[http://www.statistik.at/web\\_de/services/publikationen/4/index.html?includePage=detailedView&pubId=679&sectionName=Gesundheit](http://www.statistik.at/web_de/services/publikationen/4/index.html?includePage=detailedView&pubId=679&sectionName=Gesundheit) (20.05.2015)

[http://www.statistik.at/web\\_de/statistiken/gesundheit/krebserkrankungen/eierstock/index.html](http://www.statistik.at/web_de/statistiken/gesundheit/krebserkrankungen/eierstock/index.html) (20.05.2015)

[http://www.statistik.at/web\\_de/statistiken/gesundheit/krebserkrankungen/luftroehre\\_bronchien\\_lunge/index.html](http://www.statistik.at/web_de/statistiken/gesundheit/krebserkrankungen/luftroehre_bronchien_lunge/index.html) (20.05.2015)

STUART-HARRIS, R., BOYER, M., GREENBERG, M., STEVENS, S., & YUNG, T., 1992. The histopathological classification of small cell lung cancer: application of the IASLC classification in 124 cases. *Lung Cancer*, 8(2), 63-69.

SUPURAN, C. T., 2008. Carbonic anhydrases: novel therapeutic applications for inhibitors and activators. *Nature Reviews*, 7, 168-181.

SVASTOVA, E., ZILKA, N., ZAT'OVICOVA, M., GIBADULINOVA, A., CIAMPOR, F., PASTOREK, J., & PASTOREKOVA, S., 2003. Carbonic anhydrase IX reduces E-cadherin-mediated adhesion of MDCK cells via interaction with  $\beta$ -catenin. *Experimental Cell Research*, 290(2), 332–345.

SWARTS, D. R. A., RAMAEKERS, F. C. S., & SPEEL, E.-J. M., 2012. Molecular and cellular biology of neuroendocrine lung tumors: Evidence for separate biological entities. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1826(2), 255-271.

SWIETACH, P., VAUGHAN-JONES, R. D., & HARRIS, A. L., 2007. Regulation of tumor pH and the role of carbonic anhydrase 9. *Cancer and Metastasis Reviews*, 26(2), 299-310.

THERMO SCIENTIFIC:

[http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/MAN0011430\\_Pierce\\_BCA\\_Protein\\_Asy\\_UG.pdf](http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/MAN0011430_Pierce_BCA_Protein_Asy_UG.pdf)

TIMMERS, P. J., ZWINDERMAN, A. H., COENS, C., VERGOTE, I., & TRIMBOS, J. B., 2010. Understanding the problem of inadequately staging early ovarian cancer. *European Journal of Cancer*, 46(5), 880-884.

TINGULSTAD, S., SKJELDESTAD, F. E., HALVORSEN, T. B., & HAGEN, B. 2003. Survival and prognostic factors in patients with ovarian cancer. *Obstetrics & Gynecology*, 101(5/1), 885-91.

TRAVIS, W. D., BRAMBILLA, E., MÜLLER-HERMELINK, H. K., & HARRIS C. C., 2004, *Pathology and Genetics of Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart*. IARC Press, France, 9-124.

ULGER, S., DEMIRCI, N. Y., AYDINKARAHALIOGLU, E., KAHRAMAN, F. C., OZMEN, O., ERDOGAN, Y., CETIN, E., AVCI, E., & CENZIG, M., 2015. PET-CT guided curative conformal radiation therapy in limited stage small cell lung cancer. *Journal of Thoracic Disease*, 7(3), 295-302.

UNIV.-PROF. DR. MED. R. J. LELLÉ

<http://wordpress.lellenet.de/?p=393> (18.05.2015)

VANG, R., SHIH, I.-M. & KURMAN, R. J., 2009. Ovarian Low-grade and High-grade Serous Carcinoma: Pathogenesis, Clinicopathologic and Molecular Biologic Features, and Diagnostic Problems. *Advances in Anatomic Pathology*, 16(5), 267-82.

VARGAS, A. N., 2014. Natural history of ovarian cancer. *Ecancermedicalscience*. 8(465), 1-10.

WARTENBERG, M., LING, F. C., MÜSCHEN, M., KLEIN, F., ACKER, H., GASSMANN, M., PETRAT, K., PÜTZ, V., HESCHELER, J., & SAUER, H., 2003. Regulation of the multidrug resistance transporter P-glycoprotein in multicellular tumor spheroids by hypoxia-inducible factor-1 and reactive oxygen species. *The FASEB Journal*, 17(3), 503-5.

WEBB, B. A., CHIMENTI, M., JACOBSON, M. P., & BARBER, D. L., 2011. Dysregulated pH: a perfect storm for cancer progression. *Nature Reviews Cancer*, 11(9), 671–677.

WEBB, P. M., 2013. Obesity and Gynecologic Cancer Etiology and Survival. *ASCO Educational Book*, 222-228.

WOELBER, L., MUELLER, V., EULENBURG, C., SCHWARZ, J., CARNEY, W., JAENICKE, F., MILDE-LANGOSCH, K., & MAHNER, S., 2010. Serum carbonic anhydrase IX during first-line therapy of ovarian cancer. *Gynecologic Oncology*, 117(2), 183–188.

WWW.ATSJOURNALS.ORG

Pretreatment Evaluation of Non-Small-cell Lung Cancer, *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, Vol. 156(1), 1997, 320-332.

YOKOTA, J. & KOHNO, T., 2004. Molecular footprints of human lung cancer progression. *Cancer Science*, 95(3), 197-204.

ZAVADA, J., ZAVADOVA, Z., ZAT'OVICOVA, M., HYRSI, L., & KAWACIUK, I., 2003. Soluble form of carbonic anhydrase IX (CA IX) in the serum and urine of renal carcinoma patients. *British Journal of Cancer*, 89(6), 1067-1071.

ZEUTHEN, J., NORGAARD, J. O., AVNER, P., FELLOUS, M., WARTIOVAARA, J., VAHERI, A., ROSEN, A., & GIOVANELLA, B. C., 1980. Characterization of a human ovarian teratocarcinoma-derived cell-line. *International Journal of Cancer*, 25(1), 19-32.

ZHOU, B., SUN, Q., CONG, R., GU, H., TANG, N., YANG, L., WANG, B., 2008. Hormone replacement therapy and ovarian cancer risk: A meta-analysis. *Gynecologic Oncology*, 108(3), 641-651.

## 10 Curriculum Vitae

### Persönliches

Name: Michaela Ganster  
Geburtsort: Neunkirchen/NÖ  
Nationalität: Österreich

### Ausbildung

1993 – 1997 Volksschule Trattenbach  
1997 – 2005 Gymnasium Sachsenbrunn  
Abschluss: Reifeprüfung am 21.Juni.2005  
2006 – Lfd. Diplomstudium der Pharmazie/Universität Wien

### Ferialpraktika

2005 Apotheke zum hl. Georg, Bergheim  
2006 – 2013 Apotheke zum hl. Geist, Wien  
2013 Apotheke zum hl. Peter und Paul, Ternitz