

**Aus der Frauenklinik und Poliklinik der Universität Würzburg  
Direktor: Professor Dr. med. Johannes Dietl**

## **Adenosinrezeptoren auf Ovarialkarzinomzellen**

**Inaugural - Dissertation  
Zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät**

**der  
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg**

**vorgelegt von**

**U-Ju Heinlein  
aus  
Berlin**

**Würzburg, August 2013**



**Referent:**

Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Jörg Wischhusen

**Koreferent:**

Prof. Dr. rer. nat. Karl-Norbert Klotz

**Dekan:**

Prof. Dr. med. Matthias Frosch

**Tag der mündlichen Prüfung: 21.08.2013**

**Die Promovendin ist Zahnärztin.**

Meinen Eltern, ohne die ich nicht wäre.

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Das Ovarialkarzinom.....	1
1.1.1	Epidemiologie, Krankheitsbild.....	1
1.1.2	Diagnose .....	2
1.1.3	Therapie.....	3
1.1.4	Prognose.....	4
1.1.5	Neue Therapieansätze.....	5
1.2	Die Bedeutung von Adenosin für die Therapie von Ovarialkarzinomen...6	6
1.2.1	Adenosin .....	6
1.2.2	Adenosinrezeptoren.....	6
1.2.2.1	Signaltransduktion.....	6
1.2.2.2	Rezeptoren.....	7
1.3.	Adenosin, Adenosin-Rezeptoren und Tumorwachstum.....	9
1.4	Zielsetzung der vorliegenden Arbeit .....	11
2	Materialien und Methoden.....	13
2.1	Material.....	13
2.1.1	Geräte und Verbrauchsmaterial.....	13
2.1.1.1.	Geräte.....	13
2.1.1.2	Verbrauchsmaterial:.....	15
2.1.2	Chemische und biologische Materialien.....	16
2.1.2.1	Zelllinien.....	16
2.1.2.2	Antikörper.....	16
2.1.2.3	Allgemeine Reagenzien zur Zellkultur.....	17
2.1.2.4	Reagenzien für die Radioliganden-Bindungsstudien.....	18
2.1.2.5	Spezielle Reagenzien für Adenylylcyclase-Assays.....	19
2.1.2.6	Proliferationsassays.....	20
2.1.2.7	FACS Reagenzien.....	21
2.1.2.8	Anderes.....	21
2.2	Methoden.....	22
2.2.1	Zellkultur.....	22
2.2.1.1	Kulturbedingungen und Passage.....	22
2.2.1.2	Durchführung der Passage.....	22
2.2.2	Membranpräparation für Bindungsstudien.....	22
2.2.3	Membranpräparation für Adenylylcyclase-Versuche.....	23
2.2.4	Quantifizierung von Proteinen.....	23
2.2.5	Reinigung von [ $\alpha$ - <sup>32</sup> P]ATP.....	23
2.2.6	Stimulation der Adenylylcyclase zum Nachweis von A <sub>2B</sub> -Rezeptoren .....	24
2.2.7	Radioliganden – Bindungsassay.....	25
2.2.8	Berechnung der Zellzahl in einer Zellsuspension.....	26
2.2.9	BrdU Incorporation-Assay.....	26
2.2.10	Kristallviolett-Färbung.....	27
2.2.10.1	Prinzip.....	27
2.2.10.2	Durchführung.....	28
2.2.11	Statistische Auswertung.....	28
2.2.12	Durchflusszytometrie, FACS (fluorescence activated cell sorting).29	29

2.2.12.1 Prinzip.....	29
2.2.12.2 Durchführung.....	30
2.2.12.3 Analyse und Darstellung.....	31
3 Ergebnisse.....	33
3.1 Pharmakologische Charakterisierung der Zelllinien.....	33
3.1.1 Bindungsstudien.....	33
3.1.2 Stimulation der Adenylylcyclase zum Nachweis von A <sub>2B</sub> -Rezeptoren .....	34
3.2 Untersuchungen zur Bedeutung der charakterisierten Rezeptoren in Bezug auf Zelltod und Proliferation.....	38
3.2.1 Wirkung von Adenosin.....	38
3.2.2 Wirkung von NECA.....	40
3.2.3 Effekt von Cisplatin, Doxorubicin und Fas-Ligand auf NECA stimulierte Zellen.....	40
3.3. Untersuchungen zur Expression von CD39 und CD73 auf SK-OV-3 und OAW-42 Zellen vor und nach Stimulation mit NECA mithilfe der FACS- Methode .....	47
3.3.1 CD Antigene.....	47
4 Diskussion.....	50
4.1 Adenosinrezeptoren im Tumorgeschehen.....	50
4.2 Pharmakologische Charakterisierung.....	50
4.3 Wirkung der NECA-Stimulation auf die Zellproliferation.....	52
4.3.1 Adenosin als Ligand.....	52
4.3.2 NECA und CGS 21680 als Liganden.....	52
4.3.3 BrdU-Studien.....	53
4.4 Wirkung der NECA-Stimulation auf die Chemosensitivität von SK-OV-3 und OAW-42 bzw. die Apoptose-Induktion durch Fas-Ligand.....	55
4.4.1 Cisplatin.....	55
4.4.2 Doxorubicin.....	55
4.4.3 Fas-Ligand.....	56
4.4.4. A <sub>2A</sub> -Rezeptoren auf OAW-42 Zellen.....	56
4.4.5 A <sub>2B</sub> -Rezeptoren auf SK-OV-3 Zellen.....	57
4.4.6 A <sub>2A</sub> - und A <sub>2B</sub> -Rezeptoren auf der Oberfläche von Immunzellen.....	57
4.5 Adenosinrezeptor-Stimulation in Verbindung mit der Expression von CD39 und CD73 .....	58
4.6 Adenosinrezeptoren im Tumorgeschehen.....	60
4.6.1 A <sub>2B</sub> -Rezeptoren im Tumorgeschehen.....	60
4.6.2 A <sub>2A</sub> -Rezeptoren im Tumorgeschehen.....	61
4.6.3 Andere Adenosinrezeptorsubtypen als potenzielle Ziele für neue Therapieansätze.....	63
5 Zusammenfassung.....	65
6 Literaturverzeichnis.....	67
7 Abbildungsverzeichnis.....	79
8 Abkürzungsverzeichnis.....	81
9 Anhang.....	83

# 1 Einleitung

## 1.1 Das Ovarialkarzinom

### 1.1.1 Epidemiologie, Krankheitsbild

Das **Ovarialkarzinom** ist eine maligne Erkrankung der Eierstöcke. Knapp 8000 Frauen erkranken jährlich in Deutschland an einem epithelialen Ovarialkarzinom. Es ist das zweithäufigste Genitalmalignom, steht an 5. Stelle der Todesursachenstatistik der Frau und führt somit die Reihe der gynäkologischen Tumoren an. Das Lebenszeitrisiko ein Ovarialkarzinom zu entwickeln liegt bei 1,6%. 95% der Ovarialkarzinome treten sporadisch auf, in 5% der Fälle wird von einer genetischen Prädisposition ausgegangen. (Kreienberg et al., 2009). Das Lebenszeitrisiko an einem Ovarialkarzinom zu erkranken, erhöht sich von 1,6% auf über 5%, wenn bereits Verwandte ersten Grades erkrankt sind. Noch größer ist das Erkrankungsrisiko, wenn mehrere Familienmitglieder betroffen sind (bei  $\geq 2$  Familienangehörigen steigt das Lebenszeitrisiko auf 7,2%). Ist die Erkrankung bei wenigstens 2 Verwandten ersten Grades aufgetreten, so spricht man von einem hereditären Ovarialkarzinom. Bei einer nachgewiesenen Genmutation, kann das Lebenszeitrisiko 25 – 50% betragen (Pfisterer und Bois, 2002). Risikofaktoren ein Ovarialkarzinom zu entwickeln sind zunehmendes Alter, die kaukasische Rasse, Infertilität, Nulliparität, dauerhafte ovulatorische Zyklen, eine gesteigerte Ovulationsauslösung durch Medikamente und es scheinen niedriges Alter bei der ersten Menstruation, bzw. hohes Alter bei der letzten Regelblutung eine Rolle zu spielen. Ferner scheinen Kontakte mit Stoffen wie Asbest oder Talkum den Ausbruch der Krankheit zu fördern. Zudem besteht ein erhöhtes Risiko, wenn Familienangehörige der Frau von einem Mamma- oder Endometriumkarzinom betroffen sind (Kiechle und Schmutzler, 2002; [www.gynonko.at](http://www.gynonko.at)). Der Altersgipfel liegt zwischen dem 7. und 8. Lebensjahrzehnt, also jenseits der Menopause (Stauber und Weyerstahl, 2001). Da die Diagnose zumeist erst im fortgeschrittenen Stadium gestellt wird, nimmt das Ovarialkarzinom die oben benannte führende Rolle bei den

Krebstodesursachen ein. Ursache des späten Erkennens der Erkrankung ist unter anderem das Fehlen typischer Frühsymptome. Zu Beginn sind es eher uncharakteristische Zeichen, mögliche Symptome sind u.a. Unterbauchschmerzen, eine Zunahme des Bauchumfanges, Fremdkörpergefühl, Blutungsanomalien, Gewichtsabnahme/-zunahme oder auch ein Akutes Abdomen (Stieldrehung, Darmstenose) (Huober, 2004). In fortgeschrittenen Stadien ist vor allem das Auftreten eines Aszites wegweisend, bei dem es zu einer massiven Zunahme des Leibesumfanges kommt (Stauber und Weyerstahl, 2001).

In circa 50% der Fälle sind beide Ovarien betroffen. Durchbricht das Karzinom die Grenzen der Ovarien, kann es zum Befall der gesamten Oberfläche der Bauchhöhle, des Zwerchfells sowie des Douglas-Raumes kommen. Die Ausbreitung des Karzinoms in der Bauchhöhle wird als Peritonealkarzinose bezeichnet und geht mit einer deutlich schlechteren Prognose einher, die dann zumeist auch eintritt.

Erhält das Karzinom Anschluss an das Blutsystem, so treten bevorzugt in Pleura, Leber, Lunge oder Gehirn Metastasen auf. Mit dem Lymphstrom können besonders die paraaortalen und iliakalen Lymphknoten befallen werden.

### **1.1.2 Diagnose**

Zur Diagnostik tragen die gynäkologische, klinische Untersuchung sowie die transvaginale und abdominale Sonografie bei. Zudem kann auch ein zytologischer Zervixabstrich zur Diagnose beitragen. Weitere Optionen sind die serologische Bestimmung von Tumormarkern, v.a. CA 125 und ggf. die Fertigung einer Röntgen-Thorax-Aufnahme. In Einzelfällen kann es nützlich sein, ein intravenöses Urogramm anzufertigen, einen Kolonkontrastmitteleinlauf, eine Koloskopie, Zytoskopie oder Rektoskopie durchzuführen. Ergänzend dazu kann bei gegebener Indikation eine Computertomografie vom Abdomen bzw. Becken, oder ein MRT zur Darstellung von Metastasen in Leber und Lunge und von retroperitonealen Lymphknotenvergrößerungen nützlich sein (Huober, 2004). Eine auf



bildgebenden Verfahren beruhende Verdachtsdiagnose kann aber letztendlich nur durch die operative Entfernung der Ovarien und Eileiter endgültig bestätigt oder widerlegt werden. Eine zytologische Punktion verbietet sich aufgrund der Gefahr einer iatrogen begünstigten peritonealen Tumoraussaat.

### **1.1.3 Therapie**

Das therapeutische Vorgehen orientiert sich an der Tumorausdehnung und der Verfassung der Patientin und besteht außer bei frühen Formen des Ovarialkarzinoms (FIGO IA, Grad 1) zumeist aus einer Kombination von Operation, Chemotherapie und Bestrahlung (Stauber und Weyerstahl, 2001).

Die chirurgische Therapie ist beim Ovarialkarzinom von zentraler Bedeutung, die Primäroperation der wichtigste Behandlungsschritt im Gesamtherapiekonzept, wobei seine Durchführung nur bei einem geringen Anteil der Patientinnen zur vollständigen Kontrolle der Krankheit führt. Nach erfolgter klinischer und bildgebender Diagnostik erfolgt mit dem operativen Eingriff die intraoperative Diagnostik und chirurgische Therapie. Diese umfassen die Diagnosesicherung, das Tumorstaging, die primäre vollständige Tumorentfernung, bzw. die Reduktion der Tumorgroße, die Tumorentfernung im Intervall, die sekundäre Tumorentfernung, die Evaluierung des Tumorstatus und die Palliation. Das Staging erfolgt nicht wie üblich bei den gynäkologischen Karzinomen klinisch, sondern auf Basis der operativ und histologisch erhobenen Befunde (Meden, 1996) und es gibt bis dato keine apparative diagnostische Maßnahme, die dies ersetzen und die Operabilität verlässlich einschätzen kann (Schmalfeld et al., 2007). Die Stadieneinteilung des primären Ovarialkarzinoms erfolgt anhand der bereits genannten FIGO-Klassifikation (Fédéral Institut de Gynécologie et d'Obstétrique), wobei das Karzinom unter Einbeziehung klinischer und pathologisch-anatomischer Befunde in vier Tumorstadien eingeteilt wird (Benedet et al., 2000; 2009 (FIGO staging), siehe Anhang).

Beim Primäreingriff wird angestrebt, den Tumor maximal möglich zu entfernen (primäre zytoreduktive Therapie (Hoskin, 1994; Hoskins et al., 1994)), um die

Effizienz der postoperativen Therapie zu verbessern. Es soll so eine günstige Ausgangssituation für die sich anschließende Chemotherapie geschaffen werden. So ist es möglich, makroskopisch nicht sichtbare, verbliebene Tumorzellen durch die Chemotherapie zu zerstören, bevor eine Resistenzentwicklung möglich ist. Bei einer Reduktion des Tumorgewebes verbleiben kleinere Tumorreste mit gesteigerter Zellteilung, welche durch die nun verbesserte Durchblutung chemosensitiver als im soliden großen Tumor sind (Janovski und Paramanandhan, 1973; Grospietsch et al., 1986).

Zur Chemotherapie werden beim Ovarialkarzinom u.a. Platinderivate, v.a. Cisplatin und Carboplatin, ein weniger toxisches Analogon des Cisplatins, sowie die Taxane (Paclitaxel), früher auch alkylierende Substanzen (z.B. Cyclophosphamid) angewandt. Derzeit gilt eine Kombinationstherapie aus Carboplatin und Paclitaxel am effektivsten und verträglichsten (McGuire et al., 1996; du Bois et al., 2003). Zur Palliation bei therapierefraktären oder rezidivierenden Tumoren werden u.a. auch die Anthrazykline wie Doxorubicin und seine Analoga und Altretamin (Hexamethylmelamin) verwendet.

#### **1.1.4 Prognose**

Das Ovarialkarzinom gehört zu den Genitalkarzinomen mit der ungünstigsten Prognose und bleibt nach wie vor das Problemkarzinom in der gynäkologischen Onkologie. Die Krankheit bleibt durch eine nichtspezifische Symptomatik verschleiert und mehr als 50% der Patientinnen stellen sich demzufolge erst in einem Stadium vor, in dem eine Heilung nicht mehr zu erwarten ist (Kusche et al., 1989). Während die Karzinome, die sich in einem frühen Stadium befinden in der Regel asyptomatisch sind und daher nicht erkannt werden, befinden sich 70% der diagnostizierten Ovarialkarzinome bereits im FIGO Stadium III und IV und haben sich bereits im Abdomen ausgebreitet bzw. sind schon darüber hinausgewachsen. Die Ausdehnung des Tumors bei der Diagnose ist der wichtigste prognostische Faktor. Während die durchschnittliche 5-Jahresüberlebensrate von Frauen mit Stadium I und II bei ca. 80% bzw. 60% liegt, beträgt diese im Stadium III nur 30% und im Stadium IV sogar nur 15%

(Kristensen und Trope, 1997). Die Überlebenszeit sinkt mit steigendem Alter, Tumorstadium und zunehmender Tumorentdifferenzierung. Patientinnen, bei denen der Tumor auf die Ovarien oder wenigstens das kleine Becken begrenzt ist (FIGO I und II) haben signifikant längere Überlebenszeitverläufe als jene, bei denen bereits der Mittel- bzw. Oberbauch befallen ist (FIGO III), oder schon Leber-, Milz- oder Fernmetastasen bestehen (Kuhn et al., 2001)

#### **1.1.5 Neue Therapieansätze**

Im stetigen Kampf der Wissenschaft gegen den Krebs wird nach neuen Angriffspunkten gesucht, um die derzeitigen Behandlungsmöglichkeiten weiterzuentwickeln und zu optimieren. Die beschriebene ungünstige Prognose von betroffenen Frauen und die hohe Rezidivrate ist zudem eine Herausforderung an die Wissenschaftler und Ärzte, die Diagnostik und Therapie zu verbessern mit dem Ziel, Erkrankten neue Perspektiven zu eröffnen. Da in verschiedenen Studien nachgewiesen werden konnte, dass immunologische Parameter, insbesondere die Infiltration mit zytologischen bzw. regulatorischen T-Zellen, eine hohe prädiktive Aussagekraft bezüglich der Überlebenschancen besitzen, erscheinen Immuntherapien beim Ovarialkarzinom von besonderem Interesse (Zhang et al., 2003; Curiel et al., 2004; Dietl et al., 2007; Sato et al., 2005; Leffers et al., 2009).

## **1.2 Die Bedeutung von Adenosin für die Therapie von Ovarialkarzinomen**

### **1.2.1 Adenosin**

Adenosin ist ein Purinnukleosid, das in vielen Organsystemen eine wichtige Rolle spielt. Es dient einerseits als Baustein von Nukleotiden, die als Energielieferanten und zur Nukleinsäuresynthese verwendet werden und ist andererseits an Regulationsvorgängen in nahezu jeder Zelle des menschlichen Körpers beteiligt. Das Wichtige ist, dass Adenosin in allen Zellen und Körperflüssigkeiten vorhanden ist, wobei die extrazelluläre Konzentration unter physiologischen Bedingungen etwa zwischen 20 und 300 nM liegt (Schulte, 2004; Fredholm, 2010). Unter metabolischen Stresszuständen, wie Sauerstoffmangel oder Entzündungszuständen, wenn die Zellen viel Energie in Form von Adenosintriphosphat (ATP) verbrauchen, wird Adenosin ins Gewebe freigesetzt. Dies geschieht u.a. auch durch den Abbau von Adeninnukleotiden (ATP, Adenosindiphosphat (ADP) und Adenosinmonophosphat (AMP)) durch extrazelluläre Ektonukleotidasen, wie CD39 (Ekto-Nukleosid-triphosphat-diphosphohydrolase) und CD73 (Ekto-5'-Nukleotidase) (Zimmermann, 2000; Kumar und Sharma, 2009). Da Adenosin instabil ist und die Halbwertszeit durch Abbau zu Inosin durch die Adenosindesaminase (ADA) oder Wiederaufnahme in die Zellen begrenzt ist, kommt es durch eine Hypoxie-bedingte Konzentrationszunahme von Adenosin nur zu lokaler Adenosinrezeptor-Interaktion. Ebenfalls zur Anhäufung von Adenosin trägt die hypoxiebedingte Hemmung der Adenosinkinase bei, einem Enzym, welches die Phosphorylierung von Adenosin zu Adenosinmonophosphat katalsiert (Decking et al., 1997).

### **1.2.2 Adenosinrezeptoren**

#### **1.2.2.1 Signaltransduktion**

Durch Rezeptor-vermittelte Signaltransduktion können Zellen auf von außen kommende Reize reagieren, diese modulieren und ins Zellinnere weiterleiten. Daran sind meistens bestimmte Enzyme und sogenannte „second messenger“

in einer oder mehreren nachgeschalteten Ebenen, im Sinne einer Signalkaskade, beteiligt. Dabei kann das ursprüngliche Signal auch verstärkt werden.

Vorgänge dieser Art sind in einem einzelligen Organismus von essentieller Bedeutung um bei Änderung der Umweltbedingungen mit adäquaten Anpassungsvorgängen reagieren zu können und so das eigene Überleben abzusichern. In einem mehrzelligen Organismus ist zudem die Kommunikation zwischen den Zellen und Zellverbänden überlebenswichtig, um sowohl interne Reize als auch extrazelluläre Signale verarbeiten und die Funktion eines Zellverbands synchronisieren zu können.

Extrazelluläre Signale werden durch Botenstoffe an die Zellen herangetragen und können durch verschiedene Typen von Rezeptoren weitergeleitet werden. So wird eine spezifische zelluläre Antwort ausgelöst, da nur bestimmte Zellen die entsprechenden Rezeptoren für den ankommenden Botenstoff exprimieren.

#### **1.2.2.2 Rezeptoren**

Es sind bisher fünf Klassen von Rezeptorproteinen bekannt:

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, Liganden-gesteuerte Ionenkanäle, Rezeptoren mit intrinsischer enzymatischer Aktivität, Tyrosinkinase-aktivierende Rezeptoren und nukleäre Rezeptoren (Dissertation Leitz, 2006). G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCR) stellen die größte Gruppe von Membranrezeptoren. Zurzeit sind mehr als 800 verschiedene GPCR-Gene im Humangenom bekannt und mehr als 30% aller derzeit verwendeten Arzneimittel zielen auf G-Protein gekoppelte Rezeptoren ab (Hill, 2006).

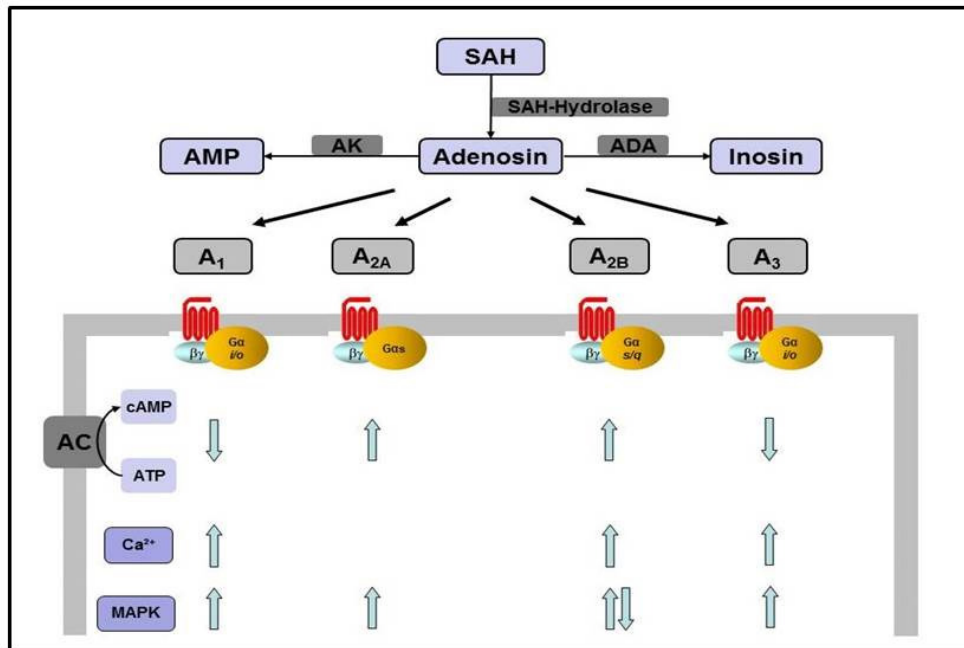
Die regulatorischen Funktionen des Adenosins werden über vier Subtypen von Adenosinrezeptoren vermittelt: A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub> und A<sub>3</sub>. Diese wurden inzwischen von mehreren Säugetierspezies kloniert und charakterisiert (Fredholm et al., 2001a) und sind praktisch auf jeder Zelle vertreten (Klotz, 2000).

Alle Adenosinrezeptoren sind G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR) und weisen die für diese Klasse typischen 7 Transmembrandomänen auf. Während

A<sub>1</sub>- und A<sub>3</sub>-Rezeptoren vorzugsweise mit inhibitorischen G<sub>i</sub>-Proteinen interagieren, aktivieren A<sub>2A</sub>- und A<sub>2B</sub>-Rezeptoren generell stimulatorische G<sub>s</sub>-Proteine.

### Abbildung 1

#### Adenosinrezeptoren



Adenosin kann an 4 verschiedene G-Protein-gekoppelte Rezeptoren binden. Während der A<sub>1</sub>- und A<sub>3</sub>-Rezeptor eine Inhibition der Adenylylcyclase (AC) vermitteln, führt eine Aktivierung von A<sub>2A</sub>- und A<sub>2B</sub>-Rezeptor zu einer Stimulation der AC-Aktivität. Andererseits können der A<sub>1</sub>-, A<sub>2B</sub>- und A<sub>3</sub>-Rezeptor auch die Phospholipase C (PLC) aktivieren, wodurch es zur Produktion von Diacylglycerol (DG) und Inositoltriphosphat (IP<sub>3</sub>) kommt und die Calciumfreisetzung aus intrazellulären Speichern ausgelöst wird. Alle Adenosinrezeptorsubtypen aktivieren die mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK), wobei der A<sub>2B</sub>-Rezeptor auch eine Hemmung vermitteln kann. Extrazellulär wird Adenosin durch die Adenosindesaminase (ADA) zu Inosin abgebaut bzw. durch die Adenosinkinase (AK) zu Adenosinmonophosphat (AMP) phosphoryliert. Zudem hydrolysiert die S-Adenosyl-Homocystein-Hydrolase S-Adenosyl-Homocystein (SAH) zu Adenosin und Homocystein.

Adenosin kann vielerlei Effekte auslösen. Die Reaktion der Zellen hängt davon

ab, welche Rezeptorsubtypen auf ihrer Oberfläche vertreten sind. Es ist hierbei auch möglich, dass ein Signal aktiv moduliert wird, wenn verschiedene Subtypen auf einer Zelle exprimiert sind.

A<sub>1</sub>-, A<sub>2A</sub>- und A<sub>3</sub>-Rezeptoren weisen eine hohe Affinität für Adenosin auf, A<sub>2B</sub>-Rezeptoren nur eine niedrige (Fredholm, 2001b; Ciruela et al., 2010). Aufgrund ihrer weiten Verbreitung im menschlichen Körper nimmt man an, dass A<sub>2B</sub>-Adenosinrezeptoren in Verbindung mit gesteigerten Adenosin-Konzentrationen an pathophysiologischen Vorgängen beteiligt sind und damit wichtige potenzielle Angriffspunkte für die pharmakologische Intervention bei vielen Krankheiten darstellen.

### **1.3. Adenosin, Adenosin-Rezeptoren und Tumorwachstum**

Es ist bereits bekannt, dass Adenosin häufig in hohen Konzentrationen in Tumorgeweben vertreten ist und möglicherweise das Tumorwachstum beeinflussen kann. Adenosin akkumuliert in Folge der hier vorherrschenden Hypoxie (Olsson et al., 1990), in der vermehrt Adeninnukleotide abgebaut werden (Merighi et al., 2003; Gessi et al., 2010).

Auf vielen Tumorzellen sind bislang Adenosinrezeptoren beschrieben worden, u.a. A<sub>1</sub>-Rezeptoren auf Melanomzellen (Merighi et al., 2001) und kolorektalen Adenokarzinomzellen (Khoo et al., 1996), A<sub>2A</sub>-Rezeptoren auf A375 Melanomzellen (Merighi et al., 2001), HT29 und DLD-1 Kolonkarzinomzellen (Gessi et al., 2007) und MCF-7 Mammakarzinomzellen (Etique et al., 2009), A<sub>2B</sub>-Rezeptoren auf Mammakarzinomzellen (Panjehpour et al., 2005), A<sub>3</sub>-Rezeptoren auf Kolonkarzinomzellen (Gessi et al., 2007) und A375 Melanomzellen (Merighi et al., 2001). Hierbei ist es von großer Bedeutung welcher Subtyp vertreten ist.

Einige Autoren beschrieben, dass Adenosin eine kontrollierende Funktion im Sinne einer Regulation des Tumorwachstums und der Zellproliferation (Madi et al., 2003; Fishman et al., 2004) ausübt, andere beobachteten eine Tumorbegünstigende Funktion (Spychala, 2000), indem es u.a. die Immunabwehr inhibiert (Stagg et al., 2010; Jin et al., 2010; Häusler et al., 2011). Auch wurde

durch Rathbone et al. beobachtet, dass Adenosin die Proliferation von Astrozytomzellen stimuliert, wobei dies offenbar über den  $A_{2A}$ -Rezeptor vermittelt wird (1992). Andere Autoren beschrieben eine adenosinabhängige Hemmung der Zellproliferation, die durch den auf Kolonkarzinomzellen exprimierten  $A_1$ -Rezeptorsubtyp vermittelt wird (Lelievre et al., 1998). Zudem wird angenommen, dass Adenosin in hypoxischer Umgebung als proangiogenetischer Faktor wirkt, der veränderten Zellstoffwechsel mit kompensatorischer Angiogenese verknüpft (Merighi et al., 2003), indem es z.B. die Proliferation und Migration von Endothelzellen fördert (Grant et al., 2001). Abhängig von der Zellart fand man heraus, dass Adenosin die Freisetzung angiogenetischer Faktoren allerdings nicht nur stimulieren (Grant et al., 1999) sondern auch hemmen kann (Feoktistov et al., 2002).

Interessant ist, dass AMP als Vorläufer von Adenosin einen antiproliferativen Effekt auf Mammakarzinomzellen auszuüben scheint (Hugo et al., 1992) und die oben beschriebene Ekto-5'-Nukleotidase (CD73), die AMP zu Adenosin abbaut, eventuell das Wachstum von diesen malignen Zellen unterstützen könnte. Dies deckt sich mit den Erkenntnissen von Canbolat et al., die herausfanden, dass CD73 auf Mammakarzinomzellen stärker exprimiert wird als auf gesunden Zellen (1996).

Tumorwachstum ist ein multifaktorieller Prozess. Neben Mutationen von sogenannten Wächtergenen wie Protoonkogenen und Tumorsuppressorgenen benötigt der Tumor eine Umgebung, die ihm trotz der Größenzunahme und der damit einhergehenden mangelnden Sauerstoffzufuhr weiteres Wachstum ermöglicht. Durch weitere Mutationen ist eine maligne Geschwulst in der Lage, eine eigene Blutzufuhr aufzubauen (Angiogenese), unter anaeroben Bedingungen zu überleben und in Körperregionen fernab des Primärtumors zu metastasieren.

Das Ovarialkarzinom ist ein solider Tumor. Die Krebszellen, welche eine kompakte Gewebemasse bilden, verhalten sich als Ganzes völlig anders als



physiologisches Körpergewebe. Das ursprünglich funktionierende Netzwerk aus kommunizierenden Zellen und Zellverbänden ist gestört, die Krebszellen proliferieren, der Krebs wächst, während gleichzeitig die Entwicklung der Gefäßversorgung nicht adäquat nachkommt und das Tumorgewebe minderwertig durchblutet wird. Das bedeutet, es sind zu wenig Gefäße, die diffus verzweigt sind und deren Kaliber nur unzureichend reguliert und kontrolliert wird. Folglich sind die Tumorzellen in solchen kompakten Massen mit Sauerstoff unterversorgt und hypoxisch (Merighi et al., 2003). Hypoxie bzw. Anämie können vor allem zu therapeutischen Problemen führen, da sie solide Tumoren resistenter gegen die Chemotherapie machen (Vaupel et al., 1989; Vaupel et al., 2001). Der bestehende Sauerstoffmangel führt zum Abbau von Adeninnukleotiden und führt zur Freisetzung und Akkumulation von Adenosin. Adenosin, als nachgewiesener potenter Immunsuppressor, sorgt im Sinne eines negativen Feedback-Mechanismus dafür, dass es nicht zu einer überschießenden Entzündungsreaktion mit Gewebeschäden kommt (Stagg et al., 2010). In der extrazellulären Flüssigkeit von Tumoren ist Adenosin in hohen Konzentrationen nachgewiesen worden. Man fand heraus, dass in soliden Tumoren, in deren Umgebung stetig ein hypoxisches Milieu herrscht, über den 5'-Nukleotidase-Weg ein vermehrter Adeninnukleotidabbau und damit erhöhte Adenosinfreisetzung vorherrscht (Blay et al., 1997). Die Konzentrationen, in denen Adenosin vorhanden ist, reichen offenbar aus, um die lokale Immunantwort gegen das Tumorgewebe zu unterdrücken (Stagg et al., 2010).

#### **1.4 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit**

In der vorgelegten Arbeit soll zunächst herausgefunden werden, ob Adenosinrezeptoren auf Ovarialkarzinomzellen exprimiert werden. Falls vorhanden sollen die Subtypen pharmakologisch charakterisiert werden, und es soll überprüft werden, ob sie für die Therapie bedeutsame Effekte vermitteln können.

Bezogen auf neue potenzielle pharmakologische Angriffspunkte an Tumoren soll geprüft werden, ob sich durch eine Stimulation dieser Rezeptoren das

Proliferationsverhalten der gestesteten Ovarialkarzinomzellen ändert und/oder ob sich die Chemosensitivität durch Stimulierung von speziellen Rezeptorsubtypen therapierelevant beeinflussen lässt. Interessant ist hier, ob in Kombination mit bekannten Chemotherapeutika synergistische Effekte ausgelöst werden können, um das Ansprechen der meist minderdurchbluteten Tumorzellen auf die Zytostatika verbessern zu können.

Obwohl sich Adenosinrezeptoren in nahezu jedem Körpergewebe finden lassen, scheint es doch von großer Bedeutung zu sein, zu verstehen, welche Rolle sie in verschiedenen Tumorentitäten spielen und wie sie sich gezielt nutzen lassen, um in pathologischem Tumorgewebe neue Angriffspunkte für die Therapie zu erschließen.

## 2 Materialien und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterial

##### 2.1.1.1. Geräte

<b>Gerät</b>	<b>Hersteller bzw. Vertreiber</b>
Brutschrank	Thermo Electron GmbH 63303 Dreieich, Deutschland
Eismaschine	Scotsman Ice Systems Vernon Hills, IL 60061, USA
ELISA READER Sunrise	TECAN Deutschland 74564 Crailsheim, Deutschland
FACSCalibur	Becton Dickinson Franklin Lakes, NJ 07417, USA
Gefrierschränke	Liebherr-International Deutschland GmbH 88400 Biberach an der Riss, Deutschland; Thermo Electron GmbH 63303 Dreieich, Deutschland; Philipp Kirsch GmbH 77608 Offenburg, Deutschland
Kühlschrank	Liebherr-International Deutschland GmbH 88400 Biberach an der Riss, Deutschland;
Orion Microplate Luminometer	Berthold Detection Systems GmbH 75173 Pforzheim, Deutschland
Mikroskop, (Zellkultur)	Leica 35606 Solms, Deutschland
Pipetten	Eppendorf AG 22339 Hamburg, Deutschland

Sterilbank	Heraeus Holding GmbH 63450 Hanau, Deutschland
Stickstofftank	AIR LIQUIDE 40235 Düsseldorf, Deutschland
Probenschüttler (Vortex)	VWR International 64295 Darmstadt, Deutschland
Heizwasserbad	Julabo Labortechnik GmbH 77960 Seelbach, Deutschland
Waage	Sartorius AG 37075 Göttingen, Deutschland
Zählkammer (Neubauer improved)	Carl Roth GmbH & Co. KG 76185 Karlsruhe, Deutschland
Zentrifugen  Ultrazentrifuge Tischzentrifuge Biofuge B	Eppendorf AG, 22339 Hamburg, Deutschland; Jouan/Thermo Electron GmbH, 63303 Dreieich, Deutschland; Beckman Avanti J-25 Centrifuge - JA 17 Rotor Beckman LE-70 - Ti 70 Rotor; Eppendorf Zentrifuge 5417; Heraeus Sepatech GmbH 37520 Osterode, Deutschland
Ultraturrax T25	IKA-Werke GmbH & Co. KG 79219 Staufen, Deutschland
β-Counter Beckmann LS 1801	Beckman Coulter GmbH 47807 Krefeld, Deutschland
Wallac 1450 MicroBeta Trilux Liquid Scintillation &	PerkinElmer 940 Winter Street Waltham, MA 02451, USA

Luminescence Counter	
MS1-Minishaker	IKA-Werke GmbH & Co. KG 79219 Staufen, Deutschland

### 2.1.1.2 Verbrauchsmaterial:

<b>Verbrauchsmaterial</b>	<b>Hersteller bzw. Vertreiber</b>
Mikro-Probengefäße (Eppendorf Cups)	Greiner Bio-One GmbH 72636 Frickenhausen, Deutschland
FACS Röhrchen	A. Hartenstein Laborbedarf GmbH 97078 Würzburg, Deutschland
Falcon-Röhrchen (15 ml, 50 ml)	Greiner Bio-One GmbH 72636 Frickenhausen, Deutschland
Handschuhe  Handschuhe	Cardinal Health Dublin, OH 43017, USA; Sempermed, Semperit Technische Produkte Gesellschaft m.b.H. 1031 Wien, Österreich
Kombitipps	Eppendorf AG 22339 Hamburg, Deutschland
Kryoröhrchen	Nunc A/S 4000 Roskilde, Dänemark
Luminometerplatten	Greiner 72636 Frickenhausen, Deutschland
Petrischalen	Carl Roth GmbH & Co. KG 76185 Karlsruhe, Deutschland
Pipettenspitzen (10 µl, 100 µl, 100 µl)	Sarstedt AG & Co. 51588 Nürnbrecht, Deutschland

Zellkulturflaschen	Greiner Bio-One 72636 Frickenhausen, Deutschland
Zellkulturplatten (96-well)	TPP Techno Plastic Products AG 8219 Trasadingen, Schweiz
Zellkulturschalen	TPP Techno Plastic Products AG 8219 Trasadingen, Schweiz

## 2.1.2 Chemische und biologische Materialien

### 2.1.2.1 Zelllinien

Zelllinie	Spezies	Herkunft
OVCAR 3	Human, OvCa	ATCC Manassas, VA 20110-2209, USA
SK-OV-3	Human, OvCa	ATCC Manassas, VA 20110-2209, USA
PA-1	Human, OvCa	ATCC Manassas, VA 20110-2209, USA
OAW-42	Human, OvCa	European Collection of Cell Cultures (ECACC)

### 2.1.2.2 Antikörper

Antikörper	Spezies	Label	Verdünnung	Quelle
IgG 1 (Klon MOPC-21) (Isotypantikörper)	Maus	PE	1:100	Immuno Tools 26169 Friesoythe, Deutschland
Mouse anti-human CD73 (Klon: AD2)	Maus	PE	1:50	BD Biosciences Pharmingen San Diego, CA 92121, USA

Goat-anti-mouse (Sekundärantikörper)	GOAT	FITC	1:500	Immuno Tools 26169 Friesoythe, Deutschland
Mouse-anti-human CD39 (Klon A1)	Maus	FITC	1:100	Caltag laboratories, Burlingame, 94010 CA, USA

### 2.1.2.3 Allgemeine Reagenzien zur Zellkultur

Reagenz	Hersteller bzw. Vertreiber
<b>Medien und Medienzusätze</b>	
Zellkulturmedium RPMI 1640	PAA Laboratories GmbH 4061 Pasching, Österreich
Fötales Kälberserum (FCS)	Biochrom AG 12247 Berlin, Deutschland
Penicillin/Streptomycin (=P/S)	PAA Laboratories GmbH 4061 Pasching, Österreich
Dimethylsulfoxid	Carl Roth GmbH & Co. KG 76185 Karlsruhe, Deutschland
<b>Puffer und Lösungen</b>	
Dulbecco' s PBS	PAA Laboratories GmbH 4061 Pasching, Österreich
5/2 Puffer für Membranpräparation 2 mM EDTA, 5 mM Tris/HCl, pH eingestellt auf 7,4 mit 1 M NaOH	
<b>Enzyme</b>	

Accutase	PAA Laboratories GmbH 4061 Pasching, Österreich
Trypsin EDTA	PAA Laboratories GmbH 4061 Pasching, Österreich

Medium	Zusammensetzung
Standardmedium	88,5% RPMI 1640, 10% FCS, 1% P/S
Einfriermedium	70% FCS, 20% Standardmedium, 10% DMSO

#### 2.1.2.4 Reagenzien für die Radioliganden-Bindungsstudien

Reagenz	Hersteller bzw. Vertreiber
NECA 5'-N-Ethyl-Carboxamido-adenosine	Biotrend Chemicals AG 8602 Wangen b. Dübendorf, Schweiz
ADA = Adenosindesaminase	Roche Diagnostics GmbH 68305 Mannheim, Deutschland
Theophyllin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH 89555 Steinheim am Albruch, Deutschland
R-Pia (R)-N <sup>6</sup> -(1-Methyl-2-phenylethyl)-adenosine	Sigma RBI Natick, MA 01760, USA
<b>Radioliganden</b>	
[ <sup>3</sup> H]HEMADO = 2-hexyn-1-yl-N <sup>6</sup> -methyladenosine	Amersham, GE Healthcare Europe GmbH 79111 Freiburg, Deutschland
[ <sup>3</sup> H]CCPA = 2-chloro-N <sup>6</sup> -cyclopentyladenosine	Amersham, GE Healthcare Europe GmbH



	79111 Freiburg, Deutschland
[ <sup>3</sup> H]NECA = 5`-N-Ethyl-Carboxamido-adenosine	Amersham, GE Healthcare Europe GmbH 79111 Freiburg, Deutschland
BSA – bovines Serumalbumin	New England Inc. Biolabs Ipswich, MA 09938-2723, USA
Bio-Rad	Proteinassay BioRad Laboratories GmbH 80939 München, Deutschland
Tris	AppliChem GmbH 64291 Darmstadt, Deutschland

### 2.1.2.5 Spezielle Reagenzien für Adenylylcyclase-Assays

Reagenz	Hersteller bzw. Vertreiber
REA-Mix (5fach-Mix): 42,5 ml H <sub>2</sub> O, 25 ml 250 mM Tris pH 7,4 5 ml 0,5 mM cAMP 10 ml 1% BSA, 5 ml 50 µM GTP 5 ml 0,5 mM ATP 5 ml 5 mM MgCl <sub>2</sub> *H <sub>2</sub> O 2,5 ml 2,5 mM Ro-20-1724 (Phosphodiesterasehemmer)	Freundlicherweise bereitgestellt durch Sonja Kachler, Pharmakologie 97078 Würzburg, Deutschland  BIOTREND Chemikalien GmbH 50933 Köln, Deutschland / Tocris Bioscience Bristol, BS11 0QL, England
CGS 21680 (2-[p-(2-carboxyethyl)phenethylamino]adenosine-5'-N-ethyluronamide)	BIOTREND Chemikalien GmbH 50933 Köln, Deutschland

DPCPX = 1,3-dipropyl-8-cyclopentylxanthine	Sigma RBI Natick, MA 01760, USA
Zinkacetat-Dihydrat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH 89555 Steinheim am Albruch, Deutschland
Natriumcarbonat	Merck 64293 Darmstadt, Deutschland
Phosphocreatin	Roche Diagnostics GmbH 68305 Mannheim, Deutschland
Creatinkinase	Roche Diagnostics GmbH 68305 Mannheim, Deutschland
Gereinigtes [ $\alpha$ - <sup>32</sup> P] ATP	HARTMANN ANALYTIC 38108 Braunschweig, Deutschland

#### 2.1.2.6 Proliferationsassays

Reagenz	Hersteller bzw. Vertreiber
<b>BrdU – Assay</b>	Roche Diagnostics (Cell Proliferation ELISA, BrdU (chemiluminescent); Roche Diagnostics GmbH 68305 Mannheim, Deutschland
<b>Kristallviolett – Assay:</b> Kristallviolett	$C_{25}H_{30}ClN_3$ Carl Roth GmbH & Co. KG 76185 Karlsruhe, Deutschland
<b>Chemotherapeutika:</b> Doxorubicin Cisplatin	Bestellt über PD Dr. Hönig bei der Klinikapotheke der Uni Würzburg, Deutschland

SuperFasLigand	Firma Enzo Lifesciences GmbH 79539 Lörrach, Deutschland
Adenosin	Carl Roth GmbH & Co. KG 76185 Karlsruhe, Deutschland

### 2.1.2.7 FACS Reagenzien

7-Aminoactinomycin-D	Sigma-Aldrich Chemie GmbH 89555 Steinheim am Albruch, Deutschland
Beriglobinlösung	Novartis GmbH & Co. KG 35041 Marburg, Deutschland
FACS Flow	Becton Dickinson Franklin Lakes, NJ 07417, USA
FACS Rinse	Becton Dickinson Franklin Lakes, NJ 07417, USA
FACS Clean	Becton Dickinson Franklin Lakes, NJ 07417, USA

### 2.1.2.8 Anderes

<b>Trypanblau</b>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH 89555 Steinheim am Albruch, Deutschland
<b>Desinfektionsmittel</b>	
Cutasept	BODE Chemie GmbH & Co. KG 22525 Hamburg, Deutschland
Ethanol	Klinikapotheke Uni Würzburg, Deutschland

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Zellkultur**

#### **2.2.1.1 Kulturbedingungen und Passage**

SK-OV-3 und OAW-42 Zellen wurden in RPMI, das mit 10% sterilem fötalen Kälberserum versetzt wurde, bei 5% CO<sub>2</sub> und 37°C kultiviert. Die Zellen wurden dreimal pro Woche im Verhältnis 1:3 gesplittet. Für geplante Membranpräparationen erfolgte eine Auftrennung im Verhältnis bis 1:10 um genügend Membranprotein zu erhalten.

#### **2.2.1.2 Durchführung der Passage**

Nach Absaugen des Mediums aus der Zellkulturschale wurde zweimal mit 5 ml PBS gewaschen und 4 ml Trypsin (0,25%) hinzugefügt. Während der Inkubation im Brutschrank bei 37°C wurde das Ablösen der Zellen regelmäßig mikroskopisch kontrolliert. Nach ca. 10 – 15 Minuten wurde die Trypsinaktivität mit 5 ml Kulturmedium abgestoppt und die Zellen in einem sterilen Zentrifugenröhrchen abzentrifugiert (1,500 rpm, 3 min, 24°C). Der Überstand wurde anschließend abgesaugt und die Zellen konnten resuspendiert und neu ausgesät bzw. für Versuche verwendet werden.

#### **2.2.2 Membranpräparation für Bindungsstudien**

Die auf Petrischalen adhärent wachsenden Zellkulturen wurden mit eiskaltem PBS zweimal gewaschen, mit je 1 ml 5/2 Puffer mit Hilfe eines Gummischabers von den Kulturschalen gelöst und in eine Pufferlösung 5/2 Puffer zu einem Pool zusammengeführt. Um eine Beschädigung der Membranproteine zu vermeiden, wurden alle Schritte auf Eis durchgeführt. Nach einer Ultra Turrax Behandlung 30 Sekunden bei maximaler Geschwindigkeit im Ultra Turrax T25 von Janke & Kunkel zur Homogenisierung der Zellen wurden 2 Zentrifugationsschritte durchgeführt. Im ersten Schritt (3,000 x g 10 Minuten (Beckmann JA 17 Rotor, 3,200 rpm, 4°C)) wurden noch intakte Zellen und Zellkerne entfernt. Nach dem 2. Schritt in der Ultrazentrifuge (30,000 x g 40 Minuten (Beckmann 70 Ti Rotor, 37,000 rpm, 4°C)) wurde das entstandene Pellet in einem entsprechendem

Volumen 50 mM Trispuffer (pH 7,4) aufgenommen, resuspendiert und in einem Glaspotter homogenisiert.

Die Membranen wurden nach Bestimmung des Proteingehalts für die Bindungsstudien aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

### **2.2.3 Membranpräparation für Adenylylcyclase-Versuche**

In ähnlicher Art und Weise wurde auch die Membranpräparation für die Adenylylcyclase-Versuche durchgeführt. Hierbei erfolgte aber die Homogenisierung nur für zweimal 5 Sekunden auf Eis und die Zentrifugation erfolgte in nur einem Ultrazentrifugationsschritt bei 27,000 rpm für 25 Minuten bei 4 °C. Das entstandene Pelett wurde in 50 mM Trispuffer aufgenommen, resuspendiert und in einem Glaspotter homogenisiert.

### **2.2.4 Quantifizierung von Proteinen**

Die Proteinbestimmung wurde mit dem Bio-Rad Protein Assay durchgeführt, dessen Prinzip auf der Methode nach Bradford 1976 (Bradford, 1976) basiert.

Die Methode beruht darauf, dass sich das Absorptionsmaximum von Coomassie Brilliant Blue G-250 in saurer Lösung bei Proteinbindung von 465 nm nach 595 nm verschiebt. In einer 1 ml Einmalküvette wurden je 1 ml Bio-Rad Reagenz mit je 4 µl der zu bestimmenden Proteinlösung kombiniert. Gleichzeitig wurde eine Eichreihe aus bovinem Serumalbumin (BSA) aufgestellt, mit deren Hilfe und dem bekannten Verdünnungsfaktor sich die Proteinkonzentration der Probe berechnen ließ.

### **2.2.5 Reinigung von [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]ATP**

Das gelieferte [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]ATP (Anfangsaktivität 250 µCi) wurde durch Ionenaustauschchromatographie DOWEX-1 Cl-form; 1 x 2-200 aufgereinigt. Dazu wurden mit ca. 800 µl gefüllte Säulen mit 5 ml H<sub>2</sub>O gewaschen und anschließend die [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]ATP Lösung aufgetragen. Anschließend wurde mit zweimal 5 ml einer 0.0316 N HCl-Lösung (pH 1,5) gespült. Danach wurde das

markierte ATP durch Zugabe von 3 x 1 ml 0.25 N HCl in 3 Aliquots eluiert und jeweils 1 µl 10 mM kaltes ATP zur Stabilisierung hinzupipettiert. Nachdem der pH-Wert mit 50%igem Triethanolamin auf pH ≤7.0 eingestellt wurde, wurde das gereinigte [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]ATP in Aliquots bei -20 °C aufbewahrt.

### 2.2.6 Stimulation der Adenylylcyclase zum Nachweis von A<sub>2B</sub>-Rezeptoren

Die benötigten Membranen werden nach dem oben beschriebenen Verfahren unmittelbar vor dem Assay frisch präpariert. Der Inkubationsansatz umfasste insgesamt 100 µl und wurde nach folgendem Pipettierschema hergestellt:

40 µl in Trispuffer suspendiertes Membranprotein
50 µl REA-Mix
10 µl destilliertes Wasser bzw. 10 µl der jeweiligen zu prüfenden Substanz in einer Endkonzentration von:
1 µM (CCPA)
10 µM (CGS 21680 und DPCPX)
100 µM (NECA)

Der **REA-Mix** wurde nach folgendem Pipettierschema angesetzt:

400 µl 5fach REA Mix (vorgefertigte Lösung)
5,9 mg Phosphocreatin
0,8 mg Creatinkinase
ca. 4 x 10 <sup>6</sup> cpm pro ml gereinigtes [ $\alpha$ - <sup>32</sup> P]ATP
Das fehlende Volumen wurde mit destilliertem Wasser auf 1 ml aufgefüllt.

Der Ansatz wurde dann sorgfältig durchmischt und bei 37 °C 20 Minuten inkubiert. Um die Reaktion abzustoppen wurden die Proben auf Eis gestellt, je Probe 400 µl frisch angesetztes 125 mM ZnAc und 500 µl 144 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> hinzu gefügt und anschließend gut gemischt. In der sich anschließenden 10-minütigen Inkubationszeit bildete sich ein Zn<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> Niederschlag, welcher in der Tischzentrifuge bei 14,000 rpm in 5 Minuten abzentrifugiert wurde.

800 µl des Überstandes jeder Probe wurden schließlich auf Alumina Säulen aufgetragen, die zuvor zweimal mit je 5 ml 100 mM Trispuffer pH 7,4 gewaschen worden waren. Nach zwei Elutionsschritten mit je 2 ml 100 mM Trispuffer pH 7,4 wurde die Cerenkov Strahlung der Proben ohne Szintillator in einem β-Counter (Beckmann LS1801) für 5 Minuten gezählt.

### 2.2.7 Radioliganden – Bindungsassay

Getestet wurden insgesamt vier Ovarialkarzinomzelllinien auf Adenosinrezeptor-Expression der Subtypen: A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub>, A<sub>3</sub>.

Der Assay wurde auf Eis pipettiert, als Puffer Tris 50 mM (pH 7,4) verwendet. Zunächst wurden alle Filter einer mit Filterböden ausgestatteten Mikrotiterplatte mit 10 µl Trispuffer abgesättigt.

Anschließend wurde pro Rezeptorsubtyp je ein Triplett für die totale und je ein Dublett für die unspezifische Bindung pipettiert. Pro 1 ml Membranprotein wurden 5 µl 10%ige Adenosindesaminase (entsprechend einer Aktivität von 0,25 units) eingesetzt. Für die A<sub>1</sub>-Bindung wurde [<sup>3</sup>H]CCPA, für die A<sub>2A</sub>-Bindung [<sup>3</sup>H]NECA und für die A<sub>3</sub>-Bindung [<sup>3</sup>H]HEMADO als spezifische Radioliganden in einer Endkonzentration von 1 nM bzw. 10 nM [<sup>3</sup>H]NECA verwendet.

Der Ansatz je Position wurde anschließend wie folgt pipettiert:

#### **Totale Bindung:**

100 µl Puffer
50 µl des rezeptorspezifischen Radioliganden
50 µl Membranprotein der zu untersuchenden Zelllinie

#### **Unspezifische Bindung:**

50 µl Puffer
50 µl Radioligand
50 µl Membranprotein
für die A <sub>1</sub> -Bindung jeweils 50 µl Theophyllin (Endkonzentration 1 mM) für die A <sub>2A</sub> - und A <sub>3</sub> - Bindung jeweils 50 µl R-PIA (Endkonzentration 100 µM).

Die Mikrotiterplatte wurde nun auf dem Minishaker kurz auf 200 U/min

geschüttelt und bei Raumtemperatur 3 Stunden inkubiert.

Anschließend erfolgte ein dreimaliges Absaugen und Waschen mit je 200 µl eiskaltem 50 mM Tris. Nachdem im Anschluss daran ein Triplett aus je 25 µl Radioligand für die Total Counts pipettiert worden waren, wurde die Platte ca. 30 Minuten bei 40°C getrocknet. Da Tritium selbst relativ wenig strahlt, wurden dann 20 µl Szintillator in jede Position pipettiert und anschließend 5 Minuten je Position im Wallac Counter die Counts gezählt.

### **2.2.8 Berechnung der Zellzahl in einer Zellsuspension**

In einem sterilen Falconröhrchen wurden je 20 µl Zellsuspension und je 20 µl Trypanblau gemischt und anschließend 20 µl des Gemisches in eine Neubauerzählkammer aufgebracht und zweimal 16 Quadrate ausgezählt. Die Zellzahl wurde wie folgt berechnet:

$$\text{Zellzahl} = \text{Anzahl gezählter Zellen} \times 2 \text{ (Verdünnungsfaktor)} \times 10.000 \text{ (Kammerfaktor)} \times \text{Volumen (ml)}$$

### **2.2.9 BrdU Incorporation-Assay**

Der BrdU-Assay bestimmt die DNA-Synthese als Maß der proliferativen Aktivität. Er beruht auf dem kompetitiven Einbau des Thymidinanalogons 5'-Bromo-2'-desoxy-Uridin in die DNA, das über nachgeschaltete Reaktionen photometrisch quantifizierbar gemacht wird. Dieser Einbau erfolgt in proliferierenden Zellen während der DNA-Neusynthese in der S-Phase des Zellzyklus.

Es wurde nach der Anleitung des entsprechenden Kits von Roche Diagnostics (Cell Proliferation ELISA, BrdU (chemiluminescent)) vorgegangen:

Die Zellen wurden in 96-well-Platten kultiviert und für 24 Stunden mit den verschiedenen Testsubstanzen inkubiert. Zur Bestimmung des BrdU-Einbaus erfolgte eine 12-stündige Inkubation mit 10 µM BrdU Markierungslösung bei 37°C. Im Anschluss wurden die Zellen nach Abklopfen des Markierungs-



reagenz und 60-minütigem Trocknen bei 60°C mit 2 ml Fixierungslösung (Fix Denat) für 30 Minuten bei Raumtemperatur fixiert und gleichzeitig denaturiert. Das Denaturieren ist wichtig, um dem Antikörper einen besseren Zugang zum BrdU zu verschaffen. Das Fix Denat wurde abdekantiert und die 96-well-Platte kräftig ausgeklopft, bevor in jede Position 100 µl frisch angesetzte Antikörperlösung (anti-BrdU-POD working solution, 1:100 verdünnt) zu den Zellen pipettiert und 90 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert wurden. Anschließend wurden die Zellen fünfmal je 5 Minuten mit 300 µl/Position Waschlösung gewaschen. Nach Zugabe von 100 µl Substratlösung in jede Position wurden die Zellen für 3 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert. Die Chemilumineszenz wurde anschließend mittels eines Mikroplattenreaders (ELISA Reader) gemessen. Die gesamte Fläche der 96 Positionen wurde mittels Multipoint-Messung erfasst. Die Messzeit betrug dabei 200 ms je Messpunkt. Entstehende Farbstoffe und damit die Absorption, sind nach Abzug des Leerwerts proportional zur Zahl der proliferierenden Zellen in der jeweiligen Mikrokultur.

## **2.2.10 Kristallviolett-Färbung**

### **2.2.10.1 Prinzip**

Die Kristallviolett-Färbung wird angewendet um das Proliferationsverhalten von Zellen zu studieren. Uns diente sie zur Bestimmung der antiproliferativen Wirkung von Cisplatin, Doxorubicin und Fas-Ligand. Sie kann nur bei adhären wachsenden Zellen angewendet werden. Sterben die Zellen ab, geht die Fähigkeit zur Adhärenz verloren und sie werden folglich im initialen Waschschrift des Assays aus der Zellkulturschale entfernt. Alle verbliebenen Zellen werden anschließend unspezifisch angefärbt und die Färbung photometrisch ausgewertet. Die Stärke der Anfärbung korreliert mit der Anzahl der vitalen, adhären Zellen.

Kristallviolett (N-hexamethylpararosanilinchlorid) ist ein Farbstoff, der in Nuclei von Zellen nachweisbar ist, die vor Durchführung der im Folgenden

beschriebenen Versuchs- und Fixationsmethode vital waren. Der aufgenommene Farbstoff kann durch Zugabe von Säure und Alkohol wieder aus den Zellkernen herausgelöst werden. Im Experiment entsteht dadurch eine Farblösung, deren Intensität photometrisch bestimmt wird und deren Extinktionswerte mit der vorliegenden Zellzahl korrelieren.

### **2.2.10.2 Durchführung**

Je Zelllinie wurden 10.000 Zellen pro „well“ in 96-well-Platten ausgesät, die sich über ca. 3 Stunden anheften konnten. Anschließend wurden steigende Konzentrationen der Testsubstanzen zu den Zellen pipettiert und 24 Stunden inkubiert. Nun wurden die Chemotherapeutika bzw. der Fas-Ligand ebenfalls in steigenden Konzentrationen hinzupipettiert und 48 Stunden inkubiert.

Das Medium wurde zunächst abdekantiert und die Platte über Zellstoff ausgeklopft. Je Position wurden dann 50 µl einer wässrigen Kristallviolettlösung (0,5% Kristallviolett und 20% Methanol in H<sub>2</sub>O) hinzupipettiert und 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen, die Platten in einem großen Gefäß mit Wasser geschwenkt, um die unspezifische Färbung auszuwaschen, ausgeklopft und 48 Stunden an der Raumluft getrocknet.

Nachdem in jede Position 50 µl Natriumcitratlösung (0,1 M Natriumcitrat in 50% Ethanol) pipettiert worden waren, wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 550 nm im ELISA-Reader gemessen. Als Leerwert dienten 50 µl Natriumcitratlösung in einer zellfreien Position.

### **2.2.11 Statistische Auswertung**

Die statistische Auswertung der BrdU- und Kristallviolett-Studien erfolgte mithilfe der freundlichen Unterstützung von Sabine Karl vom Rechenzentrum der Universität Würzburg unter Verwendung des Statistikprogramms SPSS. Für die BrdU Studien wurde der Jonckheere-Terpstra-Test angewandt, als signifikant wurden Ergebnisse gewertet, bei denen p kleiner als 0,05 war.

Aufgrund der kleinen Fallzahl wurde auf Post-Hoc-Tests verzichtet.

Bei den Kristallviolett-Studien wurde eine ANOVA durchgeführt, ebenfalls wurden Ergebnisse als signifikant gewertet, wenn  $p$  kleiner als 0,05 war. Zudem wurde für die signifikanten Haupteffekte ein sog. Dunnet-Test durchgeführt, der die Zellen, die diese Substanzen erhielten mit der Kontrollzellgruppe vergleicht.

## **2.2.12 Durchflusszytometrie, FACS (fluorescence activated cell sorting)**

### **2.2.12.1 Prinzip**

Die Durchflusszytometrie (FACS für "fluorescence-activated cell sorting", Markenname der Firma Becton Dickinson (BD), wird synonym verwendet) ist ein optisches Messverfahren zur Analyse von Partikeln, in diesem Falle von Zellen. Hierbei werden die Zellen mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gefärbt, die sich gegen bestimmte Oberflächenproteine richten. Die gefärbte Einzelzellsuspension wird anschließend durch eine Kapillare gesaugt und gelangt in die Durchflusszelle, wo jede Zelle einzeln einen fokussierten Laserstrahl passiert. Das dabei erzeugte Streu- und Fluoreszenzlicht wird separat detektiert.

Detektiert wird zum einen die Lichtstreuung, zum anderen das emittierte Fluoreszenzlicht der Antikörper-gekoppelten Fluorophore. Wenn Partikel einfallendes Laserlicht beugen, entsteht Streulicht (scatter). Die Vorwärtsstreuung (Forward Scatter, FSC), ein Maß für die Beugung des Lichts im flachen Winkel ( $2 - 20^\circ$ ), ist abhängig vom Volumen der Zelle und ist proportional zur Zellgröße, die Seitwärtsstreuung (Side-scatter (SSC)) ist ein Maß für die Lichtbrechung im rechten Winkel und entsteht an den Grenzflächen innerhalb der Zelle (z.B. Zellkern, intrazelluläres granuläres Material, Vesikel). Zudem ist es möglich, extrinsische Eigenschaften von Zellen zu beschreiben, da durch den Laser das Fluorochrom, welches an die Antikörper konjugiert ist, angeregt wird. Die von den Farbstoffen emittierte Lichtmenge ist proportional zur Zahl der mit Antikörpern markierten Epitope. Folglich ist die Lichtemission der Zelle umso höher, je mehr Antigene auf der Oberfläche exprimiert werden. Die elektrischen Signale werden verstärkt und durch einen Analog-Digital-

Wandler in digitale Signale umgewandelt, die anschließend am PC bearbeitet werden können.

### **2.2.12.2 Durchführung**

#### **FACS CD39/CD73**

Die Zellen der zu untersuchenden Zelllinien wurden auf Petrischalen ausgesät (1,5 Mio/Schale) vier Platten pro Zelllinie (Kontrolle, ADA, ADA + 5  $\mu$ M NECA, ADA + 25  $\mu$ M NECA), mit den entsprechenden NECA Konzentrationen vorbehandelt und 24 Stunden inkubiert. Unter sterilen Bedingungen wurden die Zellen nun mit je 2 ml PBS gewaschen, mit je 1 ml Accutase von den Schalen abgelöst und die Reaktion mit je 4 ml RPMI abgestoppt. Anschließend wurden die Zellen in 15 ml Falcon Röhrchen geerntet und der Überstand bei 1,500 rpm und 21 °C in 5 Minuten abzentrifugiert.

Mit je 2 ml PBS pro Röhrchen wurden die Pellets resuspendiert und erneut bei 1,500 rpm 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und mit 230  $\mu$ l (5 ng/ml) Beriglobin resuspendiert. Anschließend erfolgte eine 15-minütige Inkubation auf Eis zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen.

Je 50  $\mu$ l pro Falcon wurden nun in die FACS-Röhrchen überführt und bei 4 °C für 5 Minuten bei 1,800 rpm zentrifugiert, die Überstände verworfen und die FACS-Röhrchen leicht abgeklopft. Zur Markierung der Zellen dienten im Anschluss folgende Antikörper: Isotyp control IgG1-PE (1:100), anti human CD73 PE (1:50), Isotyp control goat anti mouse FITC (1:50) (nicht gelabelt) mouse anti human CD39 (1:50) und goat anti mouse FITC (1:500).

Iso PE, CD73 PE und Iso FITC sind bereits, CD39 ist nicht fluoreszenzmarkiert und muss daher in zwei Schritten gefärbt werden.

Die CD39 Proben der jeweiligen Zelllinien mussten also zunächst mit 50  $\mu$ l mouse anti human CD39 nach dem Zentrifugieren resuspendiert werden und dann 25 Minuten bei Dunkelheit im Kühlschrank inkubieren. Anschließend wurden 200  $\mu$ l FACS-Puffer hinzupipettiert und die Probe bei 5 °C für 5 Minuten bei 1,800 rpm zentrifugiert.

Nun wurden auf die restlichen Röhrchen 50  $\mu$ l der markierten Antikörper

gegeben. Die CD39 Probe wurde aus dem Kühlschrank entnommen, abgegossen und der goat anti mouse FITC Antikörper hinzupipettiert. Alle Proben wurden nun nochmals unter den genannten Bedingungen inkubiert.

Abschließend wurde jeder Probe 200 µl FACS-Puffer hinzugegeben und die Überstände bei 4 °C für 5 Minuten bei 1,800 rpm zentrifugiert.

Die Überstände wurden abgekippt und die Zellpellets in je 200 µl FACS-Puffer resuspendiert.

Als letzter Schritt musste noch je Röhrchen 3 µl 7AAD (7-Aminoactinomycin) hinzupipettiert werden. Dies ist ein roter Farbstoff, der in der DNA zwischen Cytosin und Guanin interkaliert, aber keine intakten Zellmembranen durchdringen kann, somit nur abgestorbene Zellen anfärbt und dadurch im FACS markiert.

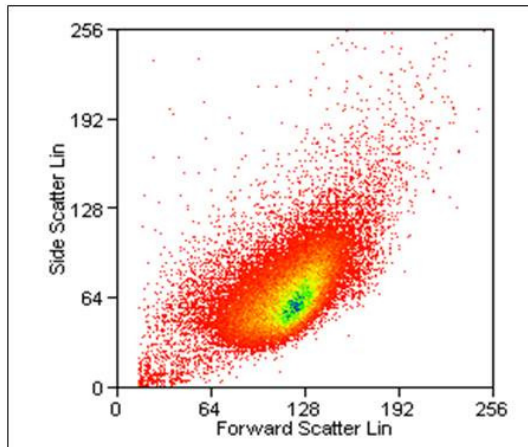
Für jede angesetzte NECA Konzentration wurde je eine Isotyp-Kontrolle und eine spezifische Färbung vorgenommen. Die Isotyp-Kontrolle ist ein gleicher IgG-Subtyp wie der spezifische Antikörper, auch identisch gelabelt und dient der Überprüfung, wieviel unspezifische Antikörperbindung an den Tumorzellen stattgefunden hat. Die spezifische Bindung eines Antikörpers ergibt sich dann anhand der Verschiebung gegenüber der Isotyp-Kontrolle.

### **2.2.12.3 Analyse und Darstellung**

Die Einstellung und die FACS-Messung selbst wurden mit Hilfe der CellQuest Software (Becton Dickinson) für Apple Macintosh durchgeführt. Zur Darstellung dienen das Streudiagramm und das Histogramm. Ersteres wird auch Zellbild genannt, da sich hier die Zellpopulationen darstellen lassen. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm Summit V4.3 (Dako Cytomation, Hamburg, Germany). Je ein typisches Histogramm und Streudiagramm sind im Folgenden dargestellt.

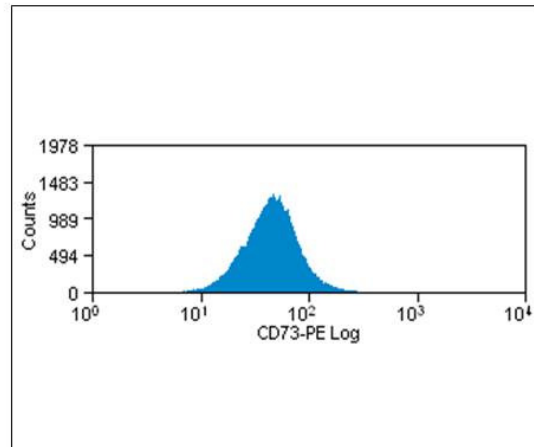
## Abbildung 2

**Streudiagramm bzw. „Dot Plot“ hier von OAW-42 Zellen**



Jede Zelle wird durch einen Punkt repräsentiert. Auf der x-Achse ist der „forward scatter“, auf der y-Achse der „side scatter“ aufgetragen.

**Histogramm hier von OAW-42 Zellen**



Auf der x-Achse ist die Fluoreszenzintensität, auf der y-Achse die Zellzahl aufgetragen.

## 3 Ergebnisse

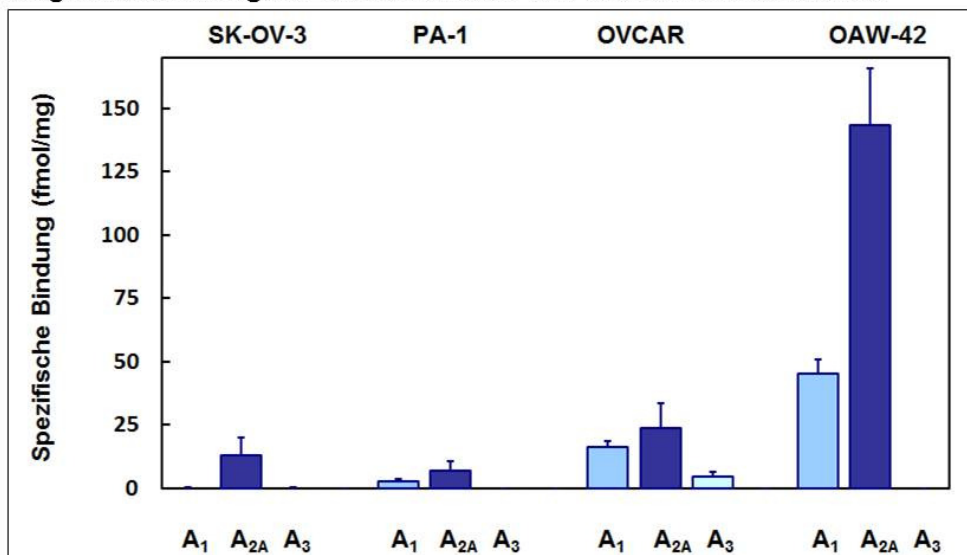
### 3.1 Pharmakologische Charakterisierung der Zelllinien

#### 3.1.1 Bindungsstudien

Als Grundlage aller Untersuchungen prüften wir, welche Subtypen von Adenosinrezeptoren in welchem Ausmaß auf den Zelllinien SK-OV-3, PA-1, OVCAR und OAW-42 exprimiert werden. Daher führten wir zunächst Bindungsstudien mit radioaktiv markierten Liganden durch (s. Abbildung 3).

#### Abbildung 3

##### Radioligandenbindung an Zellmembranen von Ovarialkarzinomzellen



Getestet wurden die Ovarialkarzinomzelllinien SK-OV-3, PA-1, OVCAR und OAW-42. Als Tritium-markierte Radioliganden dienen für A<sub>1</sub> [<sup>3</sup>H]CCPA (1 nM); für A<sub>2A</sub> [<sup>3</sup>H]NECA (10 nM); für A<sub>3</sub> [<sup>3</sup>H]HEMADO (1 nM). Es wurden 50-70 µg Protein in einem Inkubationsvolumen von 100 µl eingesetzt. Die Säulen repräsentieren Mittelwerte und SEM aus mindestens 3 Einzelexperimenten, in denen jeweils Doppelwerte gemessen wurden.

Bei der Zelllinie OAW-42 konnten A<sub>1</sub>- und deutlicher A<sub>2A</sub>-Rezeptoren nachgewiesen werden (siehe Abbildung 3). Die übrigen Zelllinien zeigten nur wenig exprimierte Rezeptoren, die Werte bewegen sich bei ≤ 25 fmol/mg und damit meist unterhalb der zuverlässigen Nachweisgrenze. Zudem sticht bei allen Zelllinien, außer den OAW-42 kein spezieller Subtyp hervor.

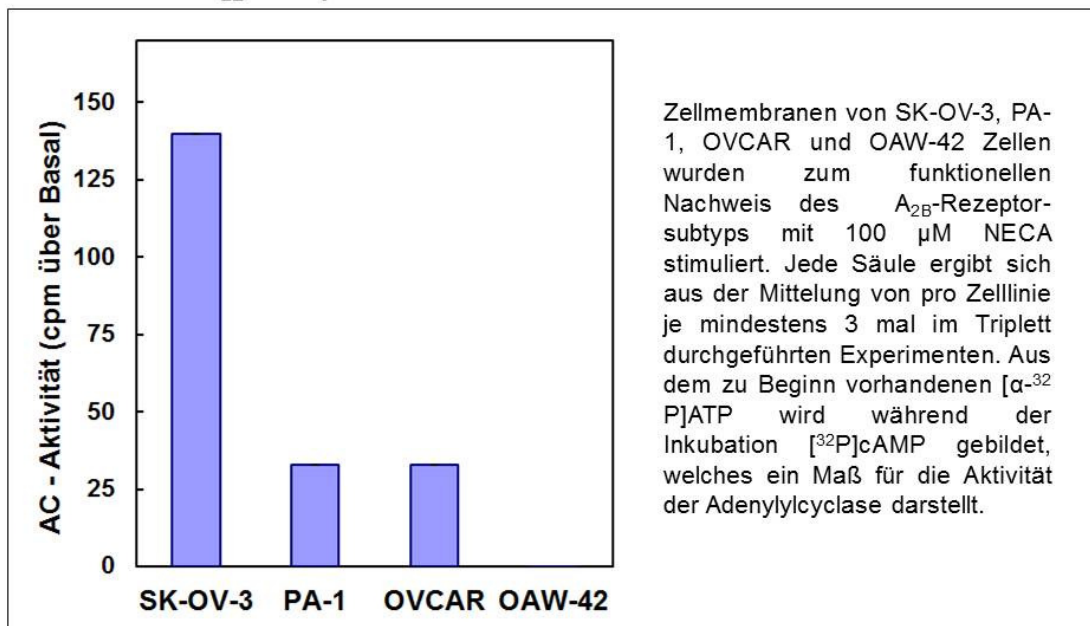
Da es für den A<sub>2B</sub>-Rezeptorsubtyp bis dato keine potenten Radioliganden gibt,

nutzten wir einen funktionellen Assay, der die Aktivierung der Adenylylcyclase in präparierten Membranen erfasst.

### 3.1.2 Stimulation der Adenylylcyclase zum Nachweis von A<sub>2B</sub>-Rezeptoren

#### Abbildung 4

#### NECA-stimulierte Aktivität der Adenylylcyclase in Ovarialkarzinomzelllinien zum Nachweis von A<sub>2B</sub>-Rezeptoren



Bei den SK-OV-3 Zellen führte die Behandlung mit NECA zu einer Stimulation der Adenylylcyclase (140 cpm über Basal), die auf A<sub>2B</sub>-Rezeptoren hinweist, aber auch von A<sub>2A</sub>-Rezeptoren vermittelt werden kann. Für die Zelllinien PA-1 und OVCAR konnte mit NECA nur eine geringe cAMP-Antwort nachgewiesen werden. OAW-42 Zellen zeigten keine Zunahme der cAMP Produktion, möglicherweise weil eine A<sub>1</sub>- und eine A<sub>2A</sub>-Antwort sich gegenseitig aufheben (s.u.) (s. Abbildung 4).

Bei den Zelllinien PA-1 und OVCAR waren die gemessenen Werte sowohl in



den Bindungsversuchen als auch bei der Stimulation der Adenylylcyclase nur gering, so dass in diesen Zellen keiner der Subtypen von Adenosinrezeptoren in relevanten Mengen vorhanden zu sein scheint (s. Abbildung 3 und 4). Daher wurde eine weitere Charakterisierung der Subtypen nur in SK-OV-3 und OAW-42 Zellen weiter verfolgt.

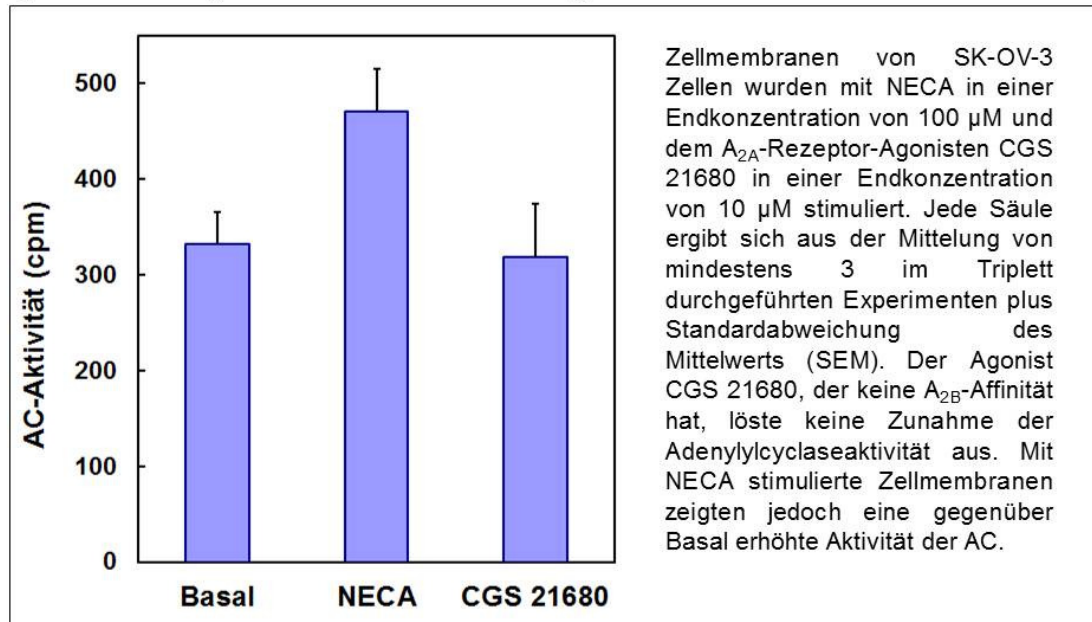
Wir erhielten also folgende Profile für die zwei Zelllinien:

- SK-OV-3: geringe Expression von  $A_{2A}$  (Bindung); Expression von  $A_{2B}$  (AC)
- OAW-42: geringe Expression von  $A_1$ ; Expression von  $A_{2A}$  (beides Bindung)

Bei den SK-OV-3 Zellen wurde durch den unselektiven Agonisten NECA eine Stimulation der AC ausgelöst (s. Abbildung 4). Eine funktionelle Kopplung konnte nachgewiesen werden, doch interessierte uns, ob diese über den in Spuren vorhandenen  $A_{2A}$ - oder den  $A_{2B}$ -Rezeptorsubtyp vermittelt wird, bzw. sich die Effekte beider Rezeptoren addieren könnten. Die Stimulation der AC wurde also parallel zu NECA mit dem Agonisten CGS 21680 durchgeführt, der nur eine sehr geringe Affinität für den  $A_{2B}$ -Rezeptor aufweist.

### Abbildung 5

#### **Stimulation der AC in Zellmembranen von SK-OV-3 mit NECA und dem A<sub>2A</sub>-spezifischen Agonisten CGS 21680 im Vergleich zur basalen Aktivität**



Es kam zu einer Zunahme der cAMP Produktion nach NECA Stimulation. Mit CGS 21680, welches nur ein A<sub>2A</sub>-Agonist ist, gingen die gemessenen Werte aber nicht über die basale Adenylylcyclaseaktivität hinaus (s. Abbildung 5). Damit scheint also die durch NECA ausgelöste Stimulation der Adenylylcyclase ausschließlich A<sub>2B</sub>-vermittelt zu sein.

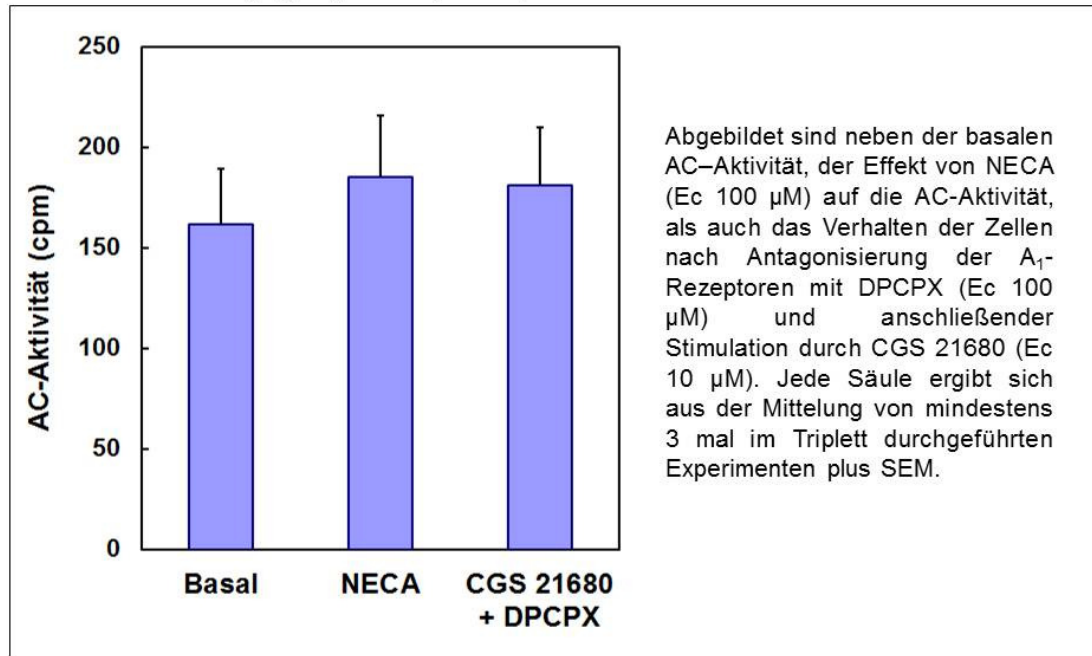
OAW-42 Zellen imponierten im Bindungsversuch mit A<sub>1</sub>- und A<sub>2A</sub>-Rezeptoren (s. Abbildung 3). Eine funktionelle Kopplung des A<sub>2A</sub>-Rezeptors konnte im AC-Versuch nicht nachgewiesen werden (s. Abbildung 4).

Da der A<sub>1</sub>-Rezeptor mit G<sub>i</sub>- und der A<sub>2A</sub>-Rezeptor mit G<sub>s</sub>-Proteinen interagiert und auf der Zelllinie OAW-42 beide Rezeptorsubtypen nachgewiesen wurden, lag die Überlegung nahe, dass eine A<sub>2A</sub>-vermittelte Stimulation durch eine A<sub>1</sub>-bedingte Hemmung überlagert sein könnte. Daher wurden vorhandene A<sub>1</sub>-Rezeptoren durch Zugabe des A<sub>1</sub>-Antagonisten DPCPX 30 Minuten vor Zugabe

des Agonisten CGS 21680 blockiert.

### **Abbildung 6**

**Stimulation der AC in Zellmembranen der Zelllinie OAW-42 mit NECA und CGS 21680 nach vorangegangener A<sub>1</sub>-Rezeptor-Inhibition durch DPCPX**



Sowohl NECA als auch CGS 21680 in Gegenwart des A<sub>1</sub>-Antagonisten DPCPX lösten nur eine von Basal nicht zu unterscheidende cAMP-Antwort aus (s. Abbildung 6). Eine A<sub>1</sub>-vermittelte hemmende Wirkung, die eine A<sub>2A</sub>-vermittelte Stimulation verschleiern könnte, konnte somit nicht nachgewiesen werden. A<sub>2A</sub>-Rezeptoren sind zwar offensichtlich auf OAW-42 Zellen vorhanden, eine funktionelle Kopplung an die Adenylylcyclase konnte jedoch nicht nachgewiesen werden.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Werte der gemessenen Rezeptormengen insgesamt gering sind. Nur in den Zelllinien SK-OV-3 (A<sub>2B</sub>) und OAW-42 (A<sub>2A</sub>, geringe Mengen A<sub>1</sub>) fanden sich genügend Rezeptoren, um weitere Untersuchungen vorzunehmen.

## **3.2 Untersuchungen zur Bedeutung der charakterisierten Rezeptoren in Bezug auf Zelltod und Proliferation**

In den folgenden Untersuchungen nutzten wir den in Kapitel 2 beschriebenen BrdU-Assay, um herauszufinden, ob die Stimulation der nachgewiesenen Adenosin-Rezeptoren einen Einfluss nehmen würde auf die Proliferation der Ovarialkarzinomzellen.

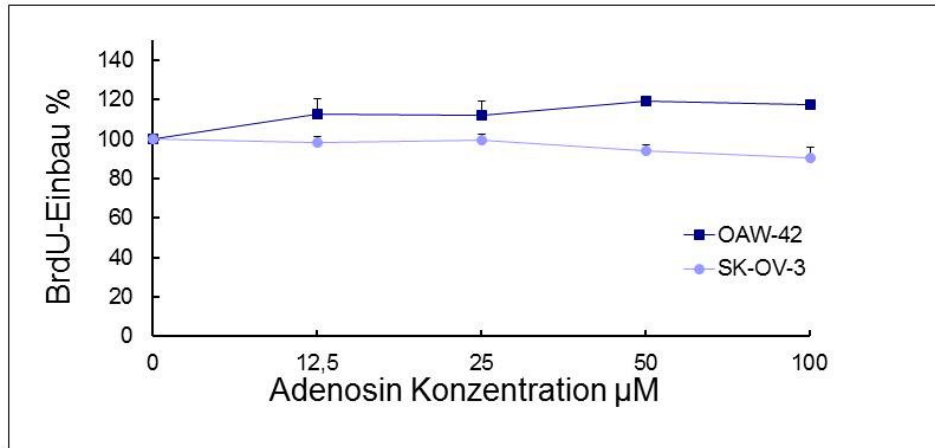
### **3.2.1 Wirkung von Adenosin**

In Tumorzellen ist die Fähigkeit zur Apoptose gestört, das Zellwachstum unkontrolliert. Das Proliferationsverhalten von entarteten Zellen zu beobachten und evtl. im kurativen Sinne zu beeinflussen ist ein interessanter Ansatzpunkt auf der Suche nach neuen Arzneistoffen für die Tumorthherapie.

Um herauszufinden, ob Adenosin über einen der identifizierten Rezeptorsubtypen einen Effekt auf die Zellproliferation ausübt, wurden SK-OV-3 und OAW-42 Zellen 24 Stunden mit Adenosin inkubiert und anschließend der BrdU–Einbau in die DNA mithilfe des BrdU Assays wie in Kapitel 2 beschrieben, gemessen.

### Abbildung 7

#### **Effekt von Adenosin auf die Zellproliferation von OAW-42 und SK-OV-3 geprüft durch den Einbau von BrdU in die Zell-DNA**



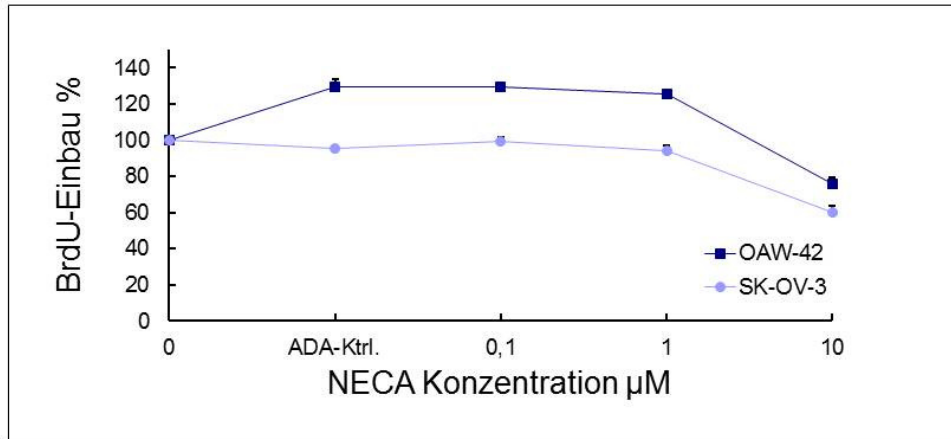
OAW-42 und SK-OV-3 Zellen wurden 24 Stunden mit Adenosin in verschiedenen Konzentrationen inkubiert. Bei steigender Adenosin-Konzentration erhöhten OAW-42 Zellen den BrdU-Einbau in die DNA ( $p=0,019$ ). SK-OV-3 Zellen zeigten bei steigender Adenosin-Konzentration keinen signifikanten Unterschied bezüglich des BrdU-Einbaus ( $p=0,097$ ). Jeder Messpunkt repräsentiert den Mittelwert  $\pm$  SEM aus 3 in Dreifachwerten durchgeführten Experimenten.

Die Zelllinien reagierten nur wenig auf das zugegebene Adenosin. Bei den OAW-42 Zellen stieg die Proliferation mit steigender Adenosin-Konzentration leicht an ( $p=0,019$ ), im Gegensatz zu den SK-OV-3 Zellen, wo sie leicht zurück ging (s. Abbildung 7) aber nicht signifikant war ( $p=0,097$ ).

Da Adenosin auf vielen verschiedenen Wegen metabolisiert werden kann, z.B. durch die ADA zu Inosin abgebaut, durch die Adenosinkinase zu AMP phosphoryliert oder in die Zelle aufgenommen werden kann und dann nicht mehr als Rezeptor-aktivierender Agonist zur Verfügung steht, entschieden wir uns bei künftigen Experimenten spezifische Liganden zur gezielten Rezeptor-Stimulation einzusetzen. Weitere Untersuchungen wurden daher mit dem ebenso wie Adenosin nichtselektiven Agonisten NECA durchgeführt, evtl. im Nährmedium vorhandenes Adenosin wurde durch Zugabe der Adenosindesaminase eliminiert.

## Abbildung 8

Effekt von NECA auf die Zellproliferation von OAW-42 und SK-OV-3 geprüft durch den Einbau von BrdU in die Zell-DNA



OAW-42 und SK-OV-3 Zellen wurden in einem Zeitraum von 24 Stunden mit 0,1, 1 und 10  $\mu\text{M}$  NECA behandelt. Vorhandenes Adenosin wurde vorher durch Zugabe von ADA eliminiert. Die ADA-Kontrollzellen wurden nur mit ADA behandelt. Alle Messpunkte ergeben sich aus 3 mal im Triplet durchgeführten Experimenten  $\pm$  SEM. Bei steigender NECA-Konzentration kam es zu einem verringerten Einbau von BrdU. Sowohl bei OAW-42 ( $p=0,021$ ) und SK-OV-3 ( $p=0,001$ ) Zellen konnte ein zwar geringer, jedoch signifikanter Trend nach unten festgestellt werden.

### 3.2.2 Wirkung von NECA

OAW-42 und SK-OV-3-Zellen reagierten bei 0,1 und 1  $\mu\text{M}$  NECA nur wenig, bei der höheren Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  verringerten sie aber beide deutlicher den BrdU-Einbau in die DNA. Trotz des statistisch signifikanten Trends zu einer sinkenden Proliferationsrate bei steigenden NECA-Konzentrationen, zeigte sich im paarweisen Vergleich der Konzentrationen untereinander aber keine statistische Signifikanz.

### 3.2.3 Effekt von Cisplatin, Doxorubicin und Fas-Ligand auf NECA stimulierte Zellen

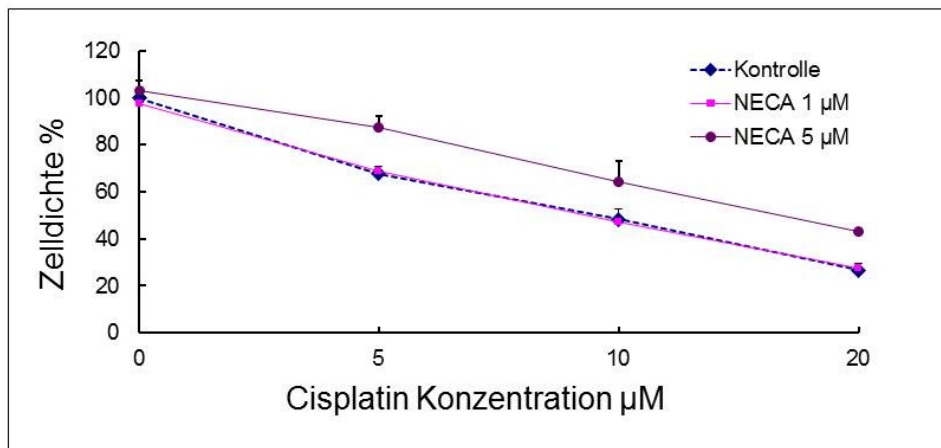
In den folgenden Experimenten prüften wir das Verhalten von SK-OV-3 und OAW-42 Zellen auf Chemotherapeutika (Cisplatin und Doxorubicin) und den Fas-Liganden, nachdem die Adenosinrezeptoren für 24 Stunden mit NECA stimuliert worden waren. Dazu untersuchten wir, ob NECA die antiproliferative

Wirkung dieser Substanzen beeinflusst.

Genutzt wurde dafür der in Kapitel 2 beschriebene Kristallviolett-Assay.

### **Abbildung 9**

**Effekt von NECA und Cisplatin auf die Zellproliferation von OAW-42 geprüft durch die Kristallviolett-Färbung vitaler, adhärenter Zellen**



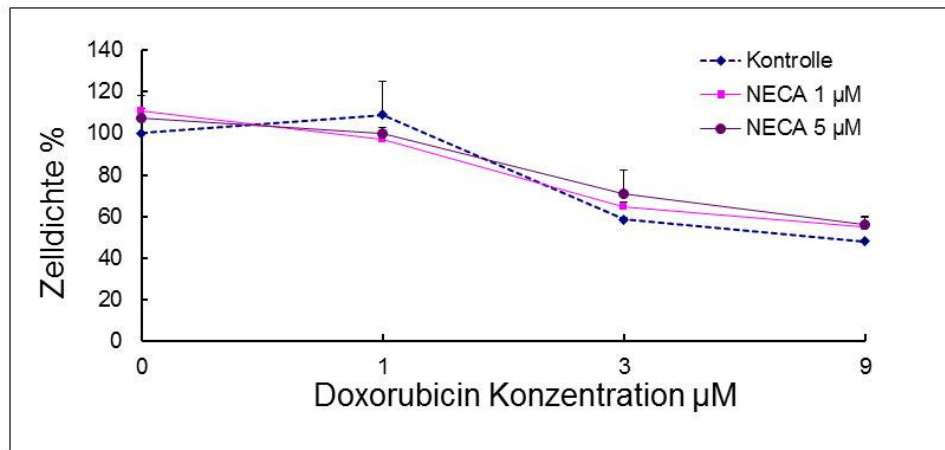
OAW-42 Zellen wurden nach Eliminierung des endogenen Adenosins durch die ADA 24 Stunden mit NECA inkubiert. Anschließend wurde das Chemotherapeutikum Cisplatin zugefügt, um den Zelltod herbeizuführen. Jeder Messpunkt repräsentiert den Mittelwert aus mindestens 3 im Triplet durchgeführten Experimenten mit Standardabweichung.

Die Untersuchungen ergaben, dass sowohl NECA als auch Cisplatin einen signifikanten Einfluss auf die Zelldichte ( $p < 0,001$  bzw.  $p < 0,001$ ) hatten. Zwischen den beiden Substanzen gab es aber keine statistisch signifikante Wechselwirkung ( $p = 0,395$ ). Mithilfe des Post-Hoc-Tests wurde die Kontrollgruppe mit den Zellen, die NECA in 1  $\mu\text{M}$  und 5  $\mu\text{M}$  Konzentration verabreicht bekommen hatten, verglichen:  $p = 0,993$  und  $p < 0,001$ . NECA in einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  beeinflusste das Verhalten der Tumorzellen gegenüber dem Chemotherapeutikum nicht, sie verhielten sich ähnlich den Kontrollzellen (s. Abbildung 9). Die Anzahl an adhärenter Zellen war signifikant höher bei einer NECA-Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  als bei 0  $\mu\text{M}$  (Kontrollzellen). Während z.B. bei einer Cisplatin-Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  bei den Kontrollzellen und den mit 1  $\mu\text{M}$  NECA behandelten Zellen die Zelldichte bei ca. 47% lag, überlebten

mehr Zellen nach vorangegangener Stimulation mit 5  $\mu$ M NECA (Zelldichte 64%) (s. Abbildung 9).

### **Abbildung 10**

**Effekt von NECA und Doxorubicin auf die Zellproliferation von OAW-42 geprüft durch die Kristallviolett-Färbung vitaler, adhärenter Zellen**



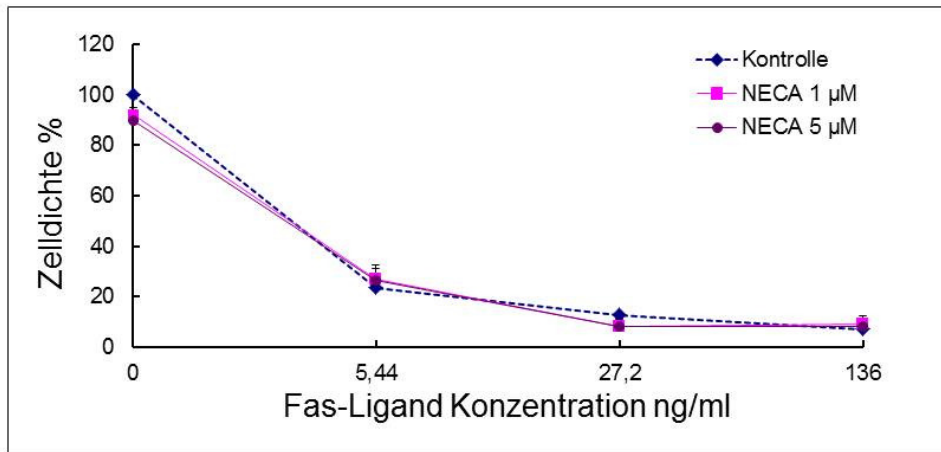
OAW-42 Zellen wurden nach Eliminierung des endogenen Adenosins durch die ADA 24 Stunden mit NECA inkubiert. Anschließend wurden sie mit Doxorubicin behandelt, welches den Zelltod einleiten sollte. Jeder Messpunkt repräsentiert den Mittelwert aus mindestens 3 im Triplet durchgeführten Experimenten mit Standardabweichung.

Aus den Kurvenverläufen in Abbildung 10 geht hervor, dass die Kurvenverläufe von OAW-42 Zellen keine Unterschiede in der Vitalität in Abhängigkeit von der zugefügten NECA-Konzentration zeigen. Doxorubicin führte zu signifikanter Dezimierung der Zellzahl ( $p < 0,001$ ), es konnte jedoch für keine NECA Konzentration ein statistisch signifikanter Unterschied zu den Kontrollzellen festgestellt werden ( $p = 0,602$ ) und auch zwischen NECA und Doxorubicin fand keine signifikante Wechselwirkung ( $p = 0,590$ ) statt.



### Abbildung 11

**Effekt von NECA und Fas-Ligand auf die Zellproliferation von OAW-42 geprüft durch die Kristallviolett-Färbung vitaler, adhärenter Zellen**

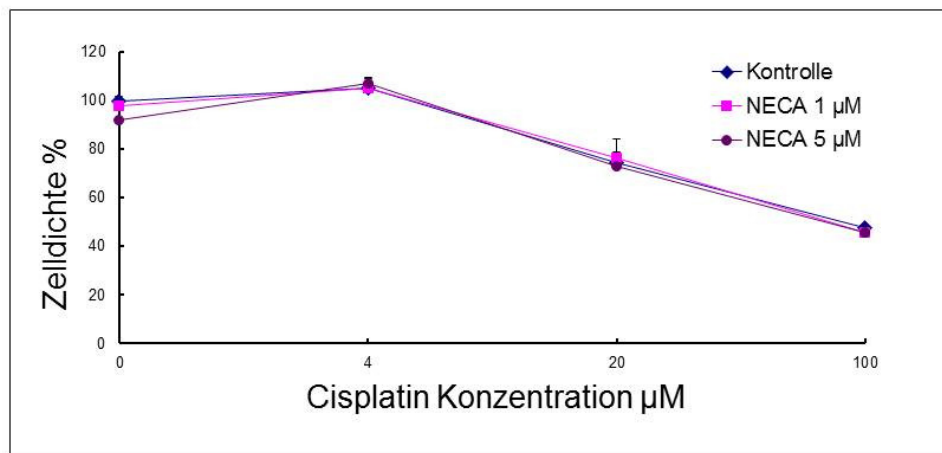


OAW-42 Zellen wurden nach Eliminierung von endogenem Adenosin durch die ADA 24 Stunden mit NECA inkubiert. Anschließend wurde dem Nährmedium Fas-Ligand zugeführt und die Apoptose dadurch eingeleitet. Jeder Messpunkt repräsentiert den Mittelwert aus mindestens 3 im Triplet durchgeführten Experimenten mit Standardabweichung. Die Stammlösung des Fas-Liganden hatte eine Konzentration von 0,68 µg/µl.

Abbildung 11 zeigt, dass eine vorangegangene Stimulation der Zellen mit NECA die Wirkung des Fas-Liganden nicht beeinflusste. Fas-Ligand wirkte bereits ab einer Konzentration von 5,44 ng/ml so stark, dass nach 24 Stunden nur noch ca. 26% der ursprünglich adhärenter Zellen nachweisbar waren ( $p < 0,001$ ). Die Kontrollzellen, sowie die mit NECA in 1 µM und 5 µM Konzentration stimulierten Tumorzellen reagierten ähnlich auf den Apoptose-induzierenden Liganden. NECA hatte keinen statistisch signifikanten Einfluss auf die Zellen ( $p = 0,506$ ) und auch eine Wechselwirkung zwischen NECA und dem Fas-Liganden konnte nicht beobachtet werden ( $p = 0,442$ ).

## Abbildung 12

### Effekt von NECA und Cisplatin auf die Zellproliferation von SK-OV-3 geprüft durch die Kristallviolett-Färbung vitaler, adhärenter Zellen

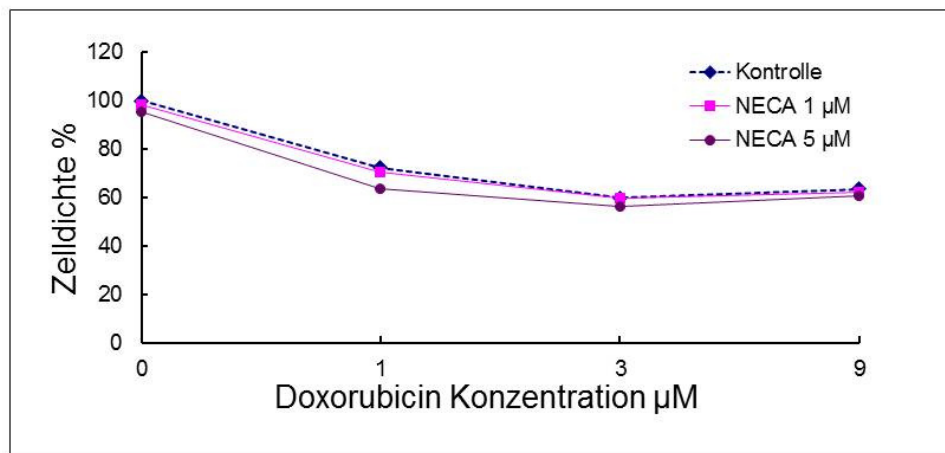


SK-OV-3 Zellen wurden nach Eliminierung des endogenen Adenosins durch die ADA 24 Stunden mit NECA 1 µM und 5 µM inkubiert. Anschließend wurde Cisplatin in unterschiedlicher Konzentration dem Nährmedium zugeführt. Jeder Messpunkt repräsentiert den Mittelwert aus 3 mal im Triplet durchgeführten Experimenten mit Standardabweichung.

Eine Stimulation der auf den SK-OV-3 Zellen nachgewiesenen  $A_{2B}$ -Rezeptoren durch den nicht selektiven Agonisten NECA beeinflusste die statistisch signifikante antiproliferative Wirkung des Chemotherapeutikums Cisplatin ( $p < 0,001$ ) nicht. Eine Konzentration von 4 µM Cisplatin reichte nicht aus, um die Tumorzellen zu dezimieren. Alle Zellen verhielten sich gegenüber Cisplatin gleich, ein verändertes Ansprechen durch Stimulation der Adenosin-Rezeptoren konnte nicht festgestellt werden. Weder NECA ( $p = 0,566$ ) noch NECA in Kombination mit Cisplatin hatte signifikante Auswirkungen auf die SK-OV-3 Zellen ( $p = 0,874$ ).

### **Abbildung 13**

**Effekt von NECA und Doxorubicin auf die Zellproliferation von SK-OV-3 geprüft durch die Kristallviolett-Färbung vitaler, adhärenter Zellen**

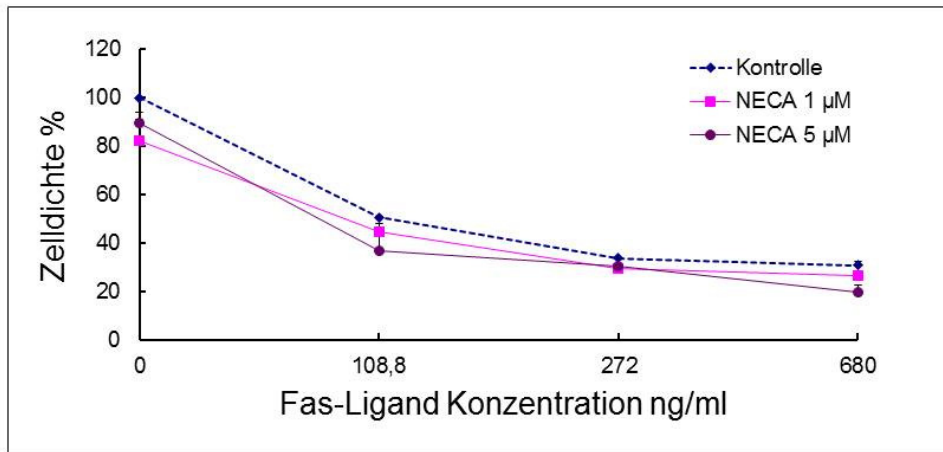


SK-OV-3 Zellen wurden nach Eliminierung des endogenen Adenosins durch die ADA 24 Stunden mit NECA stimuliert. Anschließend wurden sie mit Doxorubicin behandelt, welches den Zelltod einleiten sollte. Jeder Messpunkt repräsentiert den Mittelwert aus mindestens 3 im Triplet durchgeführten Experimenten mit Standardabweichung.

NECA hatte einen signifikanten Einfluss auf die SK-OV-3 Zellen ( $p=0,024$ ), es konnte aber zwischen NECA und Doxorubicin keine signifikante Wechselwirkung detektiert werden ( $p=0,814$ ). Mit dem Dunnet-Test wurde die Kontrollgruppe mit den Zellen, die mit 1  $\mu\text{M}$  und 5  $\mu\text{M}$  NECA stimuliert worden waren, verglichen. Letztere wiesen nach 24 Stunden eine statistisch signifikant geringere Anzahl auf als die Zellen der Kontrollgruppe ( $p=0,017$ ), wohingegen erstere sich nicht von ihnen unterschieden ( $p=0,680$ ), siehe Abbildung 13.

#### Abbildung 14

Effekt von NECA und Fas-Ligand auf die Zellproliferation von SK-OV-3 geprüft durch die Kristallviolett-Färbung vitaler, adhärenter Zellen



SK-OV-3 Zellen wurde nach Eliminierung von endogenem Adenosin durch die ADA 24 Stunden mit NECA inkubiert. Anschließend wurde dem Nährmedium Fas-Ligand zugeführt und die Apoptose dadurch eingeleitet. Jeder Messpunkt repräsentiert den Mittelwert aus mindestens 3 im Triplet durchgeführten Experimenten mit Standardabweichung. Die Stammlösung des Fas-Liganden hatte eine Konzentration von 0,68 µg/µl.

Abbildung 14 ist zu entnehmen, dass SK-OV-3 Zellen, die mit 1 bzw. 5 µM NECA stimuliert worden waren gegenüber der Kontrollzellgruppe etwas niedrigere Werte aufwiesen. NECA hatte hier statistisch signifikanten Einfluss auf die Zelldichte ( $p=0,016$ ), es konnte aber keine statistisch signifikante Wechselwirkung zwischen NECA und Fas-Ligand festgestellt werden ( $p=0,505$ ). Der nachfolgend durchgeführte Dunnett Test ergab im Vergleich von NECA in 1 µM Konzentration zur Kontrollzellgruppe  $p=0,038$  bzw.  $p=0,013$  für NECA in 5 µM Konzentration. In beiden Fällen führte somit die NECA-Stimulation zu etwas stärkerer Dezimierung der Zellzahl.

### **3.3. Untersuchungen zur Expression von CD39 und CD73 auf SK-OV-3 und OAW-42 Zellen vor und nach Stimulation mit NECA mithilfe der FACS-Methode**

#### **3.3.1 CD Antigene**

CD (Cluster of differentiation) 39 ist eine Ekto-Nukleosidtriphosphatdiphosphohydrolase, die ATP zu AMP hydrolysiert, CD73 eine Ekto-5'-Nukleotidase, die AMP zu Adenosin abbaut. Beide sind damit Substratlieferanten des Adenosin-Signalwegs (Zimmermann, 1992).

Da bereits bekannt ist, dass aus ATP über CD39 und CD73 generiertes Adenosin zu einem potenten immunsuppressiven Signal führt (Deaglio et al., 2007; Stagg et al., 2010) und aus bislang unveröffentlichten Daten hervorgeht, dass die CD39 und CD73 Expression nach vorangegangener Stimulation mit Adenosin zurückgeht, untersuchten wir speziell an OAW-42 und SK-OV-3 Zellen, ob sich die Expression der Adenosin-generierenden Enzyme durch Stimulation mit dem nichtselektiven Agonisten NECA beeinflussen ließe.

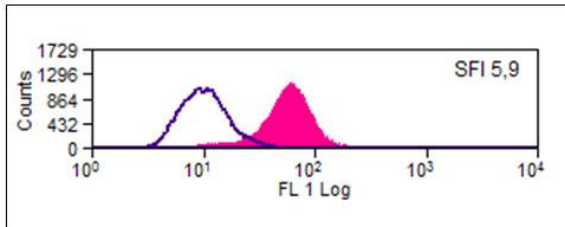
In einer homogenen Zellpopulation kann die Klassifizierung über die Analyse der Expression bestimmter Oberflächenantigene, den CD-Antigenen erfolgen. Der „specific fluorescence index“ bzw. SFI diene uns zur Beurteilung der Expression von CD39 bzw. CD73. Er bildet sich aus dem Verhältnis zwischen der medianen Fluoreszenz der spezifischen Antikörper (CD39-FITC und CD73-PE) relativ zu den analog markierten Isoantikörpern und ermöglicht so eine Aussage über die relative Anzahl von CD39 und CD73 auf der Zelloberfläche von OAW-42 bzw. SK-OV-3 Zellen.

Es wurden alle Zelllinien für 24 Stunden mit ADA und NECA vorbehandelt und anschließend die Expression von CD39 und CD73 mit den nur mit ADA behandelten Zellen verglichen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 15 bis 18 dargestellt.

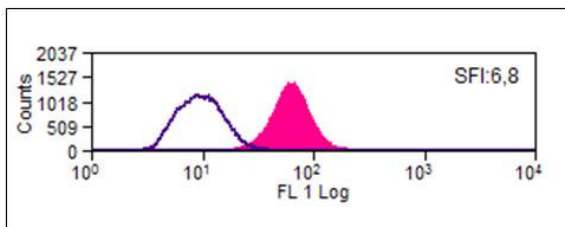
### Abbildung 15

#### Effekt von NECA auf die Expression von CD39 auf OAW-42 Zellen

OAW-42 Kontrollzellgruppe



OAW-42 + 25  $\mu$ M NECA



Die Kontrollzellen wurden 24 Stunden mit ADA behandelt um endogenes Adenosin zu eliminieren, der 2. Zellgruppe wurde zusätzlich 25  $\mu$ M NECA zum Nährmedium hinzu pipettiert.

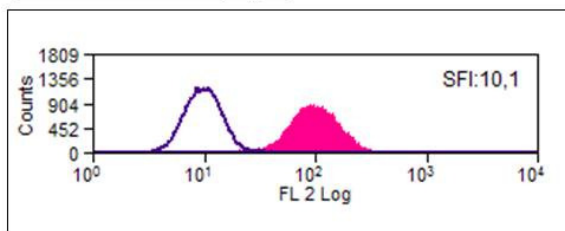
Auf der y-Achse ist die Anzahl der detektierten Zellen aufgetragen, auf der x-Achse die Fluoreszenzintensität.

Links (violette Kurve): Fluoreszenzspektrum des Isotypen, rechts (rote Fläche): Fluoreszenzspektrum der CD39-Färbung.

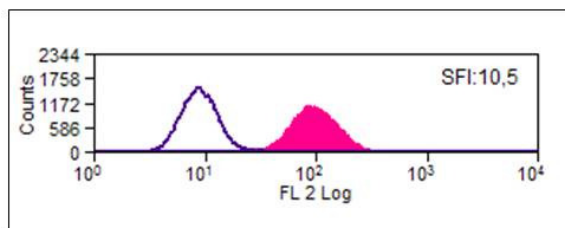
### Abbildung 16

#### Effekt von NECA auf die Expression von CD73 auf OAW-42 Zellen

OAW-42 Kontrollzellgruppe



OAW-42 + 25  $\mu$ M NECA



Die Kontrollzellen wurden 24 Stunden mit ADA behandelt um endogenes Adenosin zu eliminieren, der 2. Zellgruppe wurde zusätzlich 25  $\mu$ M NECA zum Nährmedium hinzu pipettiert.

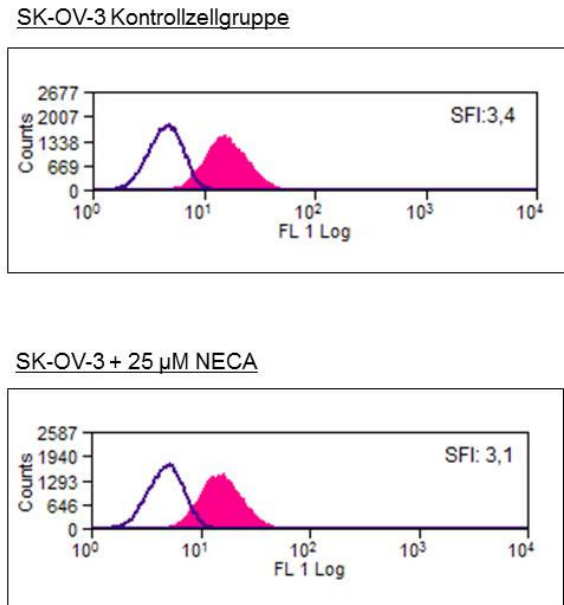
Auf der y-Achse ist die Anzahl der detektierten Zellen aufgetragen, auf der x-Achse die Fluoreszenzintensität.

Links (violette Kurve): Fluoreszenzspektrum des Isotypen, rechts (rote Fläche): Fluoreszenzspektrum der CD73-Färbung.



### Abbildung 17

#### Effekt von NECA auf die Expression von CD39 auf SK-OV-3 Zellen



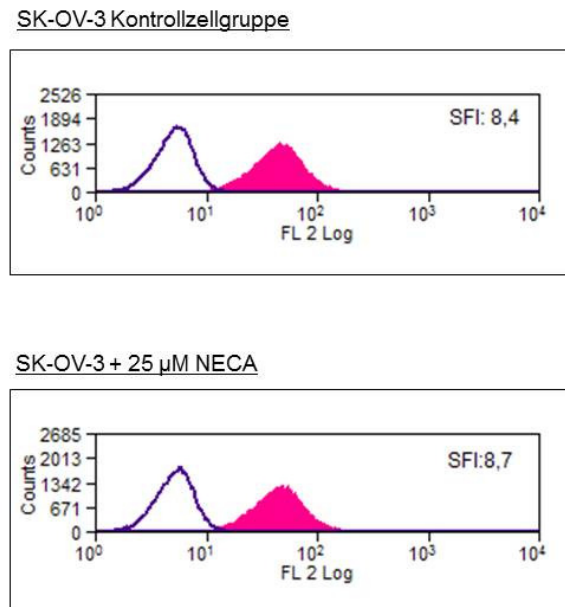
Die Kontrollzellen wurden 24 Stunden mit ADA behandelt um endogenes Adenosin zu eliminieren, der 2. Zellgruppe wurde zusätzlich 25  $\mu$ M NECA zum Nährmedium hinzu pipettiert.

Auf der y-Achse ist die Anzahl der detektierten Zellen aufgetragen, auf der x-Achse die Fluoreszenzintensität.

Links (violette Kurve): Fluoreszenzspektrum des Isotypen, rechts (rote Fläche): Fluoreszenzspektrum der CD39-Färbung.

### Abbildung 18

#### Effekt von NECA auf die Expression von CD73 auf SK-OV-3 Zellen



Die Kontrollzellen wurden 24 Stunden mit ADA behandelt um endogenes Adenosin zu eliminieren, der 2. Zellgruppe wurde zusätzlich 25  $\mu$ M NECA zum Nährmedium hinzu pipettiert.

Auf der y-Achse ist die Anzahl der detektierten Zellen aufgetragen, auf der x-Achse die Fluoreszenzintensität.

Links (violette Kurve): Fluoreszenzspektrum des Isotypen, rechts (rote Fläche): Fluoreszenzspektrum der CD73-Färbung.

Für beide Zelllinien änderte sich der SFI für CD39 nur gering. Abbildung 15 zeigt dies für OAW-42 Zellen: Der SFI der Kontrollzellen betrug 5,9 und stieg bei den mit 25  $\mu$ M NECA stimulierten Zellen auf 6,8. Die Oberflächenexpression von CD39 wurde nur geringfügig induziert. In Abbildung 17 ist dies für SK-OV-3 Zellen dargestellt: Der SFI änderte sich hier von 3,4 auf 3,1. Die NECA-Stimulation hatte keinen erkennbaren Einfluss auf die Expression von CD39.

Die CD73-Expression vor und nach NECA-Stimulation ist für OAW-42 und SK-OV-3 Zellen in Abbildung 16 (SFI 10,1 bzw. 10,5) und Abbildung 18 (Der SFI stieg von 8,4 auf 8,7) dargestellt. In beiden Fällen war aber keine deutliche Veränderung nachweisbar.



## **4 Diskussion**

### **4.1 Adenosinrezeptoren im Tumorgeschehen**

In vielen Studien wurde bereits nachgewiesen, dass Adenosin und Adenosinrezeptoren in Krankheiten eine Rolle spielen, u.a. bei kardiovaskulären Erkrankungen (Auchampach und Bolli, 1999; Ganote und Armstrong, 2000; Kitakaze und Hori, 2000), Asthma (Feoktistov et al., 1998; Spicuzza et al., 2003) und Erkrankungen des zentralen Nervensystems (Ongini und Fredholm, 1996). Weiterhin gibt es Hinweise darauf, dass Adenosin auf unterschiedlichste Weise an der Regulation des Tumorwachstums beteiligt ist (Madi et al., 2003; 2004; Lu et al., 2003; Merighi et al., 2003; Panjehpour und Karami-Therani, 2004).

Man fand heraus, dass Adenosin, welches in hypoxischen Tumorarealen erhebliche Konzentrationen erreichen kann, mit den Immunzellen des Körpers interagiert und diese daran hindert, die Tumorzellen zu bekämpfen (Blay et al., 1997; Merighi et al., 2003). Speziell konnten Hoskin et al. dies für die Hemmung der T-Killer-Zellen-Aktivierung durch Adenosin nachweisen (Hoskin et al., 1994). Für die Rolle von Adenosinrezeptoren in Mammakarzinomzellen existieren bereits viele Studien.  $A_1$ -Rezeptoren scheinen in dieser Tumorart zum Zellwachstum und -überleben beizutragen (Mirza et al., 2005). Wir untersuchten, ob Adenosinrezeptoren auch auf Ovarialkarzinomzellen exprimiert werden und sofern zutreffend, welche Subtypen vertreten sind und ob diese Effekte vermitteln, die sich im Hinblick auf die therapeutischen Probleme des soliden Tumors, im besten Falle nutzen ließen. Zudem prüften wir, ob sich durch Stimulation der Rezeptoren das Proliferationsverhalten oder das Ansprechen auf ein Chemotherapeutikum (Cisplatin, Doxorubicin) bzw. einen Todesliganden ändern würde.

### **4.2 Pharmakologische Charakterisierung**

In Bindungsstudien zeigten SK-OV-3-Zellen lediglich  $A_{2A}$ -Rezeptoren in nur geringem Ausmaße an. In funktionellen Versuchen wurden sowohl NECA als

auch CGS 21680 als Agonisten zur Stimulation der Adenylylcyclase eingesetzt. Für die Zelllinie SK-OV-3 erhielten wir eine funktionelle Antwort auf den nichtselektiven Adenosinrezeptor-Agonist NECA in Form einer Zunahme von cAMP. Dies konnte für CGS 21680 nicht beobachtet werden und bestätigte die Präsenz von A<sub>2B</sub>-Rezeptoren.

Auf den OAW-42 Zellen konnten wir in den Bindungsversuchen A<sub>2A</sub>- und A<sub>1</sub>-Rezeptoren nachweisen. Die Zellen zeigten aber keine cAMP-Antwort auf die Stimulation durch NECA. Es lag die Überlegung nahe, dass ein eventuell vorhandener A<sub>2A</sub>-vermittelter Effekt durch den ebenfalls vorhandenen A<sub>1</sub>-Rezeptor-Subtyp verdeckt, bzw. abgeschwächt sein könnte, weshalb wir diesen mit dem A<sub>1</sub>-selektiven Antagonisten DPCPX hemmten und gleichzeitig den A<sub>2A</sub>-Rezeptor mit CGS 21680 stimulierten. Wir konnten aber keine Zunahme des cAMP-Levels beobachten. Sowohl mit NECA als auch mit CGS 21680 bei blockiertem A<sub>1</sub>-Rezeptor stieg die gemessene Cyclaseaktivität nur geringfügig über die basalen Werte an. Laut unseren Bindungsstudien sind auf OAW-42 Zellen A<sub>2A</sub>-Rezeptoren in deutlichen Mengen und wenige A<sub>1</sub>-Rezeptoren vertreten. Für beide konnten wir jedoch keine funktionelle cAMP-Antwort nachweisen. Ob eventuell andere Signalwege aktiviert werden, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht.

Auf beiden Zelllinien sind die gemessenen Werte an Rezeptorprotein quantitativ nur gering. Dies muss nicht zwangsweise zur Schlussfolgerung führen, dass ihnen daher auch nur eine geringe Bedeutung zufällt, da durch Signaltransduktion wie bereits beschrieben auch eine Verstärkung eines extrazellulären Signals möglich ist. Ein Beispiel für funktionell äußerst wichtige Rezeptoren mit geringer Expression sind die  $\beta_1$ -adrenergen Rezeptoren am Herzen (Brodde, 1993). Diese werden ebenfalls durch ein G<sub>s</sub>-Protein aktiviert und führen hier zu gesteigerter Kontraktionskraft (positiv inotrope Wirkung) und Frequenz (positiv chronotrope Wirkung). Betablocker, die zu den am häufigsten verschriebenen Medikamenten überhaupt zählen, blockieren die  $\beta_1$ -Rezeptoren

wodurch infolge Herzfrequenz und Kontraktionsgeschwindigkeit und somit auch der Sauerstoffbedarf des Myokards sinkt.

## **4.3 Wirkung der NECA-Stimulation auf die Zellproliferation**

### **4.3.1 Adenosin als Ligand**

Adenosin setzten wir in den Proliferationsstudien zunächst als Liganden ein. Während SK-OV-3 Zellen keine Veränderung zeigten, steigerten OAW-42 Zellen bei steigenden Adenosin-Konzentrationen den BrdU-Einbau leicht. Da dies aber so dezent ausfiel, werteten wir dies nicht als Effekt. Dies lässt sich erklären, da Adenosin als Metabolit in verschiedene Stoffwechselwege eintreten kann (Spsychala, 2000). Es wird u.a. durch die Adenosinkinase (AK) zu AMP phosphoryliert (Spsychala et al., 1996) bzw. zu Inosin desaminiert (ADA) (Hershfield, 1998) und ist dann nicht mehr als Adenosin verfügbar, um an die spezifischen Rezeptoren zu binden. Andererseits liegt Adenosin, das aus intrazellulärem ATP entsteht, in isolierten Zellen und Membranen meist in hoher Konzentration vor und muss durch Zugabe von Adenosindesaminase eliminiert werden (Klotz, 2000). Es ist daher für Untersuchungen an Adenosinrezeptoren nicht sinnvoll zu nutzen. Dennoch bildet es den strukturellen Kern aller bislang entwickelten Agonisten, die jedoch metabolisch stabil sind und nicht durch Adenosintransporter in Zellen aufgenommen werden.

### **4.3.2 NECA und CGS 21680 als Liganden**

NECA, 5'-N-Ethylcarboxamidoadenosine, ist ein nichtselektiver Agonist. Er bindet mit hoher Affinität an alle Adenosinrezeptorsubtypen. Die Affinität für den A<sub>2B</sub>-Subtyp ist zwar deutlich geringer als für die anderen Rezeptor-Subtypen, aber verglichen mit anderen derzeit verfügbaren Verbindungen hat NECA weiterhin mit die größte Potenz für ihn (Klotz et al., 1998; Klotz, 2000). Aufgrund der beschriebenen Eigenschaften eignet sich NECA sehr gut, um sich zu Beginn einer Versuchsreihe einen Überblick über eventuelle Adenosinrezeptor-vermittelte Effekte zu verschaffen. Da weder auf OAW-42 noch SK-OV-3 Zellen ein spezieller Adenosinrezeptorsubtyp in entscheidender Konzentration (s. Abb.

3-6) nachgewiesen werden konnte, nutzten wir für die folgenden Studien zum Proliferationsverhalten weiterhin NECA um möglichst alle Rezeptorsubtypen zu stimulieren. CGS 21680, 2-[*p*-(2-carboxyethyl)phenethylamino]adenosine-5'-*N*-ethyluronamide wurde als A<sub>2A</sub>-selektiver Ligand entwickelt. Eine gewisse A<sub>2A</sub>-Selektivität ist aber nur bei Rattenrezeptoren zu beobachten, nicht jedoch bei den humanen Adenosinrezeptorsubtypen. Die Verbindung gilt dennoch als Ligand der Wahl um zwischen dem A<sub>2A</sub>- und A<sub>2B</sub>-Subtyp zu differenzieren (Klotz, 2000).

#### **4.3.3 BrdU-Studien**

Ab einer NECA-Konzentration von 10 µM sank der Einbau an BrdU in unseren Experimenten und damit äquivalent die Proliferationsrate sowohl bei SK-OV-3 als auch bei OAW-42 Zellen. Dies war jedoch bei beiden Zelllinien in einem ähnlichen Verhältnis zu beobachten (Abbildung 8). Bis zu einer Konzentration von 1 µM NECA blieb die Zelldichte bei SK-OV-3 Zellen nahezu unverändert, während sie bei OAW-42 Zellen zunächst leicht anstieg. Bei der höchsten Konzentration von NECA (10 µM) sank bei beiden Zelllinien die Zelldichte deutlicher ab. Es ist fraglich, ob dies einen Rezeptor-vermittelten Effekt darstellt, da er in Zelllinien mit verschiedenen Subtypen und unterschiedlichem Expressionslevel gleichermaßen auftrat. Wenn man beachtet, in welchen physiologischen Konzentrationen Adenosin als endogener Metabolit im menschlichen Körper vertreten ist (20-300 nM) (Schulte, 2004; Fredholm, 2010), so liegt hier doch der Verdacht nahe, dass NECA in dieser doch sehr hohen Konzentration für die Zellen toxisch ist und daher die Zelldichte sinkt. So ließe sich erklären, wieso die Kurven sich so ähnlich verhalten. Dass Adenosin in mikromolarer Konzentration jedoch eine Inhibition der Proliferation von Tumorzellen hervorrief, wurde auch von anderen Autoren beobachtet. z.B. in Prostatakarzinom- und Lymphomzellen. Normale Zellen, wie z.B. Knochenmarkzellen wurden hingegen in ihrer Proliferation stimuliert (Fishman et al., 1998; 2000).

Adenosin in einer mikromolaren Konzentration einzusetzen, obwohl

physiologische Konzentrationen im nanomolaren Bereich liegen, erschien uns dennoch sinnvoll, da unter extremen Bedingungen, wie z.B. bei starker Ischämie, wenn infolge von großflächigen Gewebetraumata nekrosebedingt zahlreiche Zellen absterben, oder im hypoxischen Milieu von soliden Tumoren aufgrund des hohen Energieverbrauchs und damit Adeninnukleotidabbaus, Adenosin unter Umständen auch sehr hohe Konzentrationen bis ca. 30  $\mu\text{M}$  erreichen kann (Andiné et al, 1990; Fredholm, 2010).

In humanen A375 Melanomzellen und humanen Astrozytomzellen wurde beschrieben, dass Adenosin in mikromolaren Konzentrationen zur Apoptose der Zellen führte. Es wurde vermutet, dass die Apoptose durch intrazelluläre Wirkungen von Adenosin ausgelöst und weniger über Oberflächenrezeptoren vermittelt wird (Abbracchio et al., 2001; Merighi et al., 2002).

Es wurde in diesem Zusammenhang ebenfalls diskutiert, ob eine sehr hohe Adenosin-Konzentration zu einer gesteigerten Aufnahme von Adenosin in die Zelle führt und es durch Phosphorylierung zu einer intrazellulären Anhäufung von AMP kommt, was möglicherweise zu einer Caspasen-Aktivierung führt (Schrier et al., 2001). Dies wäre ebenfalls bei unseren Zellen denkbar.

Die Wirkung von Adenosin auf die Zellproliferation war bereits häufig der Gegenstand von Untersuchungen, wobei andere Autoren herausfanden, dass Adenosin in einer Konzentration von 4  $\mu\text{M}$  die Proliferation von gewissen Tumorzelllinien, hier Nb2-Lymphomzellen (Fishman et al., 1998), hemmte. Hier entfaltete Adenosin seine antiproliferative Wirkung aber hauptsächlich über den  $A_3$ -Rezeptor, was diesen Rezeptorsubtyp als potenzielles Ziel in der Entwicklung von Krebschemotherapeutika interessant macht (Fishman et al., 2002).  $A_3$ -Rezeptoren konnten wir auf keiner der getesteten Ovarialkarzinomzelllinien in nennenswerter Menge nachweisen.

Zwar ließen sich auf SK-OV-3 und OAW-42 Zellen Rezeptorsubtypen nachweisen und für den auf SK-OV-3 Zellen nachgewiesenen  $A_{2B}$ -Rezeptor auch eine funktionelle Kopplung belegen, jedoch konnte kein Effekt der

Stimulation der vorhandenen Rezeptor-Subtypen mit NECA auf das Zellproliferationsverhalten detektiert werden.

#### **4.4 Wirkung der NECA-Stimulation auf die Chemosensitivität von SK-OV-3 und OAW-42 bzw. die Apoptose-Induktion durch Fas-Ligand**

Ein weiterer Aspekt unserer Forschung war, ob sich das Verhalten der Tumorzellen gegenüber einem Chemotherapeutikum (Cisplatin, Doxorubicin) oder dem Apoptose-induzierenden Fas-Liganden nach einer Stimulation der Rezeptoren mit NECA verändern würde.

##### **4.4.1 Cisplatin**

Cisplatin ist ein vielfach eingesetztes Zytostatikum. Die chemische Struktur enthält ein komplexgebundenes Platinatom. Es führt zu Querverbindungen zwischen den beiden DNA-Strängen, so dass die DNA-Replikation gehemmt wird. Der Zellstoffwechsel kommt zum Erliegen, woraufhin die Zelle die Apoptose einleitet. Ähnlich wie auch andere Zytostatika entfaltet Cisplatin seine Wirkung nicht nur auf pathologische, schnell proliferierende Zellen, sondern in geringerem Ausmaß auch auf physiologische Körperzellen (Voigt et al., 2006).

##### **4.4.2 Doxorubicin**

Doxorubicin ist das Hydroxylderivat des Anthracyclins Daunorubicin. Es wird als stereochemisch reiner Arzneistoff als Chemotherapeutikum (Zytostatikum) eingesetzt. Es gehört zur Wirkstoffgruppe der Interkalantien.

Doxorubicin wirkt, indem es die DNA- und RNA-Synthese stört und so den Zelltod evoziert. Dies geschieht durch zwei Hauptmechanismen: zum einen durch die Interkalation, was bedeutet, dass Doxorubicin sich zwischen zwei benachbarte Nukleotidpaare in der DNA schiebt und dadurch die Transkription blockiert, und zum anderen durch die Inhibition der Topoisomerase II, einem Schlüsselenzym der DNA-Synthese. Am empfindlichsten reagieren Zellen in

der S-Phase des Zellzyklus, daher sind schnell proliferierende Tumorzellen stärker von der toxischen Wirkung betroffen als gesunde Körperzellen.

#### **4.4.3 Fas-Ligand**

Apoptose ist der griechische Begriff für den herbstlichen Laubabwurf der Bäume und beschreibt den gezielten Zelluntergang, bzw. programmierten Zelltod (Kerr et al., 1972). Bei der Regulation biologischen Wachstums und der Selektion von Zellen des Immunsystems nimmt die Apoptose eine unverzichtbare Rolle ein. Grundsätzlich unterscheidet man zwischen intrinsischen und extrinsischen Apoptosestimuli. Während bei der intrinsischen Einleitung der Apoptose den Mitochondrien eine Schlüsselrolle zukommt, beruhen extrinsische Apoptosesignale auf der Bindung eines Todesliganden aus der Tumornekrose-(TNF-)Superfamilie an einen entsprechenden Rezeptor. Das bekannteste Beispiel ist hier die Interaktion zwischen dem Fas-Liganden (CD95L, Apo-1L) und dem Fas-Rezeptor (CD95, Apo-1).

Nach Bindung des Fas-Liganden an die Zielzelle kommt es zur intrazellulären Aktivierung mehrerer Caspasen, wobei am Ende die aktivierte Caspase 3 den an die Caspase-aktivierbare DNase (I-CAD) gebundenen Inhibitor spaltet. Die nun aktivierte CAD dringt in den Zellkern ein, wo sie die DNA in Apoptosecharakteristische Fragmente von etwa 200 Basenpaaren spaltet. Spätestens jetzt ist die Zelle nicht mehr funktionsfähig.

#### **4.4.4. A<sub>2A</sub>-Rezeptoren auf OAW-42 Zellen**

Die Zellen der Linie OAW-42 zeigten gegenüber Doxorubicin und Fas-Ligand keinen Unterschied zwischen unbehandeltem und NECA-stimuliertem Zustand. Die Stimulation mit NECA schien die Reaktion der Zellen auf die genannten Stoffe nicht zu beeinflussen.

Bei einer NECA-Konzentration von 5  $\mu$ M reagierten die Tumorzellen dem Cisplatin gegenüber aber resistenter als die mit 1  $\mu$ M NECA und ADA-behandelten Kontrollzellen. Dieses Verhalten lässt vermuten, dass NECA die Zellen resistenter gegenüber Cisplatin macht. Möglich wäre auch, dass dieser

Effekt tatsächlich  $A_{2A}$ -Rezeptor-vermittelt wird, da bei der Zelllinie SK-OV-3, die hauptsächlich  $A_{2B}$ -Rezeptoren exprimiert, keine Reaktion auf die NECA-Behandlung beobachtet werden konnte. Andere Autoren beschrieben gegensinnige Auswirkungen nach  $A_{2A}$ -Stimulation auf Melanomzellen, sowohl ein negativer Effekt auf die Zell-Überlebensfähigkeit als auch eine positive Auswirkung auf die Proliferation konnte nachgewiesen werden (Merighi et al., 2002).

#### **4.4.5 $A_{2B}$ -Rezeptoren auf SK-OV-3 Zellen**

Für die Zelllinie SK-OV-3 konnten wir  $A_{2B}$ -Rezeptoren als dominant vertretene Subtypen nachweisen (s. Abbildung 4 und 5).  $A_{2A}$ -Rezeptor-Aktivität konnte durch den Einsatz von CGS 21680 ausgeschlossen werden, da wie unter 4.3.2 erläutert, diese Verbindung zwar auch Affinität für andere Subtypen aufweist, aber nicht an  $A_{2B}$ -Rezeptoren bindet und daher zur Unterscheidung von  $A_{2A}$ - und  $A_{2B}$ -Rezeptor gut geeignet ist.

Zellen, die mit NECA und Cisplatin behandelt wurden, verhielten sich nicht anders als die Kontrollzellen. In den Versuchen mit Doxorubicin und Fas-Ligand zeigten SK-OV-3 Zellen dezent reduzierte Zahlen an adhärennten Zellen nach 24-stündiger NECA-Stimulation. Die Unterschiede waren aber so dezent, dass es hier wohl eher nicht als  $A_{2B}$ -Rezeptor-vermittelter Effekt gedeutet werden kann.

#### **4.4.6 $A_{2A}$ - und $A_{2B}$ -Rezeptoren auf der Oberfläche von Immunzellen**

Es ist bekannt, dass Adenosin immunsuppressive Effekte auslöst (Gessi et al., 2000; Linden, 2001) und damit zum „tumor immune escape“ beiträgt.

Hypoxiebedingt freigesetztes Adenosin scheint T-Zellen in großen, soliden Tumoren  $A_{2A}$ -Rezeptor-vermittelt daran zu hindern die malignen Zellen zu bekämpfen (Koshiba et al., 1997). Auch andere Autoren beschrieben, dass Adenosin über den  $A_{2A}$ -Rezeptor die Funktion von T-Zellen hemmt (Ohta et al., 2006; Stella et al., 2010) und vermuten hier großes Potenzial für die Immuntherapie ('*targeted therapy*'). Im Speziellen beobachteten Ohta et al.,



dass extrazelluläres Adenosin, das in Tumorgewebe akkumuliert, die malignen Zellen durch  $A_{2A}$ -Rezeptor-vermittelte Inhibition von T-Lymphozyten, vor der Immunabwehr des Körper schützt. So erklärt man sich auch die bei manchen Patienten beobachtete, paradoxe Koexistenz von Tumor und Anti-Tumor T-Zellen, dem so genannten „Hellstrom Paradoxon“ (Hellstrom et al., 1968). Durch Antagonisierung der  $A_{2A}$ -Rezeptoren konnte das Tumorwachstum gezügelt, Metastasen zerstört und die Neovaskularisation verhindert werden (Ohta et al., 2006). Den  $A_{2A}$ -Rezeptor auf T-Zellen zu inhibieren, könnte also ein interessanter Ansatzpunkt sein, um den „Tumor-immune-escape“ zu unterbinden. Momentan scheint also der  $A_{2A}$ -Rezeptorsubtyp auf Zellen des Immunsystems im Kampf gegen Tumorgewebe ein vielversprechender Angriffspunkt zu sein, die Funktion des  $A_{2B}$ -Rezeptors auf T-Zellen ist bislang nicht vollständig verstanden (Lukashev et al., 2007).

#### **4.5 Adenosinrezeptor-Stimulation in Verbindung mit der Expression von CD39 und CD73**

CD73 ist bereits auf Zellen vieler Tumortypen nachgewiesen worden, u.a. Blasenkrebs (Stella et al., 2010), Prostatakrebs (Hastie et al., 2005), Brustkrebs (Spychala et al., 2004; Stagg et al., 2010) und auch Eierstockkrebs (Cho et al., 2006). Es wurde beschrieben, dass CD73, welches die Dephosphorylierung von Adenosinmonophosphaten zu Adenosin katalysiert, auf Mamma- und Ovarialkarzinomzellen überexprimiert wird und damit einen Tumor-assoziierten Prozess darstellt, um der Immunabwehr des Körpers zu entfliehen und in andere Gebiete zu metastasieren (Stagg et al., 2010; Jin et al., 2010; Häusler et al., 2011). Andere Autoren konnten beobachten, dass CD73-abhängig gebildetes Adenosin die Zellmigration in vitro, bzw. -invasion in vivo des Mammakarzinoms steigerte (Wang et al., 2008).

CD39, ein integrales Membranprotein mit Nukleosidtriphosphat-Diphosphohydrolase-Aktivität, katalysiert den Abbau von ATP direkt zu AMP ohne Freisetzung von ADP. Auf einigen Krebszellarten, wie z.B. Pankreaskrebszellen

(Künzli et al., 2007), auf humanen Melanomzellen (Dzhandzhugazyan et al., 1998) und auf Zellen des kleinzelligen Lungenkarzinoms (Shi et al., 1994) wird CD39 offenbar überexprimiert. Es stellt wie auch CD73 einen potenziellen Angriffspunkt für eine gezielte Therapie dar.

Deaglio et al. (2007) fanden heraus, dass die Adenosin-Generierung, katalysiert durch die beiden Enzyme CD39 und CD73, zu einem immunsuppressiven Effekt führt. Andere Studien an Mammakarzinomzellen zeigten, dass die CD73-Expression invers mit der Östrogenrezeptor-Expression korrelierte. Die Autoren nahmen an, dass CD73 als Marker für aggressivere Östrogenrezeptor-negative Mammakarzinome dienen könnte. An Zellen, die durch eine hohe CD73 Expression auch viel Adenosin produzieren, könnte sich durch Antagonisierung des  $A_{2B}$ -Rezeptors eine Möglichkeit darbieten, die Tumor-Progression zu kontrollieren (Spychala et al., 2004). Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Zhou et al., die sich ebenfalls mit Brustkrebszellen beschäftigten und die Vermutung aufstellten, CD73 könne das Tumorstadium fördern und als Marker für die Tumorstadium dienen (Zhou et al., 2007).

Clayton et al. beobachteten, dass von Tumorgewebe freigesetzte Vesikel, sog. Exosomen ebenfalls CD39 und CD73 auf ihrer Oberfläche exprimieren und zur Adenosin-Generierung beitragen, die wiederum zur bereits oben genannten  $A_{2A}$ -Rezeptor-vermittelten Abschwächung der T-Zell-Funktion führt (Clayton et al., 2011).

In einer noch unveröffentlichten Studie wurde an Ovarialkarzinomzellen (SK-OV-3 und OAW-42) beobachtet, dass nach einer Stimulation der Adenosinrezeptoren durch Adenosin, als eingesetzter Agonist, die Expression von CD39 und CD73 im Sinne einer negativen Rückkopplung, zurückging. Auf dieser Erkenntnis beruhend, befassten wir uns mit der Frage, ob es durch Stimulation mit dem nichtselektiven Adenosinrezeptorliganden NECA über einen Rezeptor-vermittelten Effekt zu einer Änderung der Expression dieser integralen Membranproteine kommen würde. Das NECA-Signal, selbst in einer sehr hohen Konzentration (25  $\mu$ M) führte aber in unseren Untersuchungen bei beiden Zelllinien zu keiner signifikanten quantitativen Veränderung der

Expression dieser Enzyme.

## **4.6 Adenosinrezeptoren im Tumorgeschehen**

### **4.6.1 A<sub>2B</sub>-Rezeptoren im Tumorgeschehen**

A<sub>2B</sub>-Rezeptoren sind bereits in vielen Krebsarten nachgewiesen worden (für eine Übersicht siehe Gessi et al., 2010), zudem werden sie in vielen Geweben exprimiert. Einige Autoren beschrieben A<sub>2B</sub>-Rezeptoren auf Krebszellen und konnten gleichzeitig auch ein Rezeptor-vermitteltes Kalzium-Signal nachweisen (Feoktistov et al., 1994; Mirabet et al., 1997; Panjehpour et al., 2005). Da Kalzium an vielen zellulären Prozessen beteiligt ist, wie u.a. auch an der Zelldifferenzierung und -proliferation, der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren und der Apoptose und da Adenosin in Tumorgeweben in außergewöhnlich hohen Konzentrationen vorliegt (Blay et al., 1997), die ausreichen können um die wenig sensitiven A<sub>2B</sub>-Rezeptoren zu stimulieren (Fredholm et al., 2001b), könnte der A<sub>2B</sub>-Rezeptor für Tumorwachstum und Tumorentwicklung von Bedeutung sein. Es ist auch denkbar, dass das Zellwachstum und die Zelltransformation über den Kalzium-Signalweg und nicht über den cAMP-Weg verändert wird. Daher sollten sich nachfolgende Studien an Ovarialkarzinomzellen auch damit beschäftigen, welchen Effekt nichtselektive Agonisten wie NECA auf intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Spiegel haben. Sollte sich ein Ca<sup>2+</sup>-Signal nachweisen lassen, wäre es auch interessant, wie sich eine Behandlung mit A<sub>2B</sub>-Rezeptor-Antagonisten auf die Proliferation auswirken würde.

In anderen Studien wurde nachgewiesen, dass extrazelluläres Adenosin A<sub>2B</sub>-Rezeptor-vermittelt über den cAMP-Weg zur Apoptose von glatten Muskelzellen in menschlichen Arterien führt (Peyot et al., 2000). Adenosin kann über den A<sub>2B</sub>-Rezeptor die Proliferation von Makrophagen hemmen, während A<sub>1</sub>-, A<sub>2A</sub>- und A<sub>3</sub>-spezifische Liganden nicht in der Lage dazu waren (Xaus et al., 1999).

Zudem wurde beschrieben, dass Adenosin das Wachstum von u.a. kardialen Fibroblasten und glatten Muskelzellen (lokalisiert in der Aorta und sonstigen Gefäßen) (Dubey et al., 1998; 1999; 2000; 2001) A<sub>2B</sub>-vermittelt hemmt, aber die

Proliferation von endothelialen Zellen in Ratten-Arterien  $A_{2B}$ -Rezeptor vermittelt fördert (Dubey et al., 2002). Gessi et al. vermuten, dass  $A_{2B}$ -Rezeptoren das Tumorwachstum und die Ausbreitung der Geschwulst fördern, indem die Neovaskularisation der Tumorumgebung angeregt wird (Gessi et al., 2010). Adenosin scheint also v.a. wichtig zu sein für die Entwicklung der „Infrastruktur“ des Tumors und vielleicht nicht so sehr für die Tumorzellen per se.

Andere Autoren fanden heraus, dass Adenosin die intratumorale Durchblutung verstärkte, indem es Adenosinrezeptoren auf glatten Muskelzellen aktivierte (Natori et al., 1992; Sychala, 2000) und dass es die Proliferation von Endothelzellen stimulierte (Meininger und Granger, 1990), während es gleichzeitig auch die Freisetzung von VEGF (vascular endothelial growth factor) induzierte (Pueyo et al., 1998; Grant et al., 1999). Man nimmt an, dass durch die beobachtete  $A_{2B}$ -Rezeptor-vermittelte Freisetzung von VEGF in Endothelzellen der menschlichen Retina („HRECs“) die Neovaskularisation gefördert wird. Während man sich diese Erkenntnis einerseits bei Krankheiten zunutze machen könnte, bei denen die Gefäßbildung abnorm verläuft, wie z.B. bei Diabetikern, so liegt die Überlegung nahe, im Tumorgeschehen bezüglich Metastasierung und Ausdehnung der Geschwulst durch eine Antagonisierung von  $A_{2B}$ -Rezeptoren die Neubildung von Gefäßen zu unterbinden.

#### **4.6.2 $A_{2A}$ -Rezeptoren im Tumorgeschehen**

Adenosinrezeptoren scheinen im Tumorgeschehen viele verschiedene Aufgaben zu erfüllen, der  $A_{2A}$ - und  $A_3$ -Rezeptor-Subtyp scheinen aber derzeit am vielversprechendsten, was die therapeutischen Möglichkeiten betrifft.  $A_{2A}$ -Rezeptoren sind bereits auf Tumorzellen beschrieben worden, z.B. auf A375 Melanomzellen (Merighi et al., 2001) und HT29 Kolonkarzinomzellen (Gessi et al., 2007).

Es ist beschrieben worden, dass die Aktivierung von  $A_{2A}$ -Rezeptoren zum Zelltod von humanen A375 Melanomzellen führt (Merighi et al., 2002) und Yasuda et al. (2009) beobachteten in humanen Caco-2 Kolonkarzinomzellen, dass extrazelluläres Adenosin in Zusammenhang mit  $A_{2A}$ -vermittelter Zerstörung

der Mitochondrien die Apoptose induziert, indem es Caspase-9 und -3 aktiviert. Zudem beobachteten Montesinos et al. (2002) an Mäusen, dass der Adenosinrezeptor Agonist CGS 21680 topisch appliziert über den  $A_{2A}$ -Rezeptor die Wundheilung fördert und die Angiogenese vermittelt. Verschiedene Arbeitsgruppen beschäftigten sich mit diesem Phänomen, das vor allem bei der Therapie von schlecht heilenden Wundgebieten, wie z.B. den häufig auftretenden, Krankheits-assoziierten Fuß-Ulzera von Diabetikern nützlich sein könnte. Die Gruppe um Bruce Cronstein versuchte diesen Effekt mit dem  $A_{2A}$ -Rezeptor-spezifischen Agonisten MRE0094 auszunutzen (Cronstein, 2004). Dies scheint offenbar gut zu funktionieren, andere Autoren fanden heraus, dass Wunden, die mit CGS 21680 oder Sonedoston (MRE0094) behandelt wurden, schneller heilten als jene, auf die man Becaplermin-Gel, das rekombinanten „platelet derived growth factor“ enthält, auftrug (Victor-Vega et al., 2002).

Zudem vermutet man neben der Stimulation von Matrixbildung und Angiogenese durch  $A_{2A}$ - und  $A_{2B}$ -Rezeptoren auch eine mögliche Beteiligung des  $A_1$ -Subtyps an der Ausbildung neuer Gefäße (Feoktistov et al., 2009). Da die Bildung neuer Gefäße für das Tumorwachstum und seine Metastasierung eine essentielle Voraussetzung ist, ist dies eine wichtige Erkenntnis über den  $A_{2A}$ -Rezeptor, da durch seine Antagonisierung möglicherweise eine Tumorausdehnung verhindert werden kann. Andererseits wurden  $A_{2A}$ -Rezeptoren auf glatten Muskel- und endothelialen Zellen gefunden, wo sie eine Adenosin-induzierte vasodilatative Funktion haben (Ralevic et al., 1998; Klotz, 2000).  $A_{2A}$ -Agonisten könnten also dazu beitragen durch eine Vasodilatation der intertumoralen Gefäße einen Transport der Chemotherapeutika an ihren Wirkort zu verbessern (Gessi et al., 2010), wobei man nicht außer Acht lassen darf, dass dies wiederum auch die nicht erwünschte Versorgung der Tumorzellen begünstigen würde.

#### **4.6.3 Andere Adenosinrezeptorsubtypen als potenzielle Ziele für neue Therapieansätze**

Derzeit scheint im Zusammenhang mit Tumorzellen vor allem der A<sub>3</sub>-Rezeptorsubtyp von großer Bedeutung zu sein. Während er auf gesunden Zellen nur gering vertreten ist, jedoch vermutlich keinesfalls eine unbedeutende Rolle spielt, wird er in manchen malignen Geweben überexprimiert (Madi et al., 2004) und die Rezeptorexpression korreliert offenbar mit der Schwere der Krankheit (Fishman, 2009). Gessi et al. betiteln den A<sub>3</sub>-Rezeptor jedoch als einen „rätselhaften“ Kandidaten in der Zellbiologie (2008), da er nicht nur in Zusammenhang mit Krebszellen gegensinnige Effekte auszulösen scheint. Mittlerweile sind neben den beschriebenen, wünschenswerten proliferationshemmenden Effekten auch tumorwachstumsfördernde Effekte beobachtet worden.

Eine 48-stündige Behandlung von Krebszellen (u.a. aus der Prostata und dem Pankreas) mit dem gering A<sub>3</sub>-Rezeptor-selektiven Agonisten IB-MECA in einer Konzentration von 10 µM konnte das Tumorwachstum in vitro inhibieren. An Mäusen wurde ebenfalls nach oraler Gabe von IB-MECA bzw. CI-IB-MECA (5-100 µg/kg) eine Inhibition des Tumorwachstums in der gleichen Größenordnung wie eine alleinige Chemotherapie beobachtet. Gemeinsam verabreicht konnte ein synergistischer Effekt detektiert werden, der größer ausfiel als eine der A<sub>3</sub>-Rezeptor-spezifischen Substanzen oder das Chemotherapeutikum alleine (Fishman, 2002). Durch Stimulation der A<sub>3</sub>-Rezeptoren ließ sich in noch weiteren aktuellen Studien die Poliferation der Tumorzellen hemmen, z.B. auch in humanen Mammakarzinomzellen (Lu et al., 2003) was diesen Rezeptorsubtyp offenbar zu einem wichtigen potenziellen Angriffspunkt für Pharmaka macht (Fishman et al., 2009). Gessi et al. jedoch untersuchten A<sub>3</sub>-Rezeptoren in Kolonkarzinomzelllinien (2007) und fanden Gegenteiliges heraus: A<sub>3</sub>-Rezeptor-Aktivierung durch den Agonisten CI-IB-MECA führte in ihren Studien zu einer deutlichen Wachstumsstimulation der Tumorzellen. Zudem fanden andere Arbeitsgruppen heraus, dass Adenosin die Expression des HIF-1α Proteins über den A<sub>3</sub>-Rezeptor steigerte (Merighi et al., 2006). HIF („hypoxia-

inducible-factor)-1 $\alpha$  ist ein Faktor, der unter hypoxischen Bedingungen, wie auch im soliden Tumor vorherrschend, freigesetzt wird und im Tumorgeschehen einen entscheidenden Beitrag zur Tumorausdehnung und Metastasierung leistet, indem er die Angiogenese induziert. Diese Erkenntnisse regen also paradoxerweise dazu an, auch eine Verwendung von A<sub>3</sub>-Rezeptor-Antagonisten in zukünftige Therapieansätze miteinzubeziehen (Gessi et al., 2010).

Noch viele weitere Studien werden nötig sein, um die Rolle des Adenosins und der Adenosinrezeptoren in Bezug auf maligne Zellen und Zellverbände näher zu klären. Wir konnten zwar Adenosinrezeptoren auf OAW-42 und SK-OV-3 Ovarialkarzinomzellen nachweisen, jedoch konnte in unseren Experimenten keine klare Bedeutung dieser Rezeptoren für Proliferation und Zelltod von diesen Krebszellen erkannt werden.

## 5 Zusammenfassung

Schon seit langer Zeit beschäftigen sich Forschungsgruppen mit Adenosin, Adenosinrezeptoren und wie man sie sich in der Therapie von Krankheiten und vor allem Krebs zunütze machen kann. Bislang sind die Rezeptoren auf diversen Krebszellen nachgewiesen worden und auch in der Therapie gibt es bereits viele hoffnungsvolle Ansätze. Da das Ovarialkarzinom mit seiner leider meist erst spät auftretenden Symptomatik, keiner Möglichkeit der frühen Diagnose und seiner damit verbundenen ungünstigen Prognose eine der häufigsten Krebstodesursachen darstellt, war es ein Ziel dieser Arbeit herauszufinden, ob sich durch Adenosinrezeptoren auf diesen Zellen eine Möglichkeit des Therapieansatzes finden ließe. Dazu untersuchten wir vier Ovarialkarzinomzelllinien OVCAR, SK-OV-3, PA-1 und OAW-42 auf eine mögliche Expression von allen vier Adenosinrezeptorsubtypen zunächst durch Bindungsstudien für den A<sub>1</sub>-, A<sub>2A</sub>- und A<sub>3</sub>-Subtyp mit radioaktiv markierten Liganden (<sup>3</sup>H]CCPA, <sup>3</sup>H]NECA und <sup>3</sup>H]HEMADO) und für den A<sub>2B</sub>-Rezeptor mithilfe eines funktionellen Nachweises, der Stimulation der Adenylylcyclase mithilfe von NECA und [<sup>32</sup>P]ATP. Im Anschluss daran untersuchten wir mit zwei der gescreenten Zelllinien, OAW-42 und SK-OV-3, ob sich ihr Proliferationsverhalten durch eine Stimulation mit NECA verändern ließe und ob sich das Ansprechen auf gängige Chemotherapeutika bzw. einen Todesliganden ändern würde. Wir konnten zwar Adenosinrezeptoren auf allen Zelllinien nachweisen, doch waren die Ergebnisse der Proliferationsstudien nicht eindeutig. Zwar reagierten OAW-42 und SK-OV-3 Zellen auf eine NECA-Stimulation mit sinkendem BrdU-Einbau, OAW-42 Zellen zeigten eine leicht erhöhte Resistenz gegenüber Cisplatin nach 10 µM NECA-Behandlung und SK-OV-3 Zellen reagierten dezent sensibler auf Doxorubicin, bzw. Fas-Ligand, doch waren die Unterschiede sehr gering und wurden daher von uns als nicht entscheidender Effekt gewertet. Auch Untersuchungen zur Expression von CD39 und CD73 vor und nach NECA-Stimulation blieben ohne erkennbare Veränderung.



Die gewonnenen Daten können zukünftigen Studien als Grundlage und Ausgangspunkt nützen, auch andere Tumorzellarten zu untersuchen und im Kampf gegen den Krebs auf der Suche nach neuen potenziellen Angriffspunkten für Pharmaka neue Erkenntnisse zu erlangen.

## 6 Literaturverzeichnis

1. (2009). "Current FIGO staging for cancer of the vagina, fallopian tube, ovary, and gestational trophoblastic neoplasia." Int J Gynaecol Obstet **105**(1): 3-4.
2. Abbracchio, M. P., A. Camurri, et al. (2001). "The A3 adenosine receptor induces cytoskeleton rearrangement in human astrocytoma cells via a specific action on Rho proteins." Ann N Y Acad Sci **939**: 63-73.
3. Andine, P., K. A. Rudolphi, et al. (1990). "Effect of propentofylline (HWA 285) on extracellular purines and excitatory amino acids in CA1 of rat hippocampus during transient ischaemia." Br J Pharmacol **100**(4): 814-818.
4. Auchampach, J. A. and R. Bolli (1999). "Adenosine receptor subtypes in the heart: therapeutic opportunities and challenges." Am J Physiol **276**(3 Pt 2): H1113-1116.
5. Baraldi, P. G., B. Cacciari, et al. (2000). "Pyrazolo[4,3-e]1,2,4-triazolo[1,5-c]pyrimidine derivatives as highly potent and selective human A(3) adenosine receptor antagonists: influence of the chain at the N(8) pyrazole nitrogen." J Med Chem **43**(25): 4768-4780.
6. Benedet, J. L., H. Bender, et al. (2000). "FIGO staging classifications and clinical practice guidelines in the management of gynecologic cancers. FIGO Committee on Gynecologic Oncology." Int J Gynaecol Obstet **70**(2): 209-262.
7. Blay, J., T. D. White, et al. (1997). "The extracellular fluid of solid carcinomas contains immunosuppressive concentrations of adenosine." Cancer Res **57**(13): 2602-2605.
8. Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem **72**: 248-254.
9. Brodde, O. E. (1993). "Beta-adrenoceptors in cardiac disease." Pharmacol Ther **60**(3): 405-430.

10. Canbolat, O., I. Durak, et al. (1996). "Activities of adenosine deaminase, 5'-nucleotidase, guanase, and cytidine deaminase enzymes in cancerous and non-cancerous human breast tissues." Breast Cancer Res Treat **37**(2): 189-193.
11. Cho, S. Y., J. Polster, et al. (2006). "In vitro evaluation of adenosine 5'-monophosphate as an imaging agent of tumor metabolism." J Nucl Med **47**(5): 837-845.
12. Ciruela, F., C. Albergaria, et al. (2010). "Adenosine receptors interacting proteins (ARIPs): Behind the biology of adenosine signaling." Biochim Biophys Acta **1798**(1): 9-20.
13. Clayton, A., S. Al-Taei, et al. (2011). "Cancer exosomes express CD39 and CD73, which suppress T cells through adenosine production." J Immunol **187**(2): 676-683.
14. Cronstein, B. N. (2004). "Adenosine receptors and wound healing." ScientificWorldJournal **4**: 1-8.
15. Curiel, T. J., G. Coukos, et al. (2004). "Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival." Nat Med **10**(9): 942-949.
16. Deaglio, S., K. M. Dwyer, et al. (2007). "Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression." J Exp Med **204**(6): 1257-1265
17. Decking, U. K., G. Schlieper, et al. (1997). "Hypoxia-induced inhibition of adenosine kinase potentiates cardiac adenosine release." Circ Res **81**(2): 154-164.
18. Dietl, J., J. B. Engel, et al. (2007). "The role of regulatory T cells in ovarian cancer." Int J Gynecol Cancer **17**(4): 764-770.
19. du Bois, A., H. J. Luck, et al. (2003). "A randomized clinical trial of cisplatin/paclitaxel versus carboplatin/paclitaxel as first-line treatment of ovarian cancer." J Natl Cancer Inst **95**(17): 1320-1329.
20. Dubey, R. K., D. G. Gillespie, et al. (1998). "Adenosine inhibits collagen and protein synthesis in cardiac fibroblasts: role of A2B receptors."

- Hypertension **31**(4): 943-948.
21. Dubey, R. K., D. G. Gillespie, et al. (1999). "Adenosine inhibits collagen and total protein synthesis in vascular smooth muscle cells." Hypertension **33**(1 Pt 2): 190-194.
  22. Dubey, R. K., D. G. Gillespie, et al. (2000). "A(2B) receptors mediate antimitogenesis in vascular smooth muscle cells." Hypertension **35**(1 Pt 2): 267-272.
  23. Dubey, R. K., D. G. Gillespie, et al. (2001). "A(2B) receptors mediate the antimitogenic effects of adenosine in cardiac fibroblasts." Hypertension **37**(2 Part 2): 716-721.
  24. Dubey, R. K., D. G. Gillespie, et al. (2002). "A(2B) adenosine receptors stimulate growth of porcine and rat arterial endothelial cells." Hypertension **39**(2 Pt 2): 530-535.
  25. Dzhandzhugazyan, K. N., A. F. Kirkin, et al. (1998). "Ecto-ATP diphosphohydrolase/CD39 is overexpressed in differentiated human melanomas." FEBS Lett **430**(3): 227-230.
  26. Etique, N., I. Grillier-Vuissoz, et al. (2009). "Crosstalk between adenosine receptor (A2A isoform) and ERalpha mediates ethanol action in MCF-7 breast cancer cells." Oncol Rep **21**(4): 977-981.
  27. Feoktistov, I., J. J. Murray, et al. (1994). "Positive modulation of intracellular Ca<sup>2+</sup> levels by adenosine A2b receptors, prostacyclin, and prostaglandin E1 via a cholera toxin-sensitive mechanism in human erythroleukemia cells." Mol Pharmacol **45**(6): 1160-1167.
  28. Feoktistov, I., R. Polosa, et al. (1998). "Adenosine A2B receptors: a novel therapeutic target in asthma?" Trends Pharmacol Sci **19**(4): 148-153.
  29. Feoktistov, I., A. E. Goldstein, et al. (2002). "Differential expression of adenosine receptors in human endothelial cells: role of A2B receptors in angiogenic factor regulation." Circ Res **90**(5): 531-538.
  30. Feoktistov, I., I. Biaggioni, et al. (2009). "Adenosine receptors in wound healing, fibrosis and angiogenesis." Handb Exp Pharmacol(193): 383-397

31. Fishman, P., S. Bar-Yehuda, et al. (1998). "Adenosine and other low molecular weight factors released by muscle cells inhibit tumor cell growth." Cancer Res **58**(14): 3181-3187.
32. Fishman, P., S. Bar-Yehuda, et al. (2000). "Adenosine acts as an inhibitor of lymphoma cell growth: a major role for the A3 adenosine receptor." Eur J Cancer **36**(11): 1452-1458.
33. Fishman, P., S. Bar-Yehuda, et al. (2002). "A3 adenosine receptor as a target for cancer therapy." Anticancer Drugs **13**(5): 437-443.
34. Fishman, P., S. Bar-Yehuda, et al. (2004). "An agonist to the A3 adenosine receptor inhibits colon carcinoma growth in mice via modulation of GSK-3 beta and NF-kappa B." Oncogene **23**(14): 2465-2471.
35. Fishman, P., S. Bar-Yehuda, et al. (2004). "The A3 Adenosine Receptor (A3ar) as a Target for Cancer Treatment: From Bench to Bedside." Anticancer Research **24**(5D): 3487-3487.
36. Fishman, P., S. Bar-Yehuda, et al. (2009). "Adenosine receptors and cancer." Handb Exp Pharmacol(193): 399-441.
37. Fredholm, B. B. (2010). "Adenosine receptors as drug targets." Exp Cell Res **316**(8): 1284-1288.
38. Fredholm, B. B., I. J. AP, et al. (2001a). "International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors." Pharmacol Rev **53**(4): 527-552.
39. Fredholm, B. B., E. Irenius, et al. (2001b). "Comparison of the potency of adenosine as an agonist at human adenosine receptors expressed in Chinese hamster ovary cells." Biochem Pharmacol **61**(4): 443-448.
40. Ganote, C. E. and S. C. Armstrong (2000). "Adenosine and preconditioning in the rat heart." Cardiovasc Res **45**(1): 134-140.
41. Gessi, S., K. Varani, et al. (2000). "A(2A) adenosine receptors in human peripheral blood cells." Br J Pharmacol **129**(1): 2-11.
42. Gessi, S., S. Merighi, et al. (2007). "Adenosine receptors in colon carcinoma tissues and colon tumoral cell lines: focus on the A(3)

- adenosine subtype." J Cell Physiol **211**(3): 826-836.
43. Gessi, S., S. Merighi, et al. (2008). "The A3 adenosine receptor: an enigmatic player in cell biology." Pharmacol Ther **117**(1): 123-140.
  44. Gessi, S., S. Merighi, et al. (2010). "Adenosine receptors and cancer." Biochim Biophys Acta.
  45. Grant, M. B., R. W. Tarnuzzer, et al. (1999). "Adenosine receptor activation induces vascular endothelial growth factor in human retinal endothelial cells." Circ Res **85**(8): 699-706.
  46. Grant, M. B., M. I. Davis, et al. (2001). "Proliferation, migration, and ERK activation in human retinal endothelial cells through A(2B) adenosine receptor stimulation." Invest Ophthalmol Vis Sci **42**(9): 2068-2073.
  47. Grospietsch, G., H. Kuhnle, et al. (1986). "[Current aspects of therapy of ovarian cancer. Surgical therapy of epithelial ovarian cancer at the Gottingen University Gynecologic Clinic. A retrospective analysis of 82 patients 1981-1984]." Geburtshilfe Frauenheilkd **46**(9): 588-594.
  48. Hastie, C., M. Saxton, et al. (2005). "Combined affinity labelling and mass spectrometry analysis of differential cell surface protein expression in normal and prostate cancer cells." Oncogene **24**(38): 5905-5913.
  49. Hausler, S. F., I. Montalban del Barrio, et al. (2011). "Ectonucleotidases CD39 and CD73 on OvCA cells are potent adenosine-generating enzymes responsible for adenosine receptor 2A-dependent suppression of T cell function and NK cell cytotoxicity." Cancer Immunol Immunother **60**(10): 1405-1418.
  50. Hellstrom, I., K. E. Hellstrom, et al. (1968). "Cellular and humoral immunity to different types of human neoplasms." Nature **220**(5174): 1352-1354.
  51. Hershfield, M. S. (1998). "Adenosine deaminase deficiency: clinical expression, molecular basis, and therapy." Semin Hematol **35**(4): 291-298.
  52. Hill, S. J. (2006). "G-protein-coupled receptors: past, present and future." Br J Pharmacol **147 Suppl 1**: S27-37.

53. Hoskin, D. W., T. Reynolds, et al. (1994). "Adenosine as a possible inhibitor of killer T-cell activation in the microenvironment of solid tumours." Int J Cancer **59**(6): 854-855.
54. Hoskins, W. J. (1994). "Epithelial ovarian carcinoma: principles of primary surgery." Gynecol Oncol **55**(3 Pt 2): S91-96.
55. Hoskins, W. J., W. P. McGuire, et al. (1994). "The effect of diameter of largest residual disease on survival after primary cytoreductive surgery in patients with suboptimal residual epithelial ovarian carcinoma." Am J Obstet Gynecol **170**(4): 974-979; discussion 979-980.
56. Hugo, F., S. Mazurek, et al. (1992). "In vitro effect of extracellular AMP on MCF-7 breast cancer cells: inhibition of glycolysis and cell proliferation." J Cell Physiol **153**(3): 539-549.
57. Huober, J. (2004). "Therapie des Ovarialkarzinoms." from [www.institut-frauengesundheit.org/uploads/.../ICLIC\\_OVCA\\_Seminar\\_01.pdf](http://www.institut-frauengesundheit.org/uploads/.../ICLIC_OVCA_Seminar_01.pdf).
58. Janovski, N. A. and T. L. Paramanandhan (1973). "Ovarian tumors. Tumors and tumor-like conditions of the ovaries, fallopian tubes and ligaments of the uterus." Major Probl Obstet Gynecol **4**: 1-245.
59. Jin, D., J. Fan, et al. (2010). "CD73 on tumor cells impairs antitumor T-cell responses: a novel mechanism of tumor-induced immune suppression." Cancer Res **70**(6): 2245-2255.
60. Kerr, J. F., A. H. Wyllie, et al. (1972). "Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics." Br J Cancer **26**(4): 239-257.
61. Khoo, H. E., C. L. Ho, et al. (1996). "Differential expression of adenosine A1 receptors in colorectal cancer and related mucosa." Cancer Lett **106**(1): 17-21.
62. Kiechle, M. and R. Schmutzler (2002). "Epidemiologie, Genetik und Prävention des Ovarialkarzinoms." Der Onkologe **8**: 1142–1148.
63. Kitakaze, M. and M. Hori (2000). "Adenosine therapy: a new approach to chronic heart failure." Expert Opin Investig Drugs **9**(11): 2519-2535.
64. Klotz, K. N., J. Hessling, et al. (1998). "Comparative pharmacology of

- human adenosine receptor subtypes - characterization of stably transfected receptors in CHO cells." Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol **357**(1): 1-9.
65. Klotz, K. N. (2000). "Adenosine receptors and their ligands." Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol **362**(4-5): 382-391.
66. Koshiba, M., H. Kojima, et al. (1997). "Memory of extracellular adenosine A2A purinergic receptor-mediated signaling in murine T cells." J Biol Chem **272**(41): 25881-25889.
67. Kreienberg, R., A. Bois, et al. (2009). Hereditäres Ovarialkarzinom. Management des Ovarialkarzinoms, Springer Berlin Heidelberg: 125-131.
68. Kristensen, G. B. and C. Trope (1997). "Epithelial ovarian carcinoma." Lancet **349**(9045): 113-117.
69. Kuhn, W., A. du Bois, et al. (2001). "Operative Therapie des fortgeschrittenen Ovarialkarzinoms." Der Gynäkologe **34**(11): 1050-1057.
70. Kumar, V. and A. Sharma (2009). "Adenosine: an endogenous modulator of innate immune system with therapeutic potential." Eur J Pharmacol **616**(1-3): 7-15.
71. Kunzli, B. M., P. O. Berberat, et al. (2007). "Upregulation of CD39/NTPDases and P2 receptors in human pancreatic disease." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **292**(1): G223-230.
72. Kusche, M., K. Reusch, et al. (1989). "Prognose des Ovarialkarzinoms in Abhängigkeit vom Tumorstadium bei der Primärbehandlung." Archives of Gynecology and Obstetrics **245**(1): 634-634.
73. Leffers, N., M. J. Gooden, et al. (2009). "Prognostic significance of tumor-infiltrating T-lymphocytes in primary and metastatic lesions of advanced stage ovarian cancer." Cancer Immunol Immunother **58**(3): 449-459.
74. Leitz, M. R. (2006). Vergleichende Pharmakologie der Subtypen von menschlichen  $\beta$ -adrenergen Rezeptoren - Charakterisierung von stabil in CHO-Zellen transfizierten Rezeptoren. Würzburg, Institut für



75. Lelievre, V., J. M. Muller, et al. (1998). "Adenosine modulates cell proliferation in human colonic carcinoma. II. Differential behavior of HT29, DLD-1, Caco-2 and SW403 cell lines." Eur J Pharmacol **341**(2-3): 299-308.
76. Linden, J. (2001). "Molecular approach to adenosine receptors: receptor-mediated mechanisms of tissue protection." Annu Rev Pharmacol Toxicol **41**: 775-787.
77. Lu, J., A. Pierron, et al. (2003). "An adenosine analogue, IB-MECA, down-regulates estrogen receptor  $\alpha$  and suppresses human breast cancer cell proliferation." Cancer Research **63**(19): 6413-6423.
78. Lukashev, D., M. Sitkovsky, et al. (2007). "From "Hellstrom Paradox" to anti-adenosinergic cancer immunotherapy." Purinergic Signal **3**(1-2): 129-134.
79. Madi, L., S. Bar-Yehuda, et al. (2003). "A3 adenosine receptor activation in melanoma cells - Association between receptor fate and tumor growth inhibition." Journal of Biological Chemistry **278**(43): 42121-42130.
80. Madi, L., A. Ochaion, et al. (2004). "The A(3) adenosine receptor is highly expressed in tumor versus normal cells: Potential target for tumor growth inhibition." Clinical Cancer Research **10**(13): 4472-4479.
81. McGuire, W. P., W. J. Hoskins, et al. (1996). "Cyclophosphamide and cisplatin compared with paclitaxel and cisplatin in patients with stage III and stage IV ovarian cancer." N Engl J Med **334**(1): 1-6.
82. McGuire, W. P., W. J. Hoskins, et al. (1996). "Cyclophosphamide and cisplatin versus paclitaxel and cisplatin: a phase III randomized trial in patients with suboptimal stage III/IV ovarian cancer (from the Gynecologic Oncology Group)." Semin Oncol **23**(5 Suppl 12): 40-47.
83. Meden, H. (1996). Ovarialkarzinom : Aktuelle Aspekte zur Diagnostik und Therapie in Klinik und Praxis. Berlin , New York, de Gruyter.
84. Meininger, C. J. and H. J. Granger (1990). "Mechanisms leading to adenosine-stimulated proliferation of microvascular endothelial cells." Am

- J Physiol **258**(1 Pt 2): H198-206.
85. Merighi, S., K. Varani, et al. (2001). "Pharmacological and biochemical characterization of adenosine receptors in the human malignant melanoma A375 cell line." Br J Pharmacol **134**(6): 1215-1226.
  86. Merighi, S., P. Mirandola, et al. (2002). "Adenosine receptors as mediators of both cell proliferation and cell death of cultured human melanoma cells." J Invest Dermatol **119**(4): 923-933.
  87. Merighi, S., P. Mirandola, et al. (2003). "A glance at adenosine receptors: novel target for antitumor therapy." Pharmacology & Therapeutics **100**(1): 31-48.
  88. Merighi, S., A. Benini, et al. (2006). "Adenosine modulates vascular endothelial growth factor expression via hypoxia-inducible factor-1 in human glioblastoma cells." Biochem Pharmacol **72**(1): 19-31.
  89. Mirabet, M., J. Mallol, et al. (1997). "Calcium mobilization in Jurkat cells via A2b adenosine receptors." Br J Pharmacol **122**(6): 1075-1082.
  90. Mirza, A., A. Basso, et al. (2005). "RNA interference targeting of A1 receptor-overexpressing breast carcinoma cells leads to diminished rates of cell proliferation and induction of apoptosis." Cancer Biol Ther **4**(12): 1355-1360.
  91. Montesinos, M. C., A. Desai, et al. (2002). "Adenosine promotes wound healing and mediates angiogenesis in response to tissue injury via occupancy of A(2A) receptors." Am J Pathol **160**(6): 2009-2018.
  92. Natori, Y., T. Baba, et al. (1992). "Effects of theophylline on the selective increases in intratumoral blood flow induced by intracarotid infusion of adenosine and adenosine triphosphate in C6 glioma-transplanted rat brains." Surg Neurol **37**(1): 8-14.
  93. Ohta, A., E. Gorelik, et al. (2006). "A2A adenosine receptor protects tumors from antitumor T cells." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(35): 13132-13137.
  94. Olsson, R. A. and J. D. Pearson (1990). "Cardiovascular purinoceptors." Physiol Rev **70**(3): 761-845.

95. Ongini, E. and B. B. Fredholm (1996). "Pharmacology of adenosine A2A receptors." Trends Pharmacol Sci **17**(10): 364-372.
96. Panjehpour, M. and F. Karami-Tehrani (2004). "An adenosine analog (IB-MECA) inhibits anchorage-dependent cell growth of various human breast cancer cell lines." Int J Biochem Cell Biol **36**(8): 1502-1509.
97. Panjehpour, M., M. Castro, et al. (2005). "Human breast cancer cell line MDA-MB-231 expresses endogenous A2B adenosine receptors mediating a Ca<sup>2+</sup> signal." Br J Pharmacol **145**(2): 211-218.
98. Peyot, M. L., A. P. Gadeau, et al. (2000). "Extracellular adenosine induces apoptosis of human arterial smooth muscle cells via A(2b)-purinoceptor." Circ Res **86**(1): 76-85.
99. Pfisterer, J. and A. Bois (2002). Das Ovarialkarzinom: therapeutische Standards / klinische Empfehlungen. Georg Thieme Verlag Stuttgart
100. Pueyo, M. E., Y. Chen, et al. (1998). "Regulation of vascular endothelial growth factor expression by cAMP in rat aortic smooth muscle cells." Exp Cell Res **238**(2): 354-358.
101. Ralevic, V. and G. Burnstock (1998). "Receptors for purines and pyrimidines." Pharmacol Rev **50**(3): 413-492.
102. Rathbone, M. P., P. J. Middlemiss, et al. (1992). "Purine nucleosides and nucleotides stimulate proliferation of a wide range of cell types." In Vitro Cell Dev Biol **28A**(7-8): 529-536.
103. Sato, E., S. H. Olson, et al. (2005). "Intraepithelial CD8<sup>+</sup> tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8<sup>+</sup>/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(51): 18538-18543.
104. Schmalfeldt, P. e. a. (2007). Interdisziplinäre S2k-Leitlinie für die Diagnostik und Therapie maligner Ovarialtumoren. D-82110 Germering/München, W. Zuckschwerdt Verlag GmbH.
105. Schrier, S. M., E. W. van Tilburg, et al. (2001). "Extracellular adenosine-induced apoptosis in mouse neuroblastoma cells: studies on involvement of adenosine receptors and adenosine uptake." Biochem Pharmacol

- 61(4): 417-425.**
106. Schulte, G. (2004). "Adenosin, Adenosinrezeptoren und adenosinrezeptoraktivierte Signalwege." Biospektrum: 159-161.
  107. Shi, X. J. and A. F. Knowles (1994). "Prevalence of the mercurial-sensitive EctoATPase in human small cell lung carcinoma: characterization and partial purification." Arch Biochem Biophys **315(1)**: 177-184.
  108. Spicuzza, L. and R. Polosa (2003). "The role of adenosine as a novel bronchoprovocant in asthma." Curr Opin Allergy Clin Immunol **3(1)**: 65-69.
  109. Spychala, J., N. S. Datta, et al. (1996). "Cloning of human adenosine kinase cDNA: sequence similarity to microbial ribokinases and fructokinases." Proc Natl Acad Sci U S A **93(3)**: 1232-1237.
  110. Spychala, J. (2000). "Tumor-promoting functions of adenosine." Pharmacol Ther **87(2-3)**: 161-173.
  111. Spychala, J., E. Lazarowski, et al. (2004). "Role of estrogen receptor in the regulation of ecto-5'-nucleotidase and adenosine in breast cancer." Clinical Cancer Research **10(2)**: 708-717.
  112. Stagg, J., U. Divisekera, et al. (2010). "Anti-CD73 antibody therapy inhibits breast tumor growth and metastasis." Proc Natl Acad Sci U S A **107(4)**: 1547-1552.
  113. Stauber, M. and T. Weyerstahl (2001). Duale Reihe – Gynäkologie und Geburtshilfe. Georg Thieme Verlag
  114. Stella, J., L. Bavaresco, et al. (2010). "Differential ectonucleotidase expression in human bladder cancer cell lines." Urol Oncol **28(3)**: 260-267.
  115. Vaupel, P., F. Kallinowski, et al. (1989). "Blood flow, oxygen and nutrient supply, and metabolic microenvironment of human tumors: a review." Cancer Res **49(23)**: 6449-6465.
  116. Vaupel, P., O. Thews, et al. (2001). "Treatment resistance of solid tumors: role of hypoxia and anemia." Med Oncol **18(4)**: 243-259.

117. Victor-Vega, C., A. Desai, et al. (2002). "Adenosine A2A receptor agonists promote more rapid wound healing than recombinant human platelet-derived growth factor (Becaplermin gel)." Inflammation **26**(1): 19-24.
118. Voigt, W., A. Dietrich, et al. (2006). "Cisplatin und seine Analoga: Übersicht über den Entwicklungsstatus und klinischen Einsatz." Pharmazie in unserer Zeit **35**(2): 134-143.
119. Wang, L., X. Zhou, et al. (2008). "Ecto-5'-nucleotidase promotes invasion, migration and adhesion of human breast cancer cells." J Cancer Res Clin Oncol **134**(3): 365-372.
120. [www.gynonko.at](http://www.gynonko.at). from [www.gynonko.at](http://www.gynonko.at).
121. Xaus, J., A. F. Valledor, et al. (1999). "Adenosine inhibits macrophage colony-stimulating factor-dependent proliferation of macrophages through the induction of p27kip-1 expression." J Immunol **163**(8): 4140-4149.
122. Yasuda, Y., M. Saito, et al. (2009). "Extracellular adenosine induces apoptosis in Caco-2 human colonic cancer cells by activating caspase-9/-3 via A(2a) adenosine receptors." J Gastroenterol **44**(1): 56-65.
123. Zhang, L., J. R. Conejo-Garcia, et al. (2003). "Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer." N Engl J Med **348**(3): 203-213.
124. Zhou, X., X. Zhi, et al. (2007). "Effects of ecto-5'-nucleotidase on human breast cancer cell growth in vitro and in vivo." Oncol Rep **17**(6): 1341-1346.
125. Zimmermann, H. (1992). "5'-Nucleotidase: molecular structure and functional aspects." Biochem J **285** ( Pt 2): 345-365.
126. Zimmermann, H. (2000). "Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides." Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol **362**(4-5): 299-309.

## 7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Adenosinrezeptoren.....	8
Abbildung 2:	Streudiagramm bzw. „Dot plot“ hier von OAW-42 Zellen Histogramm hier von OAW-42 Zellen.....	32
Abbildung 3 :	Radioligandenbindung an Zellmembranen von Ovarialkarzinomzellen.....	33
Abbildung 4:	NECA-stimulierte Aktivität der Adenylylcyclase in Ovarialkarzinomzelllinien zum Nachweis von $A_{2B}$ -Rezeptoren.....	34
Abbildung 5:	Stimulation der AC in Zellmembranen von SK-OV-3 mit NECA und dem $A_{2A}$ -spezifischen Agonisten CGS 21680 im Vergleich zur basalen Aktivität.....	36
Abbildung 6:	Stimulation der AC in Zellmembranen der Zelllinie OAW-42 mit NECA und CGS 21680 nach vorangegangener $A_1$ -Rezeptor-Inhibition durch DPCPX.....	37
Abbildung 7:	Effekt von Adenosin auf die Zellproliferation von OAW-42 und SK-OV-3 geprüft durch den Einbau von BrdU in die Zell-DNA.....	39
Abbildung 8:	Effekt von NECA auf die Zellproliferation von OAW-42 und SK-OV-3 geprüft durch den Einbau von BrdU in die Zell-DNA.....	40
Abbildung 9:	Effekt von NECA und Cisplatin auf die Zellproliferation von OAW-42 geprüft durch die Kristallviolett-Färbung vitaler, adhärenter Zellen.....	41
Abbildung 10:	Effekt von NECA und Doxorubicin auf die Zellproliferation von OAW-42 geprüft durch die Kristallviolett-Färbung vitaler, adhärenter Zellen.....	42
Abbildung 11:	Effekt von NECA und FAS-Ligand auf die Zellproliferation von OAW-42 geprüft durch die Kristallviolett-Färbung vitaler, adhärenter Zellen.....	43

Abbildung 12: Effekt von NECA und Cisplatin auf die Zellproliferation von SK-OV-3 geprüft durch die Kristallviolett-Färbung vitaler, adhärenter Zellen.....	44
Abbildung 13: Effekt von NECA und Doxorubicin auf die Zellproliferation von SK-OV-3 geprüft durch die Kristallviolett-Färbung vitaler, adhärenter Zellen.....	45
Abbildung 14: Effekt von NECA und FAS-Ligand auf die Zellproliferation von SK-OV-3 geprüft durch die Kristallviolett-Färbung vitaler, adhärenter Zellen.....	46
Abbildung 15: Effekt von NECA auf die Expression von CD39 auf OAW-42 Zellen.....	48
Abbildung 16: Effekt von NECA auf die Expression von CD73 auf OAW-42 Zellen.....	48
Abbildung 17: Effekt von NECA auf die Expression von CD39 auf SK-OV-3 Zellen.....	49
Abbildung 18: Effekt von NECA auf die Expression von CD73 auf SK-OV-3 Zellen.....	49

## 8 Abkürzungsverzeichnis

7AAD – 7-Aminoactinomycin  
AC – Adenylylcyclase  
ADA – Adenosindesaminase  
ADP – Adenosindiphosphat  
AK – Adenosinkinase  
AMP – Adenosinmonophosphat  
ATP – Adenosintriphosphat  
BrdU – 5´- Bromo-2´- desoxy - Uridin  
BSA – Bovines Serumalbumin  
CAD – Caspase-aktivierbare DNAse  
cAMP – cyclisches Adenosinmonophosphat  
CD – Cluster of differentiation  
cpm – counts per minute  
DG – Diacylglycerol  
DPCPX – 8-Cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine  
DNA – Desoxyribonucleinsäure  
FACS – fluorescence activated cell sorting  
FCS – Fötale Kälberserum  
FIGO – Fédéral Institut de Gynécologie et d´Obstétrique  
FITC – Fluoresceinisothiocyanat  
FSC – Forward Scatter  
G<sub>i</sub>-Protein – inhibitorisches G-Protein  
G<sub>s</sub>-Protein – stimulatorisches G-Protein  
GPCR – G-Protein-gekoppelte Rezeptoren  
IP<sub>3</sub> – Inositoltriphosphat  
NECA – 5´- N-Ethyl-Carboxamido-adenosine  
PBS – Phosphate buffered saline  
PE – Phycoerythrin  
PLC – Phospholipase C



P/S – Penicillin/streptomycin

RNA – Ribonucleinsäure

RPMI – Roswell Park Memorial Institute

(Zellkulturmedium, das hier entwickelt wurde)

S-Phase – Synthesephase

SSC – Side Scatter

## 9 Anhang

TNM	FIGO	Befundsituation
<b>T1</b>	<b>I</b>	<b>Tumor begrenzt auf Ovarien</b>
T1a	IA	Tumor auf ein Ovar begrenzt; Kapsel intakt; kein Tumor auf der Oberfläche des Ovars
T1b	IB	Tumor auf beide Ovarien begrenzt; Kapsel intakt, kein Tumor auf der Oberfläche beider Ovarien
T1c	IC	Tumor begrenzt auf ein oder beide Ovarien mit Kapselruptur, Tumor an Ovaroberfläche oder maligne Zellen im Aszites oder bei Peritonealspülung
<b>T2</b>	<b>II</b>	<b>Tumor befällt ein oder beide Ovarien und breitet sich im Becken aus</b>
T2a	IIA	Ausbreitung auf und/oder Implantate an Uterus und/oder Tube(n)
T2b	IIB	Ausbreitung auf andere Beckengewebe
T2c	IIC	Ausbreitung im Becken (2a oder 2b) und maligne Zellen im Aszites oder bei Peritonealspülung
<b>T3 und/oder N1</b>	<b>III</b>	<b>Tumor befällt ein oder beide Ovarien, mit histologisch nachgewiesenen</b>

		<b>Peritonealmetastasen außerhalb des Beckens und/oder regionären Lymphknotenmetastasen</b>
T3a	IIIA	mikroskopische Peritonealmetastasen jenseits des Beckens
T3b	IIIB	makroskopische Peritonealmetastasen jenseits des Beckens, größte Ausdehnung ≤ 2 cm
T3c	IIIC	Peritonealmetastasen jenseits des Beckens, und/oder N1 größte Ausdehnung > 2 cm, und/oder regionäre Lymphknotenmetastasen
NX		regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0	–	keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1	–	regionäre Lymphknotenmetastasen
<b>M1</b>	<b>IV</b>	<b>Fernmetastasen (ausschließlich Peritonealmetastasen)</b>

Figo-Klassifikation (aus Schmalfeld et al. 2007)



## **Danksagung**

Ich danke meinen Doktorvätern Prof. Dr. Karl-Norbert Klotz und Prof. Dr. Jörg Wischhusen für das Vertrauen, die großartige Unterstützung und Geduld. Eine bessere Betreuung wäre wohl kaum möglich gewesen. Ich bin Euch zu großem Dank verpflichtet. Zudem danke ich den Betreuerinnen im Labor: Sonja Kachler und Monika Ossadnik für die geduldige Unterstützung bei der Durchführung der Experimente, des Weiteren Anoop Chandran, Markus Junker und Ahmed Adel Seida, die während der Zeit im Labor so oft Rat wussten und immer freundliche Worte fanden.

Ich danke meiner Komplizin und engen Vertrauten Lena Sumski, die mich geprägt und inspiriert hat und dafür, dass sie mir immer und in allen Zeiten eine Freundin war.

Nochmals vielen Dank an Charly und Jörg, es war mir eine Ehre und ich empfinde es als große Bereicherung Euch auch unabhängig von dieser Arbeit begegnet zu sein, ohne Euer Vertrauen wäre es nicht möglich gewesen.

Großer Dank gilt meinen Eltern für ihre Unterstützung und für so Vieles. Vor allem aber weil sie mir gezeigt haben was im Leben wichtig ist.