

Aus dem Fachbereich Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

betreut am
Zentrum der Chirurgie
Klinik für Allgemein-, Viszeral-, Transplantations- und Thoraxchirurgie
Direktor: Prof. Dr. Wolf O. Bechstein

**Die Carboanhydrase IX repräsentiert ein potenzielles
therapeutisches Zielmolekül in der Eradikation von Tumor-
initiierenden Zellen des Schilddrüsenkarzinoms**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

vorgelegt von
Jennifer Schmidt

aus Kreuztal (Kredenbach)

Frankfurt am Main, 2024

Dekan:	Prof. Dr. Stefan Zeuzem
Referentin:	Prof. Dr. Katharina Holzer
Korreferent/in:	Prof. Dr. Claus Michael Rödel
Tag der mündlichen Prüfung:	17.06.2024

Inhaltsverzeichnis

1 Zusammenfassung	5
1.1 Zusammenfassung in deutscher Sprache	5
1.2 Zusammenfassung in englischer Sprache	7
2 Abkürzungsverzeichnis	9
3 Übergreifende Zusammenfassung.....	10
3.1 Einleitung.....	10
3.1.1 Das Schilddrüsenkarzinom und seine Subtypen.....	10
3.1.2 Tumor-initiiierende Zellen.....	11
3.1.3 Hypoxie und dessen Einfluss auf das Tumormikromilieu.....	11
3.1.4 Carboanhydrase IX und ihre Funktion in Tumoren.....	12
3.1.5 Fragestellung und Ziele der Dissertation.....	12
3.2 Ergebnisse.....	13
3.2.1 Expression der Carboanhydrase IX im Gewebe des Schilddrüsenkarzinoms.....	13
3.2.2 Erhöhte Carboanhydrase IX-Expression in Tumorsphären und Assoziation von Carboanhydrase IX mit der Expression von Stammzellmarkern.....	13
3.2.3 Hypoxie induziert eine Carboanhydrase IX-Überexpression in Schilddrüsenkarzinom-Zellen.....	14
3.2.4 Regulation der Tumorzellproliferation und Aktivität von Tumor-initiiierenden Zellen durch Carboanhydrase IX.....	14
3.2.5 Inhibition von Carboanhydrase IX durch Methazolamid reduziert die Schilddrüsenkarzinom-Zellproliferation und Aktivität von Tumor-initiiierenden Zellen in vitro durch eine Induktion von Apoptose.....	15
3.3 Diskussion.....	16
4 Übersicht der zur Veröffentlichung angenommenen Publikation.....	21
5 Publikation.....	22
5.1 Manuskript.....	22
5.2 Supplementary Material.....	33
5.3 Graphical Abstract.....	37

6	Darstellung des eigenen Anteils.....	38
7	Literaturverzeichnis.....	39
8	Lebenslauf.....	46
9	Danksagung.....	49
10	Schriftliche Erklärung.....	50

1 Zusammenfassung

1.1 Zusammenfassung in deutscher Sprache

Das Schilddrüsenkarzinom (SK) ist die häufigste bösartige endokrine Tumorerkrankung. Während das nicht-metastasierte und nicht-mutierte papilläre Schilddrüsenkarzinom (PSK) und das follikuläre Schilddrüsenkarzinom (FSK) eine gute Heilungschance aufweisen, zeigen die mutierten und metastasierten Varianten des PSK und FSK sowie das anaplastische Schilddrüsenkarzinom (ASK) weiterhin eine schlechte Prognose. Die Entwicklung von Therapieresistenzen stellen hierbei ein Hauptproblem in der Behandlung des fortgeschrittenen Schilddrüsenkarzinoms dar.

In den letzten Jahren wurden in Studien zunehmend Tumor-initiiierende Zellen (TIZ) beschrieben, welche eine kleine Subpopulation von Zellen mit der Fähigkeit zur Selbsterneuerung, Tumorentstehung und Entwicklung von Therapieresistenzen von Tumoren darstellen. Die Existenz von TIZ wurde auch im SK nachgewiesen. Ein entscheidender Faktor für die Persistenz von TIZ ist die Hypoxie, welche über eine Veränderung des Tumormikromilieus und des Zellmetabolismus zur Entstehung von Therapieresistenzen beiträgt. Ein durch Hypoxie hochreguliertes Enzym ist die Carboanhydrase IX (CAIX). CAIX wird hauptsächlich von Tumorzellen exprimiert und katalysiert die Reaktion von Kohlendioxid zu Bicarbonat und einem Proton und trägt damit zur Säurepufferung der Tumorzelle bei. CAIX stellt somit einen entscheidenden Faktor für das Überleben von Tumorzellen in einem hypoxischen Milieu dar. Des Weiteren ist eine erhöhte Expression von CAIX mit einem schlechten Patienten-Outcome assoziiert, wie z.B. im Brustkrebs. Diese Eigenschaften machen CAIX zu einem attraktiven Angriffspunkt einer zielgerichteten Tumorthherapie. Die vorliegende Studie hat zum Ziel, die Expression von CAIX sowie dessen biologische Rolle im Schilddrüsenkarzinom näher zu untersuchen.

Hierzu wurden Proben von 114 SK-Patienten immunhistochemisch auf eine CAIX-Expression untersucht und mit tumorfremem Schilddrüsengewebe verglichen. Hierbei waren unterschiedliche SK-Subtypen vertreten. Für eine weitere Validierung der Expressionsdaten erfolgte die Auswertung eines Datensets von „The Cancer Genome Atlas“ (TCGA) mithilfe von cBioportal. Da die Hypoxie ein wichtiger Faktor

für die Persistenz von TIZ ist, wurde die CAIX-Expression in Tumorsphären, ein *in vitro* Nachweis von TIZ-Aktivität, mittels der Durchflusszytometrie bestimmt und mit der CAIX-Expression von Monolayern verglichen. Als SK-Zelllinien wurden BCPAP (PSK), FTC 133 (FSK) und 8505 C (ASK) verwendet. Anschließend wurde mithilfe der Polymerasekettenreaktion und Immunfluoreszenzfärbung untersucht, ob eine CAIX-Expression in den Tumorsphären mit der Expression von bereits bekannten Stammzellmarkern, u.a. NANOG, assoziiert ist. Die Unterschiede der CAIX-Expression, nach Inkubation der Monolayer jeweils in Normoxie und Hypoxie, wurden mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Mithilfe eines genetischen CAIX-Knockdowns sowie einer pharmakologischen Inhibition mit dem CAIX-Inhibitor Methazolamid (MZM) wurde die Tumorzellproliferation und -Sphärenbildung unter Normoxie und Hypoxie bestimmt. Zusätzlich wurde der Einfluss von MZM auf die Apoptose und den Zellzyklus untersucht.

Immunhistochemische Färbungen der Gewebeproben von SK-Patienten zeigten, dass die CAIX-Expression sowohl im PSK und FSK als auch im ASK im Vergleich zum tumorfreien Schilddrüsengewebe erhöht war. Des Weiteren zeigte die klinisch-pathologische Datenanalyse, dass eine erhöhte CAIX-Expression mit dem Auftreten von Lymphknotenmetastasen im differenzierten SK assoziiert war. Auch die Analyse des TCGA-Datasets bestätigte, dass eine erhöhte Expression der CAIX-mRNA mit einem fortgeschrittenen Tumorstadium, Fernmetastasen und mit einem kürzeren Gesamt-Überleben von SK-Patienten korrelierte. Die weiteren funktionellen *in vitro* Untersuchungen ergaben, dass die CAIX-Expression in den Tumorsphären im Vergleich zu Monolayern erhöht und mit einer erhöhten Expression von Stammzellmarkern assoziiert war. Ein genetischer CAIX-Knockdown und eine CAIX-Inhibition mit MZM führten über eine Induktion der Apoptose und eines Zellzyklusarrests zu einer verminderten Tumorzellproliferation und Sphärenbildung. Zusammenfassend deuten die Ergebnisse darauf hin, dass CAIX ein vielversprechendes Zielmolekül für eine gezielte Tumorthherapie des fortgeschrittenen SK ist. Um diese Hypothese bestätigen zu können, sind jedoch weitere prospektive Analysen von Patientenproben sowie funktionelle *in vivo* Untersuchungen am SK nötig.

1.2 Zusammenfassung in englischer Sprache

Thyroid cancer (TC) is the most common endocrine malignancy. The papillary thyroid cancer (PTC) and follicular thyroid cancer (FTC) are known to have a good prognosis. The metastasized or mutated subtypes of PTC, FTC and the anaplastic thyroid cancer (ATC) still show a poor prognosis. Development of therapy resistance is one of the main challenges in the treatment of aggressive TC subtypes.

In recent years tumor-initiating cells (TIC), a small population of tumor cells with the ability to self-renew and to initiate tumor growth, are believed to play a crucial role in the tumor progression and therapy resistance. The existence of TICs was demonstrated in TC. One factor, that promotes the persistence of TICs, is hypoxia. Hypoxia is known to change the microenvironment and thus leads to an altered tumor cell metabolism and to the development of therapy resistance. One enzyme, that is induced by hypoxia, is the Carbonic-anhydrase IX (CAIX). Interestingly, CAIX is almost exclusively expressed in tumors. It catalyzes the conversion of carbon dioxide to bicarbonate and one proton. CAIX plays an important role in pH regulation and extracellular acidosis and thus in the survival of tumor cells in a hypoxic environment. Moreover, a strong CAIX expression has been associated with a poor patient outcome, e.g. in breast cancer. Therefore, CAIX seems to represent a promising target in the treatment of cancers. The present study aimed to investigate the CAIX expression and its role in TC.

For this purpose, immunohistochemistry was performed to examine the CAIX expression in TC tissues from 114 TC patients. The CAIX expression in TC tissues was compared with the CAIX expression in normal, non-tumorous thyroid tissues. Different TC subtypes were represented. For a further evaluation of CAIX in TC, TC data sets of TCGA were examined via cBioportal. As hypoxia is important for the persistence of TICs, CAIX expression was determined in tumorspheres using flow cytometry and compared with the CAIX expression in monolayers. The TC cell lines BCPAP (PTC), FTC 133 (FTC) and 8505 C (ATC) were used. Afterwards, polymerase chain reaction and immunofluorescence staining was performed to determine an association of the CAIX expression with stemness markers, e.g. NANOG. Further, the differences of the CAIX expression was investigated in

monolayers via flow cytometry after incubation in normoxic and hypoxic conditions. After a genetic knockdown and pharmacological inhibition of CAIX with Methazolamide (MZM), tumor cell proliferation and tumorsphere formation were determined in normoxia and hypoxia. The influence of MZM on apoptosis and cell-cycle were also investigated.

Immunohistochemistry of TC tissues revealed a significantly increased CAIX expression in PTC, FTC and ATC in comparison to the normal non-tumorous thyroid tissue. Further, the clinicopathological data showed that a higher CAIX expression was associated with lymph node metastasis. The analysis of TCGA data also demonstrated that a higher expression of CAIX-mRNA was associated with advanced tumor stages, metastasized TC and with a poor overall survival of TC patients. The *in vitro* analyses showed that the CAIX expression was increased in tumorspheres in comparison to monolayers and was associated with an increased expression of stemness markers. The genetic knockdown and pharmacological inhibition of CAIX with MZM led to a reduced tumor cell proliferation and tumorsphere formation by an induction of apoptosis and a cell-cycle arrest.

In summary, our results indicate that CAIX represents a potential target for the treatment of advanced TC. However, in order to validate our results further investigations on TC patient samples and functional *in vivo* experiments are needed.

2 Abkürzungsverzeichnis

ASK	anaplastisches Schilddrüsenkarzinom
ATC	anaplastic thyroid cancer
BRAF	v-RAF murine sarcoma viral oncogene homolog B1
CAIX	Carboanhydrase IX (deutsch)/ Carbonic-anhydrase IX (englisch)
DMSO	Dimethylsulfoxid
FSK	follikuläres Schilddrüsenkarzinom
FTC	follicular thyroid cancer
HIF-1α	Hypoxia-Inducible Factor 1 α
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MSK	medulläres Schilddrüsenkarzinom
MTC	medullary thyroid cancer
MZM	Methazolamid (deutsch)/ Methazolamide (englisch)
OCT4	Octamer-binding transcription factor 4
PI3K	Phosphoinositide 3-Kinase
PROM1	Prominin 1
PSK	papilläres Schilddrüsenkarzinom
PTC	papillary thyroid cancer
RET	Rearranged during transfection
shRNA	short hairpin RNA
SK	Schilddrüsenkarzinom
TC	thyroid cancer
TCGA	The Cancer Genome Atlas
TIC	tumor-initiating cells
TIZ	Tumor-initiiierende Zellen
VEGF	Vascular endothelial growth factor

3 Übergreifende Zusammenfassung

3.1 Einleitung

3.1.1 Das Schilddrüsenkarzinom und seine Subtypen

Das Schilddrüsenkarzinom (SK) ist die häufigste bösartige endokrine Tumorerkrankung.¹ Dabei hat die Inzidenzrate des SK in den letzten 30 Jahren zugenommen, was unter anderem auf den häufigeren Gebrauch von bildgebenden Verfahren, wie z.B. die Sonographie zurückzuführen ist. Hierbei stellt das SK oftmals einen Zufallsbefund dar.¹ Das SK kann in verschiedene Subtypen unterteilt werden. Zu den häufigsten Subtypen gehören das papilläre Schilddrüsenkarzinom (PSK) mit einem Anteil von 70 bis 80 % und das follikuläre Schilddrüsenkarzinom (FSK) mit 14 %.¹ Diese beiden Subtypen entstehen aus den Zellen des Follikelepithels und gehören zu den differenzierten SK.² Das PSK gilt dabei als das am wenigsten aggressive SK.¹ Ein seltener Subtyp des SK mit einem Anteil von 2% ist das anaplastische Schilddrüsenkarzinom (ASK), welches sich auch aus den Zellen des Follikelepithels entwickelt.^{1,2} Das ASK ist im Gegensatz zu dem PSK und FSK undifferenziert.² Das ASK gilt als der aggressivste Subtyp des SK, da es bereits in einem frühen Stadium in die umgebenen Lymphknoten metastasiert und Fernmetastasen bildet.^{1,2} Ein weiterer Subtyp des SK mit einem Anteil von 3 % ist das medulläre Schilddrüsenkarzinom (MSK). Dieses entsteht aus Calcitonin-produzierenden parafollikulären C-Zellen und ist daher ein separater Subtyp.² Das PSK und das FSK sind dafür bekannt, eine gute Prognose zu haben und können aus einer Kombination aus Operation und Radioiodtherapie gut behandelt werden.³ Es gibt jedoch auch aggressivere Varianten dieser beiden SK-Subtypen. Das Tall-Cell SK ist beispielsweise eine aggressivere Variante des PSK.⁴ Bei den aggressiveren Varianten des PSK ist bekannt, dass sie häufiger eine BRAF-Mutation als andere SK-Subtypen vorweisen.⁴ Da es keine einheitlichen Diagnosekriterien für die aggressiveren Varianten des PSK gibt, wird z.B. das Tall-Cell SK immer noch unterdiagnostiziert,⁵ wodurch betroffenen Patienten eine optimale Behandlung für das aggressive SK verwehrt bleibt.⁶ In den letzten Jahren wurden neue Therapieoptionen mittels Anti-Angiogenese-Multikinase Inhibitoren, wie z.B. Sorafenib (ein Tyrosinkinaseinhibitor) beim metastasierten PSK und FSK

entwickelt.⁷ Allerdings werden weiterhin Resistenzen gegenüber den Monotherapien beobachtet und zielgerichtete Tumortherapien sind limitiert.⁷ So entwickeln ca. 5 - 15 % der Patienten mit einem differenzierten SK ein Rezidiv oder Metastasen, welche resistent gegenüber der Radioiodtherapie sind.⁸ Beispielsweise weisen 20 % der Tall-Cell SK eine Resistenz gegenüber der Radioiodtherapie auf.⁶ Aggressive SK wie z.B. das metastasierte FSK oder ASK haben weiterhin eine niedrige 5-Jahresüberlebensrate von 10 %.^{9,10} Insbesondere das ASK ist bei Diagnose häufig inoperabel und weist eine hohe Resistenz gegenüber einer Radiatio und einer Chemotherapie auf.^{9,10} Daher versterben heutzutage immer noch die meisten Patienten mit einem ASK innerhalb des ersten Jahres nach Erstdiagnose.^{9,10}

3.1.2 Tumor-initiiierende Zellen

Zuletzt wurde in Studien gezeigt, dass Tumor-initiiierende Zellen (TIZ) entscheidende Faktoren für die Entstehung und Progression eines Tumors sind sowie mit der Entwicklung von Therapieresistenzen assoziiert wurden. Hierbei präsentieren TIZ eine kleine Subpopulation von Tumorzellen, welche sich durch Stammzeleigenschaften wie einem starken Selbsterneuerungspotenzial und der Fähigkeit zur Tumorinitiierung auszeichnen.¹¹⁻¹³ Mittlerweile gibt es einige Studien, die auf die Existenz von TIZ in unterschiedlichen SK-Subtypen wie im PSK, FSK und ASK hinweisen.^{14,15}

3.1.3 Hypoxie und dessen Einfluss auf das Tumormikromilieu

Hypoxie gilt als einer der wichtigsten Einflussfaktoren auf das Tumormikromilieu und fördert die Persistenz von TIZ.¹⁶⁻¹⁸ Durch die Veränderung des Tumormikromilieus und die damit verbundene Modifizierung des Tumorzellmetabolismus trägt Hypoxie auch zur Entwicklung von Tumorresistenzen gegenüber herkömmlichen antitumoralen Therapien bei.¹⁹⁻²¹ Daher könnte die Bestimmung der regulatorischen Komponenten des Signalwegs von Hypoxie neue Therapieoptionen für die Behandlung von aggressiven SK-Subtypen aufzeigen.

3.1.4 Carboanhydrase IX und ihre Funktion in Tumoren

Die Carboanhydrase IX (CAIX) ist ein Enzym, welches unter hypoxischen Bedingungen in Tumorzellen hochreguliert wird. Dieses wurde bereits in soliden Tumoren, wie z.B. im Brust- oder Blasenkarzinom, nachgewiesen.²²⁻²⁴ CAIX wird hierbei fast ausschließlich im Tumorgewebe exprimiert.²⁴ Im normalen, tumorfreien Gewebe lässt sich CAIX nur im Gastrointestinaltrakt auf der basolateralen Membran von Enterozyten auf einem niedrigen Niveau vorfinden.²⁵ Es gilt daher als einer der wichtigsten Marker eines hypoxischen Milieus.²⁴ CAIX ist ein homodimeres Transmembran-Glycoprotein, welches die Reaktion von Kohlendioxid zu Bicarbonat und einem Proton katalysiert.²⁴ Die katalytische Aktivität von CAIX trägt zur pH Regulation und zur extrazellulären Azidose bei. Die Expression von CAIX ist daher entscheidend für das Überleben von Tumorzellen unter hypoxischen Bedingungen.^{24,26-29} In klinischen Studien konnte dargelegt werden, dass die Überexpression von CAIX mit einem höheren Risiko für das Auftreten von Metastasen und einem schlechten Patienten-Outcome assoziiert ist. Dieses wurde z.B. im Blasen-, Brust- und Lungenkarzinom festgestellt.^{22,23,30} Im SK-Subtyp MTK konnte festgestellt werden, dass eine erhöhte CAIX Expression mit aggressiveren Subtypen und dem Auftreten loco-regionaler Metastasen assoziiert ist.^{31,32} Die Expression und pathophysiologische Rolle von CAIX im PSK, FSK und ASK konnte allerdings bisher noch nicht geklärt werden.

3.1.5 Fragestellung und Ziele der Dissertation

Ziel der vorgelegten Dissertation war die Untersuchung der Bedeutung von CAIX in der Progression des SK und ob CAIX ein potenzielles Zielmolekül zur Eliminierung von TIZ darstellt. Hierzu wurde die Expression von CAIX in primärem Tumorgewebe sowie in SK-Zelllinien, welche die Subtypen des PSK, FSK und ASK repräsentieren, untersucht. Es erfolgte die Validierung der Ergebnisse mithilfe eines The Cancer Genome Atlas (TCGA) Datasets. Des Weiteren wurde die Bedeutung von CAIX für das Zellüberleben im SK und die TIZ-Aktivität *in vitro* untersucht.

Die Ergebnisse dieser Dissertation sollen dazu beitragen, einen Einblick in die funktionelle Rolle von CAIX im SK zu geben und die Arbeit könnte somit CAIX als ein potenzielles Zielmolekül in der Therapie des SK hervorheben.

3.2 Ergebnisse

3.2.1 Expression der Carboanhydrase IX im Gewebe des Schilddrüsenkarzinoms

Für die Untersuchung der CAIX-Expression im SK wurden immunhistochemische Färbungen von Tissue Microarrays, die Gewebeproben von PSK (n=64), FSK (n=36) und ASK (n=14) enthielten, vorgenommen und mit tumorfreiem Normalgewebe (n=18) der Schilddrüse verglichen. 96 % der SK-Gewebeproben wiesen eine CAIX-Expression auf, wohingegen 78 % des Normalgewebes CAIX gar nicht exprimierten. Auch die Anfärbe-Intensität war bei den SK-Gewebeproben stärker im Vergleich zum tumorfreien Gewebe. Des Weiteren zeigten die klinisch-pathologischen Daten, dass eine erhöhte CAIX-Expression signifikant mit dem Auftreten von Lymphknotenmetastasen im differenzierten SK assoziiert ist. Ein Zusammenhang zwischen der CAIX-Expression und Tumorstadien konnte allerdings nicht festgestellt werden (siehe Schmidt et al., Fig. 1 und Supplementary Table S1). Zur weiteren Validierung der CAIX-Expressionsdaten wurden Datasets des SK des The Cancer Genome Atlas (TCGA) analysiert und die Höhe der CAIX-mRNA-Expression mit klinischen Parametern mithilfe von cBioportal korreliert. Die Datenanalyse ergab, dass 5 % der PSK und FSK eine starke Expression von CAIX-mRNA zeigen und eine hohe Expression vor allem in fortgeschrittenen Tumorstadien des SK vorgefunden wird. Zusätzlich konnte mithilfe der Kaplan-Meier Analyse festgestellt werden, dass Patienten mit einer hohen Expression der CAIX-mRNA ein kürzeres Gesamt-Überleben aufweisen als Patienten mit einer niedrigen CAIX-mRNA-Expression (siehe Schmidt et al., Fig. 2).

3.2.2 Erhöhte Carboanhydrase IX-Expression in Tumorsphären und Assoziation von Carboanhydrase IX mit der Expression von Stammzellmarkern

Da in einigen Studien beschrieben wurde, dass die Hypoxie wichtig für die Persistenz von TIZ ist und CAIX ein Hypoxie-reguliertes Enzym repräsentiert, wurde die CAIX-Expression in Tumorsphären (im SK auch als Thyrosphären bezeichnet) im Vergleich zu Monolayern von SK-Zelllinien untersucht. Als SK-Zelllinien wurden BCPAP (PSK), FTC 133 (FSK) und 8505 C (ASK) verwendet. Hierbei zeigte sich, dass die Oberflächenexpression von CAIX in Thyrosphären im Vergleich zu der von Monolayern erhöht war. Des Weiteren war sowohl die mRNA- als auch die Proteinexpression von CAIX sowie der Stammzellmarker NANOG und Octamer-binding transcription factor 4 (OCT4) in den Thyrosphären signifikant erhöht im Vergleich zu Monolayern der SK-Zelllinien (siehe Schmidt et al., Fig. 3 und Supplementary Table S2).

3.2.3 Hypoxie induziert eine Carboanhydrase IX-Überexpression in Schilddrüsenkarzinom-Zellen

Um die Auswirkungen von Hypoxie auf die CAIX-Expression der SK-Zellen bestimmen zu können, wurden die SK-Zelllinien in einer Hypoxiekammer mit 1 % Sauerstoff inkubiert und anschließend die CAIX-Expression bestimmt. Unter hypoxischen Bedingungen kam es zu einer Erniedrigung des pH-Wertes im extrazellulären Medium (pH = 6,61-6,91 unter Hypoxie vs. pH = 7,03-7,33 unter Normoxie). Des Weiteren konnte unter Hypoxie eine Induktion der CAIX-Expression in den SK-Zelllinien beobachtet werden. Hierbei zeigte FTC 133 die höchste CAIX-Expression von allen 3 SK-Subtypen (siehe Schmidt et al., Fig. 4).

3.2.4 Regulation der Tumorzellproliferation und Aktivität von Tumor-initierenden Zellen durch Carboanhydrase IX

Um die Funktion von CAIX in der SK-Zellproliferation und TIZ-Aktivität überprüfen zu können, wurde ein genetischer CAIX-Knockdown in den SK-Zelllinien BCPAP, FTC 133 und 8505 C mithilfe von 2 unabhängigen short hairpin RNAs (shRNA) durchgeführt. Als Kontrolle dienten Zellen der SK-Zelllinien, welche mit einer unspezifischen scramble-shRNA transduziert worden sind. Durch beide spezifischen shRNAs konnte die CAIX-Proteinexpression in allen 3 SK-Zelllinien

signifikant reduziert werden. Ein CAIX-Knockdown führte sowohl unter Hypoxie als auch unter Normoxie zu einer signifikanten Hemmung der Proliferation von SK-Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen. Des Weiteren resultierte ein Knockdown von CAIX in einer verminderten Fähigkeit, Thyrosphären zu bilden im Vergleich zur Kontrolle. Dieses wurde insbesondere bei den Zelllinien BCPAP und 8505 C festgestellt. Unter hypoxischen Bedingungen verdeutlichte sich der inhibitorische Effekt vor allem auf die TIZ-Aktivität. Hier zeigte sich in allen 3 Zelllinien unter CAIX-Knockdown eine stark reduzierte Entwicklung von Thyrosphären im Vergleich zur Kontrolle (siehe Schmidt et al., Fig. 5 und Supplementary Fig. S1).

3.2.5 Inhibition von Carboanhydrase IX durch Methazolamid reduziert die Schilddrüsenkarzinom-Zellproliferation und Aktivität von Tumor-initiiierenden Zellen *in vitro* durch eine Induktion von Apoptose

Um die weiteren Effekte einer pharmakologischen CAIX-Inhibition auf das Tumorzellüberleben und die TIZ-Aktivität untersuchen zu können, wurden die SK-Zellen mit 2 unterschiedlichen Konzentrationen (100 μ M und 200 μ M) des potenten Carboanhydrase-Inhibitors Methazolamid (MZM) inkubiert. Mit Dimethylsulfoxid (DMSO) behandelte SK-Zellen dienten als Kontrolle. Die CAIX-Inhibition führte zu einer signifikanten Reduktion der CAIX-Expression auf mRNA- und Proteinebene. Hierbei führte eine CAIX-Inhibition zur verminderten Zellproliferation im Vergleich zur Kontrolle in allen Zelllinien sowohl unter Normoxie als auch unter Hypoxie. Des Weiteren kam es unter der CAIX-Inhibition zu einem Anstieg von apoptotischen Zellen in allen Zelllinien unter hypoxischen Bedingungen, wohingegen in Normoxie MZM nur bei den 8505 C-Zellen eine Apoptose induzierte. Um aufzuklären, wie MZM in Normoxie zu einer Reduktion der Zellexpansion von BCPAP und FTC 133-Zellen führt, jedoch ohne eine vermehrte Apoptose zu induzieren, wurde eine Zellzyklus-Analyse durchgeführt. Diese zeigte unter normoxischen Bedingungen, dass nach der Behandlung mit MZM eine signifikante Reduktion der Zellen in der S-Phase des Zellzyklus stattfand und es somit zum Zellzyklus-Arrest kam. Zur Beurteilung der TIZ-Aktivität unter CAIX-Inhibition wurden Thyrosphären unter MZM-Behandlung angezüchtet. Hier zeigte sich nach 14 Tagen, dass 200 μ M von MZM zu einer

signifikanten Reduktion der Thyrosphären-Anzahl führte, insbesondere bei BCPAP sowohl unter Normoxie als auch Hypoxie. Zusätzlich führte die Behandlung der SK-Zellen mit MZM zu einer verminderten Größe der Thyrosphären in allen 3 Zelllinien (siehe Schmidt et al., Fig. 6 und Supplementary Fig. 2A und B).

3.3 Diskussion

Bisher wurden nur wenige Studien veröffentlicht, welche die CAIX-Expression und dessen funktionelle Rolle im SK untersucht haben. Untersuchungen zur funktionellen Rolle von CAIX in anderen Tumorentitäten, wie z.B. im malignen Melanom oder Mammakarzinom, haben bisher vielversprechende Ergebnisse geliefert.^{33,34} Daher war es das Ziel dieser Arbeit, CAIX funktionell im SK zu untersuchen und zu erfassen, ob CAIX auch eine entscheidende Rolle in der Pathogenese des SK spielt. Tatsächlich belegen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass CAIX ein potenzieller prognostischer Marker und ein potenzielles therapeutisches Zielmolekül in der Therapie des SK darstellt. Takacova et al. haben im SK die CAIX-Expression untersucht. Hierbei demonstrierten Takacova et al. eine hohe CAIX-Expression im MSK und ASK. Im Vergleich dazu, wies nur ein geringer Anteil des PSK und FSK eine CAIX-Expression auf. Dieses deutet auf eine funktionelle Rolle von CAIX in der Entwicklung der aggressiveren Tumorsubtypen des SK hin.³² Die Ergebnisse der aktuellen Arbeit zeigen hingegen, dass sowohl 100 % der ASK- sowie PSK-Gewebeproben als auch 86 % der FSK-Proben CAIX exprimierten. Auch Nahm et al. untersuchten die CAIX-Expression in einzelnen SK-Subtypen. Hierbei wurde beobachtet, dass CAIX und weitere an der Glykolyse beteiligte Proteine unterschiedlich in den einzelnen SK-Subtypen exprimiert wurden. So wurde eine hohe CAIX-Expression im MSK und im BRAF^{V600E}-mutierten PSK detektiert, eine Korrelation zwischen der CAIX-Expression und dem Patienten-Outcome konnte jedoch nicht nachgewiesen werden.³⁵ Die Ergebnisse dieses Projektes zeigen hingegen, dass die CAIX-Expression mit einem erhöhten Risiko zur Ausbildung von Lymphknotenmetastasen in differenzierten SK-Subtypen assoziiert war. Ähnliche Ergebnisse ergab die TCGA-Datenanalyse. Hier zeigte sich eine Korrelation zwischen einer hohen CAIX-mRNA-Expression und einem fortgeschrittenen

Tumorstadium. Des Weiteren korrelierte eine hohe CAIX-mRNA-Expression mit einem schlechten Gesamtüberleben der Patienten beim differenzierten SK. Zusammenfassend deutet dies auf eine Assoziation der CAIX-Expression mit einem aggressiven Tumorverhalten sowie einem fortgeschrittenen Tumorleiden im SK hin. Um diese Ergebnisse weiter validieren zu können, sind jedoch prospektive Untersuchungen der CAIX-Expression in größeren Patientenkohorten erforderlich. Als weiteres Ziel dieses Projekts wurde die pathophysiologische Rolle von CAIX im SK näher untersucht.

Da es sich bei CAIX um ein Hypoxie-induziertes Enzym handelt, wurde in dieser Arbeit zunächst die Auswirkung von Hypoxie auf die CAIX-Expression untersucht. Unter hypoxischen Bedingungen konnte eine Induktion der CAIX-Expression in den SK-Zellen unterschiedlicher Subtypen festgestellt werden, wohingegen sich in der Normoxie nur eine geringe CAIX-Expression zeigte. Burrows et al. demonstrierten ebenfalls, dass unter Hypoxie HIF-1 α (Hypoxia-Inducible Factor 1 α) und CAIX stark exprimiert wurden, insbesondere in ASK- und FSK-Zelllinien.³⁶

Mithilfe eines genetischen Knockdowns von CAIX konnte gezeigt werden, dass die SK-Zellproliferation unter Hypoxie nahezu vollständig gehemmt wurde, was auf die wichtige Rolle von CAIX in der durch Hypoxie induzierten Zellproliferation hindeutet. CAIX scheint jedoch nicht nur unter hypoxischen Bedingungen bedeutend zu sein, sondern auch in Normoxie. Denn auch unter Normoxie kam es zu einer verminderten Zellproliferation nach CAIX-Knockdown. Die Ergebnisse dieses Projekts legen nicht nur eine verminderte Zellproliferation nach CAIX-Knockdown dar, sondern auch nach einer pharmakologischen CAIX-Inhibition mit MZM wurde die Zellproliferation sowohl unter Normoxie als auch unter Hypoxie signifikant reduziert. Des Weiteren zeigen unsere Ergebnisse, dass die Hemmung der Zellexpansion durch einen Zellzyklusarrest in Normoxie und durch eine Induktion der Apoptose in Hypoxie bedingt ist.

Zuletzt wurde die CAIX-Bedeutung für die Tumorprogression in einigen Studien dahingehend hervorgehoben, dass eine CAIX-Expression nicht nur durch Hypoxie, sondern auch durch Hypoxie-unabhängige Signalwege induziert werden kann.^{32,37,38} Takacova et al. beschreiben hierzu im MSK, dass über RET

(Rearranged during transfection) unabhängig von Hypoxie die Kinasen MAPK (Mitogen-activated protein kinase) und PI3K (Phosphoinositide 3-Kinase) aktiviert werden. Dieses führt zu einer HIF-1 α -Expression, wodurch CAIX exprimiert wird.³² Diese Hypoxie-unabhängige Induktion der CAIX-Expression konnte in mehreren Tumorzellmodellen, u.a. im Glioblastom, nachgewiesen werden.^{37,38} Somit ist CAIX auch direkt an der Tumorzellproliferation und -invasion über die Interaktion mit verschiedenen Signalwegen beteiligt. Unterstützt wird die Hypothese dadurch, dass die Unterdrückung oder pharmakologische Inhibition von CAIX zu einer Reduktion des Tumorzellwachstums sowohl *in vitro* als auch *in vivo* führt.^{26,39,40}

Zuletzt berichteten einige Studien über eine Subpopulation von Zellen, welche auch als TIZ bezeichnet werden und mit Stammzeleigenschaften assoziiert sind.⁴¹⁻⁴³ Diese speziellen Zellen weisen als Eigenschaften u.a. ein Selbsterneuerungspotenzial, Therapieresistenz und die Fähigkeit zur Tumorinitiierung auf.⁴³ TIZ werden daher als entscheidender Faktor in der Entstehung einer Tumorprogression oder eines Tumorrezidivs betrachtet. Morrison et al. zeigte, dass TIZ, wenn sie unter nicht-anhaftenden, serum-freien Bedingungen gezüchtet werden, aufgrund ihrer Fähigkeit zur Selbsterneuerung bzw. asymmetrischen Zellteilung drei-dimensionale Sphären ausbilden. Mithilfe der Sphärenbildung können TIZ *in vitro* nachgewiesen und ihre Frequenz in einer Tumorzellpopulation bestimmt werden.⁴³ Interessanterweise berichteten Studien auch darüber, dass CAIX mit Stammzeleigenschaften in soliden Tumoren assoziiert ist.^{44,45} Soweit uns bekannt ist, zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit zum ersten Mal, dass eine CAIX-Expression mit Stammzeleigenschaften in SK-Zellen assoziiert ist. So ließen sich sowohl eine erhöhte CAIX-Expression als auch eine erhöhte Expression der Selbsterneuerungs- und Pluripotenz-Marker NANOG⁴⁶ und OCT4⁴⁷ sowie des TIZ-Markers Prominin 1 (PROM1)⁴⁸ in Thyrosphären im Vergleich zu Monolayern nachweisen.

So war ein weiteres Ziel dieser Arbeit, den Einfluss von CAIX auf die TIZ-Aktivität und damit auf die Stammzeleigenschaften in den SK-Zellen zu untersuchen. Andere Studien zeigten, dass die Hypoxie und CAIX mit einer erhöhten Expression von Stammzellmarkern assoziiert ist. Dieses wurde im Melanom⁴⁴, Mammakarzinom⁴⁵

und im Gliom⁴⁹ nachgewiesen. In Melanom-Zellen resultierte die Inkubation unter hypoxischen Bedingungen in einer verstärkten Expression von CAIX und den Stammzellmarkern PROM1, NANOG und OCT4.⁴⁴ Des Weiteren wurden verstärkt TIZ gebildet, was mit einer stärkeren Bildung von Tumorsphären belegt werden konnte.⁴⁴ Ledaki et al. gehen sogar davon aus, dass CAIX die Transkription von Stammzell-typischen Genen reguliert, was zu einer Selbsterneuerung und Invasion von Tumorzellen führt.⁴⁵ Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen nicht auf eine Förderung der TIZ-Aktivität durch CAIX schließen. Unsere Ergebnisse zeigen jedoch, dass die CAIX-Inhibition zu einer Reduktion der Tumorzellproliferation und der Stammzellfähigkeit, Sphären zu bilden, führt. Dies zeigt, dass CAIX mit Stammzeleigenschaften von SK-Zellen assoziiert und wichtig für das Überleben von SK-Zellen und insbesondere von TIZ ist.

Ähnlich zu den Ergebnissen dieser Studie konnte auch in anderen soliden Tumoren, wie im Mamma- oder Zervixkarzinom, festgestellt werden, dass eine CAIX-Inhibition die Expansion und Funktion der TIZ beeinträchtigt.^{33,50,51}

Zum aktuellen Zeitpunkt sind keine selektiven CAIX-Inhibitoren im klinischen Gebrauch. Daher wurde für diese Studie der unselektive Carboanhydrase-Inhibitor MZM, ein Sulfonamid-Derivat, verwendet.^{52,53} MZM wird zur Therapie des Glaukoms und der Höhenkrankheit eingesetzt.^{52,54} In Studien konnte auch dessen inhibitorische Wirkung auf CAIX nachgewiesen werden.^{52,54,55} Im Pankreaskarzinom wurde die Wirkung von MZM alleine und in Kombination mit Gemcitabin auf das Tumorwachstum *in vitro* und *in vivo* getestet. Hierbei konnte eine stärkere Inhibition des Tumorwachstums nach Behandlung mit MZM zusammen mit Gemcitabin als nach Behandlung mit MZM alleine nachgewiesen werden. Des Weiteren konnte *in vivo* demonstriert werden, dass sowohl MZM alleine als auch die Kombinationstherapie die VEGF (Vascular endothelial growth factor)-Expression reduzierten. Damit konnte belegt werden, dass MZM auch eine hemmende Wirkung auf das Tumor-Gefäßwachstum hat.⁵⁶ Insgesamt zeigen diese Ergebnisse, dass eine Therapie mit MZM in Kombination mit der Standardtherapie vielversprechende Ergebnisse hervorbringen könnte. Andere Studien hemmten die CAIX-Aktivität mit neuen niedermolekulare Inhibitoren.^{53,57} Lock et al. verwendeten niedermolekulare

CAIX-Inhibitoren und behandelten damit Mammakarzinomzellen. Dies führte zu einer Reduktion der Tumorsphären-Formation unter hypoxischen Bedingungen.³³ Ein aktuell in vielen neueren Studien verwendeter niedermolekularer selektiver CAIX-Inhibitor ist SLC-0111.^{34,55,58,59} Peppicelli et al. wiesen eine signifikante Reduktion der Tumorsphären-Formation von Melanom-Zellen nach Inhibition von CAIX mit SLC-0111 nach.³⁴ In einer Phase 1-Studie wurde bereits die Sicherheit von SLC-0111 bei Patienten mit einem fortgeschrittenen soliden Tumorleiden untersucht, wenn auch nur bei einer geringen Anzahl an Studienteilnehmern. Hierbei konnte eine gute Verträglichkeit von SLC-0111 nachgewiesen werden.⁵⁸ Des Weiteren wird aktuell SLC-0111 in Kombination mit Gemcitabin in einer Phase Ib-Studie bei Patienten mit einem CAIX-positiven Pankreaskarzinom untersucht (NCT03450018).⁵⁹

Die Ergebnisse der hier vorgelegten Studie deuten darauf hin, dass die zielgerichtete CAIX-Inhibition die Tumorprogression und Selbsterneuerungsfähigkeit von SK-Zellen reduziert. Jedoch sind *in vivo* Untersuchungen notwendig, um die erzielten *in vitro* Ergebnisse validieren zu können.

Zusammenfassend konnten wir zeigen, dass CAIX ein wichtiger Faktor im Überleben und der TIZ-Aktivität von SK-Zellen ist. Damit stellt CAIX einen vielversprechenden Marker für die Tumorprognose und ein potenzielles Zielmolekül für die Therapie des SK dar. Die Standardtherapie des fortgeschrittenen SK in Kombination mit CAIX-Inhibitoren könnte aussichtsreiche Ergebnisse liefern.

4 Übersicht der zur Veröffentlichung angenommenen Publikation

Schmidt J, Oppermann E, Blaheta RA, Schreckbach T, Lunger I, Rieger MA, Bechstein WO, Holzer K, Malkomes P. Carbonic-anhydrase IX expression is increased in thyroid cancer tissue and represents a potential therapeutic target to eradicate thyroid tumor-initiating cells. *Mol Cell Endocrinol.* 2021;535:111382. doi:10.1016/j.mce.2021.111382.

Schmidt J, Oppermann E, Bechstein WO, Holzer K, Malkomes P. Targeting hypoxia inducible Carbonic-Anhydrase-IX suppresses tumor-initiating cells in thyroid cancer. *Langenbecks Arch Surg.* 2017; 402(7):1137. doi:10.1007/s00423-017-1622-5.

Schmidt J, Oppermann E, Bechstein WO, Holzer K, Malkomes P. Blocking hypoxia-inducible Carbonic-Anhydrase-IX inhibits proliferation and cell renewal of thyroid tumor initiating cells. *Langenbecks Arch Surg.* 2016;401(7):1076. doi:10.1007/s00423-016-1510-4.



Carbonic-anhydrase IX expression is increased in thyroid cancer tissue and represents a potential therapeutic target to eradicate thyroid tumor-initiating cells

Jennifer Schmidt^a, Elsie Oppermann^a, Roman A. Blaheta^b, Teresa Schreckenbach^a,
 Ilaria Lunger^{a,c}, Michael A. Rieger^{c,d,e}, Wolf Otto Bechstein^a, Katharina Holzer^{a,f,1},
 Patrizia Malkomes^{a,1,*}

^a Hospital of the Goethe University Frankfurt, Department of General, Visceral and Transplant Surgery, Theodor-Stern-Kai 7, 60590, Frankfurt am Main, Germany

^b Hospital of the Goethe University Frankfurt, Department of Urology, Theodor-Stern-Kai 7, 60590, Frankfurt am Main, Germany

^c Hospital of the Goethe University Frankfurt, Department of Inner Medicine, Hematology/Oncology, Theodor-Stern-Kai 7, 60590, Frankfurt am Main, Germany

^d German Cancer Consortium and German Cancer Research Center (DKFZ), Im Neuenheimer Feld 280, 69120, Heidelberg, Germany

^e Frankfurt Cancer Institute, Paul-Ehrlich-Straße 42-44, 60596, Frankfurt am Main, Germany

^f Philipps University Hospital of Marburg, Section of Endocrine Surgery, Department of Visceral-, Thoracic- and Vascular Surgery, Baldingerstraße, 35043, Marburg, Germany

ARTICLE INFO

Keywords:

Carbonic-anhydrase IX
 Thyroid cancer
 Hypoxia
 Tumor-initiating cells
 Methazolamide

ABSTRACT

The expression of Carbonic-anhydrase IX (CAIX) in thyroid cancer (TC) subtypes was determined and its role in cancer cell growth and tumor-initiating cells (TICs) investigated. Immunohistochemistry in 114 TC patients revealed that CAIX expression was increased in tumor specimens of papillary, follicular and anaplastic TCs compared to normal thyroid tissue. Clinicopathological data indicated that lymph node metastases were more frequent in patients with high CAIX expression. The Cancer Genome Atlas database analysis demonstrated that a strong CAIX-mRNA expression was associated with advanced tumor stages and poor survival in TCs. In TC cell lines, CAIX expression was elevated in tumorspheres compared to monolayer cultures and was associated with an increased expression of stemness markers. Genetic knockdown or pharmacological inhibition of CAIX suppressed cell proliferation and the TIC ability to form tumorspheres by an induction of apoptosis and cell-cycle arrest. These findings suggest CAIX as a potential prognostic marker and a therapeutic target for thyroid cancer.

1. Introduction

Thyroid cancer (TC) is the most common endocrine malignancy with increasing incidence rates in recent years (Nguyen et al., 2015). The majority of thyroid cancers arises from follicular epithelial cells and belongs to the subtype of papillary thyroid carcinoma (PTC) and follicular thyroid carcinoma (FTC) (Fagin and Wells, 2016). Anaplastic thyroid cancer (ATC) also derives from follicular cells, but represents a rare and undifferentiated subtype accounting for only 2% of all thyroid cancers (Fagin and Wells, 2016; Nguyen et al., 2015). Medullary thyroid carcinoma (MTC) originates from calcitonin-producing parafollicular C cells and thus represents a separate subtype (Fagin and Wells, 2016).

Although most cases of PTC and FTC are associated with a good prognosis and can be treated by surgical resection in combination with radioactive iodine therapy (RAI), some histological subtypes are associated with poor prognosis, e.g. tall-cell variant (TCV) of PTC (Xing et al., 2005). These aggressive variants of PTC show higher BRAF mutation prevalence than other thyroid cancers (Jin et al., 2021). Due to a lack of unanimous diagnostic criteria for PTC variants, discrepancies in the diagnosis of mainly TCV still exist (Hernandez-Prera et al., 2017), resulting in a suboptimal treatment of affected patients (Coca-Pelaz et al., 2020).

Despite some progress in the treatment of metastatic PTC and FTC by the introduction of anti-angiogenic multikinase inhibitors (e.g. Sorafenib), resistance to current monotherapies is frequently observed and

* Corresponding author. Hospital of the Goethe University Frankfurt Department of General, Visceral and Transplant Surgery, Theodor-Stern-Kai 7, 60590, Frankfurt am Main, Germany.

E-mail address: Patrizia.Malkomes@kgu.de (P. Malkomes).

¹ these authors contributed equally to this work.

<https://doi.org/10.1016/j.mce.2021.111382>

Received 6 March 2021; Received in revised form 23 June 2021; Accepted 29 June 2021

Available online 30 June 2021

0303-7207/© 2021 Elsevier B.V. All rights reserved.

Abbreviation	
7-AAD	7-Aminoactinomycin D
$\Delta\Delta Ct$	delta-delta cycle threshold
ABCG2	ATP-binding cassette super-family G Member 2
AJCC	American Joint Committee on Cancer
ATC	anaplastic thyroid cancer
BRAF	Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B
CAIX	Carbonic-anhydrase IX
Ct	cycle threshold
DAB	3,3'-Diaminobenzidine
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DMSO	Dimethyl Sulfoxide
DSMZ	German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH
ECACC	European Collection of Authenticated Cell Cultures
FTC	follicular thyroid cancer
GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
GOI	gene of interest
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MFI	mean fluorescence intensity
MOI	multiplicity of infection
MTC	medullary thyroid cancer
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
MZM	Methazolamide
OCT4	Octamer-binding transcription factor 4
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PROM1	Prominin 1
PTC	papillary thyroid cancer
RAI	radioactive iodine therapy
RET	rearranged during transfection
STR	short tandem repeat
TC	thyroid cancer
TCGA	The Cancer Genome Atlas
TCV	tall-cell variant
TIC	tumor-initiating cell
TMA	tissue microarray

advanced targeted therapies are limited (Nucera, 2016). Approximately, 5–15% of patients with differentiated thyroid cancer will develop recurrence or metastases showing resistance to RAI and thus poor prognosis (Worden, 2014), e.g. almost 20% of TCV are resistant to RAI (Coca-Pelaz et al., 2020). Aggressive thyroid cancer subtypes like FTC with metastases or ATC, still demonstrate a low 5-year survival rate of about 10% and patients with ATC usually succumb to their disease within a year after diagnosis regardless of the treatment modalities (Kaatsch et al., 2017; Saini et al., 2018).

In this context, current findings imply that tumor-initiating cells (TICs) are principle key drivers in tumor growth and therapy resistance. TICs represent a small subpopulation of cancer cells which are characterized by a strong self-renewal potential and the ability to initiate and promote tumor growth (Bhatia, 2014; Croker and Allan, 2008; Qureshi-Baig et al., 2017). Meanwhile, several reports have been published pointing to the existence of TICs in different thyroid cancer subtypes (Mitsutake et al., 2007). Hypoxia, as one of the most important features of the tumor microenvironment, is considered to particularly promote the persistence of TICs (Li et al., 2009; Mathieu et al., 2011; Ullmann et al., 2016). This is notable, since hypoxia contributes to therapy resistance by altering cancer cell metabolism (Gray et al., 1953; Muz et al., 2015; Rohwer and Cramer, 2011). Therefore, determining regulatory components of the signaling pathway of hypoxia might lead to new therapy options in the treatment of aggressive thyroid cancer subtypes.

The Carbonic-anhydrase IX (CAIX) is up-regulated by hypoxia as shown in solid cancers (Chen et al., 2018; Klatte et al., 2009; Supuran, 2012). Quite interestingly, CAIX is almost exclusively expressed in tumor tissue, and therefore considered one of the most prominent markers pointing to a hypoxic environment (Supuran, 2012). CAIX represents a homodimeric transmembrane glycoprotein which catalyzes the conversion of carbon dioxide to bicarbonate ions and protons (Supuran, 2012). This catalytic activity plays an important role in pH regulation and extracellular acidosis, which is critical for survival of tumor cells under hypoxia and acidosis (Chiche et al., 2009; Li et al., 2011; Supuran, 2012; Švastová et al., 2004; Swietach et al., 2007).

Different clinical studies have shown that overexpression of CAIX is associated with a higher risk of metastatic spread as well as a poor patient outcome, e.g. in bladder (Klatte et al., 2009), breast (Chen et al., 2018) and lung cancer (Kon-no et al., 2006). Studies on thyroid cancer have indicated that CAIX expression may lead to more aggressive subtypes and loco-regional metastases in MTC (Koperek et al., 2011; Takacova et al., 2014). However, the relevance of CAIX expression and

its role in PTC, FTC or ATC progression have not yet been elucidated.

This study aimed to investigate the role of CAIX in TC. Based on clinical tissue samples and tumor cell lines reflecting the papillary, follicular and anaplastic cancer subtype, the expression of CAIX was determined at the tissue and cellular level. Analysis of The Cancer Genome Atlas (TCGA) database was used to measure the correlation of CAIX expression with clinicopathological characteristics. Additionally, the relevance of CAIX for thyroid cancer cell survival and TIC activity was investigated in vitro.

2. Materials and methods

2.1. Immunohistochemistry of tissue microarrays

Tissue microarrays (TMAs) (TH8010a-2-BX, TH208-BX) were purchased from US Biomax (Derwood, USA). Slides are composed of human normal and thyroid cancer tissue cores (papillary, follicular and anaplastic carcinoma). All tissue samples were obtained from patients undergoing primary thyroid resection, thus representing untreated tumor specimens. TH8010a-2-BX contained 80 cases with a single core of 1.5 mm per case. Each core represents 1 analyzed sample. TH208-BX microarray contained 60 cases, all were triplicated cores of 1 mm diameter per case. Each 3 cores analyzed from same case equals the mean of the staining per case.

Slides were deparaffinized and antigen retrieval was performed by 2100 Antigen Retriever (Aptum Biologics, Southampton, UK) using R-Universal buffer (Aptum Biologics). Subsequently, slides were stained by using anti-human CAIX-antibody (1:200; clone: 2D3, Abcam, Cambridge, UK) for 1 h at room temperature. Multiview (mouse-HRP/rabbit-AP) IHC kit (Enzo Life Sciences, Lörrach, Germany) was used to detect immunoreactivity of mouse antibodies according to manufacturer's instructions. CAIX was visualized using DAB (3,3'-Diaminobenzidine) chromogen (brown). Tissues were counterstained with hematoxylin for nuclear staining and evaluated with Zeiss Microscopy (Axio Observer Z1, Jena, Germany) by two independent investigators, blinded to histopathological and clinical data. CAIX expression was scored by assessing the percentage of positive CAIX stained cells. Cytoplasmic and membranous staining was determined and scored as follows: 0 = no staining, 1 = weak staining with <10% CAIX-positive tumor cells, 2 = weak-moderate staining with 10–30% CAIX-positive tumor cells, 3 = moderate staining 30–70% CAIX-positive tumor cells, 4 = strong staining with 70–90% CAIX-positive tumor cells and 5 = very strong staining with >90% CAIX-positive tumor cells.

2.2. Analysis of TCGA expression data and clinical correlations

The Cancer Genome Atlas data sets for thyroid cancer (THCA) were retrieved using cBioPortal for Cancer Genomics (<https://www.cbioportal.org/>). Data contained CAIX mRNA expression levels combined with clinical characteristics. Data were generated for papillary and follicular thyroid cancer. TCGA data sets for anaplastic thyroid cancer were not available. mRNA expression levels were normalized by the DESEQ2 variance stabilization method and adjusted to z-score compared to the expression distribution of all samples (log RNA Seq V2 RSEM). Analysis was performed after dividing the patients into high (z-score threshold >1.5) and low expression groups.

2.3. Cell lines and cell culture

Three human thyroid cancer cell lines derived from a poorly differentiated PTC (BCPAP), follicular thyroid carcinoma (FTC 133) and anaplastic thyroid cancer (8505 C) were used in our experiments. BCPAP and 8505 C were purchased from German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH (DSMZ, Braunschweig, Germany), both were cultured in RPMI 1640. FTC 133 was purchased from the European Collection of Authenticated Cell Cultures (ECACC) (Sigma Aldrich, Taufkirchen, Germany) and cultured in DMEM/F-12. HEK293T and NIH3T3 cell lines were provided by M.A. Rieger and cells were cultured in DMEM/F-12. All media were purchased from Gibco Fisher Scientific (Schwerte, Germany) and were supplemented with 10% fetal bovine serum (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), 2% of 1M Hepes (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) and 100 µg/ml Gentamycin sulfate (Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf, Germany). Authentication of BCPAP and 8505 C was performed by short tandem repeat (STR) genotyping (Leibniz-Institute DSMZ) and FTC 133 was authenticated by ECACC. Cells were grown in a humidified 5% CO₂ incubator. Exposure to hypoxia was undertaken by incubating cells in a sealed hypoxic incubator (BioSpherix Xvivo System Model X3, Parish, USA) with a gas mixture of 1% O₂, 94% N₂ and 5% CO₂. All cell lines were mycoplasma free during the course of the experiment. All experiments were performed using cell lines which had been passaged <25 times.

2.4. Tumorsphere formation assay

The ability of cells to form tumorspheres (referred to as thyrospheres in the case of thyroid cells) has been associated with the stemness of cancer cells (Amaral et al., 2017; Bahmad et al., 2018; Morrison et al., 2012). To determine this TIC activity of thyroid cancer cell lines a tumorsphere formation assay was performed. Cells were seeded in ultra-low attachment 24-well plates (Corning Incorporated, Corning, USA) and cultured in Cancer Stem Cell Medium (PromoCell, Heidelberg, Germany). Spheres with a diameter of >50 µm were counted. Plates were scored microscopically after 14 days.

2.5. Detection of CAIX surface expression by flow cytometry

Monolayers and thyrospheres were detached with Accutase (Sigma-Aldrich) to achieve single cell suspension prior to staining. Cells were incubated with an APC-conjugated CAIX-antibody (clone 303123, R&D Systems, Minneapolis, USA) or a mouse isotype control (R&D Systems) and subsequently analyzed by FACSCanto II flow cytometry (BD Becton Dickinson, Heidelberg, Germany).

2.6. Quantitative polymerase chain reaction

RNA was isolated from monolayers and thyrospheres using RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to manufacturer's instructions. First strand cDNA was synthesized using 250 ng of RNA with iScript RT Supermix (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA). RT-qPCR was performed using iTaq Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad

Laboratories) and gene specific primers (CAIX, PROM1, NANOG, OCT4, ABCG2, GAPDH; Bio-Rad Laboratories) according to manufacturer's protocol. PCR runs were performed in MX3005p (Stratagene, San Diego, USA). The thermal cycles were as follows: 1 cycle of polymerase activation and DNA denaturation at 95 °C for 30 s, followed by 40 cycles at 95 °C for 5 s and annealed/extended at 60 °C for 30 s, ended by a melting curve analysis for the verification of the specificity of amplification and the lack of primer dimers at 95 °C with 0.5 °C increments for 5 s each step. GAPDH was used as reference gene. RNA levels were normalized with GAPDH and calculated in relative quantification as delta-delta cycle threshold ($\Delta\Delta C_t$, relative fold change in gene expression).

2.7. Immunofluorescence

Tumor cell monolayers were grown in 8-well Falcon chamber slides (Corning Incorporated) or harvested thyrospheres were transferred on SuperFrostPLUS™ adhesion slides (Thermo Fisher Scientific). Cells were fixed, permeabilized with 0.5% Triton X-100 in PBS (Gibco Fisher Scientific) without Ca²⁺ and Mg²⁺ and blocked with 1% BSA in PBS (Gibco Fisher Scientific) without Ca²⁺ and Mg²⁺. Slides were stained by using APC-conjugated anti-CAIX (clone 303123, R&D Systems), PE-conjugated anti-OCT4 (clone 3A2A20, BioLegend, San Diego, USA) and Alexa Fluor 488-conjugated anti-NANOG (clone 23D2-3C6, BioLegend) antibodies. Isotype control antibodies were used to differentiate non-specific background signal. Cells were mounted with Anti fading-kit with DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, Thermo Fisher Scientific) and visualized microscopically using Axio ObserverZ1 (Zeiss Microscopy).

2.8. Measurement of extracellular pH

Changes in pH-value were measured in cells that were cultured under normoxia or hypoxia for 72 h. Media were collected and pH was measured immediately by a pH-meter (Sartorius, Göttingen, Germany)

2.9. Knockdown of CAIX by shRNA constructs

For the knockdown of CAIX, two shRNAs targeting CAIX (shCAIX-1: 5'-CCGGGATCTACTACTGTTGAGGCTCTCGAGAGCCCTCAACAGTAGG TAGATCTTTTT-3'; and shCAIX-2: 5'CCGCAGCCGCTACTTCCAATAT GACTCGAGTCATATTGGAAGTAGCG GCTGTTTTT-3') were cloned into a third generation self-inactivating HIV-1 based lentiviral vector system on the backbone of pLKO.1 (kindly provided by M.A. Rieger), in which the puromycin resistance cassette was replaced by an open reading frame for a nuclear membrane bound TdTOMATO. Hairpin oligonucleotides for shRNA cloning were designed and synthetically produced by Thermo Fisher Scientific. Lentiviral packing was carried out as described previously (Naldini, 1998; Thalheimer et al., 2014). Transfection was performed using Lenti-vpak packaging kit (OriGene Technologies, Herford, Germany) and HEK293T cells according to the manufacturer's protocol. Viral titers were determined by transduction of NIH3T3 cells with different concentrations of virus supernatant. 25,000 cells of BCPAP, FTC 133 and 8505 C were seeded per well in a 24-well plate and infected with lentivirus particles in complete medium at a multiplicity of infection (MOI) of 5. Cells were harvested for subsequent assays 72 h after transduction unless otherwise stated. Transduction efficiency was monitored by detecting red fluorescent protein (tdTOMATO) via flow cytometry. Only cells with a transduction efficiency over 80% were used for the assays. Effects of the CAIX knockdown were evaluated via cell proliferation 72 h after transduction and tumorsphere formation capacity 14 days after transduction. All experiments were performed under hypoxic and normoxic conditions.

2.10. Protein expression by Wes™ system

For protein extraction, lentiviral transduced cells were lysed with

M-PER Mammalian extraction reagent on ice and supplemented with Pierce Protease and Phosphatase Inhibitor Mini Tablets (Thermo Fisher Scientific), according to the manufacturer's protocol. Protein concentration was determined using Pierce™ Coomassie plus (Bradford) Protein Assay kit (Thermo Fisher Scientific) and quantified by Infinite® M 200 microplate reader (Tecan, Crailsheim, Germany). CAIX expression was detected using Simple Western™ assay by WEST™ System (Bio-Techne, Minneapolis, USA), according to manufacturer's instructions. 50 ng of protein were loaded in each well. The primary antibody anti-CAIX was diluted at 1:200 (clone: 2D3, ab107257, Abcam). α -Tubulin (clone: DM1A, Cell signaling Technology, MA, USA) served as a loading control. Quantification of protein was based on peak area after correction for a baseline signal. Data were generated by the application of data analysis Compass software for Simple Western instruments.

2.11. *In vitro* drug treatment

The Carbonic-anhydrase inhibitor Methazolamide (MZM, Sigma-Aldrich) was dissolved in Dimethyl Sulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich) and used at a final concentration of 100 μ M and 200 μ M to block CAIX. Corresponding DMSO concentrations were used as control. BCPAP, FTC 133 and 8505 C cells were treated for at least 72 h and cell proliferation, apoptosis, cell cycle distribution as well as tumorsphere formation capacity were analyzed thereafter. Tumorspheres were treated with MZM for 14 days. All experiments were performed under hypoxic and normoxic conditions.

2.12. Cell proliferation

Cell proliferation was assessed using 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) dye reduction assay (Roche Diagnostics, Penzberg, Germany) according to manufacturer's protocol. The absorbance was spectrophotometrically measured using Infinite® M200 microplate reader (Tecan). Each experiment was carried out in triplicate. After subtracting the background absorbance, the results were expressed as the mean cell number.

2.13. Apoptosis assay

For apoptosis analysis Annexin V and 7-Aminoactinomycin D (7-AAD) staining (BD Becton Dickinson) was performed according to the manufacturer's instructions. Briefly, the cell suspension (100 μ l; 1×10^5 cells) was first stained with APC-conjugated anti-CAIX antibody for 30 min, washed and further incubated with 5 μ l of Annexin V-FITC and 5 μ l of 7-AAD in the dark for 15 min at room temperature. Cells were analyzed on FACSCanto II. The percentage of apoptotic cells (early and late) in each quadrant was calculated using FACS Diva software (BD Biosciences, Heidelberg, Germany). Each experiment was performed in triplicate and repeated three times.

2.14. Cell-cycle analysis

MZM or DMSO treated cells were analyzed using BD Cycletest™ Plus DNA reagent kit (BD Becton Dickinson) according to manufacturer's instruction. Cells were analyzed on a FACSCanto II. Percentage of cells in each cycle were determined using ModFit software (Verity Software House, Topsham, USA).

2.15. Statistical analysis

Statistical analysis was performed with GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA). All values are presented as means \pm SD from at least three independent experiments. Independent *t*-test (unpaired), One-way or Two-way ANOVA were performed for comparison of continuous or categorical variables unless otherwise

stated. For the analysis of CAIX expression data in patient-derived TMAs, the statistical analysis was performed using International Business Machines Corporation (IBM) Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) for Windows (version 22.0; IBM, Chicago, USA). Expression levels in different thyroid cancer subtypes were compared by the Kruskal-Wallis test. For TCGA dataset, clinicopathological associations were compared using the Chi-squared test and survival analyses were performed using the Kaplan-Meier method and were compared using the log-rank test. A *p*-value < 0.05 was considered statistically significant.

3. Results

3.1. Expression of CAIX in thyroid cancer tissue

CAIX expression was evaluated in cancer tissue samples of PTC (*n* = 64), FTC (*n* = 36) and ATC (*n* = 14) by immunohistochemical stainings in tissue microarrays. The data were compared to the CAIX expression level in non-cancerous thyroid tissues (*n* = 18). Fig. 1A representatively demonstrates CAIX immunostaining in thyroid cancer tissue versus non-cancerous samples. Staining of CAIX was identified in 96% of thyroid cancer tissues. Concerning the cancer subtypes, CAIX expression was detected in all PTC and ATC specimen and in 86% of FTC tissues. In contrast, only 22% of normal tissues showed a weak CAIX expression, while 78% showed no expression at all (Fig. 1B). Staining intensity of CAIX was significantly higher in all thyroid cancer subtypes compared with normal thyroid tissues (Fig. 1A and B). The link to clinicopathological data indicated a significant association between CAIX expression and an increased risk of lymph node metastasis in differentiated thyroid cancer subtypes (*p* = 0.02, Fig. 1C). However, CAIX expression did not correlate with tumor stages. Patient and tumor characteristics of all selected cases in correlation to CAIX expression levels are shown in Supplementary Table S1.

To further elucidate the clinical role of CAIX, we analyzed the CAIX mRNA expression in data sets from The Cancer Genome Atlas (TCGA) and correlated the CAIX level with clinical parameters accessed via cBioportal. The data show that about 5% of all PTC and FTC tumors express high levels of CAIX mRNA with a *z*-score of >1.5 compared to all samples (Fig. 2A). According to our TCGA data, a high mRNA expression of CAIX has been more frequently observed in tumors with advanced T stages (Fig. 2B) as well as in primary tumors with metastases (Fig. 2C). Besides, Fig. 2D points to a significant association between CAIX mRNA expression and AJCC (American Joint Committee on Cancer) stage. Kaplan-Meier survival analysis revealed that patients with high levels of CAIX mRNA exhibited shorter survival than patients with low levels of CAIX (*p* = 0.01, Fig. 2E).

3.2. CAIX expression is increased in tumorspheres and associated with stemness marker expression

As several studies indicate that hypoxia plays an important role in the persistence of TICs, we determined CAIX expression in tumorspheres, also referred to as thyrospheres, in comparison to monolayers in thyroid cancer cell lines. Surface expression of CAIX was significantly increased in thyrospheres in comparison to the surface expression of cell culture monolayers in all three cancer cell lines as determined via flow cytometry (Fig. 3A). Additionally, the expression of CAIX mRNA along with the stemness markers NANOG and OCT4 were markedly upregulated in thyrospheres, compared to the respective mRNA level in the monolayer culture system (Fig. 3B, Supplementary Table S2). The expression of CAIX, NANOG and OCT4 proteins in thyrospheres and cell monolayers were also investigated by immunofluorescence. As shown in Fig. 3C, all three cancer cell lines expressed higher levels of CAIX, OCT4 and NANOG in thyrospheres, compared to the expression detected in monolayer cultures.

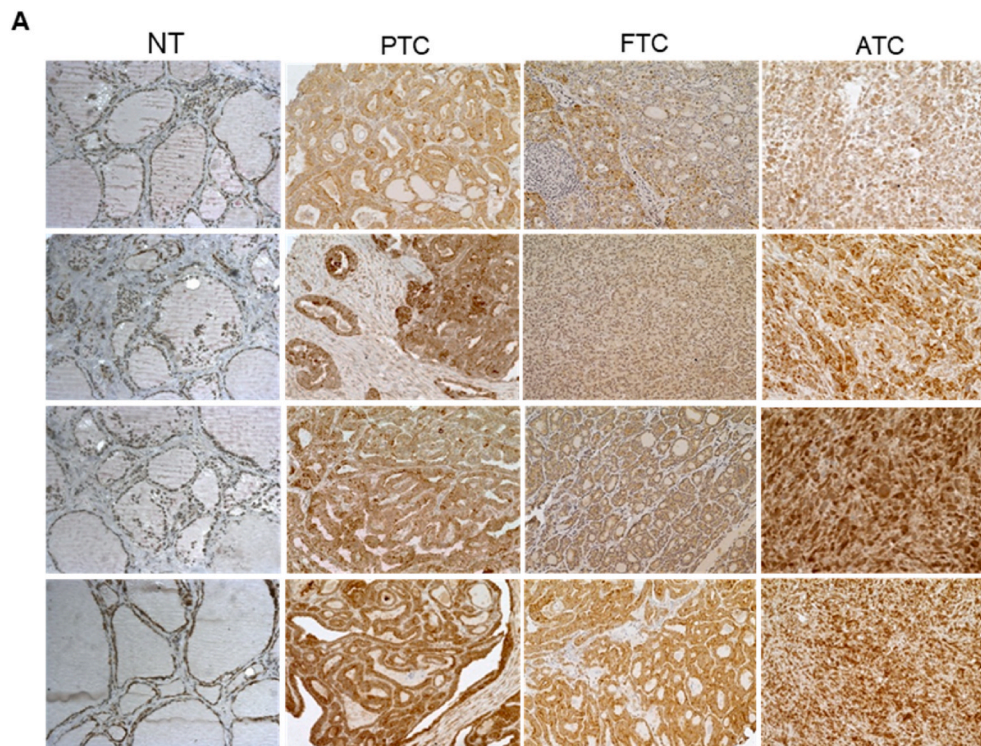
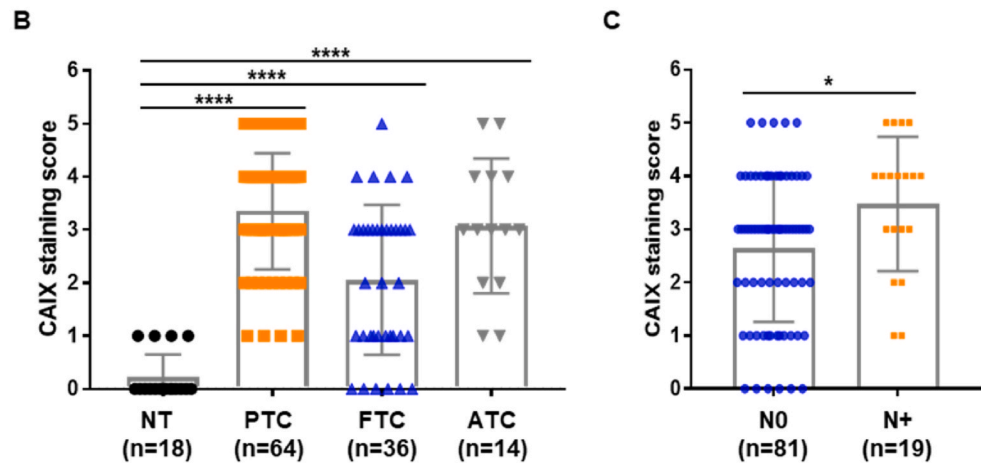


Fig. 1. Increased expression of Carbonic-anhydrase IX (CAIX) in thyroid cancer tissues. (A) Photomicrographs (magnification = 20x) of immunohistochemical staining for CAIX in normal (NT) and tumor tissues from the thyroid gland, including papillary (PTC), follicular (FTC) and anaplastic thyroid cancers (ATC). (B) Semiquantitative analysis of CAIX protein expression observed in IHC staining in thyroid cancer subtypes contained in TMAs. **** $p < 0.0001$ calculated using Kruskal-Wallis test. (C) Semiquantitative analysis of CAIX expression according to lymph node metastasis (N stage). * $p = 0.02$ calculated using Mann-Whitney *U* test. CAIX staining score: 0 (CAIX negative), 1 (weakly positive), 2–3 (moderately positive) and 4–5 (strongly positive). Data are presented as means \pm SD. Numbers in brackets indicate the amount of immunostained samples (B and C).



3.3. Hypoxia induces CAIX overexpression in thyroid cancer cells

Since CAIX is functionally linked to hypoxia, CAIX expression was determined in the thyroid cancer cell lines following exposure to 1% oxygen. As expected, hypoxic conditions resulted in acidification of the extracellular medium (pH = 6,61–6,91 in hypoxia vs pH = 7,03–7,33 in normoxia; Fig. 4). CAIX became significantly upregulated in the hypoxic setting, compared to cells incubated under normoxic conditions (Fig. 4). The highest CAIX expression was observed in FTC 133 followed by BCPAP and the lowest in 8505 C cells.

3.4. CAIX regulates tumor cell proliferation and TIC activity

The increased CAIX expression in thyroid tumors and thyroid TICs prompted us to investigate the function of CAIX in thyroid cancer cell expansion and TIC activity. We genetically knocked-down CAIX in the thyroid cancer cell lines BCPAP, FTC 133 and 8505 C, using two

independent short hairpin RNAs (referred to as shCAIX-1 and shCAIX-2). Both shRNA constructs were found to effectively reduce CAIX protein expression (Supplementary Fig. S1). Cells transduced with a scrambled shRNA (shCtrl) served as a control. The lentiviral transduction efficiency of cells was at least 80% in all experiments.

Knockdown of CAIX by both specific shRNAs significantly inhibited cell proliferation of thyroid cancer cells grown as monolayers over time in comparison to the shCtrl (Fig. 5A). The effects became evident, independently whether the tumor cells were grown under normoxic (Fig. 5A) or hypoxic conditions (Fig. 5B). Knockdown of CAIX also resulted in a significant decrease in number and size of thyrospheres in comparison to shCtrl, particularly of those thyrospheres generated from BCPAP and 8505 C cells (Fig. 5C). The inhibitory effect of CAIX knockdown on TIC activity was even more profound under hypoxic conditions (Fig. 5D). In fact, both CAIX shRNAs almost completely abolished sphere formation in comparison to the shCtrl in all three cell lines (Fig. 5D).

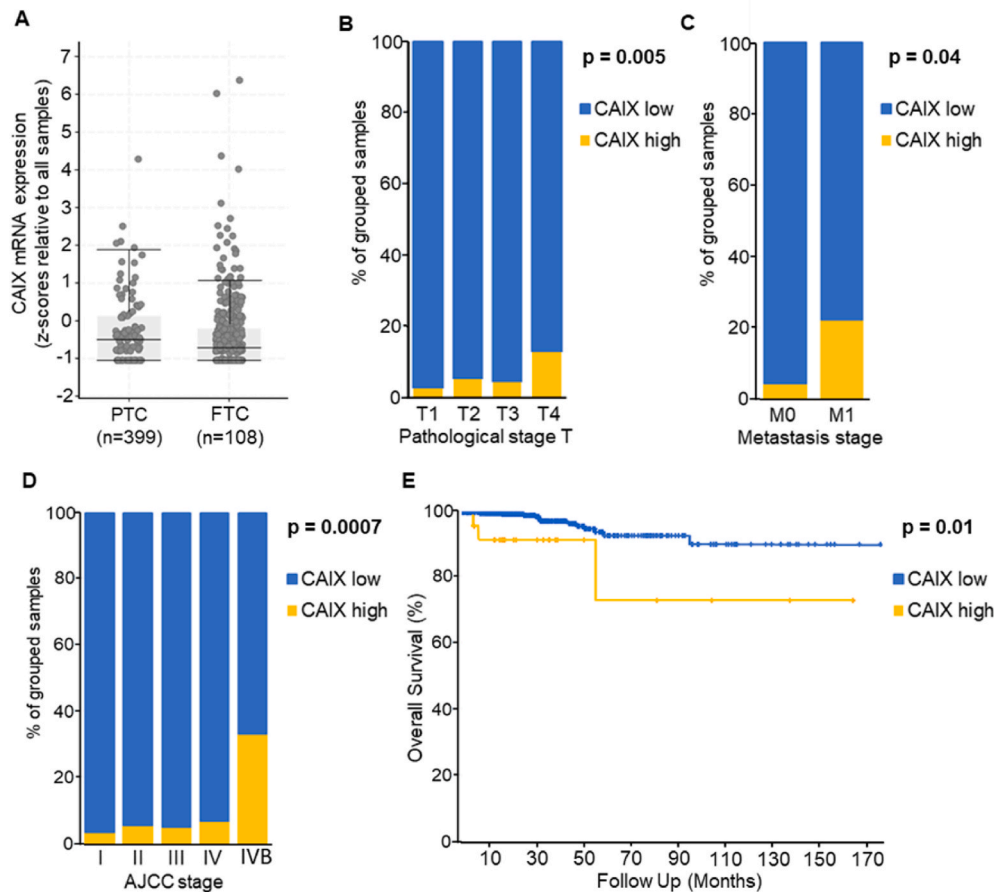


Fig. 2. High CAIX mRNA expression correlates with advanced tumor stages and poor prognosis. (A) Analysis of CAIX mRNA expression in papillary (PTC) and follicular (FTC) thyroid cancers based on the TCGA microarray data set for thyroid carcinoma. Indicated are the z-scores of CAIX mRNA-expression relative to all samples. A z-score > 1.5 was defined as high expression. (B) Analysis of CAIX mRNA expression correlated with T stages, M stages (C) and disease stage according to the American Joint Committee on Cancer Code (AJCC) (D) in 507 patients with thyroid cancer. P-value was calculated using the Chi-squared test. (E) Effect of CAIX expression on the overall survival of 507 patients with thyroid cancer was evaluated using the Kaplan-Meier method (CAIX^{low}: n = 483; CAIX^{high}: n = 24).

3.5. Inhibition of CAIX by methazolamide reduces thyroid cancer cell proliferation and TIC activity in vitro by an induction of apoptosis

To further explore the effect of CAIX inhibition as a potential therapeutic target on cancer cell survival and TIC activity, thyroid cancer cells were treated with two concentrations of Methazolamide, a potent Carbonic-anhydrase inhibitor. Compared with the DMSO group, MZM treatment diminished CAIX mRNA and protein expression (Supplementary Fig. S2A and B), indicating that the expression of CAIX was effectively suppressed by MZM. The inhibition of CAIX resulted in a significant decrease of cell proliferation in all three cancer cell lines under normoxia (Fig. 6A) and hypoxia (Fig. 6B), each compared with DMSO treated cells. Concerning apoptosis in normoxia, MZM significantly increased the number of total apoptotic 8505 C cells. However, BCPAP and FTC 133 cells were not affected by MZM (Fig. 6C). In contrast, MZM evoked apoptosis in all three cell lines under hypoxic conditions (Fig. 6D). Cell cycle analysis revealed significant reduction of cells in the S-phase after treatment with MZM in all three thyroid cancer cell lines (Fig. 6E) under normoxic conditions.

In sphere formation assay, 200 μ M MZM significantly reduced the number of thyrospheres after 14 days of incubation. Under normoxia, a significant inhibition of thyrosphere number of BCPAP and FTC 133 cells was recorded (Fig. 6F). When cultured under hypoxia, a significant reduction of sphere formation capacity of BCPAP and 8505 C cells was found (Fig. 6G). Furthermore, 200 μ M MZM also led to a distinct reduction of the thyrosphere sizes in normoxia as well as in hypoxia (Fig. 6H).

4. Discussion

In the present study, we report the importance of CAIX in the

pathogenesis of thyroid cancer and its potential as an effective therapeutic target. Here, evidence is presented that CAIX protein expression is increased in cancer tissue derived from PTC, FTC and ATC in comparison to non-cancerous thyroid tissue. Hereby, a strong CAIX expression is associated with lymph node metastasis in the differentiated subtypes PTC and FTC. Moreover, TCGA data revealed that a high mRNA expression of CAIX is correlated with advanced tumor stages and a poor overall survival in patients with differentiated thyroid cancer subtypes. Data on the expression or functional role of CAIX in thyroid tumorigenesis are sparse. Nahm et al. demonstrated that several glycolysis-related proteins, including CAIX, are differentially expressed in thyroid cancer subtypes and that their expression levels correlated with poorer cancer prognosis. CAIX was reported to be highly expressed in medullary thyroid carcinoma and in papillary thyroid cancer with BRAF^{V600E} mutation, but no correlation of CAIX expression and thyroid cancer prognosis was found (Nahm et al., 2017). Similarly, Takacova et al. observed a frequent and strong expression pattern of CAIX in medullary and anaplastic cancer samples, representing aggressive and invasive thyroid cancer subtypes, whereas only a minority of differentiated PTC and FTC tumors showed positive staining for CAIX. These results suggest a functional role of CAIX in the development of a more aggressive tumor phenotype (Takacova et al., 2014). In our patient data, we could detect a CAIX expression in 100% of ATC samples, but also in 100% of well-differentiated PTC and in 86% of FTC. Nevertheless, we could mainly observe a strong CAIX expression in tumors with lymph node metastases, emphasizing that expression of CAIX is associated with a more aggressive tumor behavior. Moreover, our TCGA data analysis revealed an association of a strong CAIX expression with advanced tumor stages and poor overall survival, thus indicating the possible involvement of CAIX in tumor malignancy and progression in thyroid cancer. To confirm these results and validate CAIX as a prognostic

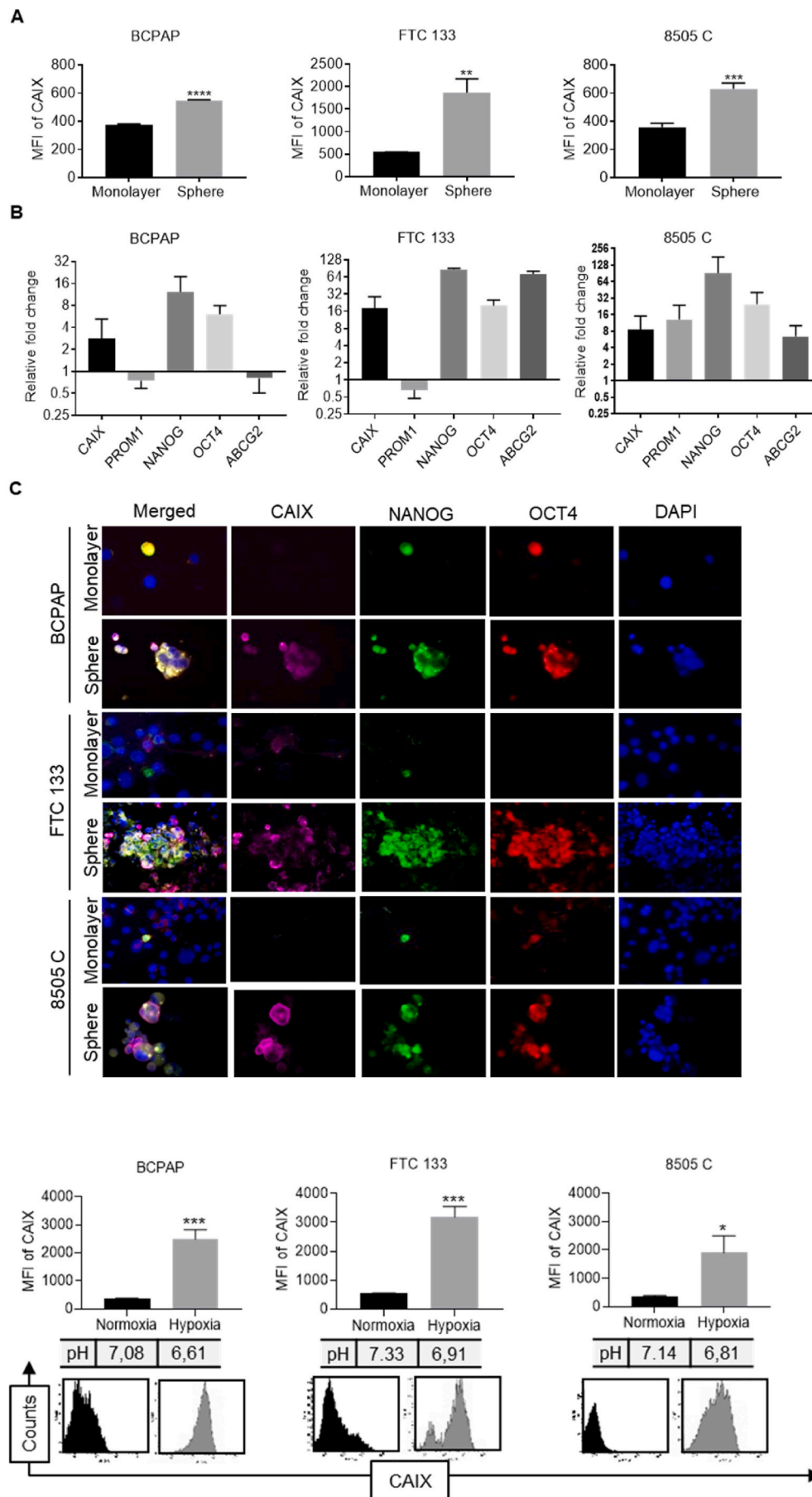


Fig. 3. Increased expression of CAIX and stemness markers in thyrospheres in comparison to monolayers. (A) CAIX surface expression was detected via flow cytometry in thyrospheres vs monolayers derived from BCPAP, FTC 133 and 8505 C cell lines. Data are shown as the mean MFI (mean fluorescence intensity) \pm SD of three independent experiments; **** $p < 0.0001$, *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$ by unpaired *t*-test. (B) Quantitative mRNA expression of CAIX and stemness markers PROM1, NANOG, OCT4 and ABCG2 were determined with qPCR. mRNA expression levels were normalized to GAPDH. The delta-delta CT method was used to determine the fold change for relative gene expression in thyrospheres in comparison to monolayers. Values represent the means \pm SD of three independent experiments. (C) Protein expression of CAIX and stemness markers NANOG and OCT4 were detected via immunofluorescence staining in thyrospheres vs monolayers derived from BCPAP, FTC 133 and 8505 C cell lines. Nuclei were counterstained with DAPI (magnification = 200x).

Fig. 4. Hypoxia induces CAIX expression in thyroid cancer cells. Mean fluorescence intensity (MFI) of CAIX surface expression in monolayers of BCPAP, FTC 133 and 8505 C under hypoxia compared with normoxia detected via flow cytometry. Representative FACS histogram demonstrating CAIX upregulation in hypoxia and corresponding extracellular pH values. Data are shown as the mean MFI \pm SD of three independent experiments (p-values calculated by unpaired *t*-test). *** $p < 0.001$, * $p < 0.05$.

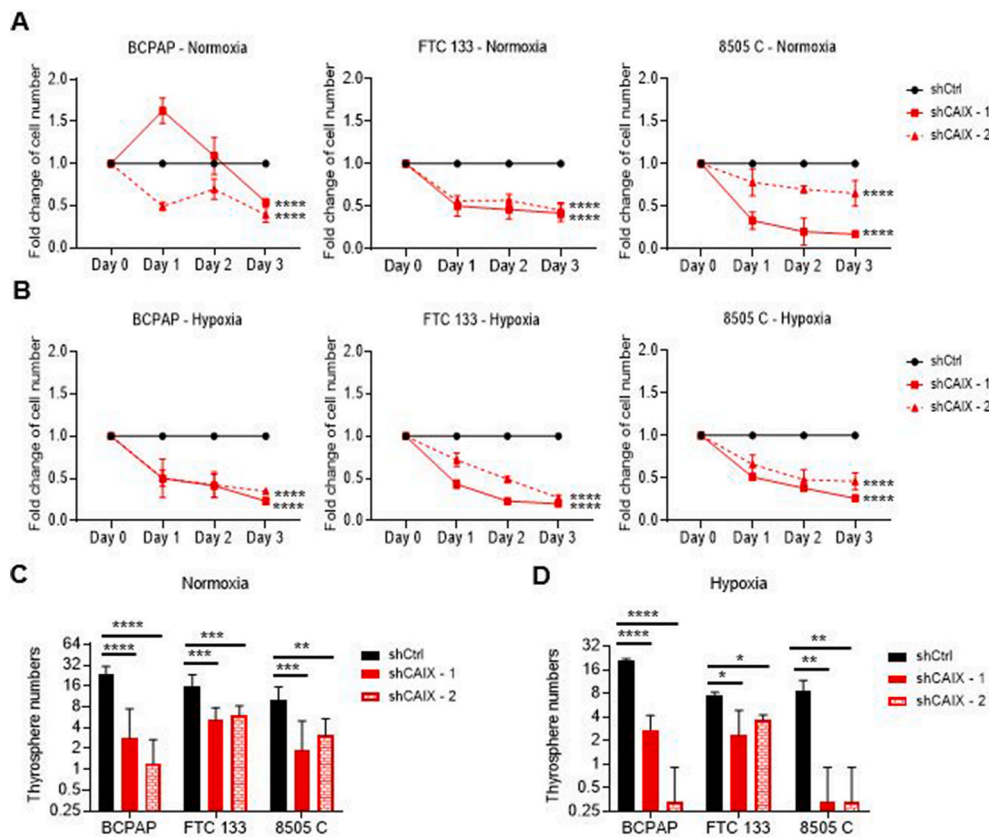


Fig. 5. Targeting CAIX inhibits thyroid cancer cell proliferation and thyrosphere formation. (A) Cell proliferation of lentiviral transduced BCPAP, FTC 133 and 8505 C cells with two independent shRNAs against CAIX (shCAIX-1, shCAIX-2) or control (shCtrl) cultured under normoxic or (B) hypoxic condition. Data are shown as fold change of cell number in the shCAIX groups in comparison to shCtrl (set to 1). Indicated are the means \pm SD of 3 independent experiments (p-values calculated by Two-way ANOVA). (C) Mean number of thyrospheres after knockdown of CAIX in BCPAP, FTC 133 and 8505 C cultured in normoxia or (D) hypoxia. Thyrosphere formation capacity was determined by microscopy after 14 days of culture. Data are shown as the mean \pm SD of three independent experiments (Ordinary One-way ANOVA). **** $p < 0.0001$, *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$.

marker, further investigations on CAIX expression in a larger patient cohort are currently conducted.

Our data raises the question of whether CAIX expression is of pathophysiological relevance in thyroid cancer and relates to an adaptation to hypoxia-induced proliferation. Under non-treated normoxic conditions, a low expression of CAIX was observed in thyroid cancer cells from different subtypes, but the expression was markedly induced by hypoxia confirming the regulatory importance of the microenvironmental conditions. In good accordance, it has previously been shown that HIF-1 α and its downstream target CAIX were strongly upregulated as a consequence of hypoxia in thyroid cancer cells, with the highest CAIX levels in anaplastic and follicular cell lines (Burrows et al., 2010). Our genetic knockdown experiments presented an evidence that loss of CAIX nearly completely inhibited thyroid cancer cell proliferation under hypoxic conditions, suggesting a crucial role of CAIX in the adaptation to hypoxia-induced proliferation. Despite the strong effects in hypoxia, CAIX also appears to have an influence on cell survival under normoxia. Thus, in normoxic conditions we could also observe a strong decrease in cell proliferation upon CAIX knockdown. Furthermore, a pharmacological inhibition of CAIX by MZM significantly reduced cell proliferation, both under normoxia and hypoxia. A cell-cycle arrest in normoxia and an induction of apoptosis in hypoxia seems to be involved in the inhibition of cell proliferation, as detected by our cell-cycle and apoptosis analysis.

These results support, that CAIX is not only upregulated in response to hypoxia, but also expressed under untreated conditions exerting influence on cell survival and proliferation. Hereby, CAIX may be regulated by oncogenic pathways. In MTC, a link between the RET (rearranged during transfection) oncoprotein expression and an induction of HIF-1 α as well as CAIX expression was found. The crosstalk between RET and HIF1 α is mediated via hypoxia-independent oncogenic signaling, including the MAPK (mitogen-activated protein kinase) and PI3K (Phosphoinositide 3-kinases) pathways (Takacova et al., 2014).

This hypoxia-independent induction of CAIX expression has been demonstrated in different cancer cell models (Ihnatko et al., 2006; Kaluz et al., 2002) underlining the hypothesis, that CAIX directly participates in cancer hallmarks, such as increased cell proliferation or invasion through the interference with several signaling pathways. This is also supported by the fact that its suppression or pharmacologic inhibition results in significantly reduced tumor cell growth in vitro (Parks et al., 2017) and in vivo (Boyd et al., 2017; Chiche et al., 2009; Zatovicova et al., 2014).

In addition to the active involvement of CAIX in cell proliferation, it has been associated with stemness and enhanced malignancy in solid cancers (Andreucci et al., 2020; Ledaki et al., 2015). To our knowledge, this is the first time that a possible association of CAIX activity and stemness properties in thyroid cancer cells could be demonstrated. Our results revealed that CAIX mRNA and protein expression were up-regulated in thyrospheres and co-expressed with the self-renewal and pluripotency markers NANOG and OCT4 (Babaie et al., 2007; Saunders et al., 2013) as well as with the TIC marker PROM1 (Qiu et al., 2015). In line with our results, hypoxia and CAIX have been associated with an increased stem-cell related marker expression in melanoma (Andreucci et al., 2020), breast cancer (Ledaki et al., 2015) and glioma cells (Li et al., 2013). Andreucci et al. also detected an overexpression of CAIX and the stemness-related proteins PROM1, NANOG and OCT4 in melanoma cells grown under hypoxic conditions. Furthermore, they demonstrated an increase in TICs in hypoxia-adapted melanoma cells as shown by an enhanced tumorsphere formation ability in vitro (Andreucci et al., 2020). Indeed, CAIX expression has been considered a critical mediator of the self-renewal and invasive potential of cancer cells by regulating the transcription of stemness-related genes (Ledaki et al., 2015).

In the present study, we cannot conclude that CAIX promotes TIC activity. However, our preliminary data indicate that CAIX is associated with stemness or “stem cell-like” properties. More importantly, the

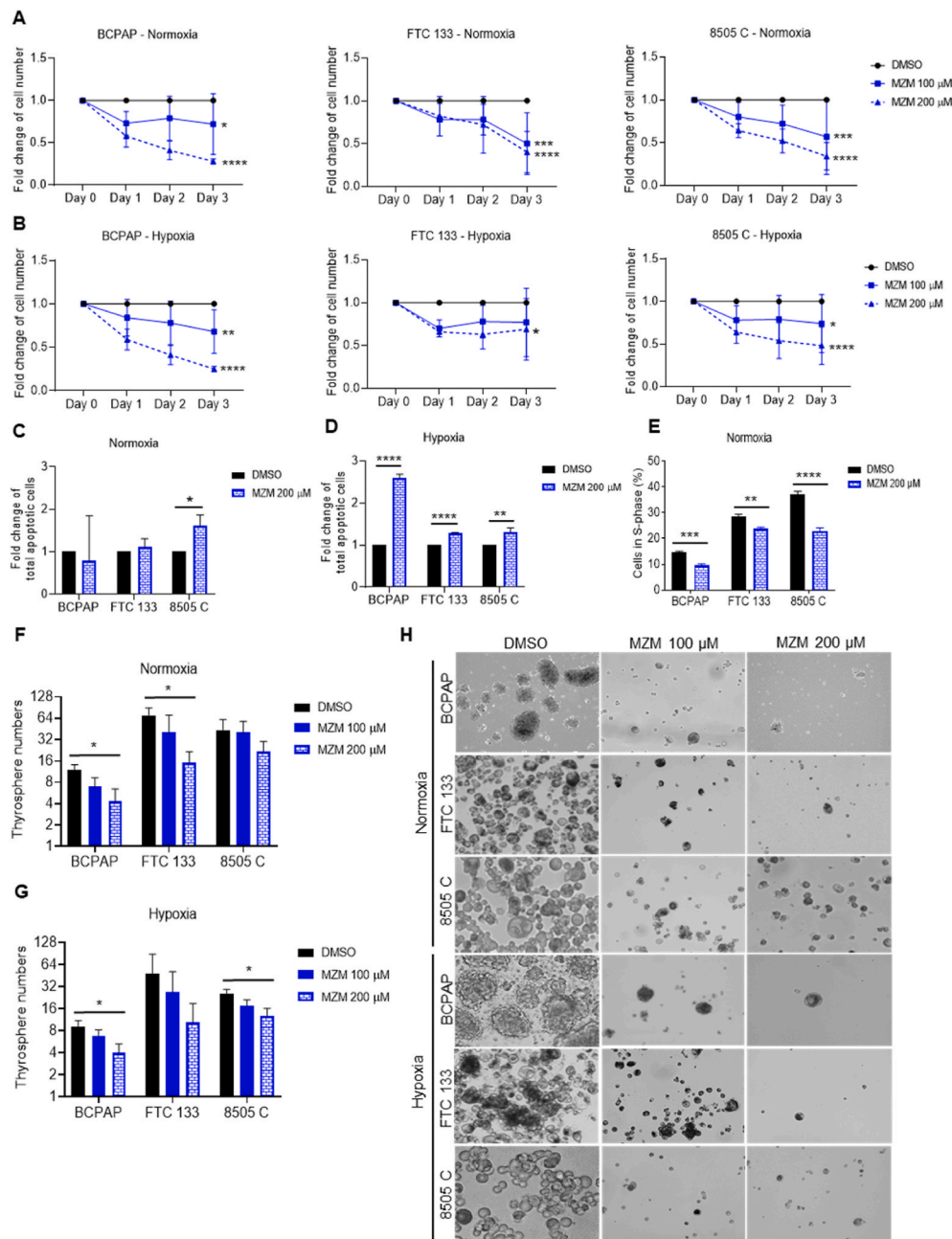


Fig. 6. Inhibition of CAIX by Methazolamide (MZM) inhibits thyroid cancer cell proliferation and thyrosphere formation capacity. Cells were treated with MZM for 72 h. DMSO treated cells served as control. Data are shown as the mean \pm SD of at least three independent experiments. **(A)** Cell proliferation of BCPAP, FTC 133 and 8505 C cells after treatment with MZM cultured under normoxia and **(B)** hypoxia. Data are shown as fold change of cell number in the MZM treated groups in comparison to DMSO (set to 1). (p-values calculated by Two-way ANOVA) **(C)** Total apoptotic BCPAP, FTC 133 and 8505 C cells after 72 h treatment with 200 μ M MZM or DMSO determined by Annexin V/7-AAD staining cultured under normoxia or **(D)** hypoxia. Data are shown as fold change of apoptotic cells treated with MZM in comparison to DMSO (set to 1). (p-values calculated by unpaired t-test). **(E)** Percentage of tumor cells in S-phase of the cell cycle after treatment with 200 μ M MZM under normoxia for 72 h (unpaired t-test). **(F)** Mean number of thyrospheres after inhibition of CAIX with MZM in BCPAP, FTC 133 and 8505 C cultured under normoxia or **(G)** hypoxia. Thyrosphere formation capacity was determined by microscopy after 14 days (Ordinary one-way ANOVA). **(H)** Representative pictures of thyrospheres in all three thyroid cancer cells lines after 14 days of treatment with MZM (magnification = 100x). Cells were cultured under normoxia or hypoxia. **** $p < 0.0001$, *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$.

present study demonstrated that suppression of CAIX resulted in a strong inhibition of cancer cell proliferation and the stem-cell ability to form thyrospheres in vitro, suggesting a pro-survival role of CAIX in thyroid cancer cells and TICs. Several laboratories have reported on the use of sphere formation in serum-free media, as an in vitro surrogate assay to assess the self-renewal and proliferation of the sphere-forming cells (Amaral et al., 2017; Bahmad et al., 2018; Morrison et al., 2012). In concordance with our study, CAIX inhibition impaired the expansion and function of tumor-initiating cells in other solid cancers, such as breast or cervix carcinoma (Lock et al., 2013; Marie-Egyptienne et al., 2017; Mokhtari et al., 2019).

Selective CAIX inhibitors for clinical use are presently unavailable. Hence, we used MZM in our in vitro experiments, a sulfonamide derivative, as CAIX inhibitor (Scozzafava and Supuran, 2014; Williams and Gieling, 2019). MZM has been shown to inhibit CAIX activity and is in clinical use for the treatment of glaucoma and high-altitude illnesses (Lu et al., 2020; Scozzafava and Supuran, 2014). Moreover, preclinical

studies have demonstrated that sulfonamides as CAIX inhibitors exert antitumor effects (Said et al., 2013; Williams and Gieling, 2019). Nevertheless, the use of novel small molecule inhibitors will potentially provide additional tools for therapeutic interventions, e.g. the use of the specific CAIX inhibitor SLC-0111 in melanoma cells resulted in a strong reduction of tumorsphere formation (Peppicelli et al., 2020). Similarly, Lock et al. demonstrated that the inhibition of CAIX with small molecule inhibitors resulted in a decrease of tumorsphere formation capacity in breast cancer cells under hypoxic condition (Lock et al., 2013).

The present results indicate, that targeting CAIX impairs the self-renewal capacity of thyroid cancer cells and might represent a promising therapeutic strategy in thyroid cancer patients. The precise molecular mechanisms underlying these antitumor effects need to be fully elucidated and require further investigation. Tumor pH buffering mediated by MZM administration can certainly play a role in tumor growth dysfunction. Moreover, targeting CAIX might also directly interfere with downstream signaling pathways, including mTOR (Lock

et al., 2013). Further research is needed on in vivo models to prove in vitro data presented in our study. These findings suggest that CAIX might represent a promising prognostic marker and therapeutic target in thyroid cancer patients.

5. Conclusion

Our study demonstrates CAIX as a potential prognostic marker and a promising therapeutic target in the treatment of thyroid cancer. Our data show that CAIX is an essential factor in the survival and TIC activity of thyroid cancer cells. Thus, CAIX inhibitors may be useful in combination with standard treatment strategies in advanced thyroid cancers expressing high levels of CAIX.

Funding sources

The study was supported in part by the Else Kröner-Fresenius-Stiftung and by the Martha Schmelz Foundation to P Malkomes.

CRediT authorship contribution statement

Jennifer Schmidt: Methodology, Investigation, Formal analysis, Data curation, Software, Visualization, Validation, Writing – original draft. **Elsie Oppermann:** Methodology, Investigation, Formal analysis, Software, Visualization. **Roman A. Blaheta:** Writing – review & editing. **Teresa Schreckenbach:** Formal analysis, Writing – review & editing. **Iliaria Lunger:** Methodology. **Michael A. Rieger:** Resources, Supervision, Writing – review & editing. **Wolf Otto Bechstein:** Resources, Supervision, Writing – review & editing. **Katharina Holzer:** Conceptualization, Resources, Project administration, Supervision, Writing – review & editing. **Patrizia Malkomes:** Conceptualization, Resources, Project administration, Methodology, Investigation, Formal analysis, Data curation, Software, Visualization, Validation, Supervision, Writing – original draft.

Declaration of competing interest

The authors declare that there is no conflict of competing interest that could be perceived as prejudicing the impartiality of the research reported.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.mce.2021.111382>.

References

- Amaral, R.L.F., Miranda, M., Marcato, P.D., Swiech, K., 2017. Comparative analysis of 3D bladder tumor spheroids obtained by forced floating and hanging drop methods for drug screening. *Front. Physiol.* 8, 605. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00605>.
- Andreucci, E., Peppicelli, S., Ruzzolini, J., Bianchini, F., Biagioni, A., Papucci, L., Magnelli, L., Mazzanti, B., Stecca, B., Calorini, L., 2020. The acidic tumor microenvironment drives a stem-like phenotype in melanoma cells. *J. Mol. Med.* 98, 1431–1446. <https://doi.org/10.1007/s00109-020-01959-y>.
- Babaie, Y., Herwig, R., Greber, B., Brink, T.C., Wruck, W., Groth, D., Lehrach, H., Burdon, T., Adjaye, J., 2007. Analysis of oct4-dependent transcriptional networks regulating self-renewal and pluripotency in human embryonic stem cells. *Stem Cell.* 25, 500–510. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2006-0426>.
- Bahmad, H.F., Cheaito, K., Chalhoub, R.M., Hadadeh, O., Monzer, A., Ballout, F., El-Hajj, A., Mukherji, D., Liu, Y.N., Daoud, G., Abou-Kheir, W., 2018. Sphere-Formation Assay: three-dimensional in vitro culturing of prostate cancer stem/Progenitor sphere-forming cells. *Front. Oncol.* 8 <https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00347>.
- Bhatia, P., 2014. Stem cell biology in thyroid cancer: insights for novel therapies. *World J. Stem Cell.* 6, 614. <https://doi.org/10.4252/wjsc.v6.i5.614>.
- Boyd, N.H., Walker, K., Fried, J., Hackney, J.R., McDonald, P.C., Benavides, G.A., Spina, R., Audia, A., Scott, S.E., Libby, C.J., Tran, A.N., Bevenssee, M.O., Griguer, C., Nozell, S., Gillespie, G.Y., Nabors, B., Bhat, K.P., Bar, E.E., Darley-Usmar, V., Xu, B., Gordon, E., Cooper, S.J., Dedhar, S., Hjelmeland, A.B., 2017. Addition of carbonic anhydrase 9 inhibitor SLC-0111 to temozolomide treatment delays glioblastoma growth in vivo. *JCI Insight* 2, 1–16. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.92928>.

- Burrows, N., Resch, J., Cowen, R.L., Von Wasielewski, R., Hoang-Vu, C., West, C.M., Williams, K.J., Brabant, G., 2010. Expression of hypoxia-inducible factor 1 α in thyroid carcinomas. *Endocr. Relat. Canc.* 17, 61–72. <https://doi.org/10.1677/ERC-08-0251>.
- Chen, Z., Ai, L., Mboge, M.Y., Tu, C., McKenna, R., Brown, K.D., Heldermon, C.D., Frost, S.C., 2018. Differential expression and function of CAIX and CXII in breast cancer: a comparison between tumorigraft models and cells. *PLoS One* 13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199476>.
- Chiche, J., Ilc, K., Laferrière, J., Trotter, E., Dayan, F., Mazure, N.M., Brahimi-Horn, M. C., Pouységur, J., 2009. Hypoxia-inducible carbonic anhydrase IX and XII promote tumor cell growth by counteracting acidosis through the regulation of the intracellular pH. *Canc. Res.* 69, 358–368. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-2470>.
- Coca-Pelaz, A., Shah, J.P., Hernandez-Prera, J.C., Ghossein, R.A., Rodrigo, J.P., Hartl, D. M., Olsen, K.D., Shaha, A.R., Zafero, M., Suarez, C., Nixon, I.J., Randolph, G.W., Mäkitie, A.A., Kowalski, L.P., Vander Poorten, V., Sanabria, A., Guntinas-Lichius, O., Simo, R., Zbären, P., Angelos, P., Khafif, A., Rinaldo, A., Ferlito, A., 2020. Papillary thyroid cancer—aggressive variants and impact on management: a narrative review. *Adv. Ther.* <https://doi.org/10.1007/s12325-020-01391-1>.
- Crocker, A.K., Allan, A.L., 2008. Cancer stem cells: implications for the progression and treatment of metastatic disease: stem Cells Review Series. *J. Cell Mol. Med.* 12, 374–390. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2007.00211.x>.
- Fagin, J.A., Wells, S.A., 2016. Biologic and clinical perspectives on thyroid cancer. *N. Engl. J. Med.* 375, 1054–1067. <https://doi.org/10.1056/nejma1501993>.
- Gray, L.H., Conger, A.D., Ebert, M., Hornsey, S., Scott, O.C., 1953. The concentration of oxygen dissolved in tissues at the time of irradiation as a factor in radiotherapy. *Br. J. Radiol.* 26, 638–648. <https://doi.org/10.1259/0007-1285-26-312-638>.
- Hernandez-Prera, J.C., Machado, R.A., Asa, S.L., Baloch, Z., Faquin, W.C., Ghossein, R., Livolsi, V.A., Lloyd, R.V., Mete, O., Nikiforov, Y.E., Seethala, R.R., Suster, S., Thompson, L.D., Turk, A.T., Sadow, P.M., Urken, M.L., Wenig, B.M., 2017. Pathologic reporting of tall-cell variant of papillary thyroid cancer: have we reached a consensus? *Thyroid* 27, 1498–1504. <https://doi.org/10.1089/thy.2017.0280>.
- Ihnatko, R., Kubes, M., Takacova, M., Sedlakova, O., Sedlak, J., Pastorek, J., Kopacek, J., Pastorekova, S., 2006. Extracellular acidosis elevates carbonic anhydrase IX in human glioblastoma cells via transcriptional modulation that does not depend on hypoxia. *Int. J. Oncol.* 29, 1025–1033. <https://doi.org/10.3892/ijo.29.4.1025>.
- Jin, M., Song, D.E., Ahn, J., Song, E., Lee, Y.-M., Sung, T.-Y., Kim, Y., Kim, W.B., Shong, Y.K., Jeon, M.J., Kim, W.G., 2021. Genetic profiles of aggressive variants of papillary thyroid carcinomas. *Cancers* 13, 892. <https://doi.org/10.3390/cancers13040892>.
- Kaatsch, P., Spix, C., Katalinic, A., Hentschel, S., Luttmann, S., Stegmaier, C., Waldeyer-Sauerland, M., Waldmann, A., Caspritz, S., Christ, M., Ernst, A., Folkerts, J., Hansmann, J., Klein, S., Kranzhöfer, K., Kunz, B., Manegold, K., Penzkofer, A., Treml, K., Weg-Remers, S., Wittenberg, K., Barnes, B., Bertz, J., Buttman-Schweiger, N., Dahm, S., Fiebig, J., Haberland, J., Kraywinkel, K., Wienecke, A., Wolf, U., 2017. Krebs in Deutschland | 2013/2014.
- Kaluz, S., Kaluzová, M., Chrastina, A., Olive, P.L., Pastoreková, S., Pastorek, J., Lerman, M.I., Stanbridge, E.J., 2002. Lowered oxygen tension induces expression of the hypoxia marker MN/carbonic anhydrase IX in the absence of hypoxia-inducible factor 1 α stabilization | cancer research [WWW Document]. *Cancer Res.* URL. <http://cancerres.aacrjournals.org/content/62/15/4469.long>, 2.20.2021.
- Klatte, T., Seligson, D.B., Rao, J.Y., Yu, H., De Martino, M., Kawaoka, K., Wong, S.G., Belldgrun, A.S., Pantuck, A.J., 2009. Carbonic anhydrase IX in bladder cancer: a diagnostic, prognostic, and therapeutic molecular marker. *Cancer* 115, 1448–1458. <https://doi.org/10.1002/cncr.24163>.
- Kon-no, H., Ishii, G., Nagai, K., Yoshida, J., Nishimura, M., Nara, M., Fujii, T., Murata, Y., Miyamoto, H., Ochiai, A., 2006. Carbonic anhydrase IX expression is associated with tumor progression and a poor prognosis of lung adenocarcinoma. *Lung Canc.* 54, 409–418. <https://doi.org/10.1016/j.jungcan.2006.08.017>.
- Koperek, O., Bergner, O., Pichlhöfer, B., Oberndorfer, F., Hainfellner, J.A., Kaserer, K., Horvat, R., Harris, A.L., Niederle, B., Birner, P., 2011. Expression of hypoxia-associated proteins in sporadic medullary thyroid cancer is associated with desmoplastic stroma reaction and lymph node metastasis and may indicate somatic mutations in the VHL gene. *J. Pathol.* 225, 63–72. <https://doi.org/10.1002/path.2926>.
- Ledaki, I., McIntyre, A., Wigfield, S., Buffa, F., McGowan, S., Baban, D., Li, J. Iiang, Harris, A.L., 2015. Carbonic anhydrase IX induction defines a heterogeneous cancer cell response to hypoxia and mediates stem cell-like properties and sensitivity to HDAC inhibition. *Oncotarget* 6, 19413–19427. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.4989>.
- Li, P., Zhou, C., Xu, L., Xiao, H., 2013. Hypoxia enhances stemness of cancer stem cells in Glioblastoma: an in vitro study. *Int. J. Med. Sci.* 10, 399–407. <https://doi.org/10.7150/ijms.5407>.
- Li, Y., Tu, C., Wang, H., Silverman, D.N., Frost, S.C., 2011. Catalysis and pH control by membrane-associated carbonic anhydrase IX in MDA-MB-231 breast cancer cells. *J. Biol. Chem.* 286, 15789–15796. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.188524>.
- Li, Z., Bao, S., Wu, Q., Wang, H., Eyller, C., Sathornsumetee, S., Shi, Q., Cao, Y., Lathia, J., McLendon, R.E., Hjelmeland, A.B., Rich, J.N., 2009. Hypoxia-Inducible factors regulate tumorigenic capacity of glioma stem cells. *Canc. Cell* 15, 501–513. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.03.018>.
- Lock, F.E., McDonald, P.C., Lou, Y., Serrano, I., Chafe, S.C., Ostlund, C., Aparicio, S., Winun, J.Y., Supuran, C.T., Dedhar, S., 2013. Targeting carbonic anhydrase IX depletes breast cancer stem cells within the hypoxic niche. *Oncogene* 32, 5210–5219. <https://doi.org/10.1038/ncr.2012.550>.
- Lu, H., Zhang, H., Jiang, Y., 2020. Methazolamide in high-altitude illnesses. *Eur. J. Pharmaceut. Sci.* <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2020.105326>.

- Marie-Egyptienne, D.T., Chaudary, N., Kalliomäki, T., Hedley, D.W., Hill, R.P., 2017. Cancer initiating-cells are enriched in the CA9 positive fraction of primary cervix cancer xenografts. *Oncotarget* 8, 1392–1404. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.13625>.
- Mathieu, J., Zhang, Z., Zhou, W., Wang, A.J., Heddleston, J.M., Pinna, C.M.A., Hubaud, A., Stadler, B., Choi, M., Bar, M., Tewari, M., Liu, A., Vessella, R., Rostomily, R., Born, D., Horwitz, M., Ware, C., Blau, C.A., Cleary, M.A., Rich, J.N., Ruohola-Baker, H., 2011. HIF induces human embryonic stem cell markers in cancer cells. *Canc. Res.* 71, 4640–4652. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-3320>.
- Mitsutake, N., Iwao, A., Nagai, K., Namba, H., Ohtsuru, A., Saenko, V., Yamashita, S., 2007. Characterization of side population in thyroid cancer cell lines: cancer stem-like cells are enriched partly but not exclusively. *Endocrinology* 148, 1797–1803. <https://doi.org/10.1210/en.2006-1553>.
- Mokhtari, R.B., Baluch, N., Morgatskaya, E., Kumar, S., Sparaneo, A., Muscarella, L.A., Zhao, S., Cheng, H.L., Das, B., Yeager, H., 2019. Human bronchial carcinoid tumor initiating cells are targeted by the combination of acetazolamide and sulforaphane. *BMC Canc.* 19, 1–19. <https://doi.org/10.1186/s12885-019-6018-1>.
- Morrison, B.J., Steel, J.C., Morris, J.C., 2012. Sphere culture of murine lung cancer cell lines are enriched with cancer initiating cells. *PLoS One* 7, 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0049752>.
- Muz, B., de la Puente, P., Azab, F., Azab, A.K., 2015. The role of hypoxia in cancer progression, angiogenesis, metastasis, and resistance to therapy. *Hypoxia* 3, 83. <https://doi.org/10.2147/hp.s93413>.
- Nahm, J.H., Kim, H.M., Koo, J.S., 2017. Glycolysis-related protein expression in thyroid cancer. *Tumor Biol.* 39 <https://doi.org/10.1177/1010428317695922>.
- Naldini, L., 1998. Lentiviruses as gene transfer agents for delivery to non-dividing cells. *Curr. Opin. Biotechnol.* 9, 457–463. [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(98\)80029-3](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(98)80029-3).
- Nguyen, Q.T., Lee, E.J., Huang, M.G., Park, Y.I., Khullar, A., Plodkowski, R.A., 2015. Diagnosis and treatment of patients with thyroid cancer. *Am. Heal. Drug Benefits.*
- Nucera, C., 2016. Evolution of resistance to thyroid cancer therapy. *Aging*. <https://doi.org/10.18632/aging.101030>. Albany, NY.
- Parks, S.K., Cormerais, Y., Durivault, J., Pouyssegur, J., 2017. Genetic disruption of the pH-regulating proteins Na⁺/H⁺ exchanger 1 (SLC9A1) and carbonic anhydrase 9 severely reduces growth of colon cancer cells. *Oncotarget* 8, 10225–10237. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.14379>.
- Peppicelli, S., Andreucci, E., Ruzzolini, J., Bianchini, F., Nediani, C., Supuran, C.T., Calorini, L., 2020. The Carbonic Anhydrase IX inhibitor SLC-0111 as emerging agent against the mesenchymal stem cell-derived pro-survival effects on melanoma cells. *J. Enzym. Inhib. Med. Chem.* 35, 1185–1193. <https://doi.org/10.1080/14756366.2020.1764549>.
- Qiu, Z.X., Zhao, S., Mo, X.M., Li, W.M., 2015. Overexpression of PROM1 (CD133) confers poor prognosis in non-small cell lung cancer. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 8, 6589–6595.
- Qureshi-Baig, K., Ullmann, P., Haan, S., Letellier, E., 2017. Tumor-Initiating Cells: a criTICal review of isolation approaches and new challenges in targeting strategies. *Mol. Canc.* 16, 1–16. <https://doi.org/10.1186/s12943-017-0602-2>.
- Rohwer, N., Cramer, T., 2011. Hypoxia-mediated drug resistance: novel insights on the functional interaction of HIFs and cell death pathways. *Drug Resist. Updates* 14, 191–201. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2011.03.001>.
- Said, H.M., Hagemann, C., Carta, F., Katzer, A., Polat, B., Staab, A., Scozzafava, A., Anacker, J., Vince, G.H., Flentje, M., Supuran, C.T., 2013. Hypoxia induced CA9 inhibitory targeting by two different sulfonamide derivatives including Acetazolamide in human Glioblastoma. *Bioorg. Med. Chem.* 21, 3949–3957. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2013.03.068>.
- Saini, S., Tulla, K., Maker, A.V., Burman, K.D., Prabhakar, B.S., 2018. Therapeutic advances in anaplastic thyroid cancer: a current perspective 11 Medical and Health Sciences 1112 Oncology and Carcinogenesis. *Mol. Canc.* <https://doi.org/10.1186/s12943-018-0903-0>.
- Saunders, A., Faiola, F., Wang, J., 2013. Concise review: pursuing self-renewal and pluripotency with the stem cell factor Nanog. *Stem Cell.* 31, 1227–1236. <https://doi.org/10.1002/stem.1384>.
- Scozzafava, A., Supuran, C.T., 2014. Glaucoma and the applications of carbonic anhydrase inhibitors. *Subcell. Biochem.* 75, 349–359. https://doi.org/10.1007/978-94-007-7359-2_17.
- Supuran, C.T., 2012. Inhibition of carbonic anhydrase IX as a novel anticancer mechanism. *World J. Clin. Oncol.* 3, 98. <https://doi.org/10.5306/wjco.v3.i7.98>.
- Švastová, E., Hulíková, A., Rafajová, M., Zát' Ovičová, M., Gibadulinová, A., Casini, A., Cecchi, A., Scozzafava, A., Supuran, C.T., Pastorek, J., Pastoreková, S., 2004. Hypoxia activates the capacity of tumor-associated carbonic anhydrase IX to acidify extracellular pH. *FEBS Lett.* 577, 439–445. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.10.043>.
- Swietach, P., Vaughan-Jones, R.D., Harris, A.L., 2007. Regulation of tumor pH and the role of carbonic anhydrase 9. *Canc. Metastasis Rev.* <https://doi.org/10.1007/s10555-007-9064-0>.
- Takacova, M., Bullova, P., Simko, V., Skvarkova, L., Poturnajova, M., Feketeova, L., Babal, P., Kivela, A.J., Kuopio, T., Kopacek, J., Pastorek, J., Parkkila, S., Pastorekova, S., 2014. Expression pattern of carbonic anhydrase IX in medullary thyroid carcinoma supports a role for RET-mediated activation of the HIF pathway. *Am. J. Pathol.* 184, 953–965. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2014.01.002>.
- Thalheimer, F.B., Wingert, S., De Giacomo, P., Haetscher, N., Rehage, M., Brill, B., Theis, F.J., Hennighausen, L., Schroeder, T., Rieger, M.A., 2014. Cytokine-regulated GADD45G induces differentiation and lineage selection in hematopoietic stem cells. *Stem Cell Reports* 3, 34–43. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2014.05.010>.
- Ullmann, P., Qureshi-Baig, K., Rodriguez, F., Ginolhac, A., Nonnenmacher, Y., Ternes, D., Weiler, J., Gäbler, K., Bahlawane, C., Hiller, K., Haan, S., Letellier, E., 2016. Hypoxia-responsive miR-210 promotes self-renewal capacity of colon tumor-initiating cells by repressing ISCU and by inducing lactate production. *Oncotarget* 7, 65454–65470. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.11772>.
- Williams, K.J., Gieling, R.G., 2019. Preclinical evaluation of ureidosulfamate carbonic anhydrase IX/XII inhibitors in the treatment of cancers. *Int. J. Mol. Sci.* <https://doi.org/10.3390/ijms20236080>.
- Worden, F., 2014. Treatment strategies for radioactive iodine-refractory differentiated thyroid cancer. *Ther. Adv. Med. Oncol.* 6, 267–279. <https://doi.org/10.1177/1758834014548188>.
- Xing, M., Westra, W.H., Tufano, R.P., Cohen, Y., Rosenbaum, E., Rhoden, K.J., Carson, K.A., Vasko, V., Larin, A., Tallini, G., Tolaney, S., Holt, E.H., Hui, P., Umbrecht, C.B., Basaria, S., Ewertz, M., Tufano, A.P., Califano, J.A., Ringel, M.D., Zeiger, M.A., Sidransky, D., Ladenson, P.W., 2005. BRAF mutation predicts a poorer clinical prognosis for papillary thyroid cancer. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 90, 6373–6379. <https://doi.org/10.1210/jc.2005-0987>.
- Zatovicova, M., Jelenska, L., Hulikova, A., Ditte, P., Ditte, Z., Csaderova, L., Svastova, E., Schmalix, W., Boettger, V., Bevan, P., Pastorek, J., Pastorekova, S., 2014. Monoclonal antibody G250 targeting CA IX: binding specificity, internalization and therapeutic effects in a non-renal cancer model. *Int. J. Oncol.* 45, 2455–2467. <https://doi.org/10.3892/ijo.2014.2658>.

5.2 Supplementary Material

Table S1: Clinicopathological characteristics of patients with differentiated (PTC and FTC) and undifferentiated thyroid carcinoma (ATC) in correlation to CAIX expression

Variables	Differentiated carcinoma (PTC and FTC)				Undifferentiated carcinoma (ATC)			
	Overall n (%) (n=100)	CAIX weak (n=27)	CAIX moderate (n=38)	CAIX strong (n=35)	Overall n (%) (n=14)	CAIX weak (n=3)	CAIX moderate (n=6)	CAIX strong (n=5)
Gender								
male	26 (26)	11 (42.3)	11 (42.3)	4 (15.4)	5 (36)	2 (40.0)	2 (40.0)	1 (20.0)
female	74 (74)	16 (21.6)	27 (36.5)	31 (41.9)	9 (64)	1 (11.2)	4 (44.4)	4 (44.4)
Age								
<55	58 (58)	18 (31.0)	20 (34.5)	20 (34.5)	8 (57)	2 (25.0)	4 (50.0)	2 (25.0)
>=55	42 (42)	9 (21.4)	18 (42.9)	15 (35.7)	6 (43)	1 (16.7)	2 (33.3)	3 (50.0)
T stage								
T1	0	0	0	0	0	0	0	0
T2	41 (41)	8 (19.5)	15 (36.6)	18 (43.9)	0	0	0	0
T3	35 (35)	10 (28.6)	12 (34.3)	13 (37.1)	0	0	0	0
T4	24 (24)	9 (37.5)	11 (45.8)	4 (16.7)	14 (100)	3 (21.4)	6 (42.9)	5 (35.7)
N stage								
N0	81 (81)	24 (29.6)	33 (40.8)	24 (29.6)	14 (100)	3 (21.4)	6 (42.9)	5 (35.7)
N+	19 (19)	3 (15.8)	5 (26.3)	11 (57.9)	0	0	0	0
UICC stage								
I	72 (72)	21 (29.2)	25 (34.7)	26 (36.1)	0	0	0	0
II	15 (15)	2 (13.3)	8 (53.4)	5 (33.3)	0	0	0	0
III	11 (11)	4 (36.4)	3 (27.2)	4 (36.4)	0	0	0	0
IV	2 (2)	0	2 (100)	0	14 (100)	3 (21.4)	6 (42.9)	5 (35.7)

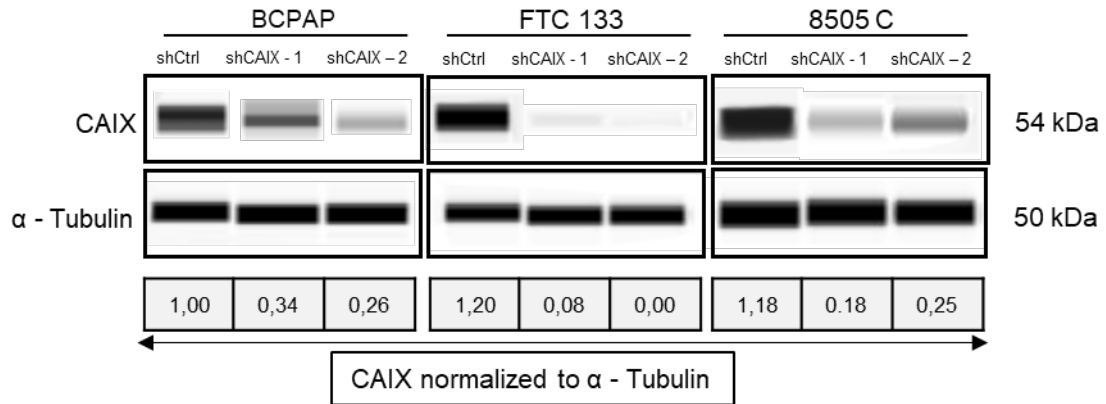
NOTE. Values are number of cases (%).

Abbreviations: CAIX, Carbonic-anhydrase IX; PTC, papillary thyroid cancer; FTC, follicular thyroid cancer; ATC, anaplastic thyroid cancer; UICC, International Union Against Cancer;

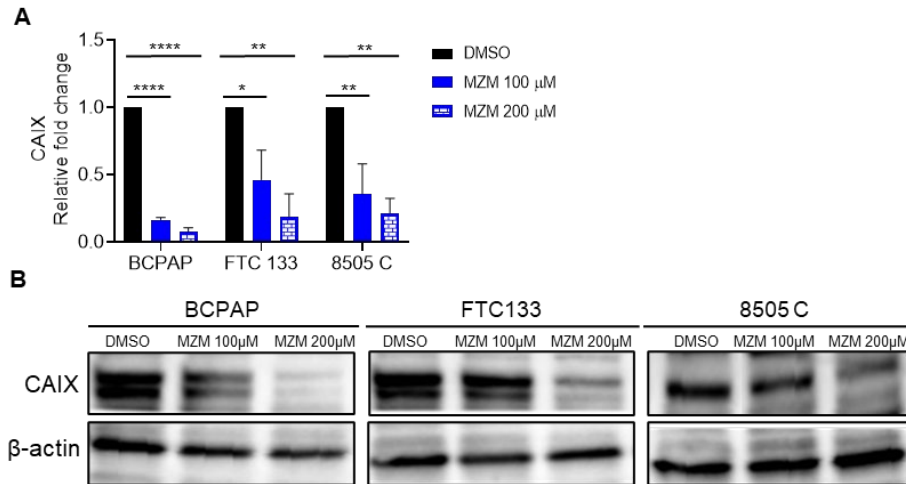
Table S2. Δ ct values of mRNA expression levels of genes of interest (GOI) detected by qPCR

GOI	BCPAP		FTC 133		8505 C	
	Monolayer	Thyrosphere	Monolayer	Thyrosphere	Monolayer	Thyrosphere
CAIX	10.505	8.8025	11.4	7.5325	12.1125	9.5675
PROM1	14.53	15.025	13.87	14.5275	19.13	15.735
NANOG	12.43	9.33	13.3875	6.9375	14.41	7.575
OCT 4	10.865	8.355	10.1825	5.91	11.2425	6.8
ABCG2	10.5525	10.9625	15.0925	8.9425	12.634	10.055

NOTE. Indicated are Δ ct values of mRNA expression of GOI. Δ ct values correspond to the difference between ct of the GOI and ct of the house keeping gene GAPDH. Abbreviations: ct, cycle threshold; GOI, gene of interest; CAIX, Carbonic-anhydrase IX; PROM1, Prominin 1; OCT4, Octamer-binding transcription factor 4; ABCG2, ATP-binding cassette super-family G Member 2; GAPDH, **Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase.**

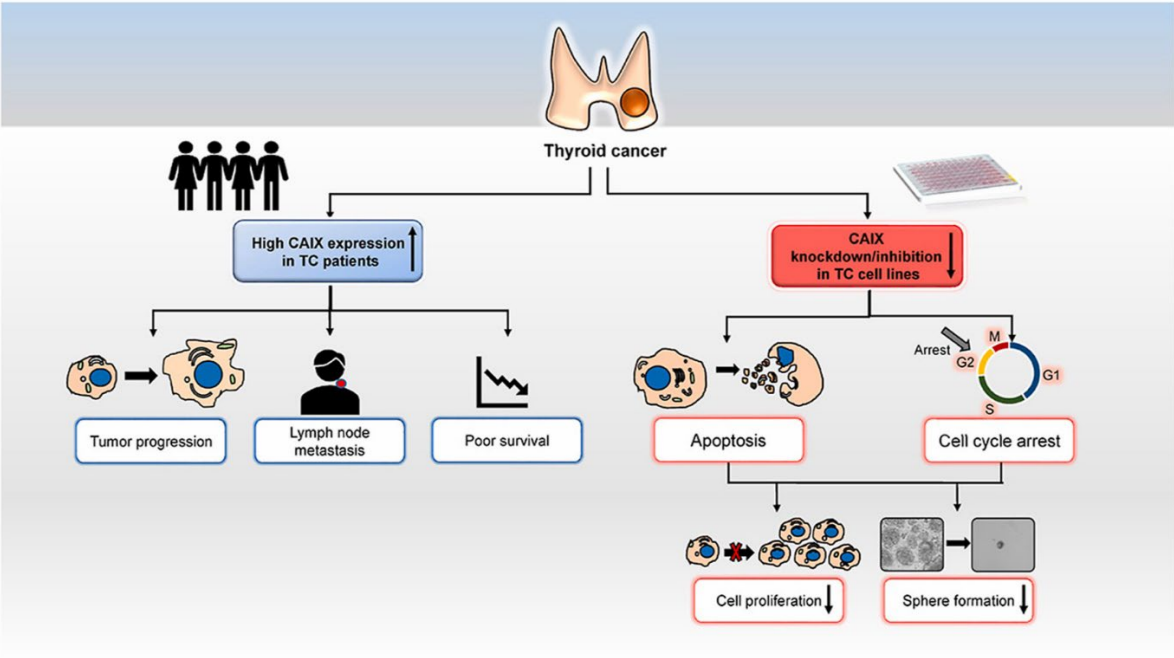


Supplementary Fig. S1. WES analysis of CAIX expression in thyroid cancer cell lines after CAIX knockdown. Representative Simple Western data of CAIX expression in BCPAP, FTC 133 and 8505 C after shRNA-mediated knockdown of CAIX. α -Tubulin served as loading control. Indicated are the values of CAIX expression normalized to α -Tubulin.



Supplementary Fig. S2. Quantitative mRNA and protein expression of CAIX in BCPAP, FTC 133 and 8505 C cells after inhibition of CAIX by MZM detected by qPCR and Western Blot. (A) RNA and (B) protein expression of CAIX was determined after MZM treatment for 72 hours under normoxia. DMSO served as control. Data are shown as the mean \pm SD of three independent experiments (Ordinary one-way ANOVA). ** $p < 0.0001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$.**

5.3 Graphical Abstract



6 Darstellung des eigenen Anteils

Publikation:

Schmidt J, Oppermann E, Blaheta RA, Schreckbach T, Lunger I, Rieger MA, Bechstein WO, Holzer K, Malkomes P. Carbonic-anhydrase IX expression is increased in thyroid cancer tissue and represents a potential therapeutic target to eradicate thyroid tumor-initiating cells. *Mol Cell Endocrinol.* 2021;535:111382. doi:10.1016/j.mce.2021.111382.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden nach Prüfung in einem anonymisierten Peer-Review-Verfahren am 15.09.2021 im Journal of Molecular and Cellular Endocrinology publiziert. Das Projekt konnte durch die Zusammenarbeit aller Autoren erfolgreich durchgeführt werden. Die Thematik dieses Manuskripts wurde durch Frau Dr. Patrizia Malkomes (P.M.) und durch Frau Prof. Dr. Katharina Holzer (K.H.) entwickelt.

Als Erstautorin war ich zunächst unter Anleitung durch P.M. und Elsie Oppermann (E.O.), später selbstständig, für die Durchführung der Versuche verantwortlich. Die statistische Auswertung sowie die graphische Darstellung der Ergebnisse oblagen in Rücksprache mit meiner Betreuerin P.M. meiner Verantwortung.

Die erste Version des Manuskripts wurde durch mich erstellt. Die Überarbeitung des Manuskripts erfolgte in enger Zusammenarbeit mit P.M. und Roman Blaheta (R.A.B.). Hierbei erfolgte eine Supervision durch K.H. Die vorläufige Version des Manuskripts wurde allen Mitautoren zur Korrektur vorgelegt und entsprechende Änderungsvorschläge wurden durch mich und P.M. umgesetzt, sodass alle Mitautoren der finalen Version des Manuskripts und damit einer Veröffentlichung in *Mol Cell Endocrinol* zustimmten. Nach Begutachtung in einem anonymisierten Peer-Review-Verfahren erfolgte die Einarbeitung der Korrekturvorschläge durch mich und meine Betreuerin P.M. Für den Knockdown von CAIX wurde pLKO.1 durch Herrn Prof. Michael A. Rieger zur Verfügung gestellt. Ressourcen wurden vollständig über K.H., P.M. und Herrn Prof. Dr. Bechstein bereitgestellt. Des Weiteren wurde ein Teil des Projekts durch Fördergelder von P.M. finanziert. Die Fördergelder stammten von der Else Kröner Fresenius – Stiftung und von der Martha Schmelz Foundation.

7 Literaturverzeichnis

1. Nguyen QT, Lee EJ, Huang MG, Park Y in, Khullar A, Plodkowski RA. Diagnosis and treatment of patients with thyroid cancer. *Am Health Drug Benefits*. 2015;8(1):30-40.
2. Fagin JA, Wells SA. Biologic and Clinical Perspectives on Thyroid Cancer. *N Engl J Med*. 2016;375(11):1054-1067. doi:10.1056/NEJMra1501993.
3. Xing M, Westra WH, Tufano RP, et al. BRAF mutation predicts a poorer clinical prognosis for papillary thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005;90(12):6373-6379. doi:10.1210/jc.2005-0987.
4. Jin M, Song DE, Ahn J, et al. Genetic Profiles of Aggressive Variants of Papillary Thyroid Carcinomas. *Cancers (Basel)*. 2021;13(4). doi:10.3390/cancers13040892.
5. Hernandez-Prera JC, Machado RA, Asa SL, et al. Pathologic Reporting of Tall-Cell Variant of Papillary Thyroid Cancer: Have We Reached a Consensus? *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association*. 2017;27(12):1498-1504. doi:10.1089/thy.2017.0280.
6. Coca-Pelaz A, Shah JP, Hernandez-Prera JC, et al. Papillary Thyroid Cancer- Aggressive Variants and Impact on Management: A Narrative Review. *Adv Ther*. 2020;37(7):3112-3128. doi:10.1007/s12325-020-01391-1.
7. Nucera C. Evolution of resistance to thyroid cancer therapy. *Aging (Albany NY)*. 2016;8(8):1576-1577. doi:10.18632/aging.101030.
8. Worden F. Treatment strategies for radioactive iodine-refractory differentiated thyroid cancer. *Ther Adv Med Oncol*. 2014;6(6):267-279. doi:10.1177/1758834014548188.
9. Kaatsch P, Spix C, Katalinic A, et al. Krebs in Deutschland | 2013/2014. 2017. https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/kid_2017/krebs_in_deutschland_2017.pdf?__blob=publicationFile. Accessed April 17, 2022.
10. Saini S, Tulla K, Maker AV, Burman KD, Prabhakar BS. Therapeutic advances in anaplastic thyroid cancer: a current perspective. *Mol Cancer*. 2018;17(1):154. doi:10.1186/s12943-018-0903-0.

11. Bhatia P, Tsumagari K, Abd Elmageed ZY, Friedlander P, Buell JF, Kandil E. Stem cell biology in thyroid cancer: Insights for novel therapies. *World J Stem Cells*. 2014;6(5):614-619. doi:10.4252/wjsc.v6.i5.614.
12. Croker AK, Allan AL. Cancer stem cells: implications for the progression and treatment of metastatic disease. *J Cell Mol Med*. 2008;12(2):374-390. doi:10.1111/j.1582-4934.2007.00211.x.
13. Qureshi-Baig K, Ullmann P, Haan S, Letellier E. Tumor-Initiating Cells: a criTICal review of isolation approaches and new challenges in targeting strategies. *Mol Cancer*. 2017;16(1):40. doi:10.1186/s12943-017-0602-2.
14. Mitsutake N, Iwao A, Nagai K, et al. Characterization of side population in thyroid cancer cell lines: cancer stem-like cells are enriched partly but not exclusively. *Endocrinology*. 2007;148(4):1797-1803. doi:10.1210/en.2006-1553.
15. Grassi ES, Ghiandai V, Persani L. Thyroid Cancer Stem-Like Cells: From Microenvironmental Niches to Therapeutic Strategies. *J Clin Med*. 2021;10(7). doi:10.3390/jcm10071455.
16. Li Z, Bao S, Wu Q, et al. Hypoxia-inducible factors regulate tumorigenic capacity of glioma stem cells. *Cancer Cell*. 2009;15(6):501-513. doi:10.1016/j.ccr.2009.03.018.
17. Mathieu J, Zhang Z, Zhou W, et al. HIF induces human embryonic stem cell markers in cancer cells. *Cancer Res*. 2011;71(13):4640-4652. doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-3320.
18. Ullmann P, Qureshi-Baig K, Rodriguez F, et al. Hypoxia-responsive miR-210 promotes self-renewal capacity of colon tumor-initiating cells by repressing ISCU and by inducing lactate production. *Oncotarget*. 2016;7(40):65454-65470. doi:10.18632/oncotarget.11772.
19. GRAY LH, CONGER AD, EBERT M, HORNSEY S, SCOTT OC. The concentration of oxygen dissolved in tissues at the time of irradiation as a factor in radiotherapy. *Br J Radiol*. 1953;26(312):638-648. doi:10.1259/0007-1285-26-312-638.

20. Muz B, La Puente Pd, Azab F, Azab AK. The role of hypoxia in cancer progression, angiogenesis, metastasis, and resistance to therapy. *Hypoxia (Auckl)*. 2015;3:83-92. doi:10.2147/HP.S93413.
21. Rohwer N, Cramer T. Hypoxia-mediated drug resistance: novel insights on the functional interaction of HIFs and cell death pathways. *Drug Resist Updat*. 2011;14(3):191-201. doi:10.1016/j.drug.2011.03.001.
22. Chen Z, Ai L, Mboge MY, et al. Differential expression and function of CAIX and CAXII in breast cancer: A comparison between tumorgraft models and cells. *PLoS One*. 2018;13(7):e0199476. doi:10.1371/journal.pone.0199476.
23. Klatte T, Seligson DB, Rao JY, et al. Carbonic anhydrase IX in bladder cancer: a diagnostic, prognostic, and therapeutic molecular marker. *Cancer*. 2009;115(7):1448-1458. doi:10.1002/cncr.24163.
24. Supuran CT. Inhibition of carbonic anhydrase IX as a novel anticancer mechanism. *World J Clin Oncol*. 2012;3(7):98-103. doi:10.5306/wjco.v3.i7.98.
25. Huizing FJ, Garousi J, Lok J, et al. CAIX-targeting radiotracers for hypoxia imaging in head and neck cancer models. *Sci Rep*. 2019;9(1):18898. doi:10.1038/s41598-019-54824-5.
26. Chiche J, Ilc K, Laferrière J, et al. Hypoxia-inducible carbonic anhydrase IX and XII promote tumor cell growth by counteracting acidosis through the regulation of the intracellular pH. *Cancer Res*. 2009;69(1):358-368. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-2470.
27. Li Y, Tu C, Wang H, Silverman DN, Frost SC. Catalysis and pH control by membrane-associated carbonic anhydrase IX in MDA-MB-231 breast cancer cells. *J Biol Chem*. 2011;286(18):15789-15796. doi:10.1074/jbc.M110.188524.
28. Svastová E, Hulíková A, Rafajová M, et al. Hypoxia activates the capacity of tumor-associated carbonic anhydrase IX to acidify extracellular pH. *FEBS Lett*. 2004;577(3):439-445. doi:10.1016/j.febslet.2004.10.043.
29. Swietach P, Vaughan-Jones RD, Harris AL. Regulation of tumor pH and the role of carbonic anhydrase 9. *Cancer Metastasis Rev*. 2007;26(2):299-310. doi:10.1007/s10555-007-9064-0.

30. Kon-no H, Ishii G, Nagai K, et al. Carbonic anhydrase IX expression is associated with tumor progression and a poor prognosis of lung adenocarcinoma. *Lung Cancer*. 2006;54(3):409-418. doi:10.1016/j.lungcan.2006.08.017.
31. Koperek O, Bergner O, Pichlhöfer B, et al. Expression of hypoxia-associated proteins in sporadic medullary thyroid cancer is associated with desmoplastic stroma reaction and lymph node metastasis and may indicate somatic mutations in the VHL gene. *J Pathol*. 2011;225(1):63-72. doi:10.1002/path.2926.
32. Takacova M, Bullova P, Simko V, et al. Expression pattern of carbonic anhydrase IX in Medullary thyroid carcinoma supports a role for RET-mediated activation of the HIF pathway. *Am J Pathol*. 2014;184(4):953-965. doi:10.1016/j.ajpath.2014.01.002.
33. Lock FE, McDonald PC, Lou Y, et al. Targeting carbonic anhydrase IX depletes breast cancer stem cells within the hypoxic niche. *Oncogene*. 2013;32(44):5210-5219. doi:10.1038/onc.2012.550.
34. Peppicelli S, Andreucci E, Ruzzolini J, et al. The Carbonic Anhydrase IX inhibitor SLC-0111 as emerging agent against the mesenchymal stem cell-derived pro-survival effects on melanoma cells. *J Enzyme Inhib Med Chem*. 2020;35(1):1185-1193. doi:10.1080/14756366.2020.1764549.
35. Nahm JH, Kim HM, Koo JS. Glycolysis-related protein expression in thyroid cancer. *Tumour Biol*. 2017;39(3):1010428317695922. doi:10.1177/1010428317695922.
36. Burrows N, Resch J, Cowen RL, et al. Expression of hypoxia-inducible factor 1 alpha in thyroid carcinomas. *Endocr Relat Cancer*. 2010;17(1):61-72. doi:10.1677/ERC-08-0251.
37. Ihnatko R, Kubes M, Takacova M, et al. Extracellular acidosis elevates carbonic anhydrase IX in human glioblastoma cells via transcriptional modulation that does not depend on hypoxia. *Int J Oncol*. 2006. doi:10.3892/ijo.29.4.1025.
38. Kaluz S, Kaluzová M, Chrastina A, et al. Lowered Oxygen Tension Induces Expression of the Hypoxia Marker MN/Carbonic Anhydrase IX in the Absence of

- Hypoxia-inducible Factor 1 α Stabilization A Role for Phosphatidylinositol 3'-Kinase. *Cancer Res.* 2002;62(15):4469-4477.
<https://aacrjournals.org/cancerres/article/62/15/4469/509054/Lowered-Oxygen-Tension-Induces-Expression-of-the>.
39. Parks SK, Cormerais Y, Durivault J, Pouyssegur J. Genetic disruption of the pH_i-regulating proteins Na⁺/H⁺ exchanger 1 (SLC9A1) and carbonic anhydrase 9 severely reduces growth of colon cancer cells. *Oncotarget.* 2017;8(6):10225-10237. doi:10.18632/oncotarget.14379.
40. Zatovicova M, Jelenska L, Hulikova A, et al. Monoclonal antibody G250 targeting CA IX: Binding specificity, internalization and therapeutic effects in a non-renal cancer model. *Int J Oncol.* 2014;45(6):2455-2467. doi:10.3892/ijo.2014.2658.
41. Amaral RLF, Miranda M, Marcato PD, Swiech K. Comparative Analysis of 3D Bladder Tumor Spheroids Obtained by Forced Floating and Hanging Drop Methods for Drug Screening. *Front Physiol.* 2017;8:605. doi:10.3389/fphys.2017.00605.
42. Bahmad HF, Cheaito K, Chalhoub RM, et al. Sphere-Formation Assay: Three-Dimensional in vitro Culturing of Prostate Cancer Stem/Progenitor Sphere-Forming Cells. *Front Oncol.* 2018;8:347. doi:10.3389/fonc.2018.00347.
43. Morrison BJ, Steel JC, Morris JC. Sphere culture of murine lung cancer cell lines are enriched with cancer initiating cells. *PLoS One.* 2012;7(11):e49752. doi:10.1371/journal.pone.0049752.
44. Andreucci E, Peppicelli S, Ruzzolini J, et al. The acidic tumor microenvironment drives a stem-like phenotype in melanoma cells. *J Mol Med (Berl).* 2020;98(10):1431-1446. doi:10.1007/s00109-020-01959-y.
45. Ledaki I, McIntyre A, Wigfield S, et al. Carbonic anhydrase IX induction defines a heterogeneous cancer cell response to hypoxia and mediates stem cell-like properties and sensitivity to HDAC inhibition. *Oncotarget.* 2015;6(23):19413-19427. doi:10.18632/oncotarget.4989.

46. Saunders A, Faiola F, Wang J. Concise review: pursuing self-renewal and pluripotency with the stem cell factor Nanog. *Stem Cells*. 2013;31(7):1227-1236. doi:10.1002/stem.1384.
47. Babaie Y, Herwig R, Greber B, et al. Analysis of Oct4-dependent transcriptional networks regulating self-renewal and pluripotency in human embryonic stem cells. *Stem Cells*. 2007;25(2):500-510. doi:10.1634/stemcells.2006-0426.
48. Qiu Z-X, Zhao S, Mo X-M, Li W-M. Overexpression of PROM1 (CD133) confers poor prognosis in non-small cell lung cancer. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015;8(6):6589-6595. Published June 1, 2015.
49. Li P, Zhou C, Xu L, Xiao H. Hypoxia enhances stemness of cancer stem cells in glioblastoma: an in vitro study. *Int J Med Sci*. 2013;10(4):399-407. doi:10.7150/ijms.5407.
50. Marie-Egyptienne DT, Chaudary N, Kalliomäki T, Hedley DW, Hill RP. Cancer initiating-cells are enriched in the CA9 positive fraction of primary cervix cancer xenografts. *Oncotarget*. 2017;8(1):1392-1404. doi:10.18632/oncotarget.13625.
51. Bayat Mokhtari R, Baluch N, Morgatskaya E, et al. Human bronchial carcinoid tumor initiating cells are targeted by the combination of acetazolamide and sulforaphane. *BMC Cancer*. 2019;19(1):864. doi:10.1186/s12885-019-6018-1.
52. Scozzafava A, Supuran CT. Glaucoma and the applications of carbonic anhydrase inhibitors. *Subcell Biochem*. 2014;75:349-359. doi:10.1007/978-94-007-7359-2_17.
53. Williams KJ, Gieling RG. Preclinical Evaluation of Ureidosulfamate Carbonic Anhydrase IX/XII Inhibitors in the Treatment of Cancers. *Int J Mol Sci*. 2019;20(23). doi:10.3390/ijms20236080.
54. Lu H, Zhang H, Jiang Y. Methazolamide in high-altitude illnesses. *Eur J Pharm Sci*. 2020;148:105326. doi:10.1016/j.ejps.2020.105326.
55. Boyd NH, Walker K, Fried J, et al. Addition of carbonic anhydrase 9 inhibitor SLC-0111 to temozolomide treatment delays glioblastoma growth in vivo. *JCI Insight*. 2017;2(24). doi:10.1172/jci.insight.92928.

56. Kalinin S, Malkova A, Sharonova T, et al. Carbonic Anhydrase IX Inhibitors as Candidates for Combination Therapy of Solid Tumors. *Int J Mol Sci*. 2021;22(24). doi:10.3390/ijms222413405.
57. Said HM, Hagemann C, Carta F, et al. Hypoxia induced CA9 inhibitory targeting by two different sulfonamide derivatives including acetazolamide in human glioblastoma. *Bioorg Med Chem*. 2013;21(13):3949-3957. doi:10.1016/j.bmc.2013.03.068.
58. McDonald PC, Chia S, Bedard PL, et al. A Phase 1 Study of SLC-0111, a Novel Inhibitor of Carbonic Anhydrase IX, in Patients With Advanced Solid Tumors. *Am J Clin Oncol*. 2020;43(7):484-490. doi:10.1097/COC.0000000000000691.
59. McDonald PC, Chafe SC, Supuran CT, Dedhar S. Cancer Therapeutic Targeting of Hypoxia Induced Carbonic Anhydrase IX: From Bench to Bedside. *Cancers (Basel)*. 2022;14(14):3297. doi:10.3390/cancers14143297.

8 Lebenslauf

9 Danksagung

Zuallererst möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Katharina Holzer und bei Frau Dr. Patrizia Malkomes dafür bedanken, dass sie mir im Rahmen meiner Dissertation die Möglichkeit gegeben haben, wertvolle Erfahrungen im Bereich der experimentellen Forschung zu sammeln. Als Mentoren standen sie mir mit Rat und Tat während der gesamten Dissertation zur Seite. Mithilfe von Frau Dr. Patrizia Malkomes und Frau Elsie Oppermann konnte ich mir ein großes Wissen zur Durchführung verschiedenster Experimente aneignen, sodass ich mein erlerntes Wissen für zukünftige Projekte in der Forschung einsetzen kann. Hierfür möchte ich mich bei beiden herzlich bedanken. Die Forschung hat mir sehr viel Spaß gemacht und ich werde mich immer an diese wunderbare Zeit und alle Menschen, die mich währenddessen begleitet haben, zurückerinnern. Des Weiteren bin ich dankbar dafür, dass Frau Prof. Dr. Katharina Holzer und Frau Dr. Patrizia Malkomes mir die Gelegenheit gegeben haben, meine Forschungsergebnisse auf Kongressen als Posterpräsentationen vorzustellen. Im Besonderen möchte ich mich auch dafür bedanken, dass Frau Prof. Dr. Katharina Holzer und Frau Dr. Patrizia Malkomes mir die Möglichkeit gegeben haben, meine Forschungsergebnisse im Rahmen einer publikationsbasierten Dissertation zu veröffentlichen. Dieses war zu Beginn der Dissertation nicht geplant. Für diese Gelegenheit bin ich unendlich dankbar. Auch möchte ich mich herzlich bei allen Ko-Autoren der Publikation für ihre konstruktive Kritik bedanken.

Ein großes Dankeschön geht an meine wunderbare Familie, die mich in allen Lebenslagen unterstützt und mir Rückhalt gibt. Ohne meine lieben Eltern wäre ich nicht da, wo ich heute bin. Ihr seid meine treibende Kraft, die mich dazu bringt, Grenzen zu überschreiten.

Zum Schluss bedanke ich mich bei Jonas. Ich danke dir für die Liebe, Freude, Unterstützung, aber auch für die Geduld, die du mir während der Fertigstellung dieser Dissertation entgegengebracht hast. Dank deiner Unterstützung schaffe ich es, das Beste aus mir herauszuholen und gelassener durch das Leben zu schreiten.

10 Schriftliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Dissertation mit dem Titel

Die Carboanhydrase IX repräsentiert ein potenzielles therapeutisches Zielmolekül in der Eradikation von Tumor-initiiierenden Zellen des Schilddrüsenkarzinoms

in der Klinik für Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie, Universitätsklinikum Frankfurt am Main unter Betreuung und Anleitung von Prof. Dr. Katharina Holzer mit Unterstützung durch Dr. Patrizia Malkomes ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Darüber hinaus versichere ich, nicht die Hilfe einer kommerziellen Promotionsvermittlung in Anspruch genommen zu haben.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht. Die vorliegende Arbeit wurde bisher nicht als Dissertation eingereicht.

Vorliegende Ergebnisse der Arbeit wurden in folgendem Publikationsorgan veröffentlicht:

Schmidt J, Oppermann E, Blaheta RA, Schreckbach T, Lunger I, Rieger MA, Bechstein WO, Holzer K, Malkomes P. Carbonic-anhydrase IX expression is increased in thyroid cancer tissue and represents a potential therapeutic target to eradicate thyroid tumor-initiating cells. *Mol Cell Endocrinol.* 2021;535:111382.

(Ort, Datum)

(Unterschrift)