

AUS DEM LEHRSTUHL  
FÜR INNERE MEDIZIN III  
PROF. DR. WOLFGANG HERR  
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**Einfluss von MCT1/2 Inhibitoren und NSARs auf Tumorzellen und  
primäre humane T-Zellen**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

an der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Lisa Maria Hacker

2019



AUS DEM LEHRSTUHL  
FÜR INNERE MEDIZIN III  
PROF. DR. WOLFGANG HERR  
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**Einfluss von MCT1/2 Inhibitoren und NSARs auf Tumorzellen und  
primäre humane T-Zellen**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

an der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Lisa Maria Hacker

2019

Dekan:

Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert

1.Berichterstatter:

PD Dr. Kathrin Renner

2.Berichterstatter:

PD Dr. Stephan Schreml

Tag der mündlichen Prüfung:

20.05.2019



# Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	3
Tabellenverzeichnis.....	4
Abkürzungsverzeichnis.....	5
1. Einleitung .....	9
1.1 Tumormetabolismus .....	9
1.1.1 Warburg Effekt und Energiestoffwechsel.....	9
1.2 Tumormetabolismus als therapeutische Zielstruktur .....	17
1.2.1 Blockade der Glykolyse.....	18
1.2.2 MCT als Zielstruktur neuer Therapien .....	20
1.3 Das Immunsystem .....	26
1.3.1 Die wichtigsten Vertreter der zellulären Immunabwehr.....	27
1.3.2 T- Zellen: Entwicklung und Funktion.....	28
1.3.3 Aktivierung von T- Zellen.....	30
1.4 Immunüberwachung und Escape-Strategien von Tumoren.....	33
1.5 Wechselwirkung Tumorstoffwechsel und Immunsystem .....	35
2. Zielsetzung.....	38
3. Material .....	39
3.1 Geräte.....	39
3.2 Verbrauchsmaterialien .....	40
3.3 Chemikalien, Medien und Zusätze .....	41
3.4 Enzyme, Testsysteme und Farbstoffe .....	42
3.5 Antikörper für Durchflusszytometrie .....	43
3.6 Antibiotika für die Kultur von Zelllinien und primären T Zellen .....	44
4. Methoden .....	45
4.1 Tumorzelllinien.....	45
4.1.1 Einfrieren und Auftauen.....	45
4.1.2 Kultivierung von Tumorzelllinien .....	46
4.1.3 Experimenteller Aufbau Tumorzelllinien .....	46
4.2 Primär humane T- Zellen .....	48
4.2.1 Isolation und Kultivierung von CD4 <sup>+</sup> und CD8 <sup>+</sup> T- Zellen .....	48
4.2.2 Experimenteller Aufbau CD4 <sup>+</sup> und CD8 <sup>+</sup> T- Zellen.....	49
4.2.3 Zytokinbestimmung mittels „Enzyme-linked Immunosorbent Assay“ (ELISA) ..	49
4.3 Bestimmung von Laktat und Glukose.....	50
4.4 Bestimmung der Proliferation .....	51
4.5 Durchflusszytometrische Messung.....	51

4.5.1	Kompensation und „Gating“ .....	52
4.5.2	Bestimmung der Expression von Oberflächenproteinen .....	52
4.5.3	Bestimmung der Apoptose .....	53
4.6	Mycoplasmen Testung .....	53
4.7	Statistische Auswertung .....	54
5.	Ergebnisse .....	55
5.1	AZD3965 im Vergleich zu Diclofenac .....	55
5.1.1	Leukämiecelllinien C7H2 und U937 .....	55
5.1.2	Solide Tumorzelllinien mit unterschiedlicher MCT-Expression .....	57
5.1.3	Zusammenfassung .....	67
5.2	Effekte einer MCT- Hemmung auf primär humane T- Zellen .....	68
5.2.1	MCT1/2 Inhibitoren AZD396 und SR13800 sowie Diclofenac im Vergleich .....	68
5.2.2	Zusammenfassung .....	73
5.3	Effekte weiterer NSAR mit struktureller Ähnlichkeit zu Diclofenac .....	74
5.3.1	Lumiracoxib .....	75
5.3.2	Indometacin .....	77
5.3.3	Ketoprofen .....	80
6.	Diskussion .....	82
6.1	Tumormetabolismus als therapeutische Zielstruktur .....	82
6.2	Targeted therapy“ – Möglichkeiten und Grenzen einer MCT- Blockade .....	87
6.3	Auswirkungen einer MCT Inhibition auf CD4 <sup>+</sup> und CD8 <sup>+</sup> Zellen .....	89
6.4	Kombination von MCT Inhibitoren mit Immuntherapie .....	91
7.	Zusammenfassung .....	93
8.	Literaturverzeichnis .....	95
	Danksagung .....	108

# Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Zellulärer Glukose Metabolismus: .....	10
Abbildung 2 Struktur des Monocarboxylattransporter 1 .....	13
Abbildung 3 Strukturformel des AZD3965.....	20
Abbildung 4 Strukturformel von Diclofenac .....	22
Abbildung 5 Strukturformeln der Diclofenac Verwandten: Lumiracoxib, Ketoprofen und Indometacin.....	24
Abbildung 6 Der gemeinsame Ursprung der myeloischen und lymphatischen Zellen aus einer gemeinsamen Stammzelle .....	27
Abbildung 7 „Gating“ der CD4+ T – Zellen zur Untersuchung der Oberflächenexpression von CD25, CD137 und CD95 .....	52
Abbildung 8 Effekte von AZD3965 und Diclofenac auf C7H2 - und U937 – Zellen:.....	56
Abbildung 9 Mct1 und 4 Expression des 2L/c und NKagI Klon .....	58
Abbildung 10 Laktatproduktion der B16 Klone unter MCT Inhibition .....	59
Abbildung 11 Glukoseaufnahme und Viabilität der B16 Zellen unter MCT Inhibition.....	60
Abbildung 12 Laktatproduktion der OC316 und IGROV-1 Zelllinienunter MCT Inhibition .....	63
Abbildung 13 Glukoseumsatz der OC316 und IGROV-1 Zellen unter MCT Inhibition .....	64
Abbildung 14 Mikroskopaufnahmen der OC316 und IGROV-1 Zellen .....	66
Abbildung 15 Laktatproduktion und Glukoseaufnahme von CD4+ und CD8+ T-Zellen.....	69
Abbildung 16 Expression der Oberflächenmarker CD25 und CD137 unter MCT Inhibition auf CD4+ und CD8+ Zellen.....	70
Abbildung 17 Zytokinproduktion der CD4+ T – Zellen .....	72
Abbildung 18 Zytokinproduktion der CD8+ T- Zellen unter MCT Inhibition.....	73
Abbildung 20 Effekte von Lumiracoxib auf die U937 Zellen im Vergleich zu Diclofenac.....	75
Abbildung 21 Effekte von Lumiracoxib auf die OC316 Zellen im Vergleich zu Diclofenac.....	76
Abbildung 22 Wirksamkeit von Indometacin auf U937 im Vergleich zu Diclofenac .....	77
Abbildung 23 Wirksamkeit von Indometacin auf die OC316 Zellen im Vergleich zu Diclofenac .....	78
Abbildung 24 Wirksamkeit von Ketoprofen auf U937 im Vergleich zu Diclofenac .....	80

# Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Km Werte (mM) für MCT1-4 für die die spezifischen Substrate:.....	14
Tabelle 2 Proliferation von C7H2 und U937 unter AZD3965 und Diclofenac Behandlung.....	56
Tabelle 3 Proliferation NKagI und 2L/c unter AZD3965 und Diclofenac Behandlung .....	61
Tabelle 4 Proliferation OC316 und IGROV-1 unter AZD3965 und Diclofenac.....	64
Tabelle 5 Medianer Durchmesser und Proliferation der CD4 <sup>+</sup> und CD8 <sup>+</sup> T - Zellen unter AZD3965, SR13800 und Diclofenac Behandlung .....	71
Tabelle 6 Proliferation der U937 und OC316 unter Lumiracoxib und Diclofenac.....	77
Tabelle 7 Proliferation der NKagI Klone und der U937 unter Indometacin im Vergleich zu Diclofenac .....	79
Tabelle 8 Proliferation der U937 unter Ketoprofen und Diclofenac.....	81

## Abkürzungsverzeichnis

<b>2-DG</b>	2-Deoxyglukose
<b>3BP</b>	3- Bromopyruvat
<b>7- AAD</b>	7- Amino-Actinomycin
<b><sup>18</sup>FDG-PET</b>	<sup>18</sup> Fluorodeoxyglukose-Positronen- Emissions-Tomographie
<b>AIDS</b>	Erworbenes Immundefektsyndrom  <i>(Acquired immunodeficiency syndrome)</i>
<b>APC</b>	Antigen präsentierende Zellen
<b>ATP</b>	Adenosintriphosphat
<b>BCR</b>	B-Zell Rezeptor
<b>CD</b>	Gruppenzugehöriges Antigen  <i>(cluster of differentiation)</i>
<b>c-Myc/MYC</b>	MYC-Gen
<b>CO<sub>2</sub></b>	Kohlenstoffdioxid
<b>COX</b>	Cyclooxygenase
<b>CTLA-4</b>	Zytotoxisches T-Zellen assoziiertes Protein  <i>(cytotoxic T lymphocyte- associated protein 4)</i>
<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid

<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraacetat
<b>ELISA</b>	Enzym-vermittelter Immunabsorptionsassay  (enzyme-linked immunosorbent assay)
<b>FACS</b>	Fluoreszenz aktivierte Zellsortierung  ( <i>fluorescence activating cell sorting</i> )
<b>FASL</b>	FAS Ligand
<b>FCS</b>	Fetales Kälberserum  (fetal calf serum)
<b>FSC</b>	Vorwärtsstreulicht  ( <i>forward scatter</i> )
<b>G6P</b>	Glukose-6-Phosphat
<b>G6PDH</b>	Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase
<b>GLUT-1</b>	Glucose-1-Transporter
<b>HIF</b>	Hypoxie-induzierter Faktor  (hypoxia-inducible factor)
<b>IDO</b>	Indolamin-2,3-Dioxygenase
<b>IFN<math>\gamma</math></b>	Interferon $\gamma$
<b>IgG</b>	Immunglobulin G

<b>IL</b>	Interleukin
<b>LDH</b>	Laktatdehydrogenase
<b>MCT</b>	Monocarboxylattransporter
<b>MHC</b>	Haupthistokompatibilitätskomplex  (major histocompatibility complex)
<b>mTOR</b>	Zielstruktur von Rapamycin in Säugetieren  (mammalian target of Rapamycin)
<b>NAD</b>	Nikotinamidadenindinukleotid
<b>NADH</b>	Reduzierte Form des Nicotinamidadenindinukleotid
<b>NK-Zellen</b>	Natürliche Killerzellen
<b>NO</b>	Stickstoffmonoxid
<b>NSAR</b>	Nichtsteroidales Antirheumatikum
<b>OXPHOS</b>	Oxidative Phosphorylierung
<b>p53</b>	Protein 53
<b>PBS</b>	Phosphat gepufferte Salzlösung  ( <i>phosphate buffered saline</i> )
<b>PD-1</b>	Programmierter Zelltod Protein 1  ( <i>Programmed cell death protein1</i> )

<b>PK</b>	Pyruvatkinase
<b>PI3K</b>	Phosphoinositol-3 Kinase
<b>RPM</b>	Umdrehungen pro Minute  <i>(Rates per minute)</i>
<b>RPMI 1640</b>	Roswell Park Memorial Institute Medium 1640 <i>(Entwicklungsort des Mediums 1640)</i>
<b>SCC</b>	Seitwärtsstreulicht  <i>(side scatter)</i>
<b>T-ALL</b>	Akute lymphatische T-Zell Leukämie
<b>TCA</b>	Tricarbonsäure-oder Zitronensäure Zyklus
<b>T<sub>c</sub>- Zelle</b>	Zytotoxische T- Zelle
<b>TCR</b>	T-Zell Rezeptor
<b>T<sub>H</sub>-Zelle</b>	T-Helferzelle
<b>TM</b>	Transmembranhelices
<b>TNF</b>	Tumornekrosefaktor
<b>T<sub>reg</sub>-Zellen</b>	Regulatorische T- Zellen
<b>VEGF</b>	Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor  <i>(vascular endothelial growth factor)</i>

# 1. Einleitung

## 1.1 Tumormetabolismus

Tumore zeichnen sich im Gegensatz zu normalen Körperzellen durch eine ungehemmte Proliferation aus, da sie sich der Kontrolle durch Wachstumsfaktoren, Suppressorgenen und Genen der Zellregulation (p53, c-Myc, PI3/Akt) entzogen haben.

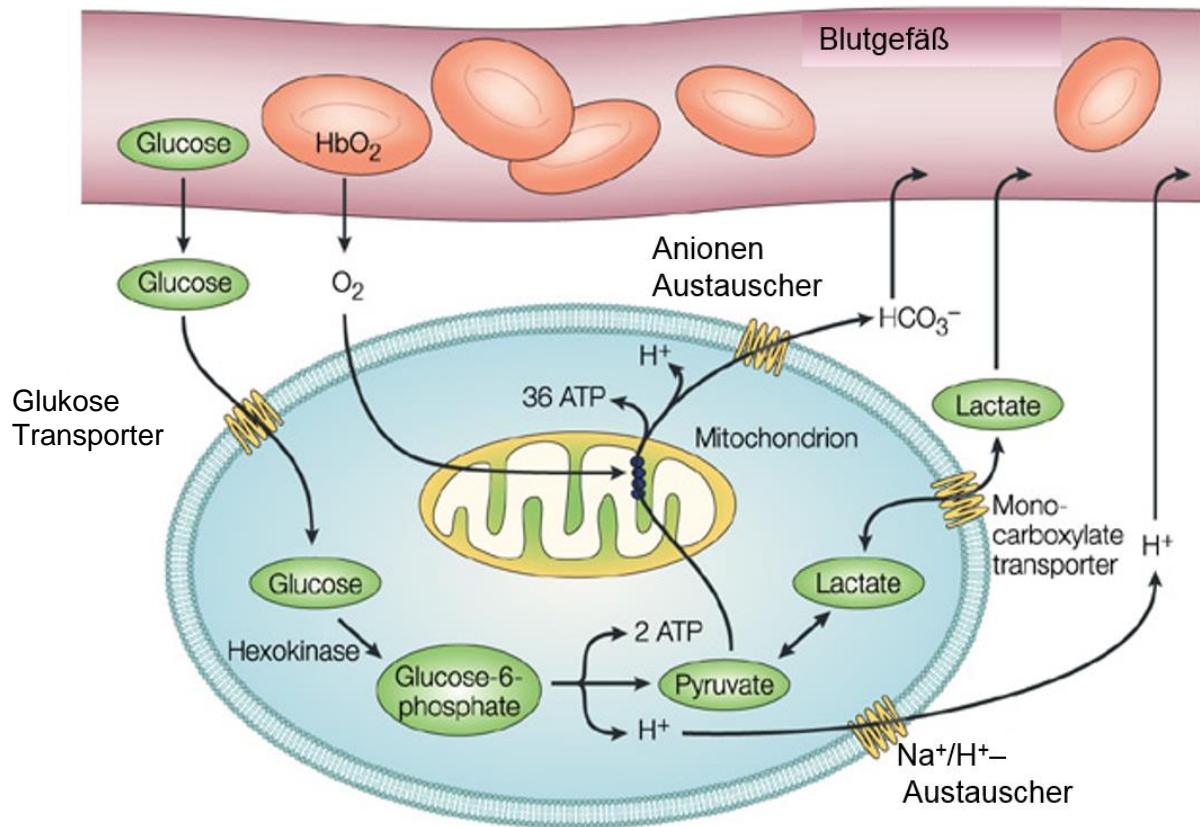
Die deregulierte Zellzykluskontrolle in Tumorzellen trägt zu gesteigerten Proliferationsraten bei. Den erhöhten Bedarf an Proteinen und Zellorganellen zu decken, stellt die Tumorzelle vor enorme Herausforderungen. Die starke Proliferation geht zum einen mit einem gesteigerten Energiebedarf einher, zum anderen ist ein hohes Substratangebot für die Biosynthese neuer Zellorganellen nötig. Daher sind Tumorzellen auf eine kontinuierliche Zufuhr an Substraten angewiesen und benötigen eine verstärkte Stoffwechselaktivität. Nur auf diese Weise kann ein gleichbleibend hoher Level an ATP gewährleistet und Proliferation sowie Wachstum der Zelle sichergestellt werden [1]. Der Metabolismus von Tumorzellen ist an diese speziellen Anforderungen adaptiert.

Bereits zu Beginn des 20. Jahrhunderts zeigte Otto Warburg, dass Tumorzellen eine erhöhte glykolytische Aktivität, auch in Gegenwart von Sauerstoff (aerobe Glykolyse), den sogenannten Warburg Effekt, aufweisen [2].

Zusätzlich sind neben der Glykolyse auch weitere Stoffwechselwege, wie beispielsweise die Glutaminolyse stark erhöht. Die Tumorzelle erlangt so einen Grad an metabolischer Autonomie, der weitgehend unabhängig von physiologischen Steuerungsprozessen im Körper bleibt [3]. Seit 2011 zählt der veränderte Tumormetabolismus zu den sogenannten „hallmarks of cancer“ [4].

### 1.1.1 Warburg Effekt und Energiestoffwechsel

Glukose wird über sogenannte GLUT-Transporter in die Körperzelle aufgenommen und normalerweise in Anwesenheit von Sauerstoff in mehreren enzymatischen Schritten im Zytosol zu Pyruvat umgewandelt. Das entstandene Pyruvat wird anschließend in die Mitochondrien aufgenommen und dient als Substrat für die oxidative Phosphorylierung (OXPHOS). Im anaeroben Milieu jedoch gewinnen Körperzellen die nötige Energie aus der Glykolyse. **(Abbildung 1)**



**Abbildung 1 Zellulärer Glukose Metabolismus:**

In Anwesenheit von Sauerstoff wird Glukose über sogenannte GLUT-Transporter in die Körperzelle aufgenommen und in mehreren enzymatischen Schritten im Zytosol zu Pyruvat umgewandelt. Dabei werden 2 Moleküle ATP freigesetzt. Das entstandene Pyruvat wird anschließend in die Mitochondrien aufgenommen und dient als Substrat für die OXPHOS, was der Zelle einen Energiegewinn von 36 ATP einbringt. Pyruvat kann bei Fehlen von Sauerstoff sofort zu Laktat abgebaut und über die Monocarboxylattransporter aus der Zelle ausgeschleust werden. (Modifiziert nach Gatenby und Gillies, 2004 [5]).

Tumorzellen weisen jedoch, wie eingangs erwähnt, auch in Anwesenheit von Sauerstoff eine erhöhte glykolytische Aktivität auf und es wird somit auch im aeroben Milieu Glukose zu Laktat verstoffwechselt (Warburg Effekt). Das dabei anfallende Laktat muss von der Zelle sezerniert werden um den glykolytischen Flux aufrecht zu halten. Im Vergleich zur Oxidativen Phosphorylierung werden bei der Glykolyse 34 Moleküle ATP (= Adenosintriphosphat) weniger produziert. Daher muss die Glykolyse in Tumorzellen, die einen großen Teil ihres Energiebedarfs über die aerobe Glykolyse decken, verstärkt ablaufen, um ein ausreichend hohes Level an ATP zu generieren. Dies gewährleisten glykolytische Tumoren durch eine Hochregulation der Expression von Glukose- und Laktattransporter (GLUT 1 – 4, Monocarboxylattransporter 1 – 4); außerdem werden vermehrt die für die Glykolyse benötigten Enzyme gebildet (u.a. Hexokinase, Laktatdehydrogenase).

Die verstärkte glykolytische Aktivität wird seit den 1960er Jahren im klinischen Alltag zur Krebsdiagnostik mittels der Positronen-Emissions-Tomographie (PET) genutzt. Dabei wird

radioaktiv markierte  $^{18}\text{F}$ -Fluordeoxyglukose von Zellen mit dem Warburg Phänotyp aufgenommen und angereichert [6, 7]. Patienten mit glykolytisch hoch aktiven Tumoren haben eine schlechtere Prognose, weisen ein aggressiveres Wachstum und außerdem höhere Metastasierungsraten auf [3, 5].

Die zu Grunde liegenden Ursachen für die verstärkte „aerobe Glykolyse“ bleiben strittig. Die These, dass die gesteigerte Glykolyse eine Anpassung an die im Tumor herrschende Hypoxie ist [5], erwies sich als unzureichend, da Tumore auch in Anwesenheit von Sauerstoff vermehrt Glukose aufnehmen [1]. Zudem konnte der „Warburg Effekt“ nicht nur in soliden Tumoren, sondern auch in leukämische Zellen beobachtet werden. Diese Tatsache spricht wiederum gegen die These der Hypoxie als Auslöser für den Warburg Phänotyp, da Sauerstoff im Blut ausreichend vorhanden ist [8].

Die erhöhte Glykolyse von Leukämiezellen wurde mit einer verstärkten Therapieresistenz und schlechter Prognose in Verbindung gebracht. Jedoch erwiesen sich leukämische Zellen als äußerst sensibel gegenüber einer Blockade des Glukosestoffwechsels durch 2-Deoxyglukose (2-DG) [8, 9].

Überdies konnte gezeigt werden, dass Tumore meist heterogen sind und aus Zellen mit einem oxidativen bzw. Zellen mit einem eher glykolytischen Phänotyp bestehen. Dies war unabhängig vom Sauerstoffgehalt in Tumoren zu beobachten [1].

Die metabolische Veränderung hin zum Warburg Phänotyp beruht auf Mutationen von Suppressorgenen (z.B. p53) und Enzymen der Glykolyse (u.a. PKM2), sowie auf einer Überexpression von Transkriptionsfaktoren, die die Expression relevanter Gene steuern (HIF, c-Myc) [10, 11].

Der Hypoxie-induzierende Faktor (HIF) besteht aus 2 Untereinheiten, die bei Normoxie hydroxyliert und abgebaut werden. Unter hypoxischen Bedingungen jedoch bleibt die Hydroxylierung und damit auch der Abbau aus. So kann der nun stabilisierte Transkriptionsfaktor HIF die Transkription der von ihm regulierten Gene verstärken. Auf diese Weise erhöht die Zelle die Expression von Enzymen und Transportern der Glykolyse [10]. Vor allem die mutierte Form von HIF verstärkt so die glykolytische Aktivität der Tumorzelle.

Ein weiterer Transkriptionsfaktor, der in Tumoren hochreguliert wird, ist c-Myc. Als Regulator von Proliferation und Zelldifferenzierung schafft c-Myc durch die verstärkte Expression von Genen der Proteinbiosynthese und der Glykolyse die Voraussetzung für vermehrte Zellteilung. Man geht davon aus, dass in ca. 70 % der Tumoren c-Myc in mutierter Form vorliegt und so unter anderem ungehemmte Proliferation ermöglicht [10].

Das Protein p53 ist als Regulator des Zellzyklus bekannt. Treten Schäden in der DNA auf induziert p53 einen Zellzyklusarrest, in dem Reparaturmechanismen greifen. Bei zu starken Schäden kann p53 allerdings auch über die Bcl-2 Familie Apoptose induzieren und so

ungehemmtes Wachstum von beschädigten Zellen verhindern. Ein permanent hoher Spiegel an mutiertem p53 führt so ebenfalls zur verstärkten Expression von Glukosetransportern und Enzymen der Glykolyse, sowie Hemmung der OXPHOS.

Tumorzellen mit dem Warburg Phänotyp gewährleisten durch den beschleunigten Glukosestoffwechsel einerseits ein hohes, intrazelluläres Substratangebot, welches für die Synthese neuer Zellorganellen zu Verfügung steht, andererseits wird ATP generiert. So können in den Mitochondrien bzw. im Tricarbonsäure-Zyklus (TCA) vermehrt Bausteine für die Synthese neuer Zellbestandteile bereitgestellt werden, da diese nicht in der OXPHOS verbraucht werden. Auf diese Weise schaffen sich Tumorzellen eine günstige Ausgangslage, um einen hohen Zellumsatz zu garantieren [1, 3].

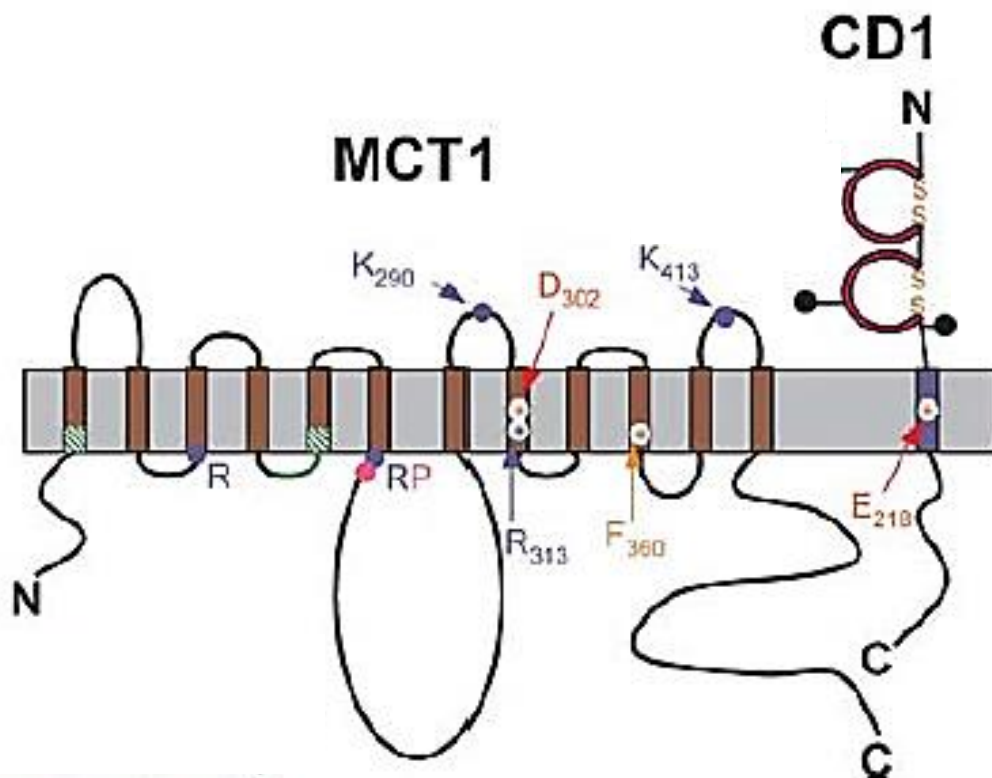
Durch das vermehrt anfallende Laktat könnte es zur intrazelluläre Azidifizierung und eine Inhibition der Glykolyse kommen. Um dies zu verhindern besitzt die Tumorzelle eine starke Expression von Transportern wie den Monocarboxylattransporter (MCT), der  $H^+$ -ATPase, und der  $H^+$ - $Na^+$ -ATPase, die Laktat transportieren bzw. dem sinkenden pH im Zytosol entgegenwirken und die Zellhomöostase erhalten [11]. Sezerniertes Laktat kann zusätzlich von Tumorzellen, die einen oxidativen Stoffwechsel besitzen, als Energiequelle genutzt werden und so zum Tumorwachstum beitragen [11]. Zugleich dient Laktat im Tumorstroma möglicherweise als parakrines Signal [12]. Eine Akkumulation von Laktat im Tumormilieu geht dabei auch mit einer schlechten Prognose der Patienten einher [13–16]. Eine Blockade ebendieser Transporter könnte also ein Ansatzpunkt in der Antitumorthherapie darstellen [12]. Demnach verursacht eine Hemmung jener Transporter eine hohe intrazelluläre Laktatkonzentration, wodurch Wachstum reduziert und vereinzelt Zelltod ausgelöst wurde [17, 18].

Eine besonders wichtige Rolle unter diesen Transportern nehmen die Monocarboxylattransporter (MCT) ein, welche eine vielversprechende Zielstruktur in der Therapie von Tumoren darstellen.

### 1.1.1.1 Monocarboxylat-Transporter – Aufgaben und Struktur

Die Aufrechterhaltung der Zellhomöostase garantiert Zellen den optimalen Ablauf ihrer Funktionen. Metaboliten müssen aufgenommen werden und gleichzeitig anfallende Stoffwechselprodukte aus der Zelle ausgeschleust werden, um intrazelluläre Schäden zu vermeiden. Die Zelle benötigt folglich Transporter, welche in der Lage sind, Metabolite in und aus Zelle zu schleusen.

Die Gruppe der Monocarboxylat-Transporter (MCT) gehört zur *SLC16* Genfamilie. Diese setzt sich aus 14 Vertretern zusammen, von denen MCT1 - 4 sogenannte Monocarboxylate transportieren [19]. Zu den transportierten Monocarboxylaten zählen unter anderem Pyruvat, Laktat und Ketonkörper. Diese werden zusammen mit einem Proton, abhängig von Substrat- und pH-Gradienten, aus der Zelle, bzw. in die Zelle geschleust [20].



**Abbildung 2 Struktur des Monocarboxylattransporter 1**

Dargestellt ist exemplarisch die molekulare Struktur des MCT1 Transporters mit dem Hilfsprotein CD147. Die Grundstruktur aller MCTs ist gleich aufgebaut. MCTs besitzen 12 Transmembranhelices; eine Schleife zwischen TM6 und TM7 liegt im Zytoplasma. Das Hilfsprotein CD147 ist ein transmembranes Glykoprotein, das im Wesentlichen aus einem kurzen zytosolärem Bereich und einem großen extrazellulären Anteil mit einer Immunglobulin Domäne besteht. Modifiziert nach Halestrap, 2004 [19].

Alle Vertreter sind im Wesentlichen gleich aufgebaut. Die MCTs haben 12 Transmembranhelices (TM), die in der Plasmamembran sind; eine Schleife zwischen TM6 und TM7 liegt im Zytoplasma. Für die volle Entfaltung ihrer Funktion benötigen die MCT1/3/4 das Hilfsprotein CD147 (Basigin), MCT2 benötigt Embigin [21] (**Abbildung 2**). Basigin ist ein transmembranes Glykoprotein mit einer kurzen zytoplasmatischen Domäne und einer großen extrazellulären Struktur mit einer Immunglobulin Domäne [22]. Die korrekte Lage der MCTs an der Zelloberfläche wird durch die direkte Interaktion von Basigin bzw. Embigin mit den MCTs sichergestellt [22, 23]. Beispielsweise führte ein Knockout von Basigin zu einer stark verminderten Oberflächenexpression der Monocarboxylat – Transporter 1 und 4 [24].

Die MCTs spielen eine wichtige Rolle in der Regulation des intrazellulären pH – Werts, da sie Laktat gleichzeitig mit einem Proton transportieren. Sie gewinnen daher insbesondere an Bedeutung, wenn die Zelle glykolytisch aktiv ist und sich intrazellulär große Mengen an Laktat und Protonen ansammeln [25].

Das bei erhöhtem Umsatz der Glykolyse anfallende Laktat muss möglichst schnell von der Zelle sezerniert werden, damit ihr Stoffwechsel nicht durch eine sogenannte „feedback“ - Hemmung von akkumulierendem Laktat und sinkendem pH zum Erliegen kommt [18, 20, 26, 27]. Monocarboxylat Transporter nehmen eine zentrale Stellung im Glukose- und Laktatstoffwechsel ein und sind damit auch in glykolytisch aktiven Tumoren von enormer Bedeutung.

Trotz ähnlicher Struktur haben die 4 Transporter jeweils verschiedene Aufgaben und Eigenschaften, die zur Expression der MCT Isoformen in unterschiedlichen Geweben führt.

**Tabelle 1 Km Werte (mM) für MCT1-4 für die die spezifischen Substrate:**

Die Daten für die  $K_m$  Werte (mM) von MCT1, MCT2, MCT4 wurden an in *Xenopus laevis* Oocyten exprimierten humanen MCT Transportern gemessen; [20, 26, 28]). Der  $K_m$  Wert von MCT3 für L-Laktat wurde in Hefe gemessen [29, 30]

Substrat	MCT1	MCT2	MCT3	MCT4
L-Laktat	3,5	0,74	6	28
D-Laktat	>60	-	-	519
Pyruvat	1,0	0,08	-	153
Acetat	-	0,8	-	216

Der MCT1 wird nahezu von allen Geweben exprimiert und ist hauptsächlich für den Transport von Monocarboxylaten zuständig. Dabei transportiert er Laktat, Pyruvat und Ketonkörper mit jeweils relativ niedrigen  $K_m$  - Werten [31]. Der MCT1 dient somit vorzugweise dem Stoffaustausch der Zellen untereinander und der zelleigenen Energieversorgung, was insbesondere bei Tumoren eine Rolle spielt.

Der MCT2 hat eine um ein Vielfaches höhere Affinität zu Laktat und Pyruvat als der MCT1 und 4. Daher wird der MCT2 hauptsächlich in Geweben exprimiert, in denen diese Substrate nur in geringer Konzentration vorhanden sind, aber dennoch möglichst schnell aufgenommen werden müssen. Unter anderem wird er in Neuronen, Leber, Niere und in der Geißel von Spermien exprimiert [20, 26]. In diesen Geweben kann Laktat in signifikanten Mengen aufgenommen und für die Glukoneogenese oder die OXPHOS verwendet werden.

Der MCT3 wurde lediglich im Pigmentepithel und im Plexus choroideus der Retina gefunden. Über Substratspezifität und Funktion ist wenig bekannt [21].

Der MCT4 ist in glykolytisch aktiven Zellen von immenser Bedeutung. Durch seinen hohen Km Wert wird selbst bei sehr hohen extrazellulären Laktatkonzentrationen ein stetiger Efflux von Laktat garantiert und zugleich eine Aufnahme von Laktat in die Zelle verhindert [19].

Da die maximale Transportkapazität für MCT4 beinahe nie erreicht wird und der Transporter gleichzeitig eine sehr hohe Spezifität für Laktat besitzt, ist er perfekt an die Bedürfnisse glykolytischer Zellen, und damit vieler Tumorzellen, angepasst [31].

Folglich konnte speziell in glykolytisch aktiven Zellen eine hohe MCT4 Expression beobachtet werden; darunter fallen Skelettmuskulatur, weiße Blutzellen, Chondrozyten und Tumorzellen [20, 26].

### **1.1.1.2 Monocarboxylat-Transporter in Tumoren**

Die Untersuchung von unterschiedlichsten Tumorentitäten hinsichtlich ihrer MCT1 und 4 Expression ist Gegenstand zahlreicher Untersuchungen. Erhöhte MCT Expression wurde dabei durchwegs mit einer deutlich schlechteren Gesamtprognose der Tumorpatienten assoziiert [18, 32–34].

Zu den Kennzeichen von Tumoren zählen unter anderem Invasivität und die Fähigkeit zu Metastasierung [4]; möglicherweise leistet sogar der MCT4 in Kombination mit  $\beta_1$ -Integrin einen für die Zellmigration entscheidenden Beitrag [35, 36].

Eine Überexpression von MCT4 korreliert demnach im Kolorektalen Karzinom direkt mit der Tumorgroße, Invasivität und Metastasierung [13]. Weiterhin zeigen Patienten, bei denen eine starke Expression von MCT4 nachgewiesen werden konnte, signifikant schlechtere Überlebensraten.

Insbesondere gynäkologische Tumoren zeigten erhöhte MCT1 und 4 Spiegel in der Plasmamembran und im Zytosol [18]. Besonders bemerkenswert dabei war die Zunahme der Expression der Transporter bei der Entwicklung von gutartigen Adenomen zu Malignomen [18].

Bei Tumoren der Prostata konnte dementsprechend bei maligner Entartung ein Anstieg von MCT2 und 4 beobachtet werden. Zugleich wiesen Tumore mit MCT1 und MCT4 ein aggressiveres Wachstum auf [37]. Eine übermäßige MCT4 und CD147 Expression korrelierte mit höheren PSA Spiegeln vor Therapiebeginn und einer höheren Invasivität. Diese Tumore waren progressiver in ihrem Wachstum und histologisch als höhergradig maligne einzustufen [38, 39]. Des Weiteren war die Prognose von Patienten mit MCT4 und CD147 Tumoren gegenüber Tumoren ohne eine solche Expression deutlich eingeschränkt.

Eine Analyse klinischer und experimenteller Daten des duktales Pankreaskarzinoms konnte einen linearen Zusammenhang zwischen erhöhten MCT4 Werten *in vitro* und einem deutlich reduzierten Gesamtüberleben der Patientenkohorte herstellen [40]

Gerlinger et al. [41] definierte MCT4 in Nierenkarzinomen als potente Zielstruktur für die Tumorthherapie.

Zusammenfassend lässt sich feststellend, dass eine verstärkte Expression der MCTs stets mit Entartung, Invasivität, aggressiverem Wachstum und einer schlechteren Prognose für die Patienten einhergeht.

## 1.2 Tumormetabolismus als therapeutische Zielstruktur

Tumore jeglicher Herkunft weisen einen veränderten Stoffwechsel auf. Nur auf diese Weise kann ein hohes Zellwachstum und ein hoher Zellumsatz garantiert werden. Dieser stark erhöhte Metabolismus stellt eine vielversprechende Zielstruktur für die Therapie dar.

Es wurden bereits unterschiedliche Ansätze unternommen, spezifische Stoffe als metabolische Inhibitoren einzusetzen und so das Tumorwachstum zu limitieren bzw. Zelltod zu induzieren [3, 42–46].

Nachweislich führte eine Blockade wesentlicher Signalwege teilweise zu einem Proliferationsarrest und einer Reduktion der Zellviabilität [43, 47, 48]. Ein erhöhter Energieumsatz und niedriger pH im Tumormilieu verhinderten bei glykolytisch aktiven Tumoren eine wirkungsvolle Anreicherung von Chemotherapeutika und reduzierten so deren Wirksamkeit [48]. Eine Blockade des Glukosestoffwechsels konnte erworbenen Therapieresistenzen teilweise rückgängig machen und auch die Sensitivität auf Chemotherapeutika erhöhen [43, 48].

Daher wurden metabolische Inhibitoren entwickelt, die bereits in klinischen Studien getestet werden [45]. Zum einen wurde versucht metabolische Signalwege durch Inhibition regulatorischer Kinasen, wie PI3K/Akt (Phosphoinositid 3-Kinase/Proteinkinase B) und mTOR („mammalian target of Rapamycin“) oder durch Blockade von Transkriptionsfaktoren, wie HIF und c-MYC, zu unterbrechen, die unter anderem mitverantwortlich für einen glykolytischen Phänotyp sind [47].

Ein anderer Ansatz galt der direkten Blockade zentraler Enzyme und Transporter, die zur basalen Energieversorgung der Zelle einen wichtigen Beitrag leisten. Zielstrukturen dabei waren vor allem Schlüsselenzyme des Glukose-, Laktat- sowie Glutaminstoffwechsels [42, 45].

Da normales Gewebe teilweise ebenfalls auf dieselben Signalwege bzw. Enzyme angewiesen ist, stellt eine besondere Herausforderung einer anti-metabolischen Tumortherapie dar.

Deswegen versucht man spezielle Substanzen zu entwickeln, die gegen eine von Tumoren bevorzugte Isoform eines Enzyms oder eine in Tumoren überexprimierte Struktur gerichtet sind. Ein Beispiel dafür ist die Isoform der Pyruvatkinase PKM2, die in Tumoren vermehrt detektiert wird, während im normalen Gewebe die Isoform PKM1 auftritt [49].

Ziel ist es Substanzen zu finden, die den Tumor effektiv zurückdrängen, ohne dass normales Gewebe dabei stark geschädigt wird.

Obwohl die klassischen Chemotherapeutika Gemcitabin und 5-Fluoruracil üblicherweise nicht als „targeted therapy“ gelten, haben diese dennoch eindeutig Angriffspunkte im Zellstoffwechsel von Tumoren, die Dihydrofolatreduktase und Thymidylatsynthase.

An diesem Beispiel wird auch klar, dass ein therapeutisches Fenster für gezielte Antitumorthérapie existieren kann [43]. Beide Enzyme sind ubiquitär im Körper vorhanden, doch vor allem Tumore werden durch die klassischen Chemotherapeutika empfindlich getroffen und haben sich über viele Jahre als klassische Therapie etabliert.

### **1.2.1 Blockade der Glykolyse**

Durch die immense Bedeutung des Glukosestoffwechsels als basale Energiequelle der Tumorzelle, aber auch als Quelle für wichtige Bausteine, ist die Zelle besonders anfällig für Störungen dieses Stoffwechselweges.

Im Folgenden soll auf Möglichkeiten und Grenzen einer zielgerichteten Tumorthérapie („targeted therapie“) durch Blockade der Glykolyse näher eingegangen werden.

Die wesentlichen Zielstrukturen einer solchen Therapie sind zum einen die Transporter, welche Glukose aufnehmen und die Endprodukte aus der Zelle transportieren, zum anderen glykolytische Enzyme.

Allerdings wurde bisher bei der Suche nach spezifischen Inhibitoren von Enzymen der Glykolyse noch kein Durchbruch erzielt.

Einen Ansatzpunkt für neue Therapien stellt das Enzym Hexokinase dar, welches die Umwandlung von Glukose zu Glukose-6-Phosphat katalysiert. Die Hexokinase überträgt eine Phosphatgruppe auf Glukose; dieser Prozess kann durch den Stoff Lonidamin, ein Derivat der Indazol-3-carbonsäure, unterbunden werden [50]. Bekannt ist seit langem, dass Lonidamin in der Lage ist, die aerobe Glykolyse in Tumoren zu inhibieren [51]. Nun zeigte Lonidamin gute Erfolge in präklinischen Studien. In klinischen Phase I/II Studien allerdings blieben ähnliche Erfolge aus; Langzeitüberleben und Progression wurden nicht positiv beeinflusst [52].

Weiterhin galt 3-Bromopyruvat (3BP) als vielversprechende Substanz [45, 47, 50, 53].

3-Bromopyruvat ist ein Derivat von Pyruvat, welches die Hexokinase II hemmt. 3BP erzielte sowohl in experimentellen als auch Tiermodellen gute Ergebnisse [54]. Eine seit 2013 geplante klinische Phase I Studie wurde allerdings noch nicht durchgeführt. Bislang existiert eine Fallstudie eines 16-jährigen Jungen mit fibrolamellären hepatozellulären Karzinom, in der durch den Einsatz von 3BP ein anfänglicher Tumorregress erreicht wurde [54]. Während der Behandlung wurde kein Hinweis auf Toxizität gefunden [54].

Als weitere wichtige Zielstrukturen einer metabolischen „targeted therapy“ sind noch die Phosphofruktokinase sowie Pyruvatkinase [17] zu nennen, für die ebenfalls aussichtsreiche Inhibitoren in Entwicklung sind.

Der letzte enzymatische Schritt der Glykolyse, die Umwandlung von Glukose zu Laktat, wird durch das Enzym Laktatdehydrogenase (LDH) katalysiert. Auch die LDH kann als Zielstruktur einer gezielten Tumortherapie gelten [55, 56]. Die Ausschaltung der LDH führt zu einer Inhibition der Glykolyse und erhöhte zusätzlich das Angebot an reaktiven Sauerstoffspezies, welche die Zelle unter oxidativen Stress setzten und in der Schlussfolge zu Zelltod bzw. Nekrose führten [57]. Die LDH gilt als ein maßgebliches Element der Tumorprogression, -proliferation und – metastasierung und ist somit besonders interessant für eine Antitumortherapie [55].

Normale Körperzellen, deren Energieversorgung nicht von der Glykolyse abhängt, könnten mit diesem Therapieansatz weniger in Mitleidenschaft gezogen werden. Der Grund hierfür ist, dass eine Inhibierung des Laktatmetabolismus normalerweise wenig Auswirkungen auf die OXPHOS hat und normale Körperzellen zumeist Pyruvat zu CO<sub>2</sub> und nicht zu Laktat verstoffwechseln [56].

2-Deoxyglukose (2-DG), ein Glukoseanalogon ist einer der wohl am besten untersuchten Hemmer der Glykolyse hinsichtlich einer „targeted therapy“ [58]. 2-DG wird wie Glukose in die Zelle aufgenommen und dort von der Hexokinase zu 2-Deoxyglukose-6-Phosphat metabolisiert. Dieses Molekül kann jedoch nicht weiterverarbeitet werden und führt zu einer kompetitiven Hemmung der Glykolyse. Durch akkumuliertes 2-DGP kommt es zusätzlich zu einer Ablösung der Hexokinase II von der mitochondrialen Membran. Dadurch wird einerseits die Glykolyse gehemmt, andererseits wird durch die Destabilisierung der Mitochondrienmembran vermehrt Apoptose induziert. Bei ausreichender Dosierung war 2-DG *in vitro* in der Lage Tumorwachstum einzudämmen und Zelltod zu induzieren [43, 59]. Dieser Effekt konnte nicht nur in soliden Tumoren, sondern auch bei Leukämien gezeigt werden [60]. Nach den erfolgversprechenden experimentellen Daten erwies sich 2-DG jedoch in den erforderlichen Substratkonzentrationen bei Patientenstudien als toxisch. Erniedrigte Dosen brachten keinen äquivalenten Erfolg [43].

Dennoch konnte eine Kombination von 2-DG in niedrigeren Konzentrationen mit anderen Chemotherapeutika (u.a. Docetaxel) oder Radiotherapie die Sensitivität auf klassische Therapien verbessern [61, 62] .

Eine weitere Zielstruktur bilden Transporter, die eine wichtige Rolle im Glukosestoffwechsel spielen. Für die GLUT Transporter 1, 2 und 4 existiert der Inhibitor Sylibn oder Silibinin, ein natürliches Flavonoidderivat [63]. Dieses wird bereits in Phase I/II Studien getestet [44]. Da normale Zellen ebenfalls GLUT exprimieren, könnte eine unspezifische Inhibition von gesundem Gewebe hier große negative Folgeschäden induzieren.

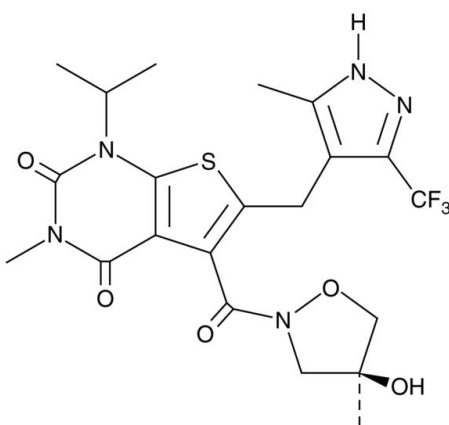
Darüber hinaus spielen die MCTs eine besondere Rolle in glykolytischen Tumoren. Daher gelten sie als besonders effiziente Angriffspunkte in der Tumorthherapie.

## 1.2.2 MCT als Zielstruktur neuer Therapien

Eine MCT1 Inhibition in Melanomen und Neuroblastomen reduzierte nachweislich den Glukose- und Laktatstoffwechsel in den Tumorzellen [25, 64], gleichzeitig wurde dadurch Wachstum und Überleben limitiert [65, 66]. Durch die Depletion von MCT1 via spezieller siRNA verloren Tumorzellen einen erheblichen Teil ihrer Fähigkeit zur Induktion der Gefäßneubildung [67]. Außerdem konnte durch eine MCT-Inhibition Tumormigration reduziert und die Sensitivität auf Radio-/Chemotherapie erhöht werden [18, 68, 69].

Zusätzlich wurden Laktattransporter unspezifisch mittels Cyano-4-hydroxycinnamate bzw. MCT1 und 4 durch genetischen „Knockout“ in unterschiedlichen Studien inhibiert [25, 39–41]. Das Silencing von jeweils MCT1 oder 4 reduzierte die Zellviabilität signifikant [39]. Dabei führte vor allem eine MCT4 Blockade zu einer verminderten Ansäuerung des extrazellulären Milieus, einer reduzierten Zellviabilität, teilweise Zelltod und einer deutlichen Einschränkung der Proliferation. Ein MCT4 knockout wiederum sensibilisierte die Tumorzelle für eine wirkungsvolle MCT1 Inhibition [40].

Für MCT1 und 2 wurden daher bereits spezielle Inhibitoren entwickelt und untersucht [70–72]. Einer der von Astra Zeneca entwickelten MCT1/2 Inhibitoren war der AR-C155858 (jetzt unter der Bezeichnung AZD3965). Bei dem AZD3965 handelt es sich um einen Inhibitor mit einem spezifischen Wirkspektrum für MCT1 und 2 [71].



Chemische Struktur AZD3965

Molekulares Gewicht: 515.51g/mol

### Abbildung 3 Strukturformel des AZD3965

Modifiziert nach <https://www.caymanchem.com/product/19912/image>

Der AZD3965 bindet mit einer hohen Affinität intrazellulär zwischen der Transmembranhelix 7 und 10 am C – Terminus des MCT1 Transporters. *Murray [70] et al* konnte in ihren Arbeiten zeigen, dass der AZD3965 in dem Bereich von 10nM bis 100nM sein optimales Wirkspektrum entfaltet. Mit einem  $K_i$  von ca. 2.3nM liegt bei 100nM bereits eine 100 prozentige Inhibition des Laktatin- und - efflux vor [71]. Ursprünglich sollten die MCT1/2 Inhibitoren zur Immunsuppression eingesetzt werden [70].

Von Astra Zeneca wurden, basierend auf den ursprünglichen Inhibitoren, mehrere mögliche Produkte synthetisiert, die alle durch eine MCT1/2 Inhibition einen reduzierten Laktatefflux erreichen.

Aufgrund ihrer guten Wirksamkeit und Spezifität werden diese Inhibitoren auch für die Tumorthapie getestet [18, 21, 73] Durch MCT1/2 Inhibitoren konnte *in vitro* erfolgreich eine Erhöhung des intrazellulären Laktatspiegels und eine damit einhergehende Minderung der Proliferation ausgelöst werden [18, 74–76].

Bei *in vitro* und *in vivo* Versuchen mit kleinzelligem Bronchialkarzinom und Tumoren mit exklusiver MCT1 Expression erzielte der AZD3965 gute Ergebnisse, vor allem wenn gleichzeitig hypoxische Bedingungen im Tumorstroma vorherrschten [77]. Bei einem Viertel der für die Studie rekrutierten Patienten wurde demnach unter hypoxischen Bedingungen eine vermehrte MCT1 Expression gefunden, ohne dass MCT4 erhöht war. Bei gleichzeitigem Vorliegen von MCT4 verliert der MCT1/2 Inhibitor allerdings an Effektivität, da der MCT4 Transporter weiterhin ungehindert Laktat aus der Zelle pumpt und so Laktatakkumulation und Proliferationsarrest verhindert wird [40, 66, 76, 77] Zusätzlich entwickelten Tumorzellen durch eine Hochregulation des vorhandenen MCT4 Transporters bei längeren Behandlungen mit dem AZD3965 Resistenzen gegenüber dem Inhibitor [76].

Die Ursachen eines Therapieversagens von AZD3965 liegen demnach in einer MCT4 Expression, wie auch einer teilweisen Verlagerung weg von der Glykolyse hin zur oxidativen Phosphorylierung [66]. Die Resistenzentwicklung durch einen „metabolischen Switch“ ließe sich mit einem mitochondrialen Inhibitor wie Metformin eindämmen.

Derzeit läuft in Großbritannien eine Phase I Studie an Patienten mit Prostata-, Magenkarzinom und Lymphomen in höhergradigen Stadien, in der Maximaldosen, Nebenwirkungsprofil und biochemische Eigenschaften des AZD3965 analysiert werden [73].

Die Gruppe um John Cleveland entwickelte ebenfalls einen MCT1/2 Inhibitor, den SR13800, mit einer ähnlichen Pharmakokinetik wie der des AZD3965 [75]. Dieser wurde uns für die vorliegende Studie zur Verfügung gestellt

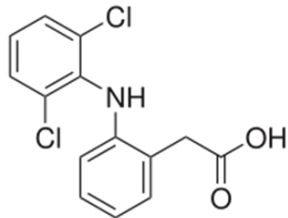
Auch wenn bei einer MCT Inhibition der Zelle noch andere Möglichkeiten der Energiegewinnung zu Verfügung stehen, scheinen die Tumorzellen doch stark von der Glykolyse abzuhängen [40]. Eine effektive und aussichtsreiche Strategie stellt somit die gleichzeitige Blockade von MCT1 und 4 dar [40], eventuell in Kombination mit einem mitochondrialen Inhibitor.

Die Suche nach geeigneten MCT1 und 4 Inhibitoren war bisher allerdings noch nicht erfolgreich.

### 1.2.2.1 Diclofenac und strukturell verwandte NSARs

Diclofenac gehört zu der Klasse der Nicht Steroidale Antirheumatika (kurz: NSAR) und wird vornehmlich zur Behandlung von moderaten Schmerzen und einiger Formen von rheumatoider Arthritis eingesetzt [78].).

Diclofenac



Molekulares Gewicht: 296,15g/mol

Summenformel: C<sub>14</sub>H<sub>11</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

**Abbildung 4 Strukturformel von Diclofenac**  
Modifiziert nach [79]

Zu den bekannten Nebenwirkungen zählen unter anderem ein erhöhtes Risiko für gastrointestinale Beschwerden, wie Magengeschwüre und Blutungen. Vor allem die Wahrscheinlichkeit an Herzinsuffizienz zu erkranken, steigt durch eine regelmäßige Einnahme von Diclofenac. Diclofenac blockiert nicht selektiv Cyclooxygenase (COX) 1 und 2 und damit die Prostaglandinsynthese [80]). Diesen wird im Zusammenhang mit Tumoren die Rolle eines Tumorprogressors zugeschrieben, da Prostaglandine an der Regulation der Gefäßneubildung, der lokalen Immunantwort und der Zellmigration beteiligt sind. Prostaglandine tragen zur Unterdrückung der lokalen Immunantwort in Tumoren bei. Eine Inhibierung der Prostaglandinsynthese durch genetische Ablation von COX konnte die Immunantwort gegen Tumore verbessern [81]. Die Reduktion der Prostaglandin Produktion durch COX-Inhibitoren

erhöhte außerdem die Effektivität mit Checkpoint- Inhibitoren wie anti-PD-1 und führte eindrücklich zu Tumorregression in einem murinen Melanommodell [81].

Der weit verbreitete Gebrauch von NSAR in der Bevölkerung hat dazu geführt, dass retrospektiv positive Nebeneffekte beobachtet werden konnten. Unter anderem ließ sich durch eine regelmäßige Einnahme von Aspirin das Risiko an bestimmten Tumorentitäten, wie Kolorektalem Karzinom, zu erkranken, signifikant senken [80].

Zusätzlich wird Diclofenac zur Behandlung der Aktinischen Keratose, einer Präkanzerose der Haut, die in 10-20% der Fälle in ein Spinaliom übergehen kann, eingesetzt [82].

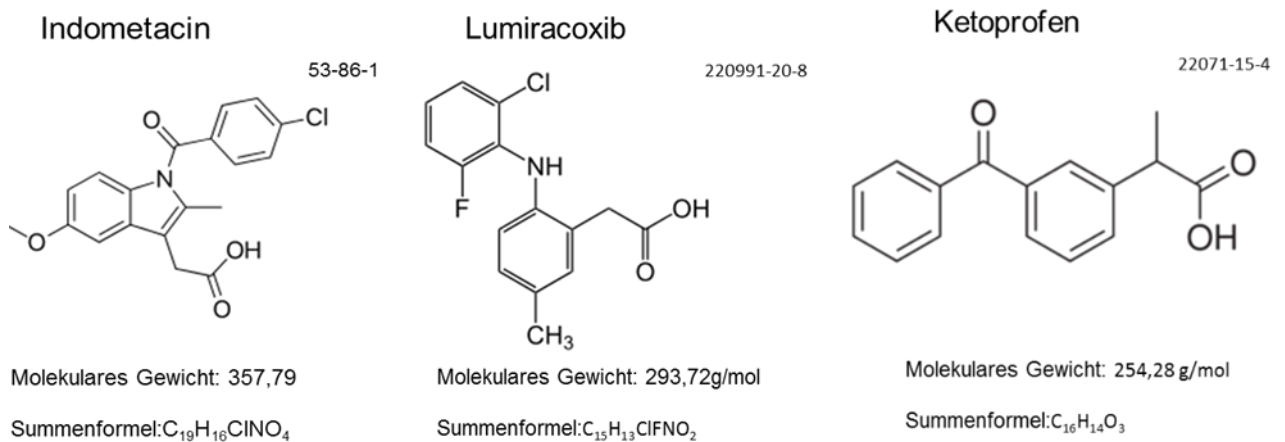
Die Arbeitsgruppe von Prof. Kreuz konnte in einer Arbeit zeigen, dass das NSAR Diclofenac in der Lage ist, die Glykolyse von verschiedensten Tumoren zu inhibieren. *In vitro* verursachte Diclofenac in verschiedenen Zelllinien (Melanom, Leukämie) eine verminderte Glukoseaufnahme bei gleichzeitiger Erhöhung des intrazellulären Laktats sowie einer Reduktion des extrazellulären Laktats [83, 84]. Bei *in vitro* Versuchen mit Melanomzellen, sowie einem kutanen T – Zellymphom, konnte Diclofenac sogar Zelltod induzieren [83, 84]. Im murinen Melanommodell reduzierte Diclofenac das Tumorwachstum, im Gliom wurde zusätzlich eine verbesserte Immunantwort durch dendritische Zellen nachgewiesen [85].

In Zusammenarbeit mit Holger Becker (TU Kaiserslautern), konnten wir zeigen, dass Diclofenac sowohl die Aktivität von MCT1 als auch die von MCT4 inhibiert (Manuskript submitted). Der ermittelte  $IC_{50}$  für Diclofenac (Konzentration bei der 50% der Prostaglandin Synthese inhibiert wird) liegt *in vitro* bei  $27 \pm 1.0 \mu M$  für COX 1 und  $20.5 \pm 6.4 \mu M$  für COX 2 [86]. Da die Gabe von 100 mg Diclofenac eine fast vollständige COX Inhibition bewirken kann, sollte auch die von unserer Arbeitsgruppe ermittelten  $K_i$  für MCT1 und 4 (MCT1:  $1.4 \pm 0.4 \mu M$ ; MCT4:  $0.14 \pm 0.01$ ; Manuskript submitted) mit den üblicherweise verabreichten Dosen an Diclofenac erreicht werden.

Bei regelmäßiger oraler Einnahme von 200mg Diclofenac einmal am Morgen über 5 Tage wurden bisher Serumlevel von 525,6ng/ml ( $1,77 \mu M$ ) gemessen [87]. Wesentlich höhere Konzentration (bis 5668ng/ml, entspricht  $19,1 \mu M$ ) konnten durch intravenöse Gaben als Bolus oder durch wiederholte Infusionen von 37.5mg, erzielt werden [88]. Ein großer Teil von Diclofenac (>99,5%) wird dabei von Serumproteinen, wie Albumin, gebunden. Die Konzentration, die letztendlich im Gewebe ankommt und dort ihre Wirkung entfaltet, ist letztendlich nicht genau bekannt. Es ist jedoch bekannt, dass Diclofenac im sauren Milieu anreichert, wie es in Tumoren zu finden ist. Es bleibt abzuwarten, ob in klinischen Studien Serumlevel erreicht werden können, die für eine MCT- Inhibition ausreichen.

In dieser Arbeit wurde neben Diclofenac noch andere Cyclooxygenase Inhibitoren (= NSAR) verwendet, die eine strukturelle Ähnlichkeit mit Diclofenac aufweisen. Dabei wurde in

Zusammenarbeit mit Dr. Eva Gottfried und Dr. Sabine Amslinger (Institut für Organische Chemie der Universität Regensburg) die COX-Inhibitoren Indometacin, Ketoprofen und Lumiracoxib ausgewählt.



**Abbildung 5 Strukturformeln der Diclofenac Verwandten: Lumiracoxib, Ketoprofen und Indometacin**

**Struktur Lumiracoxib** modifiziert nach [89]

**Struktur Indometacin** modifiziert nach [90]

**Struktur Ketoprofen** modifiziert nach [91]

Bei Ketoprofen und Indometacin handelt es sich um zwei nicht selektive COX Inhibitoren; Lumiracoxib ist ein selektiver Cyclooxygenase 2 Inhibitor. Wie in **Abbildung 5** erkennbar, haben alle NSAR die Carboxylgruppe gemein; diese könnte ein möglicher Angriffspunkt für die Blockade eines MCT Transporters darstellen. Allein bei Ketoprofen wird die Carboxylgruppe um eine Methylgruppe ergänzt. Für Indometacin existieren darüber hinaus bereits Daten zur Wirksamkeit in der antitumoralen Therapie, zusammengefasst in Hull et al [92]. Zunächst zeigte sich bei *in vivo* Versuchen mit Mäusen und Ratten eine Reduktion der Tumorzinzidenz und TumorgroÙe, sowie bemerkenswerterweise ein positiver Effekt auf das Gesamtüberleben [93–96]; ein kompletter Rückgang von wachsenden Tumoren konnte Indometacin allerdings nicht auslösen [97]. In einer großangelegten Studie von Patienten mit metastasierten Tumoren im Endstadium, erwies sich Indometacin als äußerst erfolgreich [98]. So konnte durch eine Therapie mit Indometacin der Tumorprogress verzögert und das Gesamtüberleben der Patienten um fast das Doppelte verlängert werden, ohne dass die Patienten an schwerwiegenden Komplikationen litten. Neben dieser bekannten Studie existieren außerdem weitere Einzelfallberichte, die eine Effektivität von Indometacin auf unterschiedliche Tumorentitäten zeigen [99–102].

Da Tumoren nicht nur glykolytisch aktiv sind, sondern auch Immunzellen, speziell T- Zellen und Natürliche Killerzellen, die bei der Tumorabwehr und für die Prognose des Patienten von besonderer Wichtigkeit sind, können negative Nebeneffekte auf Immunzellen nicht ausgeschlossen werden.

## 1.3 Das Immunsystem

Das humane Immunsystem umfasst eine immense Vielzahl an zellulären sowie humoralen Bestandteilen, die in einem komplexen Zusammenspiel miteinander agieren.

Die Hauptaufgabe des Immunsystems ist es den Körper vor Infektionen zu schützen, Krankheitserreger zu erkennen und diese im Falle einer manifesten Infektion möglichst frühzeitig zu eliminieren. Neben diesem Schutz von „außen“ (Viren, Erreger) hat das Immunsystem außerdem eine Schutzfunktion nach „innen“. Es hat die Aufgabe, entartete körpereigene Zellen zu erkennen und diese abnormen Zellen zu beseitigen, um den Körper vor der Entwicklung von Tumoren zu bewahren.

Die beiden Grundkomponenten des Immunsystems sind das angeborene und das adaptive Immunsystem. Das angeborene Immunsystem zeichnet sich durch eine schnelle ungerichtete, nicht spezifische Reaktion auf den eingedrungenen Erreger aus, während die adaptive Immunantwort eine selektive Spezifität dem Erreger gegenüber aufweist.

Für die vorliegende Arbeit ist vor allem das adaptive Immunsystem von Bedeutung, weshalb das angeborene Immunsystem nur kurz dargestellt werden soll.

Für Eindringlinge von außen stellt das Epithel die erste mechanische, chemische und mikrobielle Barriere dar. Falls es einem Pathogen gelingt diese Barriere zu überwinden und in den Körper einzudringen, versucht das Immunsystem dieses Pathogen mit einer Reihe an Strategien zu beseitigen.

Die Erstreaktion auf eine drohende Infektion, die sogenannte Sofortreaktion, wird über das angeborene Immunsystem vermittelt. Diese erste und meist sehr effektive Antwort des angeborenen Immunsystems soll die Ausbreitung einer Infektion verhindern und wenn möglich den Erreger aus dem Kreislauf entfernen, bevor sich die Infektion etablieren kann.

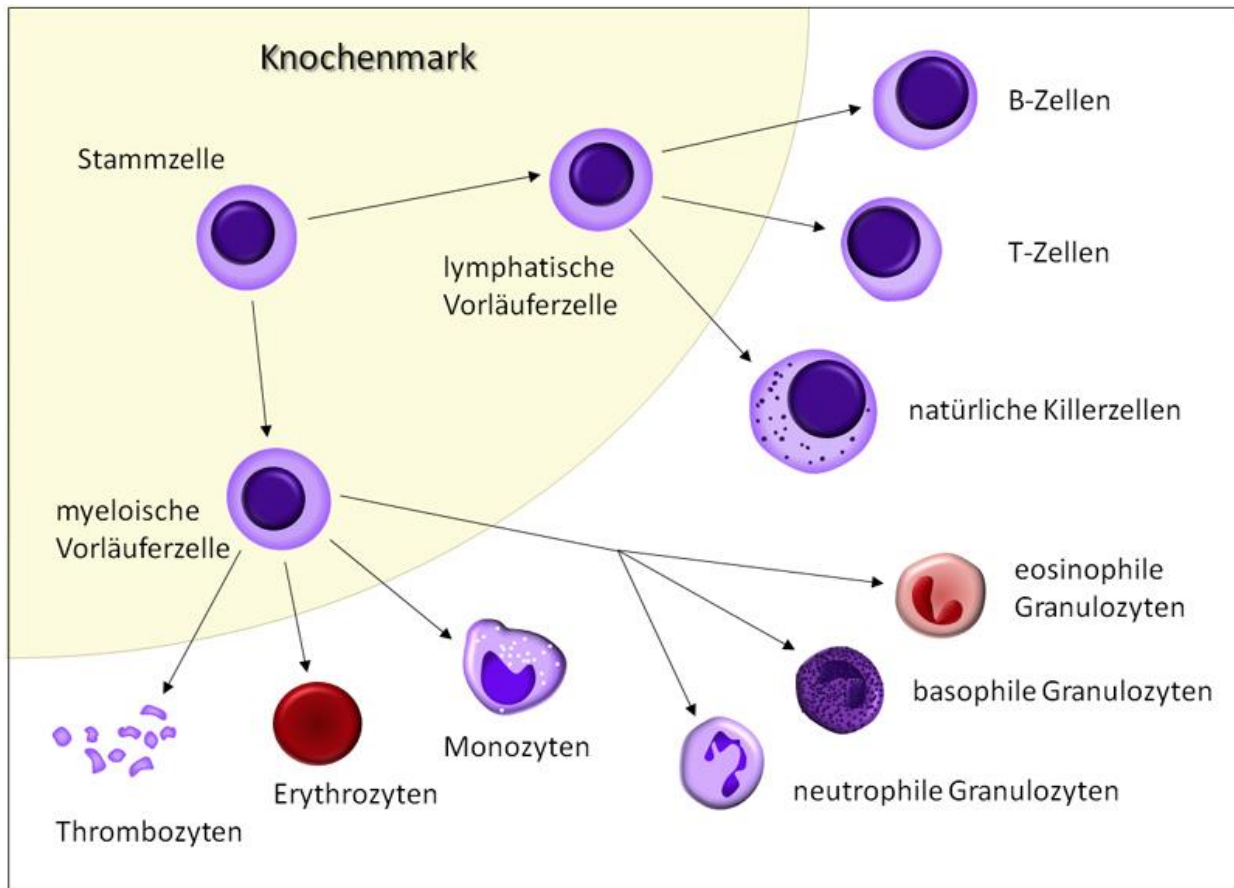
Das Epithel, Phagozyten und das Komplementsystem bilden hierbei die Hauptbestandteile.

Da das angeborene Immunsystem zwar schnell, jedoch nicht spezifisch Pathogene bekämpfen kann, bedarf es der Hilfe des adaptiven Immunsystems.

Die entscheidenden Merkmale für die Einzigartigkeit der adaptiven oder erworbenen Immunantwort sind Spezifität und Gedächtnis. Die Reaktion auf einen bestimmten Erreger ist hochspezifisch und kann durch die Differenzierung von sogenannten Gedächtniszellen erhalten bleiben, sodass bei einem erneuten Kontakt eine Infektion gezielt eingedämmt bzw. vermieden werden kann. Dies wird als immunologisches Gedächtnis bezeichnet.

### 1.3.1 Die wichtigsten Vertreter der zellulären Immunabwehr

Der gemeinsame Ursprung aller immunkompetenten Zellen liegt in einer pluripotenten, hämatopoetischen Stammzelle.



**Abbildung 6** Der gemeinsame Ursprung der myeloischen und lymphatischen Zellen aus einer gemeinsamen Stammzelle

Die Leukozyten, Erythrozyten und Thrombozyten gehen alle aus einer pluripotenten hämatopoetischen Stammzelle aus dem Knochenmark hervor.

(modifiziert nach: [103] )

Aus der myeloischen Progenitorzelle gehen Granulozyten und Monozyten, sowie Thrombozyten und Erythrozyten hervor. (**Abbildung 6**) Weiterhin entwickeln sich dendritische Zellen, die professionellen antigenpräsentierenden Zellen (APC) des Immunsystems aus den Monozyten.

Granulozyten und Makrophagen werden dem Phagozytose-System zugeordnet. Als antigenpräsentierende Zellen nehmen sie außerdem eine Schlüsselrolle für das adaptive Immunsystem ein.

Über die Zwischenstufe der lymphatischen Vorläuferzelle können aus der pluripotenten Stammzelle Lymphozyten und Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) generiert werden (**Abbildung 6**). Natürliche Killerzellen bilden zusammen mit den zytotoxischen T-Zellen die Klasse der zytotoxischen Zellen. Sie sind vor allem wichtig für die Eliminierung intrazellulärer Erreger.

Die adaptive Immunantwort wird vor allem über Lymphozyten, dazu zählen B - und T- Zellen vermittelt. Im Verlauf einer Immunantwort kommt es zunächst zur klonalen Selektion, bei der ein Pool an Lymphozyten mit dem richtigen Rezeptor für das entsprechende Antigen generiert wird, welche schließlich zu reifen Effektorzellen und Gedächtniszellen ausdifferenzieren. Im Anschluss daran erfolgt die sogenannte klonale Expansion, bei der eine Vielzahl des entsprechenden Lymphozyten erzeugt wird. Ein erneuter Kontakt mit jenem Antigen zu einem späteren Zeitpunkt führt wiederum zu einer klonalen Expansion des vorhandenen Reservoirs an spezifischen Gedächtniszellen.

Immunzellen, z. B: B- und T- Zellen, können anhand ihrer Oberflächenstruktur („cluster of differentiation“, CD) eingeteilt werden, da sie ein unterschiedliches Muster an CD- Cluster aufweisen. T- Zellen exprimieren unter anderem das für sie charakteristische CD3, B- Zellen CD19.

Zudem exprimieren B - Zellen Immunglobuline (IgM, IgD) als Antigenrezeptor auf ihrer Oberfläche, die sogenannten BCR (B - cell receptor), welche Antigene in ihrer nativen Form erkennen. Als reife Effektorzelle können B- Zellen ins Gewebe abwandern und dort als Plasmazellen Immunglobuline, die der Antigenpezifität ihres Rezeptors entsprechen, in löslicher Form sezernieren. Zusammen mit dem Komplementsystem bilden die löslichen Immunglobuline oder Antikörper die humorale Immunabwehr.

T- Zellen lassen sich zunächst in CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T- Zellen unterteilen. Dabei fungieren CD4<sup>+</sup> T- Zellen als Regulatoren der Aktivierung (CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen) und Suppression (regulatorische CD4<sup>+</sup> T- Zellen) einer Immunantwort; CD8<sup>+</sup> T- Zellen besitzen dagegen zytotoxische Eigenschaften.

Gemeinsam exprimieren sie CD2 und CD3 „Cluster“ und weisen einen spezifischen Antigenrezeptor (TCR, t - cell receptor) auf ihrer Oberfläche auf, mit dem sie ausschließlich über „major histocompatibility complex“ (MHC) Moleküle präsentierte Peptidfragmente erkennen können.

### **1.3.2 T- Zellen: Entwicklung und Funktion**

T - Zellen erlangen über ihren Rezeptor (TCR), mit dem sie Antigene erkennen, einen hohen Grad an Spezifität. Zusätzlich tragen alle T- Zellen Proteine als Kofaktoren die eine stabile Antigenbindung ermöglichen. Die Kofaktoren CD3, sowie CD4, bzw. CD8 bilden zusammen mit dem T - Zellrezeptor den TCR - Komplex.

Für T- Zellen ist die Fähigkeit zur Unterscheidung zwischen „fremd“ und „eigen“ besonders wichtig, daher durchlaufen sie im Thymus zunächst einen Selektionsprozess.

Der Vorgang der „positiven Selektion“ bezeichnet die Bindung des TCR an MHC Moleküle mit niedriger Affinität. Binden T – Zellen ein MHC II – Molekül, welches mit einem spezifischen Peptid beladen ist, reifen CD4<sup>+</sup> T- Zellen heran. Wird ein mit Peptid beladenes MHC I-Molekül von einer T-Zelle gebunden, entstehen CD8<sup>+</sup> T- Zellen.

Im Anschluss werden durch „negative Selektion“ autoreaktive T - Zellen mit einer zu hohen Affinität an körpereigene Moleküle eliminiert.

CD4<sup>+</sup>- Zellen erkennen ausschließlich Peptide, meist phagozytierte Proteine, welche durch MHC II- Moleküle auf APCs, präsentiert werden. CD8<sup>+</sup> T-Zellen hingegen können lediglich Peptide im Komplex mit MHC I binden. MHC I wird von allen kernhaltigen Zellen exprimiert.

Die Differenzierung von CD4<sup>+</sup> T- Zellen erfolgt in vier große Untergruppen (T<sub>H1</sub>, T<sub>H2</sub>, T<sub>H17</sub>, T<sub>reg</sub>). Die Entwicklung hängt größtenteils von dendritischen Zellen ab.

Je nach Erreger sezernieren dendritische Zellen unterschiedliche Zytokine, die über Differenzierung und Effektorfunktion der jeweiligen CD4<sup>+</sup> T- Zelle entscheiden.

Die regulatorischen T-Zellen (T<sub>regs</sub>) bilden hierbei eine besondere Untergruppe. Sie spielen eine wichtige Rolle in der Immunmodulation. Ein Teil dieser Zellen („Natürliche T<sub>regs</sub>“) entsteht im Thymus, während ein Großteil der verschiedenen T<sub>reg</sub>- Spezies durch unterschiedliche Zytokineinflüsse in der Peripherie entsteht.

T<sub>H1</sub> - Zellen entstehen unter dem Einfluss von IL- 12 bei bakteriellen oder viralen Infektionen und unterstützen die zelluläre Immunantwort.

T<sub>H2</sub> – Zellen, die in Anwesenheit von IL-4 entstehen, produzieren Zytokine, die die Aktivierung von Makrophagen und die Ausdifferenzierung zu T<sub>H1</sub> Zellen inhibieren, wodurch ein Gleichgewicht sichergestellt wird.

Die Entwicklung von T<sub>H17</sub>- Zellen erfolgt in der frühen Phase einer Infektion in Anwesenheit von TGF-β und IL-6 durch dendritische Zellen. T<sub>H17</sub>- Zellen stimulieren umliegendes Epithel - und Stromagewebe selbst zur Zytokinproduktion.

Aktivierte CD8<sup>+</sup> - Zellen bilden sogenannte zytotoxische T- Zellen (T<sub>c</sub>- Zellen). Deren Effektorfunktion besteht vor allem in der direkten Abtötung infizierter Zellen. Zum einen exprimieren T<sub>c</sub> - Effektorzellen den FAS - Liganden (CD95) auf ihrer Oberfläche, der durch direkte Interaktion mit dem Todesrezeptor FAS einer infizierten Zelle deren Apoptose induziert. Ein weiterer Mechanismus zur Apoptoseinduktion der Zielzelle besteht in der Freisetzung von Granula mit Perforin und Granzym, Nach Freisetzung bildet Perforin eine Pore in der Zellmembran, durch die Granzym in die Zelle eindringt und Apoptose induziert.

Nach Beendigung der Infektion sterben Effektorzellen durch Apoptose ab, da ihnen lebenswichtigen Faktoren u.a. Zytokine entzogen werden. Eine Zellpopulation jedoch, die T-

Gedächtniszellen, bleiben auch nach Abklingen einer Infektion erhalten. Diese ausdifferenzierten, ruhenden T-Lymphozyten können bei Auftreten einer erneuten Infektion sehr schnell und effizient zur sofortigen Abwehr rekrutiert werden.

### 1.3.3 Aktivierung von T- Zellen

Trifft eine ruhende T-Zelle auf ihr spezifisches Antigen, kommt es zu einer Aktivierung und Teilung dieser Zelle.

Für die Differenzierung von T- Zellen werden bestimmte Zytokine, insbesondere das von dendritischen Zellen produzierte Zytokin IL-12, benötigt. Für die klonale Expansion kommt IL-2 eine besondere Bedeutung zu. Der Kontakt mit dem spezifischen Antigen stimuliert CD4<sup>+</sup> T-Zellen zur IL-2 Produktion, welches unter anderem von den CD8<sup>+</sup> T-Zellen benötigt wird, die selbst schlechte IL-2 Produzenten sind. Während bei ruhenden T- Zellen der IL-2 Rezeptor noch nicht stark exprimiert wird, besitzen aktivierte T- Zellen durch zusätzliche Expression einer  $\alpha$  - Kette zum bestehenden Rezeptor einen hoch affinen IL-2 Rezeptor (CD25), der ein schnelles Wachstum möglich macht. Ebenso werden bei Aktivierung der T-Zelle CD137, sowie CD95 vermehrt exprimiert, wobei CD25 stärker auf CD4<sup>+</sup>T Zellen und CD137 vor allem auf CD8<sup>+</sup> T Zellen vorhanden ist

Die Aktivierung der T- Zelle zur Effektorzelle erfordert neben der MHC -/ Peptid- Bindung die Anwesenheit von kostimulatorischen Molekülen. Von enormer Bedeutung hierbei ist die Bindung der CD4 positiven Zelle an den CD28 Ligand B7, sowie an CD40 der antigenpräsentierenden Zellen.

Innerhalb der ersten 48h kommt es zu Zellwachstum; bei der sogenannten „on blast formation“ gewinnt die aktivierte T- Zelle an Volumen, Größe und Protein und beginnt außerdem Zytokine zu produzieren. Nach 48h setzt die Proliferation ein. Durch die Aktivierung erfolgt das sogenannte „metabolic reprogramming“. Die ruhende T-Zelle entwickelt sich zur metabolisch hoch aktiven Zelle [104, 105]. Während eine ruhende T-Zelle die Energie zur Erhaltung ihrer Grundfunktionen hauptsächlich aus der OXPHOS durch Einschleusen der Substrate aus Citratzyklus und  $\beta$ -Oxidation von Fettsäuren [105–107] bezieht, läuft die Energieversorgung der aktivierten T-Zelle mehrheitlich über aerobe Glykolyse [1, 2] und Glutaminolyse [105, 107–110]. Die Glukose wird in der Zelle hauptsächlich zu Laktat abgebaut [107, 111]; damit weisen T Zellen wie Tumorzellen den Warburg Phänotyp auf.

Das „metabolic reprogramming“ von T- Zellen wird durch ähnliche Signalwege gesteuert, wie sie auch bei Tumorzellen zu finden sind [112]. Einer der wichtigsten Regulatoren der gesteigerten Glykolyse ist der CD28 Signalweg über AKT/PI3K [111, 113]. Auf den

Antigenkontakt folgt in rascher Folge die Aktivierung von AKT, was unter anderem eine Hochregulation des Glukosestoffwechsels zur Folge hat [106, 114]. Weiterhin spielt AKT eine wichtige Rolle bei der Zytokinproduktion. Nach Stimulation des TCR ist außerdem vermehrt MYC in den T- Zellen zu finden. MYC trägt zur verstärkten Expression von Genen des Glukose- und Glutaminmetabolismus bei [106]. Unter Stimulation wird jedoch nicht nur die Glykolyse, sondern auch OXPHOS aktiviert [115, 116].

Studien legen nahe, dass eine hohe glykolytische Aktivität die Grundvoraussetzung für die klonalen Expansion aber auch wichtig für Effektorfunktionen von T- Zellen ist [105, 106, 108]. Es wurde gezeigt, dass neben der Nutzung zur Herstellung von Nukleotiden und Zellorganellen, sowie der Glykosylierung intrazellulärer Proteine T-Zellen über die Glykolyse Energie gewinnen [109]. Eine Inhibition der Glykolyse beispielsweise durch Verminderung des Glukoseangebots im Medium beeinträchtigt murine T-Zellen in ihren IFN $\gamma$  Produktion [108, 116–118]. Weiterhin wurde gezeigt, dass gerade die Proliferation muriner T- Zellen durch eine Glukoserestriktion deutlich reduziert wird. Allerdings wirft eine Studie von *Peng et al.* [119] neue Fragen auf. Ein „LDHA Knockout“ in murinen CD4+ T Zellen hemmte zwar die IFN $\gamma$  Produktion, jedoch blieben Zellgröße und Überleben der Knockout Klone weitgehend unbeeinträchtigt und die Proliferation setzte nur leicht zeitlich verzögert ein. Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass die Laktatproduktion der Zellen zwar fast vollständig inhibiert war, während die Glukoseaufnahme der LDHA knock-out CD4+ T Zellen nur um ca. 30% reduziert war im Vergleich zu Wildtyp CD4+ T-Zellen.

Im humanen System wird der Zusammenhang zwischen Glykolyse und Effektorfunktionen kontrovers diskutiert. Verschieden Arbeiten zeigen, dass auch unter Glukoserestriktion Effektorfunktionen wie IFN $\gamma$  und TNF Produktion erhalten bleiben [115, 118, 120]. Auch die zytolytische Aktivität wird nicht beeinträchtigt [121]. Ein Grund hierfür könnte sein, dass eine Hochregulation von OXPHOS die Glukoserestriktion der Zellen kompensiert und so die Produktion von IFN $\gamma$  aufrechterhalten wird [115].

Die Abhängigkeit der T Zellen von der Glykolyse bleibt weiterhin Gegenstand von Untersuchungen.

Die Aktivierung bedeutet eine außergewöhnliche metabolische Herausforderung für T-Zellen, sie benötigt nicht nur enorm viel Energie, sondern zugleich auch Biomasse, die bei jeder Zellteilung verdoppelt werden muss [104, 114]. T- Zellen sind daher auf ein ausreichendes Angebot an Aminosäuren angewiesen, da sie diese nicht selbst herstellen können. Essentiell für Proliferation und Energiegewinn der aktivierten T- Zellen ist Glutamin [112]; zusätzlich benötigen sie Tryptophan, Zystein und Arginin zur Aufrechterhaltung der Proliferation.

Da bei aktivierten T-Zellen, genau wie bei Tumoren ein „Switch“ hin zu starker Proliferation, erhöhtem Glukoseumsatz und gesteigerten metabolischen Aktivität beobachtet werden kann, ist es von großer Bedeutung die molekularen Mechanismen aber auch die tatsächliche Abhängigkeit von Stoffwechselwegen zu entschlüsseln, um Immunzellen durch Therapien mit metabolische Inhibitoren nicht zu beeinträchtigen.

## 1.4 Immunüberwachung und Escape-Strategien von Tumoren

Das Immunsystem dient nicht nur der Bekämpfung von Infektionen, sondern nimmt auch bei der Interaktion des Körpers mit Tumoren eine zentrale Position ein.

Ein intaktes Immunsystem ist für Tumorpatienten von entscheidendem Vorteil. Die Anzahl an tumor-infiltrierenden Lymphozyten in Melanomen [122] und Kolorektalen Karzinomen [123] ist mit einer besseren Prognose assoziiert. *Galon et al.* [124] konnte in umfangreichen Analysen an humanen Kolorektalen Tumoren zeigen, dass die Dichte, Lokalisation und Art der tumorinfiltrierenden Lymphozyten mit einer Verbesserung des klinischen Outcomes, insbesondere einer Verlängerung der tumorfreien Zeit, sowie des Gesamtüberlebens, korrelieren [124]. Gleichzeitig war eine schwache Immunreaktion mit einer schlechten Prognose verbunden. Dies ließ sich auch in Studien mit AIDS Patienten bestätigen. AIDS Patienten hatten durch ihr bereits supprimiertes Immunsystem ein höheres Risiko an Tumoren zu erkranken [125]. So kann ein funktionierendes Immunsystem die Entwicklung von bestimmten Tumoren verhindern [126].

Die Voraussetzung für eine Elimination des Tumors durch das adaptive Immunsystem ist die Präsentation von Antigenen, die als fremd erkannt werden. Bei der Erkennung eines als „fremd“ wahrgenommenen Antigens kommt es zur Expansion, Proliferation und Aktivierung spezifischer T-Zellen [127]. Der Vorgang gestaltet sich jedoch komplexer, als zunächst angenommen. Tumorzellen können zwar tumorspezifische Antigene exprimieren, haben jedoch in den meisten Fällen Strategien entwickelt, der Immunantwort zu entgehen. Ein Begriff, der das Zusammenspiel von Immunsystem und Tumor treffend umschreibt ist das sogenannte „Immuneediting“ [126]. „Immuneediting“ beschreibt einen dynamischen Selektionsprozess, der im Endeffekt dazu führt, dass niedrig immunogene Zellen überleben, da sie einer Kontrolle durch das Immunsystem entgehen [128].

Das Immunsystem trägt auf diese Weise entscheidend zur Immunmodulation von Tumoren bei. So wiesen beispielsweise Tumore von immundefizienten Mäusen, d.h. Tieren ohne B/T Zellen, einen höheren Anteil immunogener Antigene auf, verglichen mit Tumoren von immunkompetenten Mäusen [126]. „Immuneediting“ lässt sich in 3 Phasen einteilen: *Elimination, Equilibrium, Escape* [129]

Werden Tumorzellen in der Eliminationsphase noch durch angeborene und adaptive Immunabwehr erkannt und zerstört, agiert im Equilibrium nur noch das adaptive Immunsystem. Die Tumorzellen werden in einem Zustand gehalten, in dem sie überdauern, jedoch durch progredienten Verlust immunogener Proteine nicht mehr vernichtet werden.

Gelingt es nun Tumorzellen die immunologische Kontrolle vollständig zu umgehen, indem sie eine Vielzahl an Mutationen anhäufen, welche durch Verlust immunogener Antigene eine Immunantwort verhindern, wird der latente Tumorverbund zu einem manifesten Tumor [128]. Mehrere Escape-Mechanismen sind bekannt, darunter der Verlust von MHC I Molekülen auf der Oberfläche oder der Verlust von vorübergehend exprimierten Antigenen, sowie die Sekretion immunsuppressiver Zytokine durch den Tumor [130].

## 1.5 Wechselwirkung Tumorstoffwechsel und Immunsystem

Der Tumorstoffwechsel beeinflusst die Immunantwort auf unterschiedlichste Weise. Durch ähnliche metabolische Bedürfnisse von Tumor- und Immunzellen entsteht eine Konkurrenz um vorhandene Ressourcen. Hiervon betroffen ist unter anderem der Aminosäurestoffwechsel. [112] T- Zellen sind auf die Bereitstellung von Aminosäuren, insbesondere Tryptophan, Arginin und Glutamin angewiesen.

Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO), das entscheidende Enzym im Tryptophan Stoffwechsel, welches Tryptophan zu Kynurenin abbaut, wird von verschiedenen Tumoren (Magen-, Nieren-, Kolonkarzinom) vermehrt exprimiert [131]. Eine hohe IDO Expression in Tumoren führt zu niedrigen extrazellulären Konzentration von Tryptophan, wodurch die Immunantwort, insbesondere auch die Proliferation von T- Zellen, eingeschränkt wird [132]. In Kolorektalen Karzinomen korrelierte eine Überexpression von IDO mit einer geringen Anzahl an infiltrierenden T- Lymphozyten, sowie einer schlechteren Prognose der Patienten [133].

Eine weitere Aminosäure, die Tumor- und Immunzellen als wichtige Energiequelle dient, ist Glutamin. In vielen Tumoren konnte eine Überexpression des Enzyms Glutaminase gefunden werden [134], welches die Umwandlung von Glutamin in Glutamat katalysiert. Bei Tumorpatienten wurden erniedrigte Glutamin-, sowie erhöhte Glutamat Serumpiegel gemessen [135]. Eine solche Akkumulation an Glutamat konnte wiederum die Immunantwort im Tumor unterdrücken [136].

Das durch Tumoren erniedrigte Angebot an Aminosäuren kann sich demnach direkt auf die Entwicklung von Zellen des Immunsystems auswirken.

Viele Tumorzellen besitzen den Warburg Phänotyp und sind so auf eine hohe Glukosezufuhr angewiesen. Eine hohe GLUT Expression war im Nierenzellkarzinomen mit einer signifikant niedrigeren Anzahl an zytotoxischen T- Effektorzellen assoziiert [137]. CD8+ T-Lymphozyten, die den Tumor infiltrierten, wiesen weiterhin verminderte Spiegel an Effektormolekülen, wie Granzym und Perforin, auf. Im Tumorstroma herrscht ein Wettstreit um die vorhandene Glukose. Tumorzellen verursachten in murinen Sarkomen durch ihren hohen Glukoseumsatz eine Glukoserestriktion bei T- Zellen, welche dazu führte, dass T-Zellen selbst in ihrer glykolytischen Aktivität eingeschränkt waren und insgesamt weniger IFN $\gamma$  produzierten [138]. In wieweit ein Glukosemangel in humanen Tumoren vorliegt ist unklar. Die im Melanom gemessenen Spiegel lagen über jener Menge, die zu einer T Zellinhibition führt [139].

In humanen Melanomen [140], Kopf-Hals-Karzinomen [15], aber auch im Zervixkarzinom ([14, 141] wurden erhöhte Laktatkonzentrationen gefunden, welche mit einer höheren Metastasierungsrate und niedrigeren Überlebenschancen der Patienten korrelierten [14].

In verschiedenen Studien konnte zudem ein schädigender Effekt von Laktat auf das Immunsystem im Tumormilieu nachgewiesen werden [139, 142]. Durch die tumorassoziierten hohen Laktatspiegel kam es einerseits zur Aufnahme von exogenem Laktat in T-Zellen und zugleich zur Inhibition der Sekretion des intrazellulär anfallenden Laktats. Diese beiden Effekten führten zur intrazellulären Laktatakkumulation und damit zur Reduktion der Immunantwort [139, 142]. Auf diese Weise können Tumorzellen der Überwachung durch das Immunsystem entgehen und Tumorprogression voranschreiten.

Dementsprechend wurde *in vitro* die Proliferation und Aktivierung humaner T- Zellen durch Laktat reduziert [142, 143]. Zudem inhibierte Laktat, neben T- Zellen, auch die Aktivierung von Monozyten, sowie die Differenzierung dendritischer Zellen [144, 145].

*In vivo* wiesen NK - Zellen in LDH-A depletierten Tumoren eine verbesserte zytotoxische Funktion auf [146]. Unter anderem war im Melanomtausmodell die Anzahl sowie die Funktion von T- und NK- Zellen in Tumoren mit hohem Laktatlevel eingeschränkt [139].

Zusammenfassend kann man sagen, dass tumorassoziiertes Laktat in der Lage war die Reaktion des Immunsystems entscheidend zu modellieren. Effektorfunktion und Proliferation infiltrierender Immunzellen wurden unterdrückt, die Entwicklung von protumorigenen Makrophagen gefördert [147]. Dies stellt einen weiteren Baustein bei der Unterdrückung der Eliminierung durch das adaptive Immunsystem dar. Indem glykolytische Inhibitoren tumorassoziierte Laktatspiegel reduzieren, könnten sie zu einer Unterstützung der Immunantwort beitragen. Dieser Effekt konnte beispielsweise durch eine Reduktion der intratumoralen Ldha Expression erzielt werden [139]. Eine reduzierte Ldha Expression in murinen Melanomzellen führte *in vivo* demnach zu einer Reduktion des intratumoralen Laktatspiegels und somit zu einer Verbesserung der Immunantwort durch tumorinfiltrierende T- und NK- Zellen [139].

Aktivierte T-Zellen, wie auch Tumorzellen, benötigen besonders für ihre Proliferation eine extrem hohe Rate an Glykolyse, um hohe Teilungsraten zu gewährleisten. Daher entwickelten *Murray et al* [70] als erste geeignete MCT1/2 Inhibitoren zur Immunsuppression, die eine hohe Wirksamkeit und Spezifität bei gleichzeitiger guter Bioverfügbarkeit versprechen [70, 148, 149]. Die Effekte der MCT1/2 Inhibitoren wurden vor allem hinsichtlich einer Proliferationshemmung auf T- Zellen untersucht, Auswirkungen auf Effektorfunktionen wurden nicht analysiert.

Der MCT1/2 Inhibitor AZD396 war sowohl *in vitro* als auch *in vivo* dazu in der Lage eine Immunsuppression im Ratten- und Humanmodell zu induzieren [70]. Allerdings war der Effekt auf humane T- Zellen deutlich geringer ausgeprägt als im murinen System. Gleichzeitig wurde der AZD3965 erfolgreich gegen Tumore eingesetzt.

Da die T-Zelle bei ihrer Aktivierung jedoch ähnlichen Stoffwechselfvorgängen unterworfen ist, wie sie auch bei glykolytisch aktiven Tumoren zu finden sind, könnte eine Blockade der Zielstrukturen glykolytischer Prozesse in Tumoren das Immunsystem in gleicher Weise beeinträchtigen [150]. Dies könnte nun bei einer Therapie mit neuen Immunmodulatoren an Bedeutung gewinnen

Im Kontext des neuen Ansatzes Tumorthherapie über eine metabolische Blockade zu entfalten, ist es daher äußerst wichtig das Zusammenspiel zwischen T-Zell - und Tumormetabolismus zu kennen, um eine Immunsuppression zu verhindern [115, 150]. Daher gilt es eine Therapie zu finden, welche Immunzellen stärkt oder möglichst wenig inhibiert und die erworbenen immunsuppressiven metabolischen Eigenschaften von Tumorzellen reduziert [128].

## 2. Zielsetzung

Diese Arbeit gliedert sich in drei Teilbereiche.

Da sich die MCT Transporter insbesondere in der Tumorthherapie als eine vielversprechende Zielstruktur herauskristallisierten, lag der Fokus dieser Arbeit auf der Untersuchung und Identifizierung von Substanzen, die eine Blockade ebendieser Transporter hervorrufen.

Ziel des ersten Teils war es, die Wirksamkeit des MCT1/2 Inhibitors AZD3965 von AstraZeneca im Hinblick auf eine Inhibition der Glykolyse, der Proliferation und der Apoptose an verschiedenen Tumorzelllinien mit unterschiedlicher glykolytischer Aktivität und MCT Expression, mit Diclofenac zu vergleichen.

Im zweiten Teil wurden die Auswirkungen einer MCT Inhibition auf primäre humane CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T- Zellen untersucht.

Der dritte Teil schließlich beschäftigt sich mit der Frage, ob neben Diclofenac auch andere NSAR eine MCT Blockade bewirken können.

## 3. Material

### 3.1 Geräte

Balance LP1200S Sartorius	Göttingen, Deutschland
Biofuge fresco Heraeus	Hanau, Deutschland
Brutschränke	Heraeus, Hanau, Deutschland
CASY Zellzähler	Innovatis/Roche, Basel, Schweiz
ELISA- Reader	MWG Biotech, Ebersberg, Deutschland
EVOS Cell Imaging	System Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
FACS Calibur Durchflusszytometer	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Microtiter plate washer	Thermo Electron Corporation, Waltham, MA, USA
MACSiMAC Seperator	Milteny Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Mr Frosty Gefrierbehälter	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Pipettierhilfe	Integra Biosciences, Fernwald, Deutschland
Pipetten	Eppendorf, Hamburg, Deutschland oder
QuadroMACS Separator	Milteny Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Rotilabomini Zentrifuge	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Sterilbank (Laminar Air Flow)	Telstar, Woerden, Niederlande
Vortex Schüttler	Scientific Industries Ink., Bohemia, NY, USA

Wasseraufbereitungsanlage	Merck Millipore, Billerica, MA, USA
Wasserbad	Julabo, Seelstadt, Deutschland
Zentrifuge Sepatech Megafuge 1.0	Heraeus, Hanau, Deutschland
Zentrifuge Sepatech Megafuge 3.0	Heraeus, Hanau, Deutschland

### 3.2 Verbrauchsmaterialien

Einmalpipetten	Costar, Cambridge, MA, USA
LS-Säulen	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Kryoröhrchen	Costar, Cambridge, MA, USA
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Polystyrolröhrchen	Falcon, Heidelberg, Deutschland
Reaktionsgefäße (0.5 ml, 1.5 ml, 2 ml)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zellkulturplatten (6, 12, 96 Wells)	Costar, Cambridge, MA, USA
Zellkulturflaschen (25 cm <sup>2</sup> , 75 cm <sup>2</sup> )	Costar, Cambridge, MA, USA
Zentrifugenröhrchen (5 ml, 15 ml, 50 ml)	Falcon, Heidelberg, Deutschland

### 3.3 Chemikalien, Medien und Zusätze

β-Mercaptoethanol	Gibco/Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Aqua dest.	B. Braun Melsungen, Melsungen, Deutschland
CasyTON	Roche, Basel, Switzerland
DMSO	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Diclofenac- Natrium	Fagron, Barsbüttel, Deutschland
FACS Clean	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA
FACS Flow	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA
FACS Rinse	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA
Fötales Kälberserum	PAA/GE Healthcare, Chalfont St Giles, UK
Humanes AB-Serum	Bayrisches Rotes Kreuz, Regensburg, Deutschland
Indometacin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Ketoprofen	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
L-Glutamin (instabil)	Gibco/Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Lumiracoxib	Selleckchem.com, München, Germany
AZD3965	AstraZeneca, London, Großbritannien
SR13800	Cleveland, Abteilung für Tumorbilogie, Moffitt Cancer Center, Tampa, FL

MEM Nicht-essentielle Aminosäuren	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Natriumpyruvat	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Vitaminlösung	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Methanol	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
PBS	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
RPMI Medium 1640	Gibco/Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Tween 20	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Trypsin-EDTA	PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland

### 3.4 Enzyme, Testsysteme und Farbstoffe

7- AAD (7- Amino-Actinomycin)	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA
Annexin-V - FITC	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA
Annexin-V Bindungspuffer	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA
Elisa (IL-10, IL-2, IL-4, IFN $\gamma$ )	R&D Systems, Minnesota, USA
CD4 T-Zell Isolationskit	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
CD8 T-Zell Isolationskit	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
EDTA	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Glukose Assay Kit	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

IL-2 (Proleukin)

Novartis, Basel, Switzerland

MycoAlert Mycoplasma Detection Kit

Cambrex, Rockland, ME, USA

### 3.5 Antikörper für Durchflusszytometrie

<i>Antigen</i>	<i>Klon</i>	<i>Isotyp</i>	<i>Firma</i>
CD25 PE-Cy7	MOPC-21	IgG <sub>κ</sub>	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA
CD95 FITC	DX2	IgG1 <sub>κ</sub>	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA
CD137 PE	4B4	IgG1	eBioscience, San Diego, CA, USA
CD4 PE	RPA - T4	IgG1 <sub>κ</sub>	biolegend, San Diego, CA, USA
CD8 PE-Cy7	SK1	Igk1 <sub>κ</sub>	biolegend, San Diego, CA, USA

#### Zellstimulation

CD3 human,

Maus IgG2a

Miltenyi Biotec, Deutschland

CD28 PE human,

Maus IgG1

Miltenyi Biotec, Deutschland

Dynabeads Human T-activator CD3/CD28

Gibco/Life Technologies, Carlsbad, CA,  
USA

### **3.6 Antibiotika für die Kultur von Zelllinien und primären T Zellen**

Ampicillin Calbiochem,	San Diego, CA, USA
Blasticidin Invitrogen,	Camarillo, CA, USA
G418 Sigma-Aldrich,	St. Louis, MO, USA
Penicillin/Streptomycin	Gibco/Life Technologies, Carlsbad, CA, USA

## 4. Methoden

### 4.1 Tumorzelllinien

Die Arbeit mit Zellen erfolgte stets unter der Sterilbank. Die Zellen wurden, wenn nicht anders angegeben, bei 4° C für 8 Minuten mit 1300 Umdrehungen pro Minute (rounds per minute, rpm) zentrifugiert.

Die verwendeten humanen Ovarialkarzinomzelllinien IGROV-1 und OC316 wurden von Prof. Dr. W. Müller-Klieser (Universitätsklinikum Mainz, Deutschland) zur Verfügung gestellt.

Die murine Melanomzelllinie B16.SIY E12 wurde von C. Blank generiert. Durch Plasmidtransfektion und shRNA Technologie wurden in Vorarbeiten Subklone mit einer unterschiedlichen Expression der Laktatdehydrogenase generiert, welche als Konsequenz ein unterschiedliches MCT Muster tragen. Während der „high lac“ Klon NKagl vermehrt MCT1 und MCT4 exprimiert und somit eine größere Menge Laktat sezerniert, weist der „low lac“ Klon 2L/c ein vermindertes MCT4 Oberflächenprofil mit niedriger Laktatproduktion auf.

Das unterschiedliche MCT Oberflächenprofil wurde von Prof. Dr. Müller-Klieser (Institut für Pathophysiologie der Universität Mainz) mit immunhistochemischen Färbungen bestätigt.

Die verwendete leukämischen T-ALL Zelllinie CEM-CCRF-C7H2 wurde von Dr. R. Kofler zur Verfügung gestellt (Tiroler Krebsforschungsinstitut, Innsbruck, Österreich). Die histiozytäre Lymphomzelllinie U937 wurde von dem Leibniz-Instituts DSMZ erworben (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Deutschland)

#### 4.1.1 Einfrieren und Auftauen

##### *Einfrieren*

Zum Einfrieren wurden  $5 \times 10^6$  Zellen in 0.5 ml Medium aufgenommen und mit Einfriermedium (80% FCS und 20% Dimethylsulfoxid) im Verhältnis von 1:1 in einem Kryoröhrchen vermischt, sodass eine Endkonzentration von 90% FCS und 10% DMSO erreicht wurde. Die Zellen wurden im Kryoröhrchen über Nacht bei -80 °C im Gefrierbehälter („Frosty“) gelagert, um eine langsame Abkühlung der Zellen zu garantieren. Für eine langfristige Lagerung wurden die Röhrchen in flüssigen Stickstoff überführt.

### *Auftauen*

Eingefrorene Zellen wurden zum Auftauen rasch erwärmt und sofort mit 10 ml kaltem Medium versetzt. Nach dem Zentrifugieren wurde das Zellpellet in 10 ml Medium aufgenommen und in einer Zellkulturflasche ausgesät.

Vor Beginn einer Versuchsreihe wurden die Zellen ein bis zwei Mal passagiert, um ein logarithmisches Wachstum sicherzustellen.

## **4.1.2 Kultivierung von Tumorzelllinien**

Die Tumorzelllinien wurden bei 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> und 95% Luftfeuchtigkeit in RPMI Medium 1640 mit 10% FCS und 2 mM Glutamin kultiviert. Die B16 Klone wurden zudem mit den Selektionsantibiotika Blastocidin und G418 kultiviert.

Die adhärenenten Tumorzelllinien B16 (Nkag1, 2Llc), IG-ROV und OC316 wurden alle 3-4 Tage gesplittet. Nach einem Waschschrift mit 10 ml PBS und dem Zusatz von 1 ml 0.05%iger - Trypsin/EDTA-Lösung wurden die Tumorzellen nach einer Inkubationszeit von 5 Minuten im Brutschrank abgelöst. Zur Inaktivierung des Trypsins wurde frisches Medium im Verhältnis 1:10 hinzugefügt. Nach einer Zentrifugation wurden die Zellen in 2-3ml Medium aufgenommen. Die Zellzahl wurde ermittelt. Je nach Zelllinie wurden 0.5-1 x 10<sup>6</sup> Zellen pro Flasche in 20 ml Medium ausgesät.

Die Leukämiezelllinien U937 und C7H2 wurden ebenfalls im Abstand von 2-3 Tagen passagiert, zentrifugiert und mit einer Zellkonzentration von 0.3x10<sup>6</sup> mit neuem Medium verdünnt.

## **4.1.3 Experimenteller Aufbau Tumorzelllinien**

### *Suspensionszelllinien*

Für die Versuchsreihen mit den Zelllinien C7H2 und U937 wurden die Zellen in 6-Well Platten mit einer Konzentration von 0.3 x 10<sup>6</sup> Zellen pro ml in RPMI 1640 in einem Gesamtvolumen von 5 ml ausgesät. Die Zellen wurden mit unterschiedlicher Konzentration von AZD3965 (10, 25, 50 und 100 nM), von Diclofenac (50, 100 und 200 µM), sowie mit äquimolaren Mengen

Lumiracoxib, Indometacin und Ketoprofen behandelt. Es wurden Kontrollen mit den Trägersubstanzen Ethanol und DMSO durchgeführt. Nach 72 h wurden die Zellen geerntet und die Zellzahl bestimmt, sowie die Viabilität mit Hilfe einer Annexin-V/7- AAD Färbung im Durchflusszytometer untersucht. Die Überstände wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C eingefroren. In den Überständen wurde die Laktat- und die Glukosekonzentration gemessen, um die Laktatproduktion und die Glukoseaufnahme der Zellen zu untersuchen.

### *Adhärente Zelllinien*

Versuche mit den B16- Klonen erfolgten bei einer Konzentration von  $0.2 \times 10^6$  Zellen pro Well. Die Ovariakarzinomlinien IGROV-1 und OC316 wurden in einer Konzentration von  $0.05 \times 10^6$  pro Well in einem Gesamtvolumen von 6 ml ausgesät. Die adhären Zellen wurden für 72 h mit 10, 25, 50 und 100 nM AZD3965 und mit 50, 100 und 200  $\mu$ M Diclofenac inkubiert; zusätzlich wurde eine Kombination aus 100 nM AZD3965 und 200  $\mu$ M Diclofenac untersucht. Für die Analyse weiterer NSAR (Lumiracoxib, Indometacin, Ketoprofen) wurden im gleichen Versuchsaufbau äquimolare Konzentrationen wie bei Diclofenac eingesetzt. Die Substanzen wurden 2 h nach Aussaat zugegeben, um die Adhärenz der Zellen sicherzustellen. Zur Bestimmung der Laktatproduktion und Glukoseaufnahme wurden nach 72 h Überstände genommen. Die Laktatproduktion der IGROV-1 und OC316 lag nur minimal über den im Medium vorgegebenen Laktatwert von 1mM, weshalb der in den Abbildungen dargestellte Laktatwert um den Wert 1mM korrigiert wurde. Das heißt, der im Medium vorgegebene Laktatwert von 1mM wurde zur übersichtlicheren Darstellung von dem jeweils gemessenen Laktatwert im Überstand abgezogen. Für die Darstellung des Glukoseverbrauchs der Zellen wurde die Glukosekonzentration im Überstand zu dem Zeitpunkt 72 h von der Ausgangskonzentration der Glukose im Medium subtrahiert.

Die Bestimmung der Viabilität erfolgte nach 72 h über Annexin-V/7- AAD Färbung im Durchflusszytometer.

## 4.2 Primär humane T- Zellen

### 4.2.1 Isolation und Kultivierung von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T- Zellen

#### *Isolation von T- Zellen*

Die humanen T-Zellen wurden von gesunden Spendern mittels Leukapherese gewonnen. Die mononukleären Zellen (MNCs) wurden durch eine Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation isoliert. Die Interphase, in welcher sich die MNCs und somit die gewünschten T-Zellen befinden, wurde abgenommen und mit PBS gewaschen und zentrifugiert (Zwei Durchgänge bei 1800 rpm, 7 min, 4°C, der dritte bei 1200 rpm, 7 min, 4°C). CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> - T-Zellen wurden basierend auf der MACS Separation der Firma Miltenyi Biotech über positive und negative Selektion angereichert. Bei der negativen Selektion binden Microbeads an die zu depletierenden Zellpopulationen, wohingegen bei der positiven Selektion die Microbeads an die gewünschte Subpopulation binden. Die anti-CD4 und anti-CD8 Dynabeads wurden hinzugefügt und für 15 Minuten bei 4°C inkubiert. Pro  $10 \times 10^6$  MNCs wurden 40 µl MACS Puffer und 10 µl MicroBeads verwendet. Die Reagenzien wurden der Zellzahl entsprechend angepasst. Durch einen Waschschrift mit MACS Puffer wurden nicht gebundene MicroBeads entfernt.

Um die Populationen mit dem geforderten Phänotyp zu isolieren, gibt man die Zellsuspension mit den gebundenen Microbeads auf eine mit MACS Waschpuffer (PBS mit 1% FCS, 2mM EDTA) kalibrierte LS-Säule. Die Säule wird in einen Magneten eingespannt, wodurch die an Microbeads gebundenen Zellen in der Säule verbleiben. So wird bei der positiven Selektion die gewünschte Zellpopulation in der Säule gehalten, während bei der negativen Selektion die gewünschten Zellen im Durchfluss zu finden sind. CD8<sup>+</sup> T- Zellen wurden durch positive Selektion gewonnen, CD4<sup>+</sup> T- Zellen durch negative Selektion.

Die gereinigten CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T- Zellen wurden mit 5 ml MACS Waschpuffer von der Säule eluiert, zentrifugiert und in T- Zell Medium aufgenommen. Anschließend wurden die Reinheit der gewonnenen T- Zellen im FACS Durchflusszytometer überprüft. Die Reinheit betrug durchgehend mehr als 98%

#### Kultivierung von T- Zellen

T- Zellen wurden in einem speziellen T- Zell-Medium kultiviert. RPMI 1640 Medium wurde mit 2mM L-Glutamin, 0,1 mM nicht-essentielle Aminosäuren, 2ml Vitamine, 1 mM Natriumpyruvat, 100 U/ml Penicillin-Streptomycin, 0,05 mM β-Mercaptoethanol, 10% AB- Serum, sowie 100 U/ml IL-2 versetzt.

Die Zellen wurden mittels anti-CD3/CD28 Beads in einem Zell zu Bead Verhältnis von 1:1 stimuliert. Ein Teil der Zellen wurde unstimuliert ausgesät. T- Zellen wurden im ersten

Stimulationszyklus mit einer Konzentration von  $0.444 \times 10^6$  Zellen pro ml in 225  $\mu$ l ( $0.1 \times 10^6$  Zellen pro Well) für 6 Tage kultiviert. Nach jeweils 72h wurden die T- Zellen gesplittet und mit frischem T- Zell- Medium auf die Ausgangskonzentration verdünnt. Nach 6 Tagen im ersten Stimulationszyklus wurden die Zellen mit neuen Beads versetzt, auf die Ausgangszellzahl verdünnt, und für einen weiteren Zyklus von 6 Tagen stimuliert.

#### **4.2.2 Experimenteller Aufbau CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T- Zellen**

In beiden Stimulationszyklen wurden die T-Zellen mit 50 und 200  $\mu$ M Diclofenac, sowie 10, 50 und 100 nM des MCT1/2 Inhibitors AZD3965 und 100 nM des MCT1/2 Inhibitors SR13800 behandelt. Nach 24h, 48h und 72h wurden Überstände zur Bestimmung der Laktatproduktion und der Glukoseaufnahme genommen; die Zellzahl und der Zelldurchmesser, die Expression der Oberflächenantigene wurden ebenfalls untersucht. Nach 72h wurde die Viabilität der Zellen mittels Annexin-V/7 – AAD Färbung bestimmt.

Im zweiten Stimulationszyklus wurden zu den gleichen Zeitpunkten Proben wie im ersten Stimulus entnommen und die oben genannten Parameter untersucht.

#### **4.2.3 Zytokinbestimmung mittels „Enzyme-linked Immunosorbent Assay“ (ELISA)**

Die Methode des ELISAs beruht darauf, dass Zytokine spezifisch an einen auf dem Plattenboden fixierten Antikörper binden. Das lösliche Antigen wird gebunden und bleibt im darauffolgenden Waschschrift, bei dem nicht gebundenes Material entfernt wird, haften. Nun erfolgt die Konjugation des fixierten Antigens mit einem speziellen Antikörper, der mit einem Enzym verbunden ist. Nach einem weiteren Waschschrift wird jetzt ein Substrat zugegeben, das in einer Reaktion mit dem Enzym des Antikörpers einen Farbumschlag bewirkt. Die Farbintensität ist proportional zu der im Überstand enthaltenen jeweiligen Zytokinkonzentration. Die Zytokinkonzentration wird über eine mitgeführte Standardgerade ermittelt.

Die Konzentration der Zytokine in den Überständen der T-Zellen wurde mittels ELISA untersucht. Die Durchführung der verschiedenen ELISA erfolgte nach Angaben des Herstellers. IL-2, IL-4, IL-10 und IFN $\gamma$  wurden in den Überständen der CD4<sup>+</sup> T-Zellen

untersucht. zudem IL-2 und IFN $\gamma$  in den Überständen der CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Die Bestimmung der Zytokine erfolgte zu dem Zeitpunkt von 48 h nach Stimulation bzw. Restimulation.

## 4.3 Bestimmung von Laktat und Glukose

### *Bestimmung von Laktat*

Zur Bestimmung der Laktatsekretion und der Glukoseaufnahme wurden die Überstände der behandelten und unbehandelten Zellen untersucht. Überstände wurden jeweils nach 24, 48 und 72 h, bei den T- Zellversuchen zu den genannten Zeitpunkten im Stimulus und Restimulus entnommen.

Die Messung der Laktatkonzentration in den Überständen wurde durch die Abteilung der Klinischen Chemie (Universitätsklinikum Regensburg, Deutschland) mit dem ADVIA 1650 Analyzer durchgeführt. Bei der enzymatischen Bestimmung wird das in den Proben vorhandene Laktat durch die Laktatoxidase reduziert. Das dabei entstehende Wasserstoffperoxid reagiert in Anwesenheit einer Peroxidase mit Chromogen. Der bei diesem Prozess entstehende Farbstoff wird mittels Spektrophotometrie gemessen und ist proportional zu dem in der Probe vorhandenen Laktat.

### *Bestimmung von Glukose*

In einem ersten Schritt wird Glukose mit ATP durch die Hexokinase zu Glukose-6-Phosphat (G6P) und ADP umgesetzt. Das entstandene G6P wird nun in einem zweiten Schritt in Anwesenheit von NAD zu 6-Phosphoglukonat oxidiert. Diesen Schritt katalysiert das Enzym Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6PDH). Das bei der Oxidation entstehende NADH verursacht eine Änderung der Absorption, welche in einem Photometer mit einer Wellenlänge von 340 nm detektiert werden kann. Die gemessene Farbintensität ist proportional zur Glukosekonzentration der Probe.

Die Bestimmung der Glukoseaufnahme erfolgte über eine Messung der in den Überständen noch vorhandenen Glukose nach 24, 48 und 72 h. Die Analyse wurde mit dem Glucose Assay Kit nach Herstellerangaben durchgeführt. Für die Messung wurden 195  $\mu$ l des Substrats mit 5  $\mu$ l der Probe für 15 Minuten in einer 96-Well Platte inkubiert. Die in der Probe enthaltene Glukose wurde über eine mitgeführte Standardkurve bestimmt.

## 4.4 Bestimmung der Proliferation

Die Zellzahl wurde mittels „Pulsflächenanalyse“ mit dem CASY Zellzähler ermittelt. Hierbei detektiert das CASY System ein volumenabhängiges, elektrisches Signal bei Durchtritt einer intakten Zelle durch eine hochspezifische Membranpore. Abgestorbene Zellen können so durch ihr volumenabhängiges Signal leicht von vitalen Zellen unterschieden werden. Neben Zellzahl werden auch Zellgröße und Zelldurchmesser vom CASY System bestimmt.

## 4.5 Durchflusszytometrische Messung

Die durchflusszytometrischen Messungen wurden am FACS Calibur (fluorescence-activated cell sorting) durchgeführt. Dabei passieren die Zellen nach Aufnahme in das FACS-Gerät einen Laser, wodurch eine spezifische Lichtstreuung generiert wird. Das Gerät detektiert so zum einen das sogenannte „scatter“ Licht; zum anderen kann das Gerät die Fluoreszenz von Zielstrukturen in oder auf den Zellen detektieren. Die Zielstrukturen werden hierfür mit speziellen Antikörpern, die an ein fluoreszierendes Molekül konjugiert wurden, gefärbt. Das „scatter“ Licht besteht aus dem „Vorwärts - Streulicht“ (FCS) und dem „Seitwärts - Streulicht“ (SCC). Das „Vorwärts - Streulicht“ gibt Hinweise auf das Volumen einer Zelle; das „Seitwärts - Streulicht“ liefert Informationen über die Granularität.

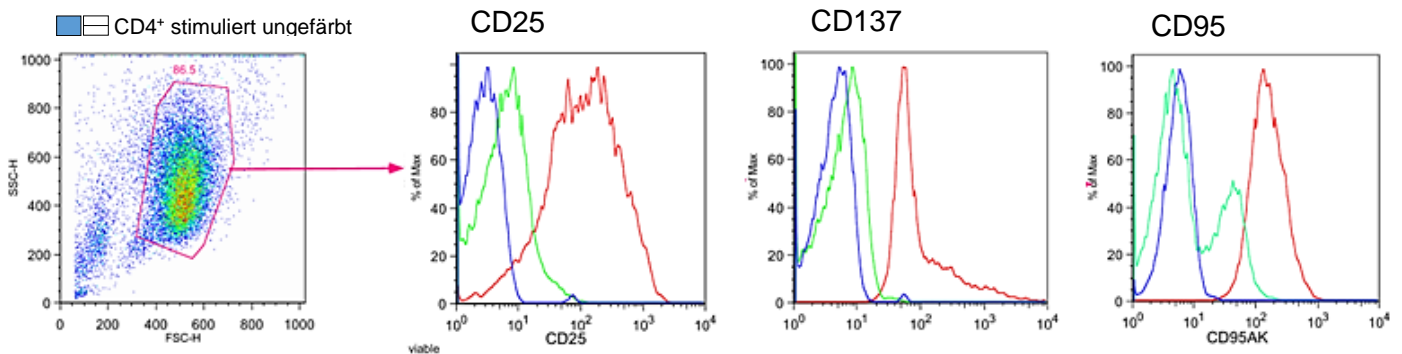
In dieser Arbeit wurde die Durchflusszytometrie zur Bestimmung der Viabilität und der Expression von den Oberflächenantigenen CD4, CD8, CD25, CD95 und CD137 verwendet. Die eingesetzten Antikörper sind unter 2.5 aufgeführt. Als Farbstoffkonjugate wurden FITC (Fluorothioisocyanat), PE (Phycoerythrin) und PE-Cy7 (Peridin-Chlorophyll-Protein) verwendet.

Zur Analyse der Durchflusszytometriedaten wurde die FlowJo Software (FlowJo, LLC, Ashland, OR, USA) verwendet.

### 4.5.1 Kompensation und „Gating“

Zur Korrektur der Autofluoreszenz wurden ungefärbte Kontrollproben aller Zelllinien verwendet. Die Einstellungen blieben als Kontrolle während des gesamten Versuchsablaufs erhalten.

Für die Untersuchung der Oberflächenantigene CD25, CD137 und CD95 von T-Zellen wurden die lebenden Zellen im FSC/SSC („Vorwärts Streulicht/Seitwärts Streulicht“) wie in **Abbildung 8** gezeigt, markiert. Das viable „Gate“ wurde den gesamten Versuchsaufbau über beibehalten.



**Abbildung 7** „Gating“ der CD4+ T – Zellen zur Untersuchung der Oberflächenexpression von CD25, CD137 und CD95

Das „Gating“ der CD8+ T – Zellen erfolgte in gleicher Weise

Bei der Bestimmung der Apoptose durch die Doppelfärbung mit Annexin-V und 7- AAD wurde nicht auf die viablen Zellen gated, sondern alle Zellen in der Analyse eingeschlossen. Doppelt negative Zellen stellten die viable Population dar.

### 4.5.2 Bestimmung der Expression von Oberflächenproteinen

Die Oberflächenantigene CD4, CD8, CD25, CD95 und CD137 wurden auf T-Zellen analysiert. Für die Färbung der Oberflächenantigene wurden unstimulierte T-Zellen gepoolt und bei 4 °C für 4 Minuten bei 1600 rpm zentrifugiert. Bei stimulierten T-Zellen wurden vor der Zentrifugation die anti-CD3/CD28 Beads mittels eines Magneten entfernt. Nach zweimaligem Waschen mit 1 ml FACS Waschpuffer (PBS mit 2% FCS) wurden die Oberflächenantigene mit spezifischen Antikörpern gefärbt. Die Menge des zugegebenen Antiköpers entsprach den Angaben des Herstellers.

Die Suspension wurde für 20 Minuten bei 4 °C inkubiert. Nach 2 weiteren Waschschritten mit je 1 ml FACS Waschpuffer und nachfolgender Zentrifugation wurden die Zellen in 400 µl FACS Waschpuffer aufgenommen und analysiert.

Die Reinheit der CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurde 24h nach Isolation in den unstimulierten T Zellen überprüft. Die Expression der Aktivierungsmarker CD25, CD95 und CD137 wurde ebenfalls bei den unstimulierten T-Zellen nach 24 h gemessen, um den Aktivierungszustand der unstimulierten T-Zellen zu analysieren. Die Expression von CD25 und CD137 wurde nach 48 h, die Expression von CD95 sowie CD25 wurden nach 6 Tagen gemessen.

### **4.5.3 Bestimmung der Apoptose**

Um die Viabilität der Zellen zu ermitteln, wurden die Zellen mit 7- AAD und Annexin-V gefärbt. Doppelt negative Zellen stellen die viable Population dar. Nekrotische Zellen nehmen das 7- AAD auf, da der Farbstoff bei nicht intakter Zellmembran ungehindert passieren kann und mit der DNA interkaliert. Annexin-V färbt Phosphatidylserine, die auf der Außenseite der Membran von frühapoptotische Zellen exprimiert werden. Apoptotische Zellen weisen ein doppelt-positives Signal auf. Die Zellen wurden geerntet, zentrifugiert und in PBS aufgenommen. Je  $0,25 \times 10^6$  Zellen wurden in ein Polystyrolröhrchen überführt und zweimal mit 400 µl PBS gewaschen. Die Zellpellets wurden in 400 µl Annexin-Bindungs-Puffer aufgenommen und die entsprechende Menge an 7- AAD und Annexin-V (nach Herstellerangaben) zugegeben. Nach 20-minütiger Inkubation im Dunklen bei Raumtemperatur wurden die Proben am FACS Calibur analysiert. Das mit FITC markierte Annexin-V wurde in Kanal 1, 7- AAD in Kanal 3 detektiert.

## **4.6 Mycoplasmen Testung**

Alle Zelllinien wurden regelmäßig einer Mycoplasmentestung nach Angabe des Herstellers mit dem MycoAlert System unterzogen.

## 4.7 Statistische Auswertung

Statistische Analysen wurden mit der One way Anova oder dem Kruskal - Wallis - Test durchgeführt. Unterschiede von \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  bzw. \*\*\* $p < 0.001$  wurden als signifikant bezeichnet.

Alle statistischen Analysen wurden mit der GraphPad Prism 5 Software (GraphPad Software Inc., San Diego, USA) durchgeführt.

## 5. Ergebnisse

### 5.1 AZD3965 im Vergleich zu Diclofenac

Der AZD3965 und Diclofenac wurden hinsichtlich ihrer Fähigkeit, die Laktatproduktion von Tumorzellen zu reduzieren, sowie Proliferationsarrest und Apoptose zu induzieren, miteinander verglichen.

Die eingesetzten Konzentrationen des AZD3965 basieren auf bereits publizierten Daten, die zeigen, dass in diesem Konzentrationsbereich eine vollständige Blockade der Transporter erzielt wird. [71]. Dabei löste eine Konzentration von 100nM eine komplette Blockade des MCT1 und 2 aus.

Anhand dieser Ergebnisse wurde der AZD3965 in dieser Arbeit zwischen Konzentrationen von 10nM bis 100nM titriert, um die kleinstmögliche Wirkkonzentration zu bestimmen.

Die eingesetzten Konzentrationen von Diclofenac gehen auf publizierte Vordaten der Arbeitsgruppe zurück, in denen gezeigt wurde, dass bei 100µM bereits eine sehr gute Inhibition der Laktatsekretion, bei 200µM eine fast vollständige Blockade erzielt werden kann [83].

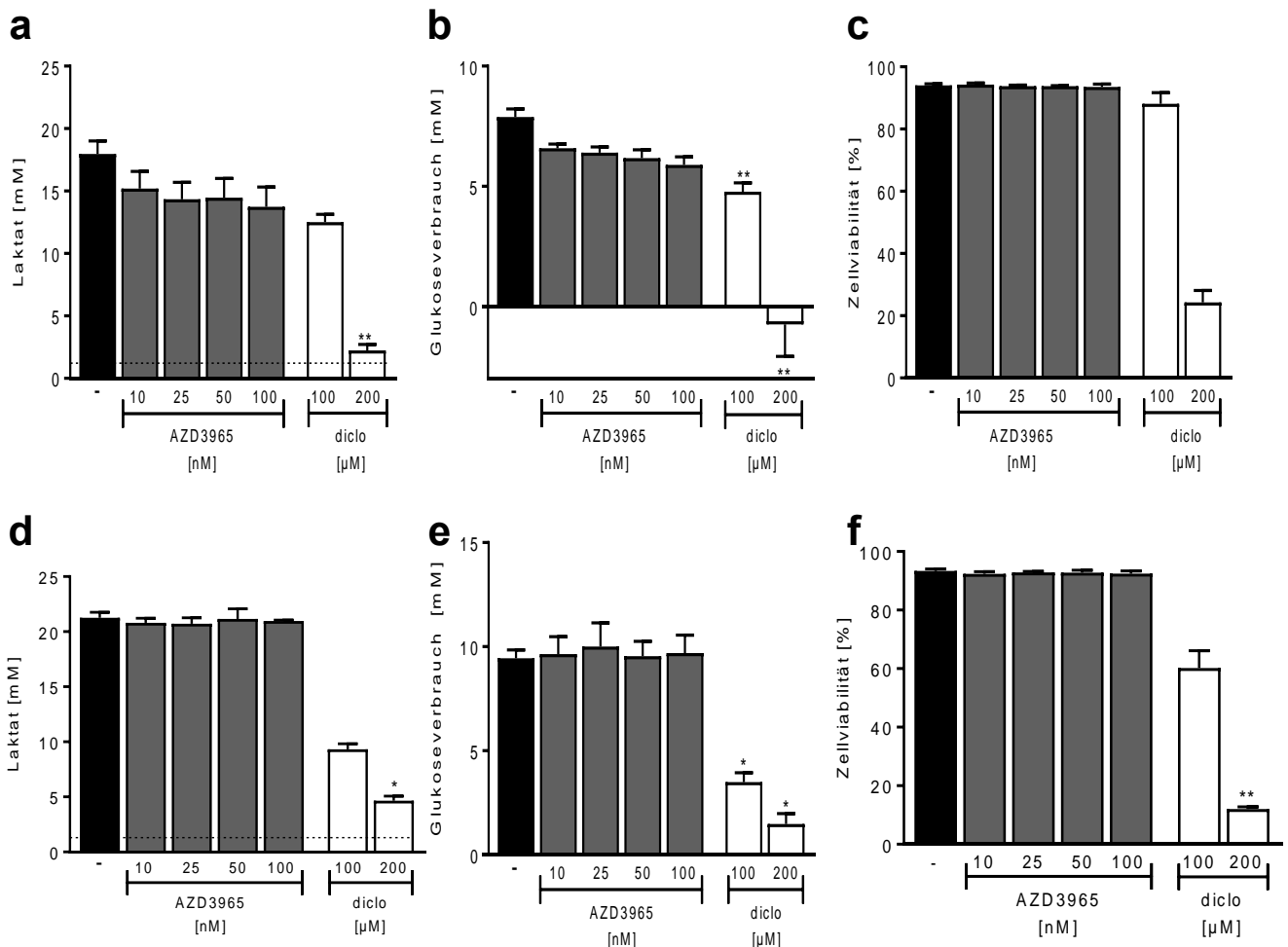
#### 5.1.1 Leukämielinien C7H2 und U937

Zunächst wurden die lymphatische T-Zell Leukämielinie C7H2 und die histiozytäre Lymphomlinie U937 untersucht.

Die Kultivierung der C7H2 und U937 erfolgte in 6-well Platten bei einer Konzentration von  $0.3 \times 10^6$  Zellen/ml mit unterschiedlichen Konzentrationen des MCT1/2 Inhibitors AZD3965 (10nM, 25nM, 50nM, 100nM) und Diclofenac (100µM, 200µM). Die Effekte auf Laktatproduktion, Glukoseaufnahme, Proliferation und Viabilität wurden jeweils im Zeitverlauf untersucht. Nach 72h wurden die Zellen geerntet, die Zellzahl und Viabilität im Durchflusszytometer gemessen.

Auf die Laktatproduktion übte der AZD3965 nur in den C7H2 Zellen nach 72h einen geringen negativen Effekt aus (**Abbildung 8a, d**). Dieser war jedoch nicht signifikant.

Die Glukoseaufnahme war lediglich in der C7H2 Linie etwas beeinträchtigt. (**Abbildung 8b, e**)



**Abbildung 8 Effekte von AZD3965 und Diclofenac auf C7H2 - und U937 – Zellen:**

Die (a-c) C7H2 und (d-f) U937 Zellen wurden bei einer Anfangspopulation von  $0.3 \times 10^6$  Zellen/ml in Anwesenheit von AZD3965 (10nM, 25nM, 50nM, 100nM) und Diclofenac (100µM, 200µM) inkubiert. Nach 72h wurden die Zellen geerntet, Laktatproduktion (a, d) und Glukoseaufnahme (b, e) mittels enzymatischer Analyse bestimmt, sowie Viabilität (c, f) gemessen mittels Annexin-V/7- AAD Färbung (n=3 mean und SD, Kruskal – Wallis Test, Dunn's multiple comparison test, \* P < 0.05, \*\* P < 0.01, und \*\*\* P < 0.001).

Bei Betrachtung der Proliferation und Zellviabilität zeigte sich, dass der MCT1/2 Inhibitor auch bei hohen Konzentrationen in den leukämischen Zelllinien C7H2 und U937 keine Effekte hatte (Abbildung 8c, f und Tabelle 2)

**Tabelle 2 Proliferation von C7H2 und U937 unter AZD3965 und Diclofenac Behandlung**

	Kontrolle	100nM AZD3965	100µM Diclofenac	200µM Diclofenac
C7H2 [Mio/ml]	2.022 ± 0,37	1,70 ± 0.04	1.98 ± 0.16	0,84 ± 0.2*
U937 [Mio/ml]	2,02 ± 0.21	2,08 ± 0.2	1,23 ± 0.01	0,57** ± 0.10

Die Zellen wurden für 72h mit 100nM des AZD3965, sowie mit 100µM und 200µM Diclofenac behandelt. Nach 72h wurden die Zellen geerntet und die Zellzahl mittels CASY System bestimmt, (Anfangspopulationen:  $0.3 \times 10^6$  Zellen/ml); Dargestellt ist jeweils der Mittelwert nach 72h (n=3 mean und SD, Kruskal – Wallis Test, Dunn's multiple comparison test, \* P < 0.05, \*\* P < 0.01, und \*\*\* P < 0.001).

Eine mögliche Erklärung für die Resistenz gegenüber einer MCT1/2 Inhibition könnte in einer starken Expression von MCT4 liegen. Das heißt beide Zelllinien würden die Blockade des MCT1 und MCT2 durch eine verstärkte Nutzung des verbliebenen MCT4 kompensieren.

Der Effekt des MCT1/2 Inhibitors auf die C7H2 könnte somit durch eine starker MCT1 Expression bei schwache MCT4 Expression erklärt werden, da sich nur bei den C7H2 ein geringer Effekt des AZD3965 nachweisen lässt.

Diclofenac reduzierte im Vergleich zum AZD3965 den Glukosestoffwechsel in beiden Linien signifikant. Zusätzlich kam es bei einer Konzentration von 200µM Diclofenac zu einem nahezu kompletten Proliferationsarrest (**Tabelle 2**) Die Konzentration von 50µM Diclofenac konnte zwar die Laktatproduktion reduzieren, hatte aber keinerlei Einfluss auf die Proliferation (Daten nicht gezeigt). Daraus kann geschlossen werden, dass die Inhibition des Glukosestoffwechsels unabhängig von einer Inhibition der Proliferation ist.

Die Viabilität war ebenfalls bei einer Konzentration von 200µM signifikant um ca 80% in der U937 Linie, um ca 90% in der C7H2 Linie reduziert. (**Abbildung 8c, e**)

Eine mögliche Erklärung hierfür wäre eine durch Diclofenac ausgelöste Blockade sowohl des MCT1 als auch des MCT4, was der Zelle wenig Kompenstionsmechanismen lässt und sie so in den Proliferationsarrest und in weiterer Folge in den Zelltod treibt.

### **5.1.2 Solide Tumorzelllinien mit unterschiedlicher MCT-Expression**

In einem nächsten Schritt wurde die Wirkung des MCT1/2 Inhibitors und Diclofenac auf adhärenzte Zelllinien untersucht, welche sich in ihrem MCT Expressionsprofil deutlich unterscheiden.

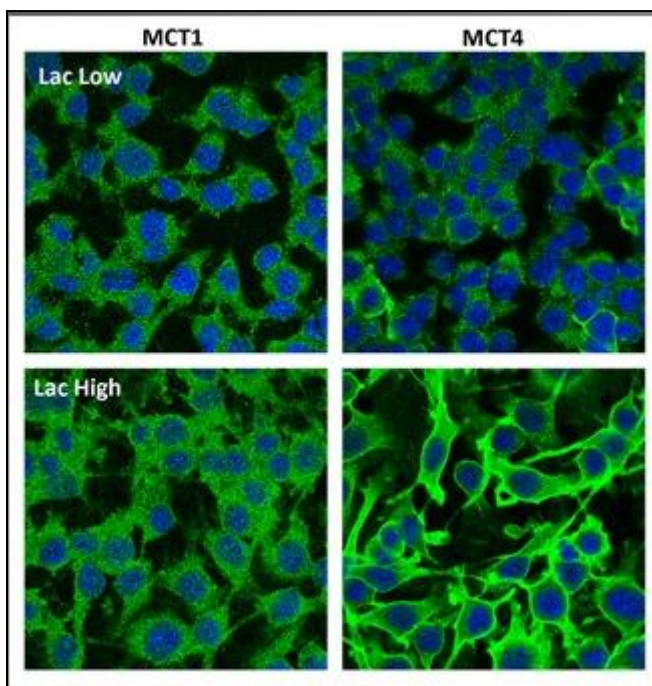
Dafür wurden die murine Melanomlinie B16.SIY mit hoher und niedriger Ldha Expression, sowie die humanen Ovarialkarzinomlinien OC316 und IGROV-1 verwendet. Die Zelllinien unterscheiden sich nicht nur in ihrem Glukosestoffwechsel, sondern auch in ihre MCT-Expression [151].

### 5.1.2.1 Murine Melanomzelllinie B16 SIY

Die speziellen Subklone B16 NKagl und 2L/c zeichnen sich durch eine unterschiedliche Expression der Laktatdehydrogenase A (Ldha), sowie einem divergierendes MCT Expressionsmuster aus.

Der Klon NKagl („lac high“) produziert durch eine vermehrte Ldha Expression höhere Mengen an Laktat und zeigt ebenfalls eine hohe Expression an Mct1 und Mct4. Demgegenüber ist die Laktatproduktion des 2L/c Klons („lac low“), auf Grund einer durch genetischen Modifikation erniedrigte Ldha Expression, deutlich reduziert. Die Mct1 Transporter Expression ist in beiden Klonen vergleichbar, im 2 L/c Klon jedoch wird Mct4 deutlich geringer exprimiert.

Die immunhistochemischen Färbungen der Mcts in den B16 Klonen wurden von Prof. Dr. Müller-Klieser (Institut für Pathophysiologie der Universität Mainz) durchgeführt und zur Verfügung gestellt.

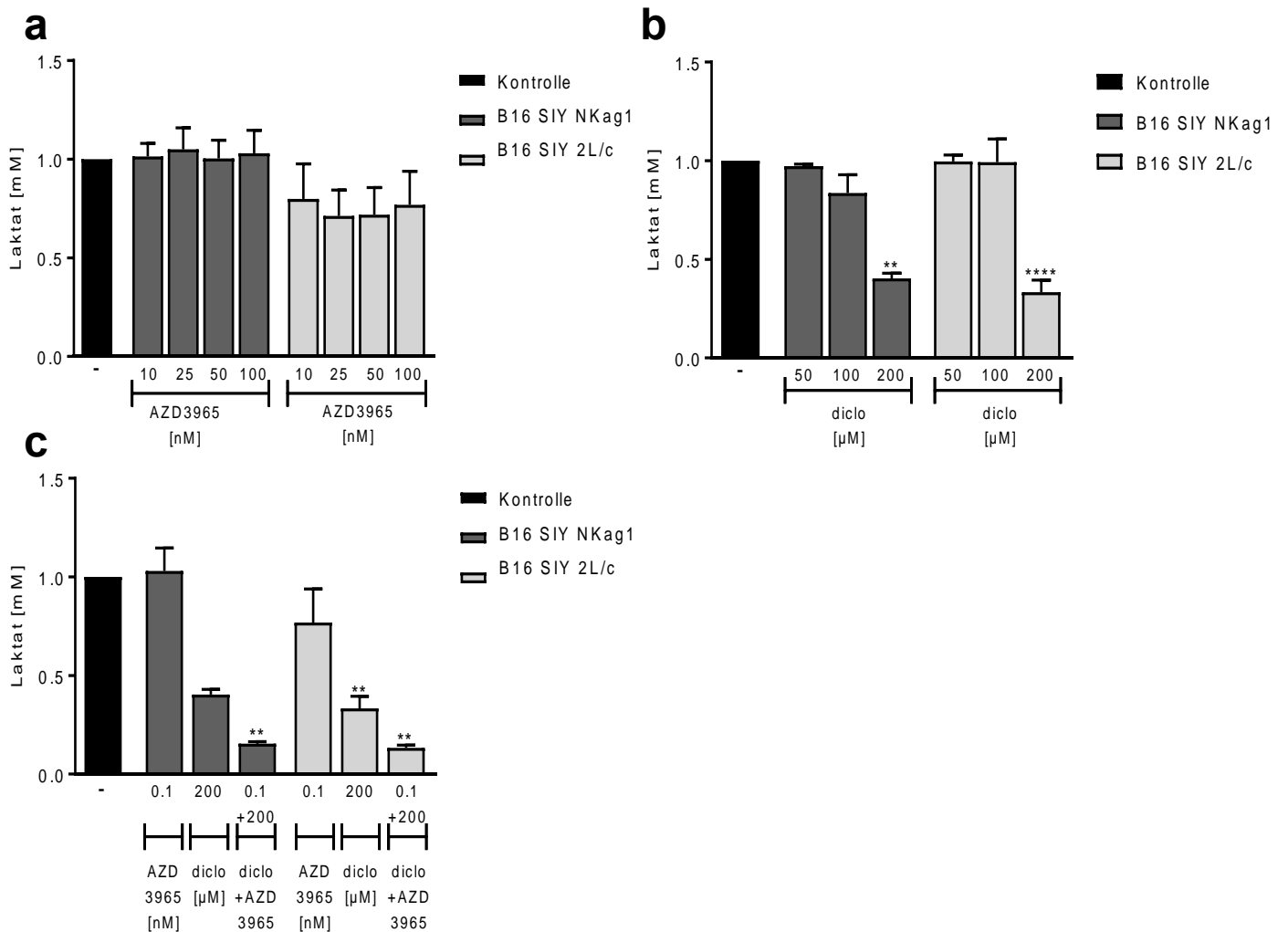


**Abbildung 9 Mct1 und 4 Expression des 2L/c und NKagl Klon**

Immunhistochemische Färbungen von Mct1 und Mct4 auf dem NKagl („high lac“) und 2L/c Klon („low Lac“)

Die B16-Zellen wurden im gleichen Versuchsaufbau für 72h bei einer Anfangspopulation von  $0.2 \times 10^6$  pro Well mit Diclofenac (50 $\mu$ M, 100 $\mu$ M, 200 $\mu$ M) und MCT1/2 Inhibitor (10nM, 25nM, 50nM, 100nM) inkubiert. Überstände zur Bestimmung von Laktat- und Glukosekonzentration wurden alle 24h entnommen, nach 72h Zellzahl und Viabilität gemessen. Dargestellt sind hier jeweils die Ergebnisse nach 72h.

In **Abbildung 10** wurde die Laktatproduktion des NKag1 und des 2L/c Klons unter Behandlung mit den MCT Inhibitoren direkt gegenübergestellt.



### Abbildung 10 Laktatproduktion der B16 Klone unter MCT Inhibition

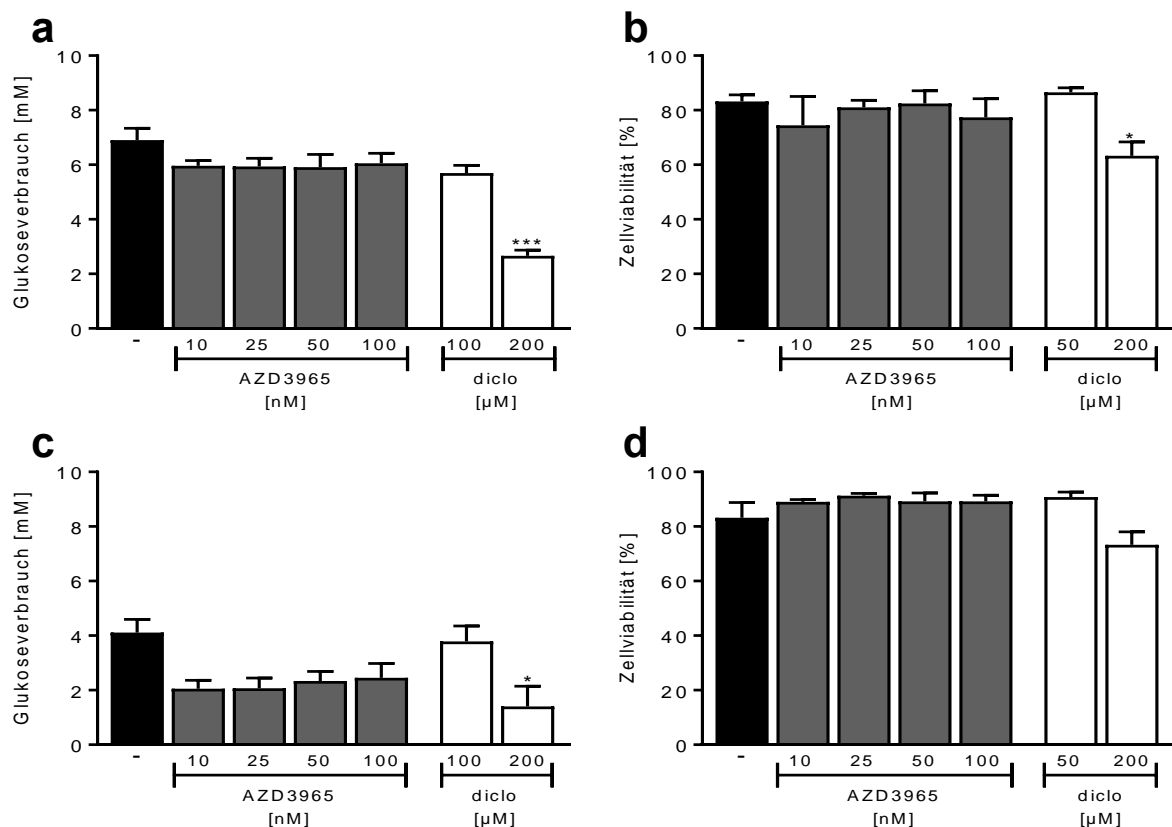
(a - c) B16 Zellen wurden bei einer Anfangspopulation von  $0.2 \times 10^6$ / Well mit unterschiedlichen Konzentrationen an Diclofenac und AZD behandelt. Überstände zur Bestimmung der Laktatproduktion wurden nach 72h abgenommen. Laktat wurde mittels enzymatischer Analyse bestimmt und dann auf die Konzentrationen der Kontrolle normalisiert (a) Vergleich der Laktatproduktion der B16 – Zellen unter AZD3965im Vergleich zur, (b) Ratio der Laktatproduktion der B16 – Zellen unter Diclofenac, (c) Vergleich der Ratio der Laktatproduktion unter der Kombination 200μM Diclofenac und 100nM AZD3965. ( $n = 3$  für die Kombination aus Diclofenac und AZD3965,  $n = 6$  für Diclofenac; mean und SD, Kruskal – Wallis Test, Dunn's multiple comparison test, \*\*  $P < 0.01$ , und \*\*\*  $P < 0.001$ )

Bei dem 2L/c Klon zeigte sich unter Behandlung mit dem AZD3965 eine leicht eingeschränkte Laktatproduktion, wohingegen die Laktatproduktion des NKag1 durch den MCT1/2 Inhibitor wenig beeinträchtigt wird. Diclofenac hingegen reduzierte die Laktatproduktion des 2L/c Klons ebenso wie die des NKag1 Klons. Zusätzlich wurde eine Kombination aus AZD3965 und Diclofenac angewandt, mit dem Ziel einer zusätzlichen Reduktion der Laktatproduktion durch die Inhibition von Mct2. Zu sehen ist, dass der Laktatefflux durch die Kombination beider Wirkstoffe in beiden Klons noch stärker abnahm, jedoch nicht völlig zum Erliegen kam

**(Abbildung 10).** Obwohl durch die Kombination des AZD3965 und Diclofenac eine ausreichende Blockade sowohl des Mct1, 2 und 4 bestehen sollte, gelang es den B16 Klonen weiterhin Laktat aus der Zelle zu schleusen. Dies könnte durch eine passive Diffusion aus der Zelle oder die Expression anderer Laktattransporter erklärt werden.

Die Glukoseaufnahme konnte durch den AZ3965, wie in **Abbildung 11a** und **c** dargestellt, weder im NKagl Klon, noch im 2L/c Klon deutlich reduziert werden. Selbst hohe Konzentrationen des MCT1/2 Inhibitors bewirkten keine signifikante Einschränkung des Glukoseverbrauchs der B16 Zellen. Auch im Fall einer überwiegenden Mct1 Präsentation, wie bei dem 2L/c Klon, war der AZD3965 nicht in der Lage die Zellen ausreichend in ihrer glykolytischen Aktivität zu hemmen.

Viabilität (**Abbildung 11b, d**) und Proliferation (**Tabelle 3**) der B16 Klone zeigten sich ebenfalls weitgehend unempfindlich gegenüber den eingesetzten Konzentrationen des MCT1/2 Inhibitors. Auch im Fall einer überwiegenden MCT1 Präsentation, wie bei dem 2L/c Klon, war lediglich eine Tendenz zur Hemmung der Proliferation erkennbar.



**Abbildung 11 Glukoseaufnahme und Viabilität der B16 Zellen unter MCT Inhibition**

NKagl (**a, b**) und 2L/c (**c, d**) wurden für 72h bei einer Anfangspopulation von  $0.2 \times 10^6$ / Well mit AZD3965 (10nM, 25nM, 50nM, 100nM) und Diclofenac (50µM, 100µM, 200µM) inkubiert. (**a, c**) Überstände zur Bestimmung von Glukosekonzentration wurden nach 72h abgenommen und mittels enzymatischer Analyse bestimmt. (**b, d**) Viabilität wurde nach 72h nach Ablösung der Zellen mittels Annexin-V/7- AAD Färbung gemessen. ( $n = 6$  für Diclofenac,  $n = 3$  für AZD3965; mean und SD, Kruskal – Wallis Test, Dunn's multiple comparison test, \*  $P < 0.05$ , und \*\*\*  $P < 0.001$ )

	Kontrolle	100µM Diclofenac	200µM Diclofenac	100nM AZD3965	Kombination AZD3965(100nM) Diclofenac(200µM)
Nkagl [Mio/Well]	1.85 ± 0.44	1.67 ± 0.5	0.33 ± 0.06**	1.84 ± 0.27	0.33 ± 0.06*
2L/c [Mio/Well]	1.69 ± 0.44	1.54 ± 0.35	0.52 ± 0.24*	1.56 ± 0.13	0.45 ± 0.09

**Tabelle 3 Proliferation NKagl und 2L/c unter AZD3965 und Diclofenac Behandlung**

Die Zellen wurden für 72h mit AZD3965 (100nM) und Diclofenac (100µM, 200µM) behandelt. Nach 72h wurden die Zellen geerntet und die Zellzahl mittels CASY System bestimmt, (Anfangspopulationen:  $0.2 \times 10^6$  pro Well, dargestellt ist jeweils der Mittelwert nach 72h) (n = 3; mean und SD, Kruskal – Wallis Test, Dunn's multiple comparison test, \* P < 0.05\*\* P < 0.01).

Diclofenac führte ab einer Konzentration von 200µM zu einer signifikanten Minderung der Glukoseaufnahme bei dem NKagl sowie dem 2L/c Klon (**Abbildung 11a, c**). Die Inkubation mit 50µM Diclofenac hatte keinen Einfluss auf die B16 Klone (Daten nicht gezeigt).

Zusätzlich induzierte Diclofenac ab einer Konzentration von 200µM in beiden Zelllinien einen fast vollständigen Proliferationsarrest (**Tabelle 3**). Ab einer Konzentration von 200µM Diclofenac konnte darüber hinaus eine um 30% reduzierte Viabilität in beiden B16 Klonen beobachtet werden (**Abbildung 11b, d**).

Die Kombination aus Diclofenac und AZD3965 konnte die Proliferation und Viabilität nicht mehr zusätzlich einschränken.

Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass als Reaktion auf die Blockade von MCT1 und MCT2, der MCT4 für die Zelle an Bedeutung gewinnt und sie auf diese Weise ihren Glukoseumsatz an ihr vorheriges Niveau anzugleichen vermag.

Daher stellte sich nun die Frage, ob auch geringste Mengen an MCT4, die auf der Zelloberfläche exprimiert werden, ausreichen, die Effektivität des AZD3965 zu reduzieren. Zusätzlich sollte der Effekt von Diclofenac auf Zellen, bei denen die MCT4 Expression noch stärker supprimiert ist, geprüft werden.

Dazu wurden die humanen Ovarialkarzinomlinien OC316 und IGROV-1 verwendet.

### 5.1.2.2 Humane Ovarialkarzinomlinien OC316 und IGROV-1

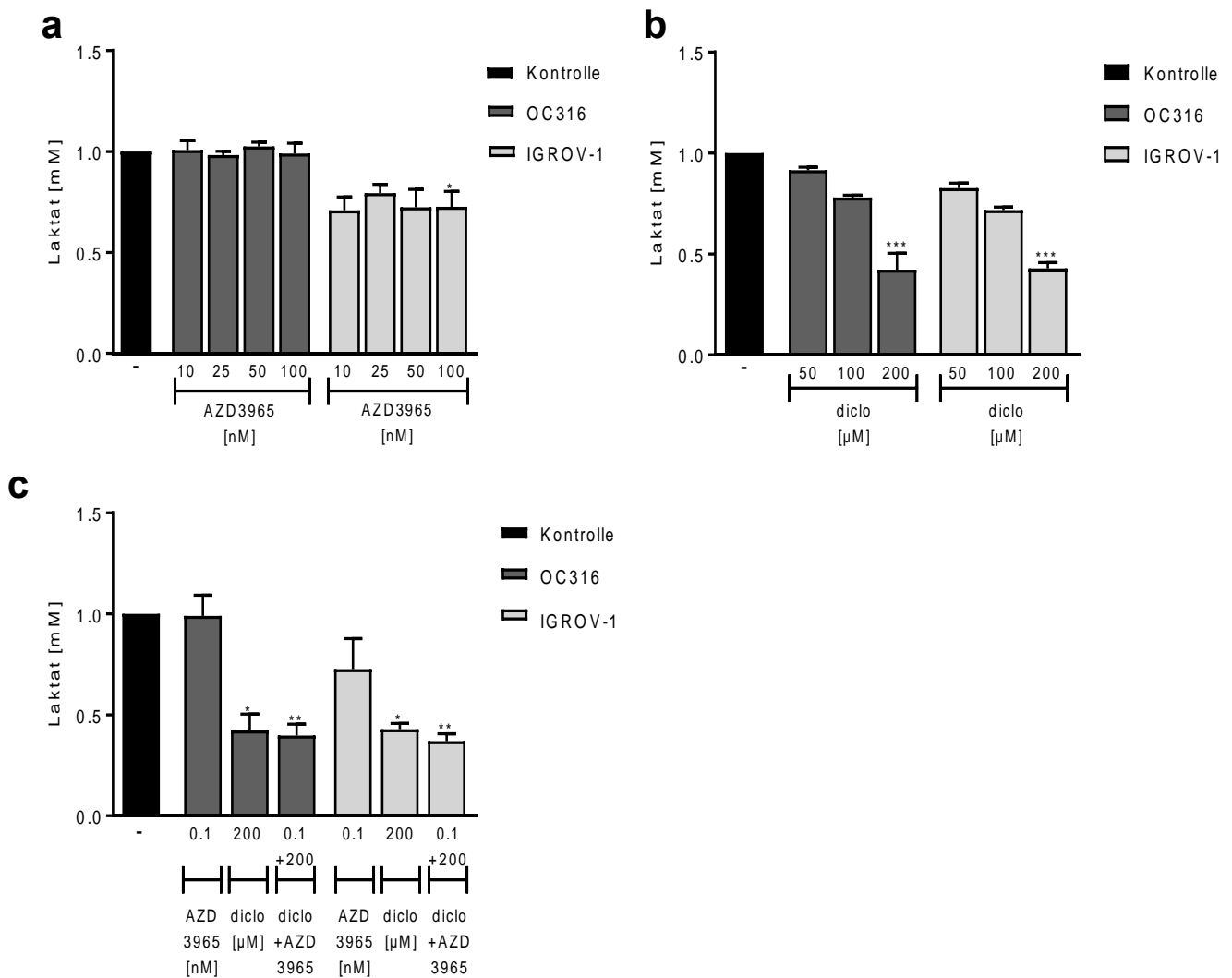
Es wurde der gleiche Versuchsaufbau wie für die B16 Klone verwendet, um einheitliche Rahmenbedingungen zu gewährleisten. Jedoch wurde hier eine reduzierte Ausgangszellzahl ( $0.05 \times 10^6$ /Well) eingesetzt, da sich die Zelllinien in ihrem Wachstumsverhalten unterschieden.

Die OC316 Zellen zeichneten sich durch eine deutlich erhöhte glykolytische Aktivität im Vergleich zu den IGROV-1 Zellen aus. Dies geht mit einer höheren Expression an glykolytischen Enzymen einher [151]. In immunhistochemischen Färbungen wurde ersichtlich, dass die OC316 Zellen erheblich mehr MCT4 als die IGROV-1 exprimieren, wobei aber MCT4 auch bei den IGROV-1 nachzuweisen war. Die Expression von MCT1 war in beiden Zelllinien gleichermaßen vorhanden [151].

In der direkten Gegenüberstellung der zwei Zelllinien zeigte sich eindrücklich, dass die IGROV-1 Linie mit niedriger MCT4 Expression von einer Blockade ihres MCT1 durch den AZD3965 in größerem Ausmaß betroffen war als die OC316 Linie (**Abbildung 12a**). Als Konsequenz war die Laktatproduktion der IGROV-1 signifikant durch den MCT1/2 Inhibitor eingeschränkt; die Laktatproduktion der OC316 Zellen war dagegen nicht inhibiert.

Diclofenac konnte eine zu den vorherigen Ergebnissen analoge Hemmung der Laktatproduktion in beiden Zelllinien hervorrufen (**Abbildung 12a**).

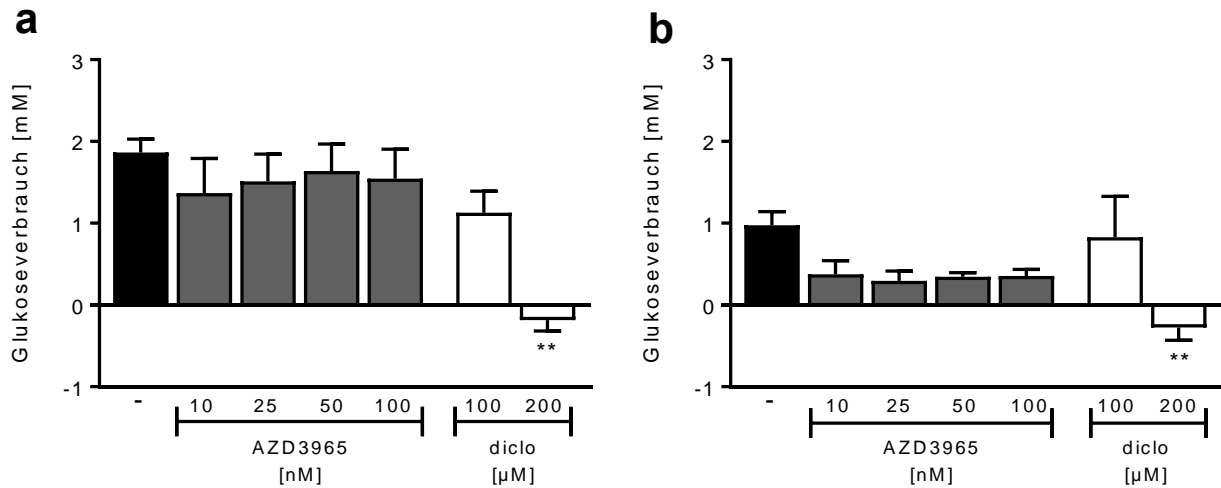
Eine Kombination aus AZD3965 und Diclofenac induzierte auch in diesem Versuchssetting eine, wenn auch minimale, weitere Reduktion des extrazellulären Laktatspiegels (**Abbildung 12c**). Jedoch kam auch hier die Laktatsekretion durch die Kombination beider Wirkstoffe nicht gänzlich zum Erliegen.



### Abbildung 12 Laktatproduktion der OC316 und IGROV-1 Zelllinien unter MCT Inhibition

Die OC316 und IGROV-1 wurden 72h mit AZD3965 (10nM, 25nM, 50nM, 100nM) und Diclofenac (50µM, 100µM, 200µM) inkubiert, zusätzlich wurde die Kombination aus Diclofenac und AZD3965 eingesetzt. Überstände zur Bestimmung der Laktatproduktion wurden nach 72h abgenommen, und die Laktatmenge enzymatisch bestimmt. Dargestellt ist die Laktatinhibition normalisiert auf die Kontrolle. **(a)** Vergleich der Ratio der Laktatproduktion der OC316 und IGROV-1 unter AZD3965, **(b)** Vergleich der Ratio der Laktatproduktion der OC316 und IGROV-1 unter Diclofenac, **(c)** Vergleich der Ratio der Laktatproduktion unter der Kombination 100nM AZD3965 und 200µM Diclofenac. ( $n = 3$  mean and SD, Kruskal – Wallis Test, Dunn's multiple comparison test, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , und \*\*\*  $P < 0.001$ ).

Der AZD3965 induzierte eine Hemmung der Glukoseaufnahme bei der IGROV-1 Linie, welche jedoch auch aufgrund der geringen Anzahl an Experimenten nicht signifikant war (**Abbildung 13**). Die Glukoseaufnahme der OC316 Linie wurde durch den AZD3965 nicht reduziert. Diclofenac erniedrigte die Glukoseaufnahme der Ovarialkarzinomlinien (**Abbildung 13**). Vor allem war die Glukoseaufnahme bei der höheren Konzentration an Diclofenac (200µM) in beiden Zelllinien signifikant eingeschränkt.



**Abbildung 13 Glukoseumsatz der OC316 und IGROV-1 Zellen unter MCT Inhibition**

Die OC316 (a) und IGROV-1 (b) wurden jeweils mit AZD3965 (10nM, 25nM, 50nM, 100nM) und Diclofenac (50µM, 100µM, 200µM) inkubiert. Überstände zur Bestimmung von Glukosekonzentration (a, c) wurden nach 72h abgenommen und enzymatisch bestimmt. (n = 3 für Diclofenac, n = 3 für AZD3965 mean und SD, Kruskal – Wallis Test, Dunn’s multiple comparison test, \*\* P < 0.01).

Weiterhin war in Anwesenheit des AZD3965 keine signifikante Proliferationshemmung in den Ovarialkarzinomlinien zu beobachten, ein leicht negativer Trend konnte jedoch bei der IGROV-1 Linie unter der Behandlung mit dem MCT1/2 Inhibitor detektiert werden (Tabelle 4).

Eine reduzierte Proliferation ist also nicht der Grund für die erniedrigten Laktatspiegel im Überstand.

**Tabelle 4 Proliferation OC316 und IGROV-1 unter AZD3965 und Diclofenac**

	Kontrolle	100µM Diclofenac	200µM Diclofenac	100nM AZD3965	Kombination AZD3965(100nM) Diclofenac(200µM)
OC316 [Mio/Well]	0.59 ± 0.1	0.62 ± 0.11	0.35 ± 0.04	0.63 ± 0.13	0.35 ± 0.05
IGROV-1 [Mio/Well]	0.42 ± 0.05	0.34 ± 0.01	0.14 ± 0.05**	0.34 ± 0.04	0.13 ± 0.03*

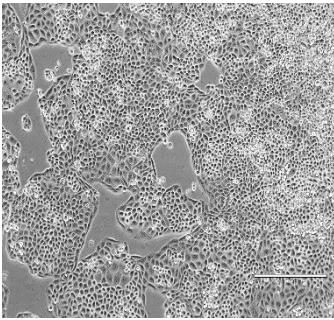
Die Zellen wurden für 72h mit AZD3965 (100nM) und Diclofenac (100µM, 200µM) behandelt. Nach 72h wurden die Zellen geerntet und die Zellzahl mittels CASY System bestimmt, (Anfangspopulationen: OC316, IGROV-1: 0.05x10<sup>6</sup>/Well, dargestellt ist jeweils der Mittelwert nach 72h) (n = 3; mean und SD, Kruskal – Wallis Test, Dunn’s multiple comparison test, \* P < 0.05, \*\* P < 0.01).

Eine eindruckliche Proliferationsreduktion erzielte Diclofenac ebenfalls ab einer Konzentration von 200µM. Zudem lies sich feststellen, dass die IGROV-1 Linie mit einer signifikanten Proliferationsminderung bzw. einem Proliferationsarrest besonders empfindlich auf eine Konzentration von 200µM Diclofenac reagierte (Tabelle 4). Durch eine Kombination aus AZD3965 und Diclofenac konnte die Proliferation nicht weiter eingeschränkt werden.

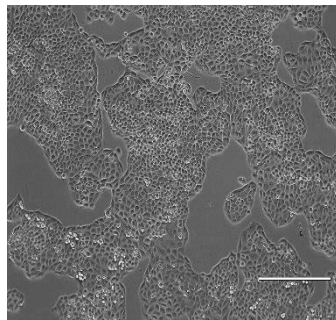
In den leukämischen Zelllinien C7H2 und U937 induzierte Diclofenac Apoptose, bestimmt mittels einer Annexin-V/ 7- AAD Färbung. Die Viabilität der OC316 und IGROV-Zellen jedoch ließ sich mit dieser Methode nicht klar beurteilen. Obwohl die Zellen optisch eindeutig nicht mehr als viabel gewertet werden konnten (**Abbildung 14 d, h, l, p**) waren die Zellen negativ für die klassischen Apoptosemarker (Daten nicht gezeigt). Es kann der Schluss gezogen werden, dass die OC316 und IGROV-1 nicht dem üblichen Apoptosemodell folgten.

## OC316

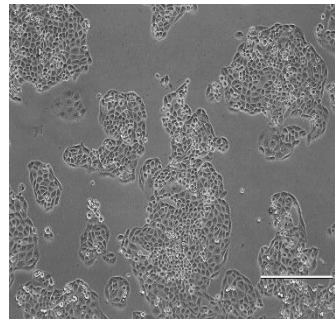
**a** Kontrolle



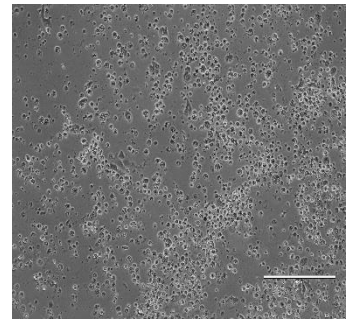
**b** 100nM AZD3965



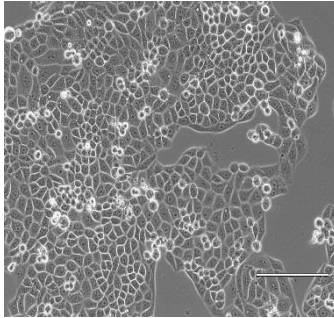
**c** 100µM Diclofenac



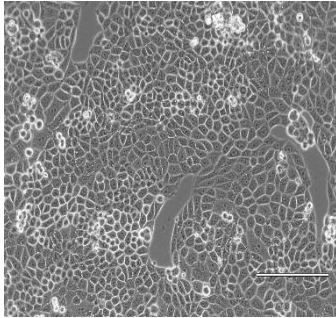
**d** 200µM Diclofenac



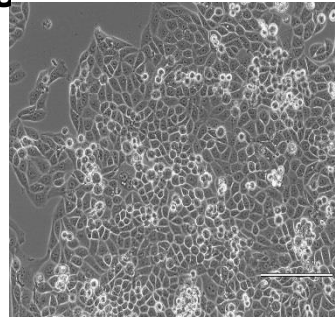
**e**



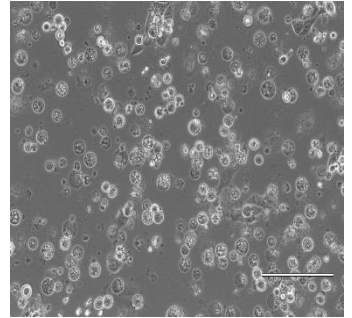
**f**



**g**

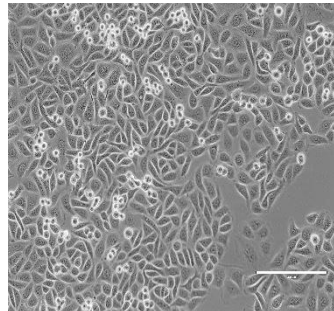


**h**

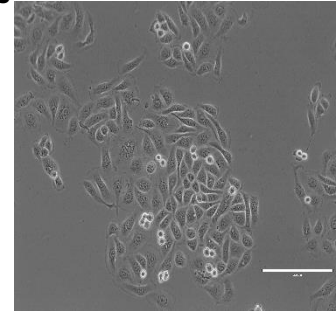


## IGROV-1

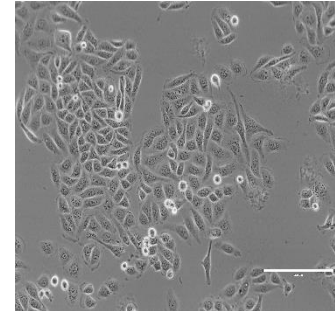
**i** Kontrolle



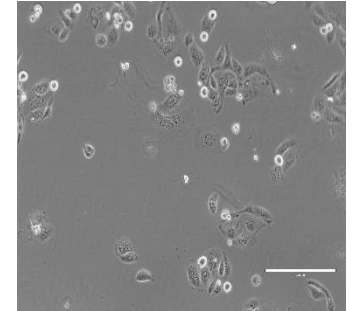
**j** 100nm AZD3965



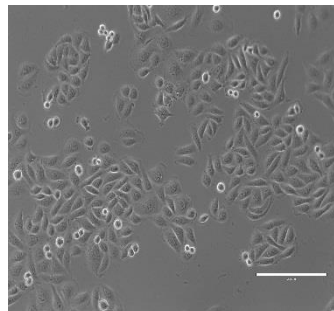
**k** 100µM Diclofenac



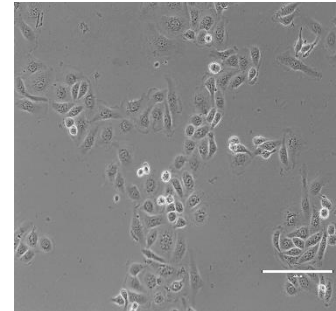
**l** 200 µM Diclofenac



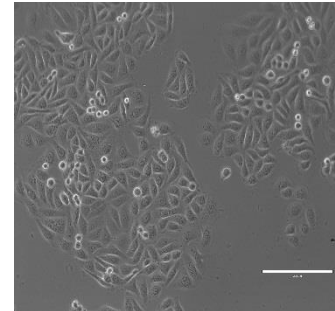
**m**



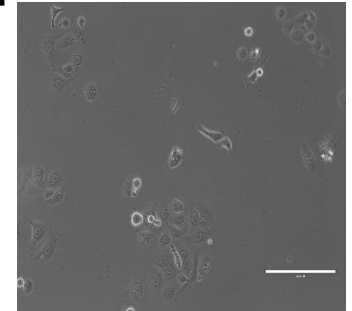
**n**



**o**



**p**



### Abbildung 14 Mikroskopaufnahmen der OC316 und IGROV-1 Zellen

Mikroskop Aufnahmen der **(a-h)** OC316 und **(i-p)** IGROV-1 im Maßstab 1:250

Die OC316 und IGROV-1 wurden jeweils mit Diclofenac (100µM, 200µM), sowie dem AZD3965 (100nM) inkubiert. Nach 72h wurden vor der endgültigen Aufarbeitung Aufnahmen zur Bestimmung der Viabilität **(a-h)** der OC316 und der **(i-p)** IGROV-1 gemacht.

**(a, e)** Kontrollgruppe OC316 nach 72h; **(b, f)** OC316 nach 72h unter 100nm AZD3965; **(c, g)** OC316 nach 72h unter 100µM Diclofenac; **(d, h)** OC316 nach 72h unter 200µM Diclofenac.

**(i, m)** Kontrollgruppe IGROV-1 nach 72h; **(j, n)** IGROV-1 nach 72h unter 100nm AZD3965; **(k, o)** IGROV-1 nach 72h unter 100µM Diclofenac; **(l, p)** IGROV-1 nach 72h unter 200µM Diclofenac.

Aus den Bildern in **Abbildung 14** lässt sich außerdem schlussfolgern, dass weder die OC316 noch die IGROV-1 Zellen in ihrer Intaktheit bzw. Viabilität durch den MCT1/2 Inhibitor AZD3965 beeinträchtigt wurden.

Darüber hinaus lässt sich aus den Bildern ableiten, dass Diclofenac eine gänzliche Ablösung der OC316 Zellen bewirkte, was normalerweise nur bei toten Zellen auftritt. Die OC316 waren durch die Konzentration von 200µM besonders stark angegriffen, während die IGROV-1 Linie zwar beeinträchtigt schien, jedoch nicht im gleichen Ausmaße wie die OC316. Als Grund für die Schwierigkeiten in der Apoptosefärbung wäre eine starke Schädigung der Zellmembran denkbar, die infolgedessen den Farbstoff nicht mehr ordnungsgemäß bindet.

### **5.1.3 Zusammenfassung**

Aus den Versuchen mit den adhären Zelllinien B16.SIY, OC316 und IGROV-1 und den beiden Suspensionszelllinien U937 und C7H2 lässt sich folgende Bilanz ziehen:

Der MCT1/2 Inhibitor AZD3965 reduzierte die Laktatproduktion und in Teilen die Aufnahme der Glukose in den IGROV-1 und B16 2L/c Zellen, welche die geringste MCT4 Expression aufwiesen. Die weiteren getesteten Zelllinien kompensierten die Blockade von MCT1/2 durch Nutzung des verbliebenen MCT4. Die Zelllinien OC316 und B16 NKag1 besitzen eine stärkeren MCT4 Expression. Daher wurde der Glukosestoffwechsel dieser Zelllinien nicht eingeschränkt. Eine Tendenz zur Proliferationshemmung war ebenfalls nur in den IGROV-1 und B16 2L/c Zellen zu erkennen.

Im Gegensatz dazu gelang es mit Diclofenac die Laktatproduktion und Glukoseaufnahme in allen Zelllinien signifikant zu mindern, sowie die Proliferation einzuschränken. Ein Effekt auf die Viabilität war nur in den C7H2 und U937 eindeutig nachzuweisen. Die optische Beurteilung der OC316 und IGROV-1 allerdings spricht auch in diesen Zellen für eine deutliche Reduktion der Viabilität durch die Zugabe von Diclofenac.

## 5.2 Effekte einer MCT- Hemmung auf primär humane T- Zellen

Wie eingangs erwähnt, sind aktivierte T -Zellen, wie auch Tumorzellen, glykolytisch hoch aktiv; dies bedeutet unter anderem, dass T -Zellen ebenso auf die effiziente Sekretion von Laktat durch MCTs angewiesen sind. Eine MCT1 Expression wurde bereits nachgewiesen [142], eine MCT4 Expression diskutiert [70]. Eine Blockade ihres Glukoseumsatzes könnte für T - Zellen eine immense Beeinträchtigung mit möglicherweise negativen Folgen für ihre Effektorfunktionen nach sich ziehen. Daher wurde in dieser Arbeit neben den Auswirkungen einer MCT Inhibition auf Tumorzelllinien, auch die Effekte von Diclofenac und AZD3965 auf humane T - Zellen untersucht.

### 5.2.1 MCT1/2 Inhibitoren AZD396 und SR13800 sowie Diclofenac im Vergleich

In Voruntersuchungen konnte in der Arbeitsgruppe bereits gezeigt werden, dass Diclofenac zwar die Proliferation von T Zellen reduziert, Zytokinproduktion und Expression von wichtigen Oberflächenmolekülen jedoch nicht beeinträchtigt.

Da jedoch eine supprimierte Proliferation unter einer MCT1/2 Inhibition bereits gezeigt wurde, wurden die Effekte der MCT1/ Inhibitoren AZD3965 und SR13800 (von J. Cleveland entwickelt und zur Verfügung gestellt) auf primäre CD4 und CD8 T-Zellen mit denen von Diclofenac verglichen und mögliche Beeinträchtigung der T Zellfunktion detailliert analysiert. Der AZD3965 wurde wie in den Tumorzelllinien in den Konzentrationen 10nm, 50nM und 100nM titriert. Der SR13800 wurde nur in der höchsten Konzentration (100nM) eingesetzt.

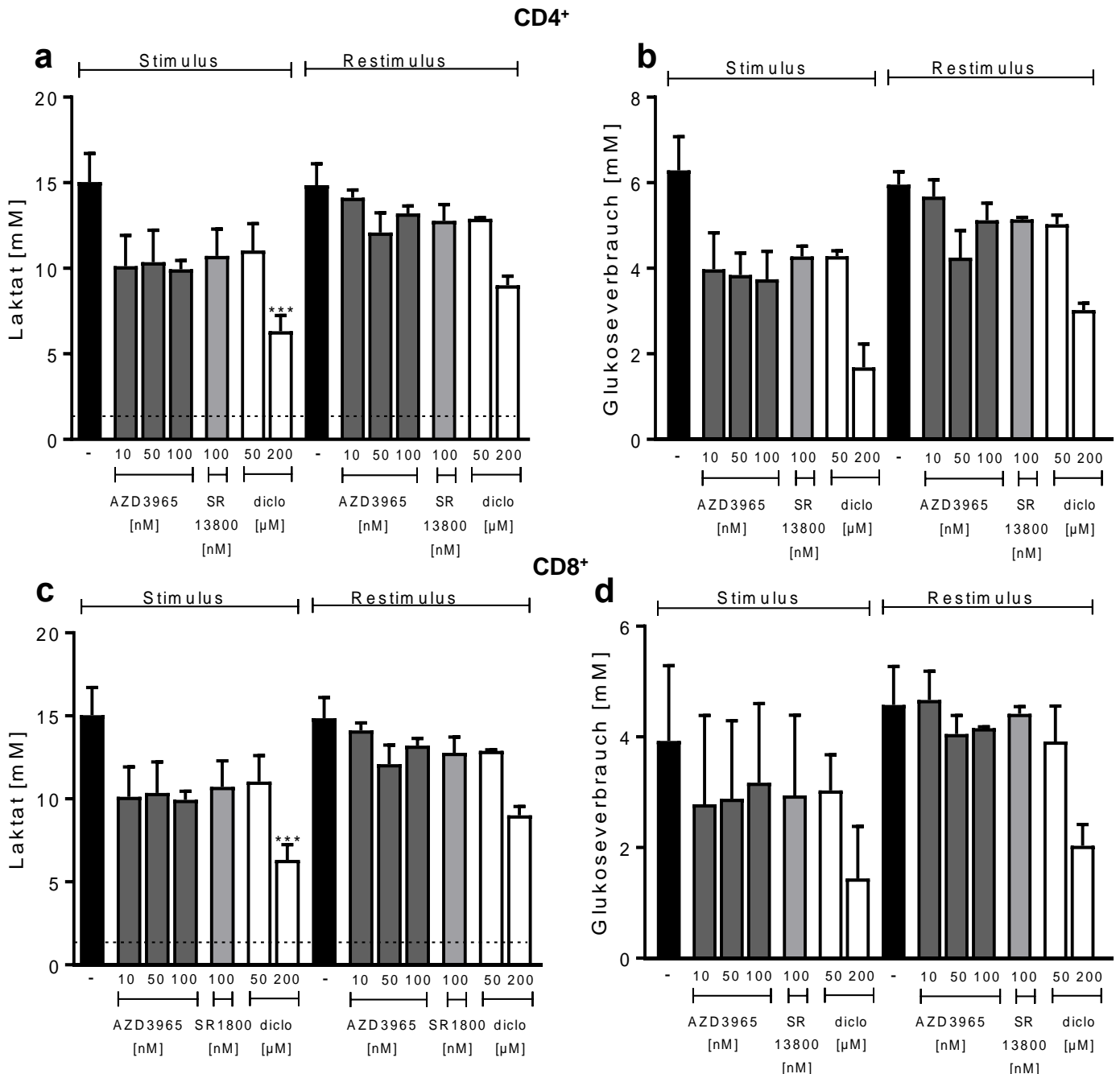
#### 5.2.1.1 Metabolismus, Aktivierung, Proliferation, Viabilität

Humane CD4 und CD8 T Zellen wurden aus dem Blut von gesunden Spendern isoliert und mittels anti-CD3/CD28 Microbeads im Verhältnis 1:1 (erster Stimulus) aktiviert. Nach 6 Tagen wurden die Beads entfernt, die T Zellen in neuem Medium unter Zugabe von neuen Beads erneut stimuliert (Restimulus). Dabei wurde der Glukosestoffwechsel, die Proliferation und Viabilität der T Zellen sowohl im Stimulus als auch im Restimulus im Zeitverlauf analysiert.

In **Abbildung 15** sind die Effekte der beiden MCT1/2 Inhibitoren auf den Stoffwechsel von primären humanen T Zellen jenen von Diclofenac gegenübergestellt. Hierbei wird zwischen

erstem Stimulus und Restimulus unterschieden. Dargestellt sind im Folgenden die Ergebnisse der CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen.

Beide MCT1/2 Inhibitoren entfalteten ihre Wirkung auf den Metabolismus vor allem in der ersten Stimulationsphase. Die volle Wirkung war bereits ab einer Konzentration von 10 nM erreicht, auch eine 10-fach höhere Konzentration hatte keine zusätzlichen Effekte mehr.



**Abbildung 15 Laktatproduktion und Glukoseaufnahme von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen**

Die T-Zellen wurden mit anti-CD3/CD28 Antikörpern in einem „cell to bead“ Verhältnis von 1:1 für 6 Tage kultiviert. Im 1. und 2. Stimulationszyklus wurden die T-Zellen mit AZD3965(10nM, 50nM,100nM) und SR13800 (100nM), sowie Diclofenac (50µM, 200µM) behandelt. Glukoseverbrauch und Laktat wurden nach 72h in den Kulturüberständen enzymatisch bestimmt.

**(a)** Laktatproduktion und **(b)** die Glukoseaufnahme der CD4<sup>+</sup> T-Zellen.

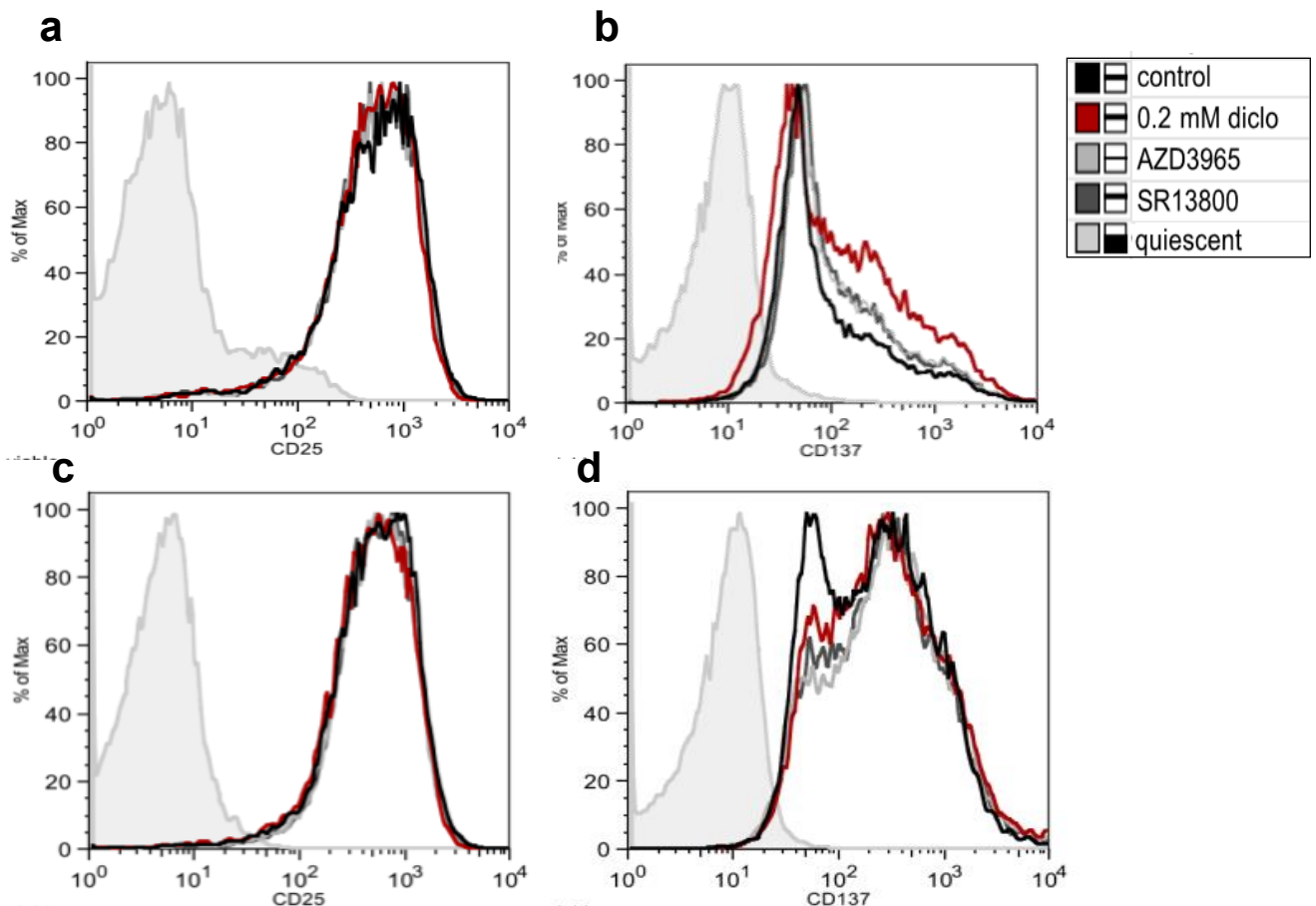
**(c)** Laktatproduktion und **(d)** Glukoseaufnahme der CD8<sup>+</sup> T-Zellen.

(*n* = 3, *n* = 4 für Diclofenac, mean und SD, Kruskal – Wallis Test, Dunn’s multiple comparison test\*\* *P* < 0.01, und \*\*\* *P* < 0.001).

Während die Laktatproduktion und die Glukoseaufnahme in der ersten Stimulationsphase von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen noch durch beide MCT1/2 Inhibitoren gesenkt werden konnten, war eine hemmende Wirkung der MCT1/2 Inhibitoren im Restimulus nicht mehr detektierbar (**Abbildung 15**). Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass aktivierte T-Zellen im Verlauf der Stimulation noch andere Isoformen der MCTs exprimieren, durch die eine MCT1 und 2 Inhibition nicht mehr blockierend wirkt.

Diclofenac bewirkte sowohl in der ersten Stimulationsphase, als auch im Restimulus eine signifikante Abnahme der Laktatproduktion und Glukoseaufnahme; am deutlichsten konnte diese Abnahme bei einer Konzentration von 200µM Diclofenac beobachtet werden (**Abbildung 15**)

Allerdings blieb die durch Aktivierung erhöhte Expression der Oberflächenmarker CD25, CD95 und CD137 sowohl in Anwesenheit der MCT1/2 Inhibitoren AZD3965 und SR13800 als auch unter Diclofenac unbeeinflusst (**Abbildung 16**). Die Daten für CD95 sind nicht gezeigt.



**Abbildung 16** Expression der Oberflächenmarker CD25 und CD137 unter MCT Inhibition auf CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Zellen

CD4 T Zellen wurden mit anti-CD3/CD28 Antikörpern in einem „cell to bead“ Verhältnis von 1:1 mit 200µM Diclofenac, sowie 100nM AZD3965 oder 100nM des SR13800 für 6 Tage kultiviert. Die Expression der Oberflächenmarker wurde 48h nach Aktivierung mittels Durchflusszytometrie bestimmt, als Kontrolle für unspezifische Bindung wurde die CD25 und CD137 Expression auf unstimulierten T-Zellen bestimmt. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment.

(a) CD 25 und (b) CD 137 Expression der CD4<sup>+</sup> T- Zellen,  
(c) CD 25 und (d) CD 137 Expression der CD8<sup>+</sup> T- Zellen.

Ebenfalls unbeeinträchtigt durch Diclofenac und die MCT1/2 Inhibitoren blieb die initiale Wachstumsphase der T-Zellen unter Stimulation, gemessen am medianen Durchmesser der T-Zellen. (Tabelle 5).

**Tabelle 5 Medianer Durchmesser und Proliferation der CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T - Zellen unter AZD3965, SR13800 und Diclofenac Behandlung**

	Kontrolle	AZD396 100nM	SR13800 100nM	Diclofenac 200µM
Durchmesser CD4 <sup>+</sup> [µm]	11.08 ± 0.57	11.51 ± 0.23	11.50 ± 0.09	11.45 ± 0.24
Durchmesser CD8 <sup>+</sup> [µm]	11.02 ± 0.66	11.46 ± 0.03	11.31 ± 0.08	11.47 ± 0.50
CD8 <sup>+</sup> Zellzahl [Mio/ml]	1.33 ± 0.30	1.05 ± 0.19	1.10 ± 0.38	0.82 ± 0.16*
CD8 <sup>+</sup> Zellzahl [Mio/ml]	1.02 ± 0.03	0.87 ± 0.05	0.83 ± 0.05	0.71 ± 0.17

Die T-Zellen wurden mit anti-CD3/CD28 Antikörpern in einem „cell to bead“ Verhältnis von 1:1 für 6 Tage mit 200µM Diclofenac, sowie 100nM AZD3965 und 100nM des SR13800 kultiviert. Dabei wurde nach 72h die Zellzahl und der mediane Durchmesser der T - Zellen mittels CASY System ermittelt (Ausgangspopulation 0.44x10<sup>6</sup>/ml, Mittelwert Durchmesser anfangs 7.57µm, dargestellt ist jeweils der Mittelwert nach 72h) (n = 3; mean und SD, Kruskal – Wallis Test, Dunn’s multiple comparison test \* P < 0.05).

Die Inhibition des Glukosestoffwechsels führte jedoch zu einer Reduktion in der Proliferation. Sowohl durch den AZD3956 als auch den SR13800 gelang es die Proliferation der CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen im ersten Stimulus tendenziell um 30% zu reduzieren. Auch hier konnte eine Erhöhung der Konzentration keine zusätzliche Reduktion bewirken (Tabelle 5). Dieser, wenn auch geringe, Effekt war im Restimulus nicht mehr nachweisbar (Daten nicht gezeigt).

200µM Diclofenac reduzierte – wie schon in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe gezeigt – die Proliferation um ca. 40% (Tabelle 5); dieser Effekt war im Restimulus weiterhin, jedoch in abgemilderter Form erkennbar (Daten nicht gezeigt). Bei der niedrigeren Konzentration von 100µM hingegen war ein hemmender Effekt auf die Proliferation lediglich im ersten Stimulus zu sehen.

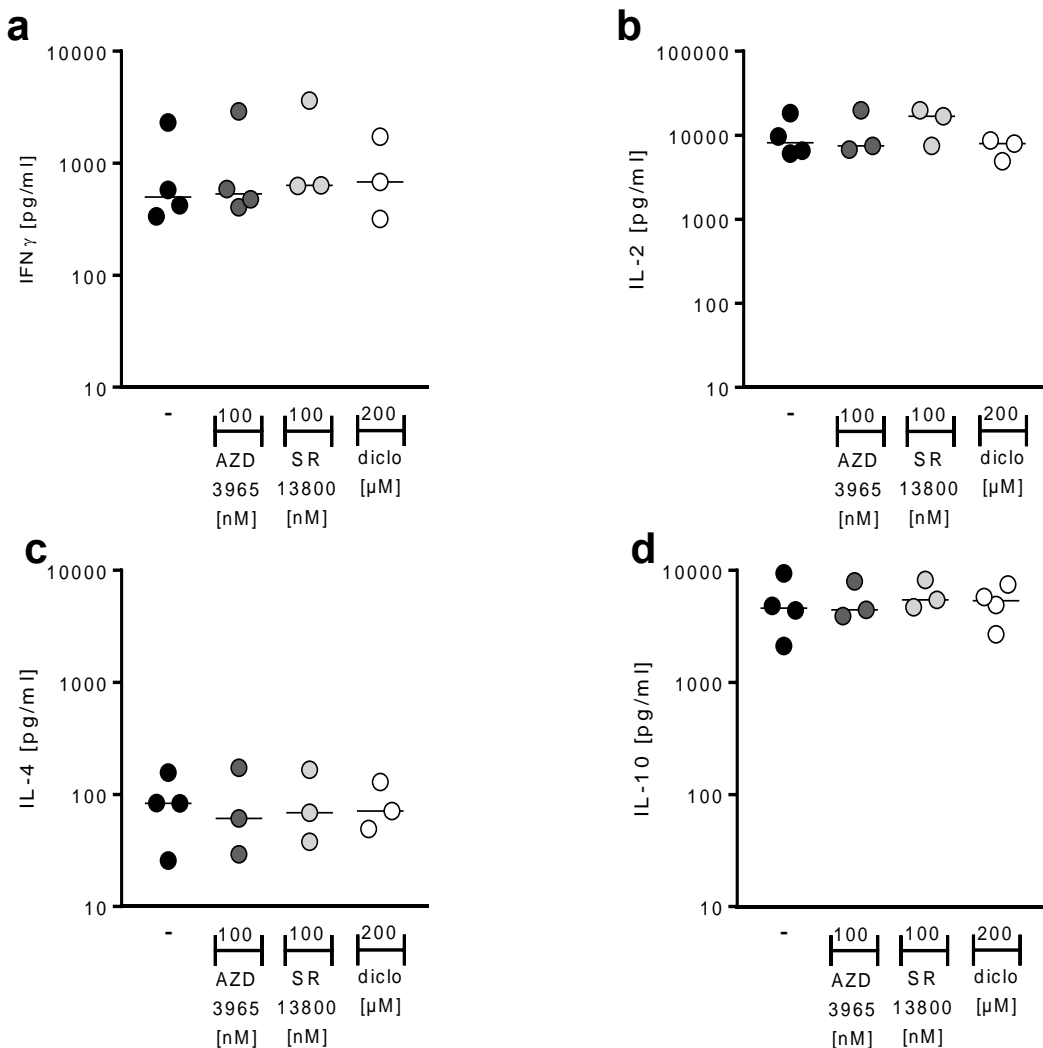
Weder eine Behandlung mit Diclofenac, noch mit den MCT1/2 Inhibitoren AZD3965 und SR13800 hatten einen Einfluss auf die Viabilität der CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen (Daten nicht gezeigt).

Inwieweit sich eine Reduktion des Glukoseumsatzes auf Effektorfunktionen der T-Zellen auswirkt, soll im nächsten Abschnitt erläutert werden.

### 5.2.1.2 Effektorfunktion

Im murinen System ist gezeigt, dass Effektorfunktionen von T Zellen vom Glukosestoffwechsel abhängen und eine Reduktion der Glykolyse beispielsweise zu einer Inhibition der IFN $\gamma$  Produktion führt [108]. Die MCT1/2 Inhibitoren wurden ursprünglich als Immunsuppressiva entwickelt. Es konnte eine reduzierte Proliferation gezeigt werden; Auswirkungen auf die Effektorfunktionen wurden jedoch nicht im Detail untersucht.

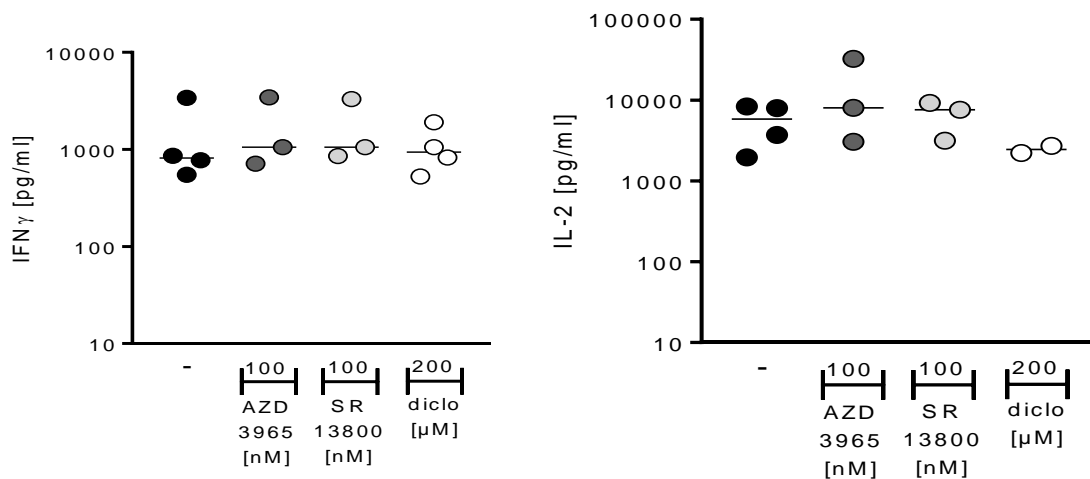
Trotz einer leichten Inhibition der Glykolyse unter den MCT1/2 Inhibitoren und einer deutlichen Reduktion unter Diclofenac im Erststimulus, konnte in keiner der beiden T-Zellpopulationen eine signifikante Beeinträchtigung der Effektorfunktionen beobachtet werden.



**Abbildung 17 Zytokinproduktion der CD4<sup>+</sup> T – Zellen**

Die T-Zellen wurden mit anti-CD3/CD28 Antikörpern in einem „cell to bead“ Verhältnis von 1:1 mit 200 $\mu$ M Diclofenac, sowie 100nM AZD3965 und 100nM des SR13800 inkubiert. In den Kulturüberständen erfolgte 48h nach Aktivierung eine Bestimmung der Zytokinproduktion mittels ELISA. (a) IFN $\gamma$  (b) IL – 2 (c) IL – 4 (d) IL– 10 Produktion von CD4<sup>+</sup> T – Zellen. (n = 3, mean und SD)

Aus der **Abbildung 17** wird ersichtlich, dass die Beeinträchtigung des Glukosestoffwechsels durch die MCT1/2 Inhibitoren AZD3965 und SR13800 sowie durch Diclofenac keine Effekte auf die Zytokinproduktion der CD4<sup>+</sup> T-Zellen (IL-2, IFN $\gamma$ , IL-4, IL-10) hatte; die Zytokinproduktion der CD8<sup>+</sup> T-Zellen (IL-2, IFN $\gamma$ ) zeigte sich ebenfalls unbeeinflusst (**Abbildung 18**), der Einsatz von Diclofenac zeigte lediglich eine marginale Reduktion der IL-2 Produktion .



**Abbildung 18 Zytokinproduktion der CD8<sup>+</sup> T- Zellen unter MCT Inhibition**

T-Zellen wurden mit anti-CD3/CD28 Antikörpern in einem „cell to bead“ Verhältnis von 1:1 mit 50 $\mu$ M und 200 $\mu$ M Diclofenac, sowie 100nM AZD3965 und 100nM des SR13800 stimuliert. 48h nach Aktivierung erfolgte in den Kulturüberständen die Bestimmung von IFN $\gamma$  und IL-2 mittels ELISA. **(a)** IFN $\gamma$  Produktion der CD8<sup>+</sup> T – Zellen; **(b)** IL– 2 Produktion der CD8<sup>+</sup> T – Zellen ( $n = 3$ ,  $n = 4$  für Diclofenac, mean und SD)

## 5.2.2 Zusammenfassung

Eine immunsuppressive Wirksamkeit der MCT1/2 Inhibitoren AZD3965 und SR13800 war in den hier durchgeführten Analysen mit humanen T Zellen nur bedingt nachweisbar. Zwar konnte im ersten Stimulus ein Rückgang der Glukoseaufnahme und Laktatproduktion, sowie der Proliferation beobachtet werden, allerdings war dieser Effekt im Restimulus nicht mehr feststellbar. Die Effektorfunktionen waren durch die Inhibitoren nicht beeinträchtigt. Demnach ließ sich eine immunsuppressive Wirkung der MCT1/2 Inhibitoren nur bedingt bestätigen.

Die mit Diclofenac behandelten T-Zellen zeigten sich vor allem in ihrer glykolytischen Aktivität und Proliferation beeinträchtigt, wenn auch die Proliferation durch Diclofenac erst bei einer Konzentration von 200 $\mu$ M gehemmt wurde. Zwar war der negative Effekt auf die Proliferation im Restimulus leicht abgemildert, aber dennoch vorhanden. Negative Auswirkungen auf die Effektorfunktionen der T- Zellen konnten jedoch nicht beobachtet werden.

### 5.3 Effekte weiterer NSAR mit struktureller Ähnlichkeit zu Diclofenac

Der letzte Teil der Arbeit setzte sich mit der Frage auseinander, ob andere NSAR, deren Strukturen eine hohe Ähnlichkeit zu Diclofenac aufweisen (**Abbildung 19**), ebenfalls MCT1 und 4 inhibieren können.

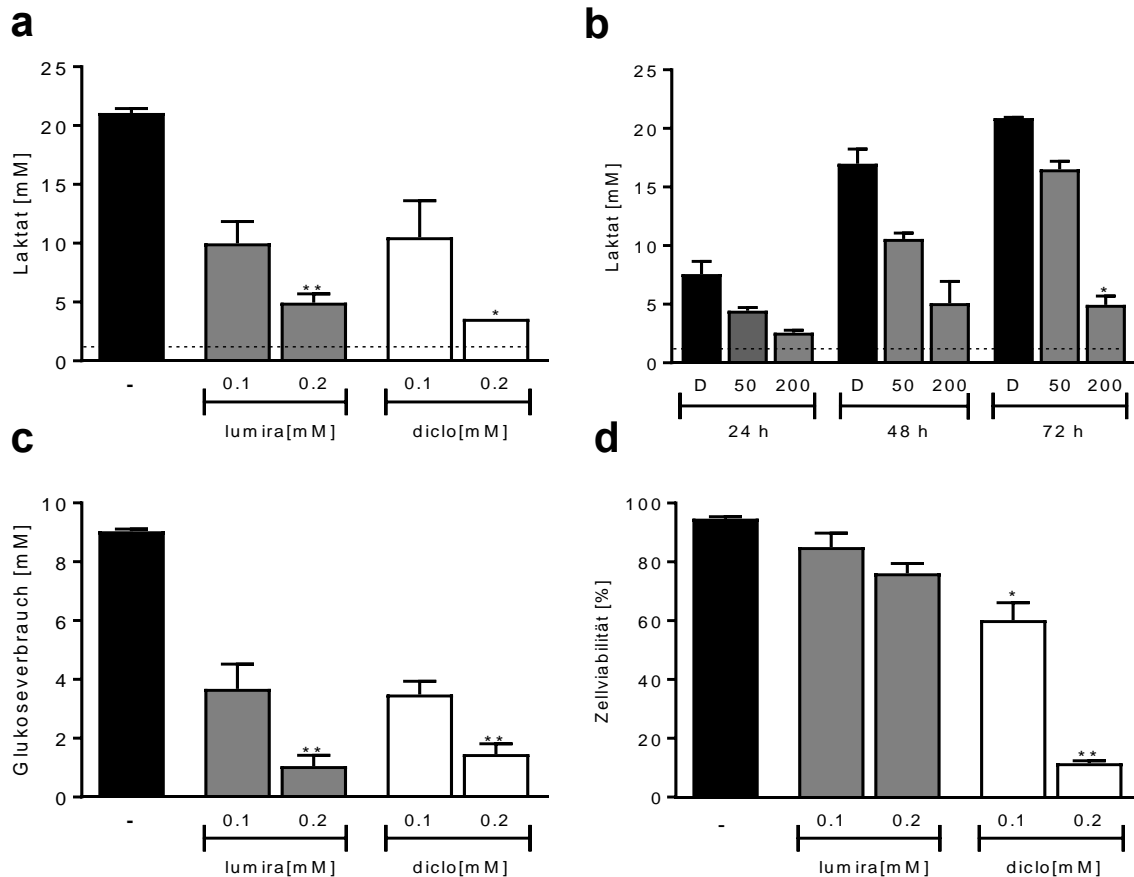
Weiterhin sollte geklärt werden, ob ein Teil der beobachteten Effekte der Glykolyse auf die Hemmung der Cyclooxygenase zurückzuführen ist.

Die ausgewählten Substanzen Lumiracoxib, Indometacin und Ketoprofen (**Abbildung 19**) wurden an den U937, C7H2, B16 Klonen, OC316 und IGROV-1 Zellen im gleichen Versuchsaufbau wie unter **5.1** getestet.

Da der Einsatz der ausgewählten NSAR in den verschiedenen Zelllinien vergleichbare Ergebnisse erzielte, sind hier exemplarisch die Resultate für die Suspensionszelllinie U937 und die adhärente Zelllinie OC316 dargestellt.

### 5.3.1 Lumiracoxib

In **Abbildung 20 a-d** sind die Ergebnisse für die Zelllinie U937 dargestellt. Lumiracoxib senkte die Laktatproduktion in nahezu gleichem Maße wie Diclofenac.



**Abbildung 19** Effekte von Lumiracoxib auf die U937 Zellen im Vergleich zu Diclofenac

(a-d) Die U937 Zellen wurden für 72h in Anwesenheit von Lumiracoxib (100µM, 200µM) kultiviert. Laktat und Glukose wurden jeweils enzymatisch bestimmt.

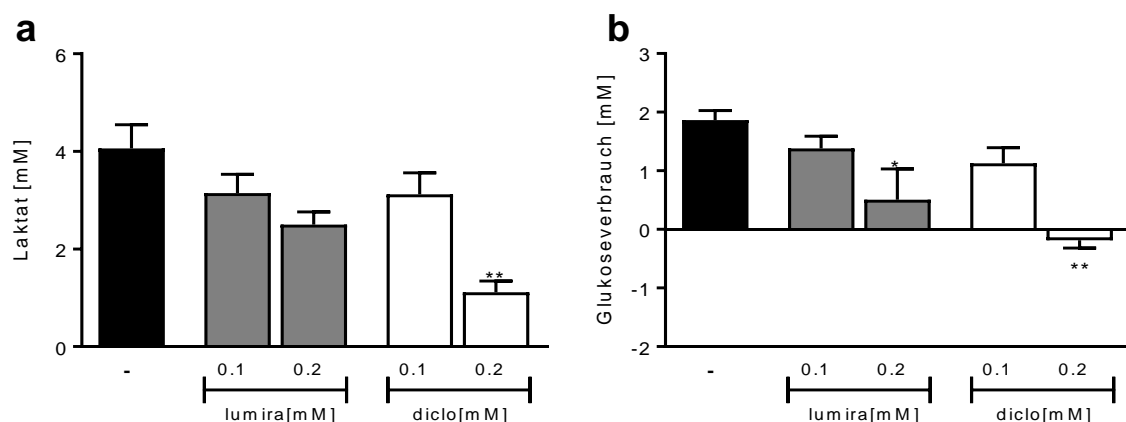
Vergleich der Effektivität von Lumiracoxib und Diclofenac bei den U937 Zellen hinsichtlich Hemmung der (a) Laktatproduktion nach 72h im Vergleich zu Diclofenac und (b) im Zeitverlauf, (c) des Glukoseverbrauchs und (d) Induktion der Apoptose, gemessen mittels Annexin-V/7- AAD Färbung. ( $n = 3$ , mean und SD, (Kruskal – Wallis Test, Dunn's multiple comparison test \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ )

Lumiracoxib reduzierte die Laktatproduktion konzentrationsabhängig, bei einer Konzentration von 200µM Lumiracoxib kam der Laktatflux der U937 beinahe vollständig zum Erliegen. Der Effekt auf die Laktatsekretion der U937 wird anhand der Kinetik noch deutlicher (**Abbildung 20b**). Der Laktatefflux kam unter 200µM Lumiracoxib bereits nach 24h fast vollständig zum Erliegen, was auch Auswirkungen auf die Proliferation nach sich zog. So wurde bei einer Konzentration von 200µM nach 72h ein nahezu vollständiger Proliferationsarrest beobachtet. Somit erwies sich Lumiracoxib ebenfalls als effizienter Hemmer der Laktatsekretion in unterschiedlichen Tumorzellen.

Die Glukoseaufnahme der U937 war bereits ab einer Konzentration von 100µM Lumiracoxib reduziert (**Abbildung 20c**). Eine signifikante Erniedrigung des Glukosestoffwechsels konnte bei der höheren Konzentration von 200µM beobachtet werden.

Die Viabilität der mit Lumiracoxib behandelten U937 Zellen war nur leicht reduziert (**Abbildung 20d**). Eine Induktion von Zelltod konnte unter Lumiracoxib im Gegensatz zu Diclofenac nicht beobachtet werden.

Die Laktatproduktion der OC316 war in Anwesenheit von Lumiracoxib reduziert, jedoch war die beobachtete Reduktion des Laktatspiegels im Vergleich zu den U937 deutlich geringer ausgeprägt (**Abbildung 21a**).



**Abbildung 20 Effekte von Lumiracoxib auf die OC316 Zellen im Vergleich zu Diclofenac**

Die OC316 wurden jeweils in 6-well-Platten ausgesät und mit Diclofenac und Lumiracoxib behandelt.

(a-b) Vergleich der Effektivität von Lumiracoxib und Diclofenac bei den OC316 hinsichtlich Hemmung der (a) Laktatproduktion und des (b) Glukoseverbrauchs. Diese wurden nach 72h in den Zellkulturüberständen enzymatisch gemessen. ( $n = 3$ , mean und SD, (Kruskal – Wallis Test, Dunn's multiple comparison test \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ )

Die Glukoseaufnahme hingegen wurde bei den OC316 in Anwesenheit von Lumiracoxib in vergleichbarem Ausmaß wie bei den U937 reduziert (**Abbildung 21b**). Eine signifikante Erniedrigung des Glukosestoffwechsels konnte ebenfalls bei der Konzentration von 200µM beobachtet werden.

Die Anwesenheit von Lumiracoxib führte im Verlauf zu einer Proliferationshemmung der U937 (**Tabelle 6**), die in ihrem Ausmaß mit Diclofenac vergleichbar war. Die Zellteilung der OC316 blieb unter Lumiracoxib allerdings weitgehend erhalten (**Tabelle 6**).

**Tabelle 6 Proliferation der U937 und OC316 unter Lumiracoxib und Diclofenac**

	Kontrolle	Lumiracoxib 100µM	Lumiracoxib 200µM	Diclofenac 100µM	Diclofenac 200µM
U937 ± SD [Mio/ml]	2.08 ± 0.21	1.11 ± 0.21	0.72 ± 0.07**	1.23 ± 0.04	0.6 ± 0.11**
OC316 ± SD [Mio/Well]	0.59 ± 0.17	0.56 ± 0.14	0.45 ± 0.1	0.62 ± 0.22	0.35

Die Zellen wurden für 72h mit 100µM und 200µM Lumiracoxib, sowie mit äquimolaren Mengen Diclofenac inkubiert. Nach 72h wurden die Zellen geerntet und die Zellzahl mittels CASY System bestimmt, (Anfangspopulationen: U937:  $0.3 \times 10^6$  Zellen/ml; OC316:  $0.05 \times 10^6$ /Well, dargestellt ist jeweils der Mittelwert nach 72h) ( $n = 3$ ; mean und SD, Kruskal – Wallis Test, Dunn's multiple comparison test \*\*  $P < 0.01$ ).

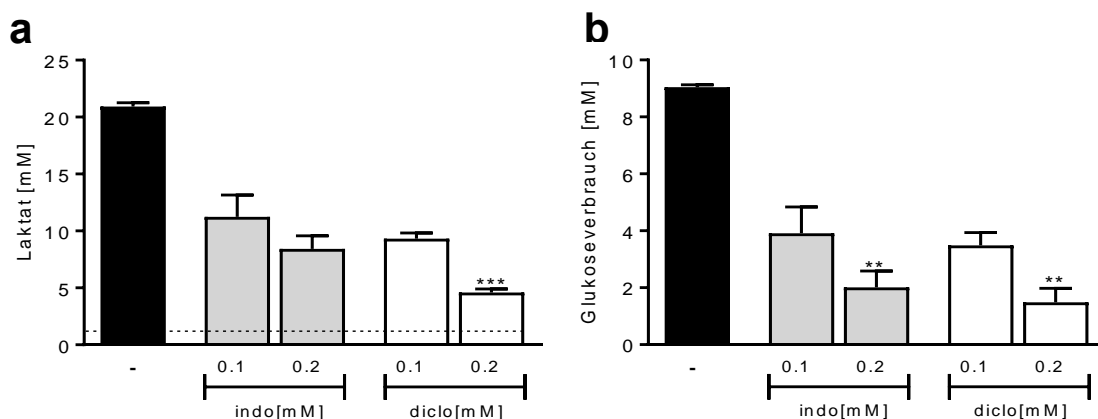
Lumiracoxib erwies sich demnach als effizienter Inhibitor der Glykolyse.

Auch in den anderen Zelllinien (U937, B16, IGROV-1) ließen sich die Ergebnisse reproduzieren (Daten nicht gezeigt).

### 5.3.2 Indometacin

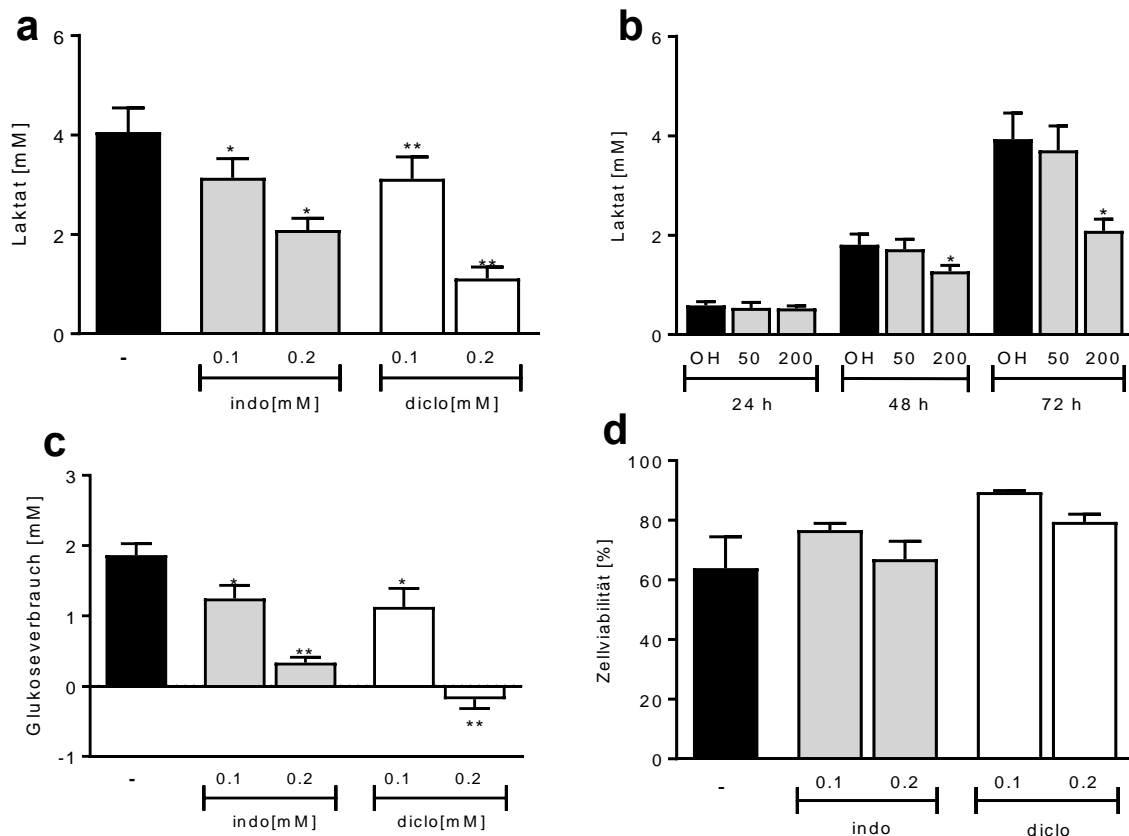
Anschließend wurden die Effekte von Indometacin auf die verschiedenen Tumorzellen untersucht.

Der Laktat Spiegel in den Kulturüberständen der U937 Zellen konnte nach 72h Behandlung mit Indometacin signifikant gesenkt werden (**Abbildung 22a**). Auch die Glukoseaufnahme der U937 Zellen war durch Indometacin in der niedrigeren Konzentration von 100µM, wie auch bei 200µM, eingeschränkt. (**Abbildung 22b**).



**Abbildung 21 Wirksamkeit von Indometacin auf U937 im Vergleich zu Diclofenac**

Die Kultivierung der U937 erfolgte unter äquimolaren Konzentrationen von Indometacin und Diclofenac (**a-b**) Vergleich der Effektivität von Indometacin und Diclofenac bei den U937 hinsichtlich Hemmung der (**a**) Laktatproduktion und des (**b**) Glukoseverbrauchs. Diese wurden nach 72h in den Zellkulturüberständen enzymatisch bestimmt. ( $n = 3$ , mean und SD, Kruskal – Wallis Test, Dunn's multiple comparison test \*\*  $P < 0.01$ , und \*\*\*  $P < 0.001$ ).



**Abbildung 22 Wirksamkeit von Indometacin auf die OC316 Zellen im Vergleich zu Diclofenac**

**(a-d)** Vergleich der Effektivität von Indometacin und Diclofenac bei den OC316 Zellen

Die OC316 Zellen wurden für 72h mit äquimolaren Mengen Indometacin und Diclofenac kultiviert. Überstände zur Bestimmung von Laktat- und Glukosekonzentration wurden jeweils nach 72h abgenommen und mittels enzymatischer Analyse, die Viabilität mittels Annexin-V/7- AAD Färbung gemessen.

Dargestellt sind die **(a-b)** Laktatproduktion nach **(a)** 72h und **(b)** im Zeitverlauf, der **(c)** Glukoseverbrauchs und die **(d)** Viabilität der Zellen. ( $n = 3$ , mean und SD, Kruskal – Wallis Test, Dunn’s multiple comparison test \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , und \*\*\*  $P < 0.001$ ).

In den OC316 verursachte Indometacin bereits ab der Konzentration von 100µM einen signifikanten Rückgang der Laktatproduktion (**Abbildung 23a, b**).

Betrachtet man die Laktatproduktion der OC316 im Zeitverlauf, ist erkennbar, dass die Laktatspiegel nach 24h unter Indometacin im Vergleich zu den Kontrollen unverändert sind (**Abbildung 23b**). Nach Ablauf von 48h vor allem aber nach 72h sind die Laktatspiegel der OC316 in Anwesenheit von 200µM Indometacin dann gegenüber den Kontrollen deutlich reduziert.

Die Glukoseaufnahme der OC316 Zellen war nach 72h durch die verwendeten Konzentrationen Indometacin (100µM, 200µM) ebenfalls stark eingeschränkt (**Abbildung 23c**).

Die Viabilität des OC316 Klon war durch die Behandlung mit Indometacin, ebenso wie durch eine Behandlung mit Diclofenac, nicht signifikant beeinträchtigt (**Abbildung 23d**).

Allerdings hatte Indometacin schon in der niedrigen Konzentration von 100µM in drei von vier Experimenten einen negativen Effekt auf die Proliferation der U937 und OC316 Zellen (**Tabelle 7**).

**Tabelle 7 Proliferation der OC316 Klone und der U937 unter Indometacin im Vergleich zu Diclofenac**

	Kontrolle	Indometacin 100µM	Indometacin 200µM	Diclofenac 100µM	Diclofenac 200µM
OC316 ± SD [Mio/Well]	0.5 ± 0.19	0.46 ± 0.15	0.40 ± 0.17	0.62 ± 0.22	0.35 ± 0.08
U937 ± SD [Mio/ml]	2.03 ± 0.27	1.08 ± 0.27	0.86 ± 0.11*	1.20 ± 0.06	0.6 ± 0.11**

Die Zellen wurden für 72h mit 100µM oder 200µM Indometacin behandelt und im Vergleich zu Diclofenac dargestellt. Nach 72h wurden die Zellen geerntet und die Zellzahl mittels CASY System bestimmt. (Anfangspopulationen: OC316 0.05x10<sup>6</sup> pro Well; U937: 0.3x10<sup>6</sup> Zellen/ml, dargestellt ist jeweils der Mittelwert nach 72h) Im Vergleich sind die Effekte unter Diclofenac dargestellt. (n = 3; mean und SD, Kruskal – Wallis Test, Dunn's multiple comparison test \* P < 0.05, \*\* P < 0.01).

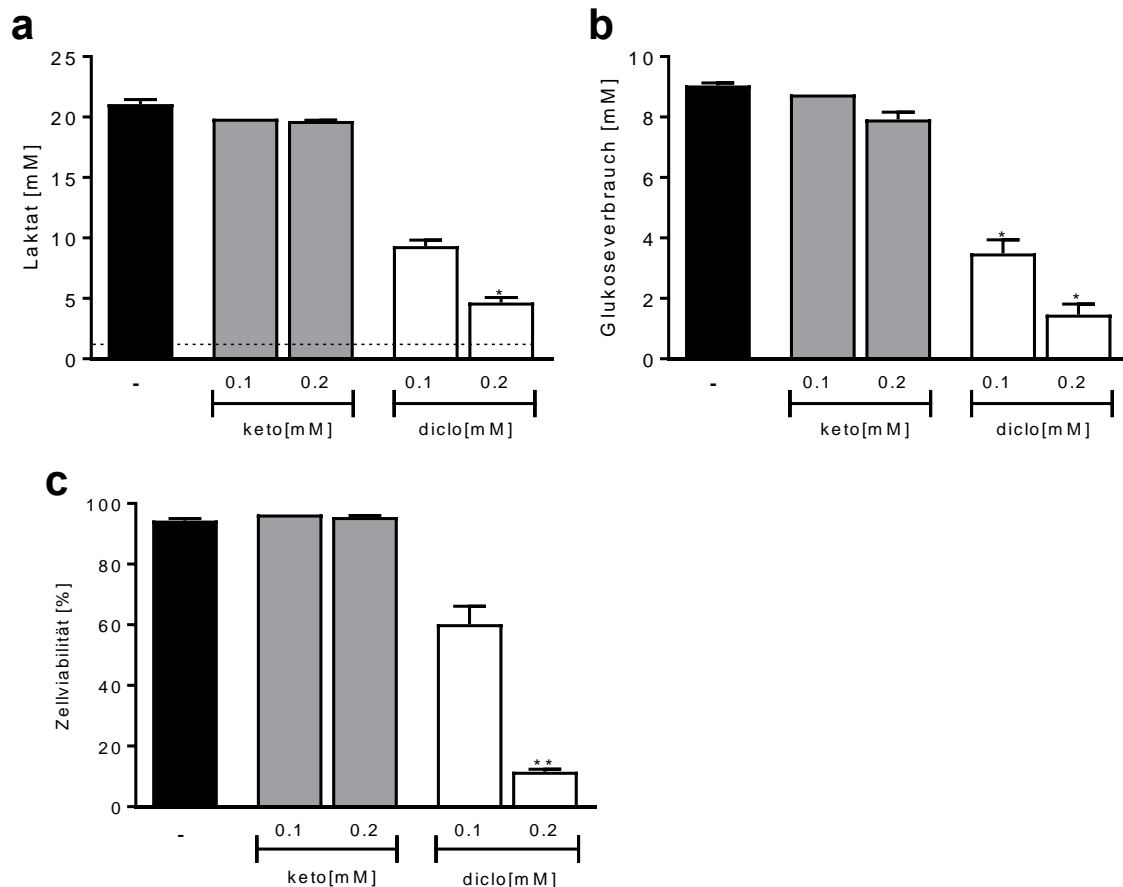
Die Reduktion der Zellteilung (**Tabelle 7**) ist die hauptsächliche Ursache für die Abnahme des extrazellulären Laktats, da nach 24h, in denen die Zellzahl noch relativ konstant ist, noch kein negativer Effekt auf die Laktatproduktion, im Gegensatz zu Diclofenac und Lumiracoxib, zu beobachten war. (**Abbildung 23b**). Im Verlauf korrelierte die Abnahme der Zellzahl stets mit den reduzierten Laktatspiegeln. Auch die eindrückliche Reduktion der Glukoseaufnahme durch Indometacin ließe sich demnach durch die geringeren Zellzahlen erklären.

Bezeichnend für eine Behandlung mit Indometacin war die eindrückliche Proliferationshemmung bereits ab einer Konzentration von 100µM in den Suspensionszelllinien, sowie den B16 Klonen, bei der Diclofenac noch keine nennenswerten Effekte erzielen konnte. In den Ovarialzelllinien konnte ein Rückgang der Proliferation erst ab einer Konzentration von 200µM beobachtet werden. (Daten der C7H2, NKagI, 2L/c, IGROV-1 Linien nicht gezeigt).

Die gezeigten Ergebnisse erlauben die Schlussforderung, dass Indometacin ein relativ guter Inhibitor der Proliferation ist, und daher die Reduktion der extrazellulären Laktatspiegel eher auf reduzierte Zellzahlen, als auf eine Inhibition der MCT1 und 4 Transporter zurückzuführen ist.

### 5.3.3 Ketoprofen

Zuletzt wurden die Effekte von Ketoprofen, ein ebenfalls unspezifischer COX Inhibitor mit sehr ähnliche  $IC_{50}$  Werten für die Inhibition vor allem von COX1, auf verschiedene Tumorzellen untersucht. Auch hier wurde im gleichen Versuchssetting wie in **5.1** gearbeitet.



**Abbildung 23 Wirksamkeit von Ketoprofen auf U937 im Vergleich zu Diclofenac**

Die U937 Zellen wurden mit äquimolaren Mengen Ketoprofen (50 $\mu$ M, 100 $\mu$ M, 200 $\mu$ M) bei einer Ausgangspopulation von  $0,3 \times 10^3$ /ml kultiviert und die Ergebnisse im Vergleich zu Diclofenac dargestellt. **(a)** Hemmung der Laktatproduktion und **(b)** des Glukoseverbrauchs; diese wurden enzymatisch nach 72 Behandlung in den Zellkulturüberständen gemessen **(c)** Bestimmung der Zellviabilität mittels Annexin-V/7-ADD Färbung. ( $n = 3$ ; mean und SD, Kruskal – Wallis Test, Dunn's multiple comparison test \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ ).

Ketoprofen hatte, auch in hoher Konzentration, im Gegensatz zu Diclofenac weder Einfluss auf Laktatproduktion und Glukoseaufnahme, noch auf Proliferation sowie Viabilität der U937 **(Abbildung 24 und Tabelle 8)**.

**Tabelle 8 Proliferation der U937 unter Ketoprofen und Diclofenac**

	Kontrolle	Ketoprofen 200µM	Diclofenac 100µM	Diclofenac 200µM
U937±SD [Mio/ml]	2.05 ± 0.3	1.71 ± 0.11	1.2 ± 0.06	0.6 ± 0.11**

Die Zellen wurden für 72h mit 100µM und 200µM Ketoprofen inkubiert und im Vergleich mit Diclofenac dargestellt. Nach 72h wurden die Zellen geerntet und die Zellzahl mittels CASY System bestimmt, (Anfangspopulationen U93:  $0.3 \times 10^6$  Zellen/ml, dargestellt ist jeweils der Mittelwert nach 72h) ( $n = 3$ ; mean and SD, Kruskal – Wallis Test, Dunn's multiple comparison test \*\*  $P < 0.01$ ).

Die für U937 erzielten Ergebnisse waren in den anderen untersuchten Zelllinien (C7H2, B16) reproduzierbar.

Aufgrund dieser Resultate, besitzt Ketoprofen, obwohl es ein strukturverwandter Cyclooxygenase Inhibitor ist, in den physiologisch relevanten Konzentrationen nicht die Fähigkeit die MCTs zu inhibieren.

Damit zeigte sich, dass eine COX – Inhibition alleine kaum Effekte auf Tumorzellen hatte.

## 6. Diskussion

### 6.1 Tumormetabolismus als therapeutische Zielstruktur

Im Zuge der Entwicklung gezielter Tumortherapien gewinnt der Tumormetabolismus immer mehr an Bedeutung. Die Tatsache, dass sich Tumorzellen in ihrem Stoffwechsel von den übrigen Geweben unterscheiden, kann man sich gezielt in der Therapie zunutze machen und eben diese Veränderung angreifen. Der Fokus dieser Arbeit lag auf dem Glukosestoffwechsel von Tumoren als therapeutische Zielstruktur. Tumorzellen setzen große Mengen an Glukose in der aeroben Glykolyse zu Laktat um [2].

Das dabei anfallende Laktat wird über MCT Transporter aus der Zelle transportiert. Dieser Vorgang hat für die Zelle mehrere Vorteile [11]. Der stark erhöhte Glukosestoffwechsel dient zusätzlich der Energiegewinnung. Zudem sorgt ein hoher Glukoseumsatz für einen ständigen Nachschub an Ausgangssubstraten für anabole Vorgänge in der Zelle [1]. Somit stehen Zwischenprodukte des Zitratzyklus, die nun nicht zur Energiegewinnung durch oxidativen Phosphorylierung benötigt werden, für die Biosynthese neuer Moleküle zur Verfügung. Zum anderen kann durch die Glykolyse eine kontinuierliche Energieproduktion auch unter hypoxischen Bedingungen im Tumor gewährleistet werden.

Das entstandene Laktat, das die Zelle in großen Mengen in den extrazellulären Raum sezerniert, kann nun einerseits anderen Zellen im Tumorstroma als Energiequelle dienen [68] und übt gleichzeitig eine immunsuppressive Wirkung auf infiltrierende Effektorzellen der Immunabwehr aus [85]. Hierzu zählen unter anderem myeloide Zellen, Zellen des adaptiven Immunsystems, dendritische Zellen, sowie natürliche Killerzellen. Hohe extrazelluläre Laktatspiegel führten zur Inhibition der zelleigenen Laktatsekretion von T- Zellen und gleichzeitig zur intrazellulären Ansäuerung durch Aufnahme von exogenem Laktat. Diese Effekte haben eine Reduktion der lokalen gegen den Tumor gerichteten Immunantwort zur Folge [139, 142].

Dementsprechend wurde *in vitro* und *in vivo* gezeigt, dass die Proliferation und Aktivierung humaner T- Zellen durch Laktat deutlich eingeschränkt wird [139, 142, 143]. Zudem inhibiert Laktat, neben T- Zellen, auch die Aktivierung von Monozyten, sowie die Differenzierung dendritischer Zellen [144, 145].

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass tumorassoziiertes Laktat in der Lage ist, die Reaktion des Immunsystems entscheidend zu modellieren. Effektorfunktion und Proliferation

infiltrierender Immunzellen werden unterdrückt, die Entwicklung von pro-tumorigenen Makrophagen gefördert [147].

Die Inhibition des Laktatstoffwechsels stellt daher aus zwei Gründen eine vielversprechende Therapieoption dar, einerseits trifft es die Tumorzellen selbst, andererseits führt es zu einer Reduktion des immunsuppressiven Metaboliten Laktat und damit zu einer verbesserten gegen den Tumor gerichteten, Immunantwort.

Daher wurden bereits Inhibitoren für glykolytische Enzyme und für den Glukosestoffwechsel wichtige Transporter entwickelt. Die vielversprechendsten Inhibitoren werden derzeit in klinische Studien getestet. Als eine der aussichtsreichsten Zielstruktur gelten hierbei auch die MCTs [11, 66]

Auch in dieser Arbeit erwies sich eine glykolytische Inhibition über eine Blockade der MCTs als ein erfolgversprechender Ansatz in der Tumorthherapie.

In den vorgelegten Untersuchungen wurden verschiedene MCT Inhibitoren hinsichtlich ihrer Wirksamkeit auf den Glukosestoffwechsel, die Proliferation und Viabilität von Tumorzellen getestet. Einerseits kamen die NSARs Diclofenac und Lumiracoxib, die sowohl MCT1 als auch MCT4 direkt blockieren können, als auch der AZD3965 und SR13800, die ihre Wirkung über eine MCT1/2 Blockade entfalten, zum Einsatz. Dabei zeigte sich, dass leukämische Zelllinien sowie adhärenente Melanom- und Zervixkarzinomlinien mit MCT1 und MCT4 Expression durch den Einsatz der MCT1/2 Inhibitoren hinsichtlich der untersuchten Parameter nicht beeinträchtigt werden. Weder konnte die Laktatproduktion und Glukoseaufnahme signifikant gehemmt, noch Proliferation eingeschränkt und Zelltod ausgelöst werden. Betrachtet man nun jedoch vorwiegend MCT1 exprimierende Zelllinien, wie den weniger glykolytische B16 Klon 2L/c und die Zervixkarzinomlinie IGROV-1 erhält man ein unterschiedliches Ergebnis. In diesen Zelllinien konnte die Laktatsekretion und Glukoseaufnahme, vor allem im Vergleich mit dem hochglykolytischen B16 Klon NKagI und der Zervixkarzinomlinie OC316, die MCT1 und 4 auf der Oberfläche tragen, deutlich gesenkt werden. Auch konnte in der IGROV-1 Linie eine Tendenz zu einer reduzierten Proliferation beobachtet werden. Die MCT1/2 Inhibitoren vermochten jedoch auch in MCT1 abhängigen Zellen keinen Zelltod zu induzieren.

Die Effizienz einer MCT1/2 Blockade bei der Bekämpfung von Tumorzellen dürfte sich demnach hauptsächlich auf Tumoren beschränken, die überwiegend MCT1 exprimieren [75, 77]. In diesen Tumoren kann eine alleinige MCT1/2 Hemmung die Tumorzelle empfindlich treffen.

Aus den Versuchen mit Diclofenac lässt sich folgende Bilanz ziehen:

Mit Diclofenac gelang es, die Laktatproduktion in allen getesteten Zelllinien signifikant zu mindern und in höheren Konzentrationen auch die Proliferation zu reduzieren. Bei den leukämischen Linien wurde außerdem die Viabilität bei einer Konzentration von 0.2 mM gravierend gesenkt und Apoptose induziert. Es zeigte sich jedoch ein Unterschied zwischen leukämischen und damit Suspensionszellen und adhärenen Linien.

Die Glukoseaufnahme und Laktatexkretion in den Leukämiecellinien C7H2 und U937 kam beim Einsatz von 200µM Diclofenac fast vollständig zum Erliegen; in den adhärenen Zelllinien war die Inhibition des Glukoseumsatzes zwar ebenfalls signifikant reduziert, jedoch gelang es den adhärenen Zellen ihren Glukosestoffwechsel in Teilen aufrecht zu erhalten.

Eindrücklich waren die Unterschiede bei der Induktion von Zelltod; in den leukämischen Suspensionszellen führte eine Konzentration von 200µM (teilweise schon bei der Verwendung niedrigerer Konzentrationen) zum Proliferationsarrest und induzierte effektiv Zelltod. Hingegen reagierten die adhärenen Zelllinien etwas weniger sensitiv auf Diclofenac hinsichtlich Zelltod und Proliferationsinhibition.

Allerdings könnte ein Teil der beobachteten Unterschiede durch das abweichende Apoptoseverhalten der OC316 und IGROV-1 erklärt werden. Die Zellen zeigten nicht die klassischen Apoptosezeichen der Phosphatidylexpression an der Zelloberfläche, messbar durch die Bindung von Annexin-V, und sekundärer Nekrose (gemessen mittels 7-AAD Färbung). Auch die Zahl an primär nekrotischen Zellen war nicht erhöht. Morphologisch wiesen die Zellen jedoch deutliche Zeichen von Schädigung auf. Zusammenfassend zeigte sich, eine reduzierte Wirksamkeit von Diclofenac auf adhärenen Zelllinien.

Diclofenac hat in höheren Konzentrationen einen weiteren Wirkmechanismus, es inhibiert die mitochondriale Aktivität [83, 84]. Die Hemmung der mitochondrialen Atmung dürfte dazu beitragen, dass Diclofenac die Fähigkeit zur Apoptoseinduktion besitzt [84]. Die kombinierte Blockade von zwei wichtigen metabolischen Stoffwechselfvorgängen lässt der Tumorzelle wenig Kompensationsmöglichkeiten.

Aus den Ergebnissen lässt sich letztendlich schlussfolgern, dass eine vollständige Blockade der MCT1 und MCT4, die man mit Diclofenac erreicht, eine wesentlich effizientere Hemmung des zellulären Glukosestoffwechsels erzielt, als eine alleinige Blockade von MCT1 und MCT2. Aufgrund der Tatsache, dass die meisten Tumorentitäten MCT1/2 und MCT4 gleichzeitig exprimieren, wäre Diclofenac ein wesentlich effizienterer Inhibitor mit einem breiteren Wirkungsspektrum im klinischen Alltag, als ein alleiniger MCT 1/2 Inhibitor. Zusätzlich entwickelten Tumorzellen durch eine Hochregulation des vorhandenen MCT4 Transporters bei längeren Behandlungen mit dem AZD3965 Resistenzen gegenüber dem Inhibitor [74].

Zusammenfassend kann man festhalten, dass eine MCT Inhibition die Tumorzellen selbst trifft und zu einer effizienten Reduktion der Laktatsekretion sowie der Glukoseaufnahme führt. Damit könnten die MCTs tatsächlich eine vielversprechende Zielstruktur für die Tumorthherapie darstellen.

Weiterhin wurde in dieser Arbeit die Wirksamkeit von Lumiracoxib, Ketoprofen und Indometacin, welche eine Strukturverwandtschaft mit Diclofenac zeigen (**Abbildung 25**), untersucht. Es zeigte sich, dass Lumiracoxib, welches die höchste strukturelle Ähnlichkeit zu Diclofenac aufweist und auch MCT1 und MCT4 direkt inhibieren kann (**Abbildung 25**), starke inhibitorische Effekte auf den Glukosestoffwechsel hat.

Lumiracoxib bewirkte ähnlich wie Diclofenac eine gute Hemmung der Laktatsekretion und der Glukoseaufnahme. Der Laktatefflux kam unter 200 $\mu$ M Lumiracoxib bereits nach 24h fast vollständig zum Erliegen, was auch Auswirkungen auf die Proliferation nach sich zog. So wurde bei einer Konzentration von 200 $\mu$ M nach 72h ein nahezu vollständiger Proliferationsarrest beobachtet. Somit erwies sich Lumiracoxib ebenfalls als effizienter Hemmer der Laktatsekretion in unterschiedlichen Tumorzellen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen darauf schließen, dass es sich bei Lumiracoxib wahrscheinlich um einen guten MCT Inhibitor handeln dürfte. Wie auch das strukturverwandte Diclofenac konnte Lumiracoxib den Glukosestoffwechsel von Tumorzellen stark beeinträchtigen. Lumiracoxib war in der Lage Laktatflux und Proliferation zu reduzieren, aber Zelltod als mögliche Folge davon war in keinem Experiment zu beobachten. Diese fehlende Fähigkeit von Lumiracoxib zur Apoptoseinduktion scheint bemerkenswert. Offenbar lässt Lumiracoxib der Tumorzelle Möglichkeiten, die mit Diclofenac behandelten Tumorzellen fehlen, den Verlust des gängigen Glukosestoffwechsels zu kompensieren. Denkbar wäre hier ein mitochondrialer Block, den Diclofenac teilweise auslösen kann [83, 152], Lumiracoxib jedoch möglicherweise nicht. Dies sollte in weiterführenden Untersuchungen analysiert werden, ebenso mögliche Effekte von Lumiracoxib auf die Funktion von Immunzellen.

Durch die Untersuchungen in dieser Arbeit konnte neben der Bestätigung von Diclofenac als MCT Inhibitor auch die Hypothese Diclofenac könnte seine Wirkung über eine COX - Blockade entfalten, widerlegt werden. Ketoprofen, ein unspezifischer COX 1 - und 2 – Hemmer (**Abbildung 5**), war als MCT Inhibitor völlig ungeeignet. Beim Einsatz von Ketoprofen in einer Dosierung im Bereich des IC50, bei der Ketoprofen klinisch bereits eine ausreichende COX – Hemmung erzielt, zeigte sich kein Effekt auf die Laktatsekretion. Selbst hohe Konzentrationen von Ketoprofen hatten keine Wirksamkeit hinsichtlich einer Hemmung des Glukosestoffwechsels, der Zellteilung und -viabilität. Untersuchungen an MCT1 bzw. MCT4 exprimierenden Oocyten zeigten, dass Ketoprofen die Transporter nur in sehr hohen

Konzentrationen inhibieren kann, die *in vivo* nicht erreicht werden können (*Renner et al*, submitted)

Abschließend wurde Indometacin, welches die höchsten strukturellen Unterschiede zu Diclofenac (**Abbildung 5**) aufweist, untersucht. Wie eingangs erwähnt wurde Indometacin in klinischen Studien und Fallberichten effektiv gegen Tumoren eingesetzt. [98, 100–102]. Die Resultate dieser Arbeit bestätigten, dass Indometacin eine deutliche Hemmung der Proliferation induziert. Bereits ab einer Konzentration von 100µM, bei der Diclofenac noch keine nennenswerten Effekte erzielen konnte, gelang Indometacin eine eindruckliche Hemmung der Zellteilung. Allerdings war der Effekt auf den Glukosestoffwechsel im Vergleich zu Diclofenac aber auch zu Lumiracoxib deutlich geringer ausgeprägt.

Die nach 72h beobachtete Abnahme des Laktatspiegels lässt sich dabei wahrscheinlich jedoch weniger auf eine direkte MCT Hemmung zurückführen, als auf eine Reduktion der Zellteilung. Durch die geringeren Zellzahlen in den mit Indometacin behandelten Proben war folglich insgesamt weniger extrazelluläres Laktat vorhanden. Dennoch dürfte Indometacin auch eine geringfügige Inhibition der MCT auslösen, wenn auch nicht in dem Maße, in dem Diclofenac dies vermag.

Ein interessanter Aspekt bei einer Behandlung der Tumorzellen mit Indometacin war die Reduktion der Proliferation und Apoptoseinduktion. *In vivo* Studien mit murinen Kolonkarzinomen legten bereits in den 80er Jahren eine Hemmung des Größenwachstums durch eine Therapie mit Indometacin nahe [97]. Zudem belegte eine klinische Studie, dass Indometacin einen positiven Effekt auf das Langzeitüberleben von Patienten mit metastasierten Kolonkarzinomen hat [98]. Ein vollständiger Rückgang der Tumoren wurde durch die Therapie mit Indometacin jedoch nicht erzielt [97].

Indometacin führte in dieser Arbeit zwar ebenfalls nicht zu einem kompletten Absterben der Zellpopulation, führte jedoch analog zu den Ergebnissen der vorherigen Studien zu einem deutlichen Rückgang der Zellpopulation. Bei einer Konzentration von 200µM war zudem in der Aufarbeitung ein größerer Anteil an apoptotischen Zellen zu beobachten. Daher könnten sich weitere Untersuchungen zu Indometacin bezüglich des Mechanismus der Proliferationshemmung und Apoptoseinduktion lohnen.

## 6.2 Targeted therapy“ – Möglichkeiten und Grenzen einer MCT- Blockade

Eine MCT1 und 4 Blockade allein, wie sie in dieser Arbeit durch Diclofenac erzeugt wird, reicht möglicherweise nicht aus, Tumorzellen über einen längeren Zeitraum zu inhibieren. *Marchiq et al* [153] konnte mit einem MCT4 und Basigin Knockout in Kolonkarzinom- und Glioblastomzellen zeigen, dass die Glykolyse bei diesen Knockout Tumoren unter dem Einsatz eines MCT1/2 Inhibitors fast vollständig zum Erliegen kam. Jedoch war gleichzeitig eine erhöhte Aktivität in der oxidativen Phosphorylierung zu beobachten. Dieser Switch hin zur oxidativen Phosphorylierung, lieferte der Tumorzelle genügend Energie, um weiterhin, wenn auch eingeschränkt, zu proliferieren und vor allem auch dem Zelltod zu entgehen. Entsprechend konnten unsere AG in einer neuen Arbeit zeigen, dass trotz komplettem Verlust der Laktatproduktion nach Deletion von LDHA oder LDHB trotzdem Tumorwachstum möglich ist [154].

Auch wenn Diclofenac Effekte auf die mitochondriale Atmung zugeschrieben werden [83, 152], könnte Diclofenac alleine möglicherweise nicht ausreichen die beiden Stoffwechselwege, Glykolyse und OXPHOS, ausreichend zu blockieren.

Daher beschreibt ein vielversprechender, neuer Ansatz der Tumorbekämpfung den parallelen Einsatz eines glykolytischen Inhibitors mit einer Blockade der mitochondrialen Funktion.

In unterschiedlichen Studien hat sich gezeigt, dass eine alleinige Blockade der Glykolyse einen metabolischen Switch der Zelle hin zur mitochondrialen Atmung auslöst und dadurch an Wirksamkeit einbüßt [75, 155]. Aus diesem Grund ist man nun dazu übergegangen eine Kombination von Inhibitoren beider Stoffwechselwege einzusetzen. Metformin bzw. Pioglitazone, welche mitochondriale Signalwege beeinträchtigen, induzierten *in vitro* zusammen mit dem glykolytischen Hemmer 2-DG Zelltod und konnten die Proliferation eindämmen [155–157].

Im Xenograft Maus Modell verzögerte die Kombination der Substanzen das Tumorwachstum und die Metastasierung. Dabei wurde eine Reduktion der zellulären ATP Produktion um 70% beobachtet [155].

Eine MCT1 und MCT4 Blockade sensibilisierte Tumorzellen für den zusätzlichen Einsatz der mitochondrialen Inhibitoren Metformin bzw. Phenformin, deren Wirksamkeit in einer Mono - Therapie in Tumoren begrenzt war. Auf diese Weise trieb die Kombination der Inhibitoren die Zelle in den Zelltod [74, 158]. Die so erzeugte „metabolic catastrophe“ für Tumorzellen führte zu einem rapiden Abfall des intrazellulären ATP – Spiegel und löste in Anbetracht fehlender Kompensationsmechanismen Zelltod aus. Eine duale Blockade könnte somit eine

aussichtsreiche Möglichkeit in der Tumorthherapie sein, die nun weiter untersucht wird. Zu bedenken gilt allerdings hierbei, dass auch normale Körperzellen von einer solchen „metabolic catastrophe“ betroffen sein könnten. Dadurch muss bei der Anwendung mit möglichen Nebenwirkungen gerechnet werden.

Festzuhalten bleibt in jedem Falle, dass eine suffiziente Anti-Tumor Strategie nur dann erreicht werden kann, wenn MCT1 und MCT4 blockiert sind. Den dafür nötigen MCT4 Inhibitor AZD93 hat AstraZeneca bereits entwickelt, der seine Effizienz in Studien jedoch erst noch beweisen muss [159]. In vitro konnte der MCT4 Inhibitor Tumorwachstum inhibieren, aber nur in Kombination mit einer pharmakologischen oder genetischen MCT1/2 Blockade. Die Frage nach der Toxizität der Substanzen, die scheinbar nur in Kombination ihre volle Wirkung entfalten, bleibt abzuwarten. Um eine Therapie via MCT Inhibition weiterhin effizienter zu gestalten und langfristig einsetzbar zu machen, dürfte wahrscheinlich ein zusätzlicher Inhibitor der Mitochondrien wie Metformin von Nöten sein.

Zu beachten sind bei einer solchen kombinierten Therapie die möglichen Nebenwirkungen, die sich gegenseitig verstärken könnten. Dafür wird man in Zukunft zunächst Untersuchungen und schließlich klinische Studien benötigen, um Aussagen zur Toxizität treffen zu können.

Es wäre durchaus denkbar, dass sich eine sequentielle Therapie mit Diclofenac auf die bereits bekannten Nebenwirkungen beschränken könnte. Da allerdings bereits im Einsatz von Diclofenac in der Schmerztherapie Todesfälle durch gastrointestinale Blutungen bekannt sind [160], bleibt der Einsatz von Diclofenac mit Vorsicht zu behandeln, sollte jedoch in jedem Falle mit einem Magenschutz kombiniert werden.

Weiterhin gilt es, den Einsatz von Diclofenac bei kardiovaskulär vorerkrankten Personengruppen zu überdenken.

Für das weitverbreitete Metformin, welches in der Langzeittherapie meist gut vertragen wird, ist die Laktatazidose wohl die gefürchtetste Nebenwirkung.

Neben den bekannten Nebenwirkungen könnten anti-metabolisch wirksame Substanzen starke Effekte auf das Immunsystem haben.

Eine Vielzahl an neueren Studien, vor allem im murinen System, zeigen, dass nicht nur glykolytisch aktive Tumorzellen, sondern auch aktivierte T-Zellen eine Hochregulation der MCT1 und 4 Expression aufweisen [70, 106]. Durch eine MCT Blockade, kann so eine Immunsuppression erzielt werden [70]. Auch eine Inhibition der Glykolyse kann in bestimmten Fällen eine Immunsuppression auslösen [117].

Daher bedeutet eine erfolgreiche Therapie von Tumoren gleichzeitig ein möglichst schonendes Vorgehen gegenüber dem Immunsystem. Deswegen sollte beim Einsatz von

MCT- Inhibitoren in der Tumorthherapie mögliche negative Auswirkungen der Substanzen auf das Immunsystem bedacht werden. Ein intaktes Immunsystem kann durchaus einen entscheidenden Beitrag bei der Eliminierung von Tumorzellen leisten und dabei die Wirkung gezielter Therapien unterstützen [124]. Der Frage, inwieweit eine Blockade der MCTs sich auf die Funktion von humanen T Zellen auswirkt war ein weiterer Teilaspekt dieser Arbeit.

### **6.3 Auswirkungen einer MCT Inhibition auf CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Zellen**

Dem Immunsystem kommt im Zuge der Tumorentwicklung eine paradoxe Rolle zu [125]. Einerseits kann das Immunsystem zur Entstehung eines manifesten Tumors beitragen, andererseits kommt ihm eine wichtige Rolle in der Überwachung und Bekämpfung von Tumoren zu. Entscheidend für eine effiziente Therapie gegen Tumore ist es, das Immunsystem durch den Einsatz von antitumoralen Substanzen nicht in seiner Intaktheit anzugreifen und stattdessen immunsuppressive Mechanismen des Tumors zu überwinden [128]. Tumoren entfalten ihre immunsuppressive Wirkung u.a. durch hohe extrazelluläre Laktatlevel, auf diese Weise werden T- Zellen und NK Zellen in ihren Effektorfunktionen und der Fähigkeit zur Proliferation eingeschränkt [139, 142]. Zugleich wird die Entwicklung von pro-tumorigenen Makrophagen und regulatorischen T- Zellen gefördert [85, 147].

Eine Reduktion des tumorassoziierten Laktatspiegels durch eine MCT Inhibition könnte somit zur Restauration einer effektiven Immunantwort beitragen. Hierbei gilt es jedoch zu bedenken, dass eine MCT Inhibition nicht nur Tumorzellen trifft, sondern auch bei T- Zellen zu einer Reduktion der Proliferation führt [70]. Der MCT Inhibitor AZD3965, dessen Einsatz in der Tumorthherapie erprobt wird, wurde demnach ursprünglich als Immunsuppressor entwickelt [70]. Darüber hinaus gibt es eine Vielzahl an Arbeiten, die zeigen, dass der Glukosestoffwechsel für Effektorfunktionen wie die Interferon- $\gamma$  Produktion von T Zellen wichtig ist [105, 106, 108, 110]. Eine Inhibition der Glykolyse beispielsweise durch Verminderung des Glukoseangebots im Medium beeinträchtigt murine T-Zellen in ihren IFN- $\gamma$  Produktion [108, 116–118]. Weiterhin wurde gezeigt, dass gerade die Proliferation muriner T- Zellen durch eine Glukoserestriktion deutlich reduziert wird.

Untersuchungen im humanen System zeigen jedoch, dass T Zellen ihre Effektorfunktionen durchaus ausführen können auch wenn nur geringste Mengen an Glukose vorhanden sind

[115, 161]. T Zellen scheinen eine gewisse metabolische Flexibilität aufzuweisen, die es ihnen ermöglicht auch unter Restriktion der Glykolyse ihre Funktionen aufrecht zu erhalten. Auch in den vorgelegten Untersuchungen war eine immunsuppressive Wirkung der MCT1/2 Inhibitoren AZD3965 und SR13800 in humanen CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T- Zellen nur bedingt nachweisbar. Zwar konnte bei einer primären Stimulation frisch isolierter T Zellen ein Rückgang der Laktatproduktion und Glukoseaufnahme sowie der Proliferation beobachtet werden, allerdings war dieser Effekt nach einer 6-tägigen Expansion der T- Zellen und einer Restimulation (Restimulus) nicht mehr feststellbar. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass T - Zellen im Laufe ihrer Aktivierung neben MCT1 vermehrt MCT4 exprimieren [21, 117]. Damit würde ein MCT1/2 Inhibitor zunehmend an Wirksamkeit verlieren und eine Immunsuppression wäre allenfalls im Anfangsstadium der T- Zell Aktivierung gewährleistet. Hinsichtlich eines Einsatzes von AZD3965 und SR13800 in der Tumorthherapie wäre allerdings im Rückschluss auch ein intakt funktionierendes Immunsystems sichergestellt.

Dagegen konnte in dieser Studie belegt werden, dass Diclofenac eine aussichtsreiche Substanz in der Tumorthherapie sein könnte. Mit Hilfe von Diclofenac gelang es Tumorzellen in ihrer Funktionalität zu schädigen; Lymphozyten jedoch zeigten sich größtenteils unbeeinflusst. Zwar reduzierte Diclofenac, ebenso wie bei Tumorzellen, die Laktatsekretion und Glukoseaufnahme in CD4 und CD8 T - Zellen, jedoch blieben Effektorfunktionen unter der Behandlung mit Diclofenac erhalten. Trotz einer starken Inhibition der Glykolyse, blieb die Produktion von IFN- $\gamma$  unbeeinträchtigt, was im Kontrast zu bislang publizierten Daten steht. Bisher wurde gezeigt, dass aktivierte T- Zellen für optimale Effektorfunktionen auf eine funktionierende Glykolyse angewiesen sind [1, 109, 162]). Eine Blockade ebendieser führte bei murinen T- Zellen zur Einschränkung der IFN $\gamma$  Produktion [110, 116, 163]. Dies ist möglicherweise auf Spezies-spezifische Unterschiede oder durch die experimentellen Bedingungen (die Untersuchungen im murinen System wurden unter Serum-freien Bedingungen durchgeführt) zurückzuführen. Effekte einer glykolytischen Hemmung müssen für das humane System noch genauer untersucht werden.

Eine Einschränkung jedoch gilt es zu berücksichtigen. Diclofenac beeinträchtigte die Proliferation von T-Zellen. Im ersten Stimulus war eine Reduktion um ca. 50% zu beobachten; im Restimulus ist der dieser Effekt zwar leicht vermindert, aber dennoch vorhanden. Eine Beeinträchtigung in der Zellteilung, wenn auch nur minimal, muss beim Einsatz von Diclofenac stets bedacht werden.

## 6.4 Kombination von MCT Inhibitoren mit Immuntherapie

Unterschiedliche Ansätze der Immuntherapie in Bezug auf Tumorbekämpfung sind Gegenstand aktueller Forschung. Darunter zu nennen sind Impfstrategien, welche das adaptive Immunsystem für Tumorantigene sensibilisieren sollten, adoptiver T – Zell Transfer, sowie die Inhibition sogenannter „Checkpoints“, die als Mediatoren immunsuppressiver Mechanismen dienen.

An Bedeutung gewonnen haben in den letzten Jahren vor allem die Versuche „tumor escape“ – Mechanismen mittels „Checkpoint – Inhibitoren“ zu überwinden. Über den immunmodulatorischen „programmed death“ Rezeptor 1 (PD – 1) und den „cytotoxic T-lymphocyte associated antigen-4“ (CTLA-4) Rezeptor können Tumoren das Immunsystem auf negative Weise beeinflussen [164]. Die Interaktion von PD-1 bzw. CTLA-4 auf T-Zellen mit dem entsprechenden, überexprimierten Liganden im Tumor führt zur Immunsuppression.

Daher wurden in den letzten Jahren verschiedene Antikörper gegen CTLA – 4 und PD – 1 bzw. den Gegenspieler PDL-1 in Tumoren entwickelt, die sich in klinischen Studien als aussichtsreich erwiesen und bereits Eingang in die klinische Tumorthherapie von metastasierten Melanomen und kleinzelligen Lungenkarzinomen fanden [165]. Trotz aller Erfolge profitierte bisher nur in etwa die Hälfte der Patienten von der Therapie. Auf der Suche nach prädiktiven Markern, die eine Ansprechen der CTLA – 4 und PD -1 Antikörper vorhersagen könnten, identifizierte man die Laktatdehydrogenase. Eine Erhöhung der Serumspiegel um das 2 – fache des Normwertes korrelierte demnach mit einem schlechten Ansprechen auf Checkpoint Blockade und einem schlechteren Gesamtüberleben [166, 167]. Es wird spekuliert, dass die Serum LDH Level mit der glykolytischen Aktivität des Tumors korreliert.

Der im Tumormilieu herrschende, niedrige pH und die erhöhten Laktatspiegel beeinträchtigen die Immunantwort von T -Zellen [139, 142] und könnte dadurch die Effizienz von Checkpoint Inhibitoren reduzieren. Dementsprechend konnte eine Neutralisierung des extrazellulären Milieus im Tumorstroma die Wirkung der Immuntherapie erhöhen und als Folge davon die Ansprechraten der Antitumor Therapie erhöhen [168]. An diesem Punkt wäre nun der Einsatz von Diclofenac denkbar. Durch eine verminderte Ansäuerung des Tumormilieus, bedingt durch eine MCT Blockade, würde sich die Wirkung der „Checkpoint“ – Inhibitoren ebenfalls verbessern. Außerdem wäre es T - Zellen durch die verminderte Laktatakkumulation möglich, ihre normale Funktion wiederaufzunehmen und die Tumormasse einzudämmen.

Diclofenac entfaltet seine Wirkung an mehreren Zielstrukturen. Zum einen beeinträchtigt Diclofenac mittels einer MCT- Blockade den Tumor, zum anderen wäre in Anwesenheit von Diclofenac die T – Zell – Antwort im Tumor durch Anhebung des pH – Werts in Teilen

restauriert. Zusätzlich sollte der Effekt von Diclofenac auf die Inhibition der Prostaglandinsynthese beachtet werden. Eine Arbeit von *Zelenay et al* [81] zeigt, dass Prostaglandin eine entscheidende Rolle in der Tumorprogression, sowie der Unterdrückung der lokalen Immunantwort, spielt. Eine Inhibierung der Prostaglandinsynthese verhinderte im murinen Melanommodell diese Prozesse weitgehend [81]; außerdem konnte durch den Einsatz von COX-Inhibitoren die Effektivität von Checkpoint- Inhibitoren wie anti-PD-1 erhöht werden [81].

Eine Kombination der „Checkpoint“ – Inhibitoren CTLA – 4 oder PD – 1/PD – L1 mit Diclofenac wäre demnach durch die gleichzeitige Reduktion des Prostaglandin- und Laktatspiegels besonders sinnvoll.

Eine hohe Rate an Tumor infiltrierenden T – Zell scheint außerdem entscheidend zur Wirksamkeit von PD – 1 und CTLA – 4 beizutragen [169]. Daher sollte zusätzlich zur Checkpoint Blockade eine kombinierte Therapie mit adoptivem T – Zell Transfer in Betracht gezogen werden.

Cascone et al. zeigte, dass adoptiver T- Zell Transfer bei glykolytisch hoch aktiven Tumoren an Wirksamkeit verliert; so waren unter anderem die Raten an tumorinfiltrierenden T- Zellen, sowie die Funktion von NK- Zellen eingeschränkt [170]. Durch den Einsatz eines LDHA Inhibitors wiederum konnte die Effizienz gesteigert werden.

Zusammenfassend ließe sich die Wirksamkeit einer Kombination aus Checkpoint Inhibitoren und Immuntherapie in Anwesenheit eines Inhibitors der Glykolyse erhöhen.

Trotzdem gilt es die möglichen negativen Auswirkungen einer Blockade der Glykolyse auf das Immunsystem zu beachten. Ein LDHA knockout führte in murinen T-Zellen zur Verminderung der IFN- $\gamma$  Produktion [119]. Diese Überlegungen bleibt es im humanen System und in klinischen Studien zu belegen, um letztendlich den betroffenen Patienten erfolgreich zu therapieren.

## 7. Zusammenfassung

Im Zuge der Entwicklung neuer Strategien in der Tumorthherapie, hat der Tumormetabolismus zunehmend an Bedeutung gewonnen. Der Fokus dieser Arbeit lag auf dem Glukosestoffwechsel, und hier vor allem den MCT Transportern, welche im Ko-Transport mit einem Proton Laktat aus der Zelle schleusen. Eine Inhibition des Glukosestoffwechsels und folglich Reduktion des extrazellulären Laktats gilt dabei als aussichtsreicher therapeutischer Ansatz.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine Blockade der MCT Transporter eine Reduktion des Glukosestoffwechsels, der Proliferation und teilweise der Zellviabilität erzielt. Eine MCT 1/2 Inhibition zeigte dabei lediglich in Zellen mit Überexpression von MCT1/2 Effekte auf den Glukosestoffwechsel, wohingegen eine MCT 1/2 und MCT 4 Blockade mittels Diclofenac in allen Zelllinien eine deutliche Reduktion des Glukosestoffwechsels und der Proliferation bewirkte.

Die Hypothese, dass Diclofenac seine Wirkung ausschließlich über eine COX – Inhibition entfalte, konnte durch die fehlende Wirksamkeit des COX- Hemmers Ketoprofen, widerlegt werden. Weiterhin erwies sich das NSAR Lumiracoxib als relativ guter Inhibitor des Glukosestoffwechsels. Das NSAR Indometacin entfaltete seine Wirkung hauptsächlich über eine Reduktion der Proliferation. Für beide Substanzen bedarf es daher weitergehende Untersuchungen.

Die Untersuchung der unterschiedlichen NSAR zeigen, dass eine alleinige Zugehörigkeit zu der Gruppe der COX – Inhibitoren, noch eine strukturelle Ähnlichkeit genügen die Effekte von Diclofenac auf Tumorzellen zu reproduzieren.

Des Weiteren beschäftigte sich diese Arbeit mit der Interaktion von Tumor und Immunsystem und den Auswirkungen effizienter antitumoraler Substanzen auf das Immunsystem.

Ein intaktes Immunsystem gilt als Voraussetzung für eine erfolgreiche Therapie gegen Tumoren. Die immunsuppressive Wirkung hoher extrazellulärer Laktatlevel könnte durch eine MCT Inhibition in Teilen reduziert werden. Zu bedenken gilt, dass aktivierte T- Zellen, wie auch Tumorzellen, hohe glykolytische Aktivität aufweisen. Allerdings blieben in dieser Arbeit, im Gegensatz zu bekannten Daten aus dem murinen System [119], die Effektorfunktionen der T- Zellen trotz einer Einschränkung des Glukosestoffwechsels durch eine MCT 1/2 und MCT 4 Blockade unbeeinträchtigt.

Möglicherweise könnte Diclofenac im klinischen Einsatz Tumorzellen einschränken und dabei T- Zellen in ihren Aufgaben unbeeinträchtigt lassen. Dieses Prinzip könnte gerade bei einer Kombination von Diclofenac mit neu entwickelten Immuntherapien von Interesse sein.

Durch eine alleinige Blockade der MCT1/2 Transporter kam es zu einer Hochregulation des zunächst unterexprimierten MCT 4, und somit teilweise zu einer Resistenzentwicklung in den behandelten Tumorzelllinien [24, 159].

## 8. Literaturverzeichnis

1. Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB: Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Science* 2009(324): 1029–33.
2. Warburg O: On the Origin of Cancer Cells. *Science, New Series*, Vol. 123, 1956(No. 3191): pp. 309-314.
3. DeBerardinis RJ, Lum JJ, Hatzivassiliou G, Thompson CB: The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. *Cell Metab.* 2008; 7(1): 11–20.
4. Hanahan D, Weinberg RA: Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011; 144(5): 646–74.
5. Gatenby RA, Gillies RJ: Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat Rev Cancer* 2004; 4(11): 891–9.
6. Deutsche Gesellschaft für Nuklearmedizin e.V.: Deutsche Gesellschaft für Nuklearmedizin e.V. [http://www.nuklearmedizin.de/leistungen/leitlinien/html/tumo\\_pet\\_ct.php?navId=53](http://www.nuklearmedizin.de/leistungen/leitlinien/html/tumo_pet_ct.php?navId=53) (last accessed on 2 September 2015).
7. Jadvar H, Alavi A, Gambhir SS: 18F-FDG uptake in lung, breast, and colon cancers: molecular biology correlates and disease characterization. *J Nucl Med* 2009; 50(11): 1820–7.
8. Sukanuma K, Miwa H, Imai N, et al.: Energy metabolism of leukemia cells: glycolysis versus oxidative phosphorylation. *Leukemia & lymphoma* 2010; 51(11): 2112–9.
9. Boag JM, Beesley AH, Firth MJ, et al.: Altered glucose metabolism in childhood pre-B acute lymphoblastic leukaemia. *Leukemia* 2006; 20(10): 1731–7.
10. Soga T: Cancer metabolism: key players in metabolic reprogramming. *Cancer science* 2013; 104(3): 275–81.
11. Kroemer G, Pouyssegur J: Tumor cell metabolism: cancer's Achilles' heel. *Cancer Cell* 2008; 13(6): 472–82.
12. Hsu PP, Sabatini DM: Cancer cell metabolism: Warburg and beyond. *Cell* 2008; 134(5): 703–7.
13. Nakayama Y, Torigoe T, Inoue Y, et al.: Prognostic significance of monocarboxylate transporter 4 expression in patients with colorectal cancer. *Exp Ther Med* 2012; 3(1): 25–30.
14. Walenta S, Wetterling M, Lehrke M, et al.: High lactate levels predict likelihood of metastases, tumor recurrence, and restricted patient survival in human cervical cancers 2000; 60(4): 916–21.
15. Walenta S, Salameh A, Lyng H, et al.: Correlation of high lactate levels in head and neck tumors with incidence of metastasis. *Am J Pathol* 1997; 150(2): 409–15.

16. Kennedy KM, Dewhirst MW: Tumor metabolism of lactate: the influence and therapeutic potential for MCT and CD147 regulation. *Future Oncol* 2010; 6(1): 127–48.
17. Granchi C, Minutolo F: Anticancer agents that counteract tumor glycolysis. *ChemMedChem* 2012; 7(8): 1318–50.
18. Pinheiro C, Longatto-Filho A, Azevedo-Silva J, Casal M, Schmitt FC, Baltazar F: Role of monocarboxylate transporters in human cancers: state of the art. *J Bioenerg Biomembr* 2012; 44(1): 127–39.
19. Halestrap AP, Meredith D: The SLC16 gene family—from monocarboxylate transporters (MCTs) to aromatic amino acid transporters and beyond. *Pflugers Arch.* 2004; 447(5): 619–28.
20. Halestrap AP, Price NT: The proton-linked monocarboxylate transporter (MCT) family: structure, function and regulation. *Biochemical Journal* 1999; 343: 281–99.
21. Halestrap AP: The monocarboxylate transporter family--Structure and functional characterization. *IUBMB Life* 2012; 64(1): 1–9.
22. Muramatsu T, Miyauchi T: Basigin (CD147): a multifunctional transmembrane protein involved in reproduction, neural function, inflammation and tumor invasion. *Histol Histopathol* 2003; 18(3): 981–7.
23. Gallagher SM, Castorino JJ, Wang D, Philp NJ: Monocarboxylate transporter 4 regulates maturation and trafficking of CD147 to the plasma membrane in the metastatic breast cancer cell line MDA-MB-231. *Cancer research* 2007; 67(9): 4182–9.
24. Marchiq I, Le Floch R, Roux D, Simon M-P, Pouyssegur J: Genetic disruption of lactate/H<sup>+</sup> symporters (MCTs) and their subunit CD147/BASIGIN sensitizes glycolytic tumor cells to phenformin. *Cancer research* 2015; 75(1): 171–80.
25. Wahl ML, Owen JA, Burd R, et al.: Regulation of Intracellular pH in Human Melanoma: Potential Therapeutic Implications 1 Supported by NIH Grant P01 CA56690 (to MLW, RB, CSO, DBL); Grant R25CA48010 from National Cancer Institute, NIH, and Department of Health and Human Services, National Science Foundation MCB RUI Grant 9057010 (to JAO, SSN, RAH); and NIH Grant CA39248 (to DB). 1. *Mol Cancer Ther* 2002; 1(8): 617–28.
26. Halestrap AP, Wilson MC: The monocarboxylate transporter family--role and regulation. *IUBMB Life* 2012; 64(2): 109–19.
27. Parks SK, Chiche J, Pouyssegur J: Disrupting proton dynamics and energy metabolism for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2013; 13(9): 611–23.
28. Bröer S, Schneider, H. P., Bröer, A., Rahman, B., Hamprecht, B., Deitmer, J. W: Characterization of the monocarboxylate transporter 1 expressed in *xenopus laevis* oocytes by changes in cytosolic pH. *Biochemical Journal* 1998; 333(1): 167–74.

29. Chiche J, Le Fur Y, Vilmen C, et al.: In vivo pH in metabolic-defective Ras-transformed fibroblast tumors: key role of the monocarboxylate transporter, MCT4, for inducing an alkaline intracellular pH. *Int. J. Cancer* 2012; 130(7): 1511–20.
30. Yoon H, Fanelli A, Grollman EF, Philp NJ: Identification of a unique monocarboxylate transporter (MCT3) in retinal pigment epithelium. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 234(1): 90–4.
31. Dimmer K-S, Friedrich B, Lang F, Deitmer JW, Bröer S: The low-affinity monocarboxylate transporter MCT4 is adapted to the export of lactate in highly glycolytic cells. *Biochemical Journal* 2000; 350: 219–27.
32. Pinheiro C, Albergaria A, Paredes J, et al.: Monocarboxylate transporter 1 is up-regulated in basal-like breast carcinoma. *Histopathology* 2010; 56(7): 860–7.
33. Witkiewicz AK, Whitaker-Menezes D, Dasgupta A, et al.: Using the "reverse Warburg effect" to identify high-risk breast cancer patients: stromal MCT4 predicts poor clinical outcome in triple-negative breast cancers. *Cell Cycle* 2012; 11(6): 1108–17.
34. Pinheiro C, Longatto-Filho A, Scapulatempo C, et al.: Increased expression of monocarboxylate transporters 1, 2, and 4 in colorectal carcinomas. *Virchows Arch* 2008; 452(2): 139–46.
35. Gallagher SM, Castorino JJ, Philp NJ: Interaction of monocarboxylate transporter 4 with beta1-integrin and its role in cell migration. *Am J Physiol Cell Physiol* 2009; 296(3): C414–21.
36. Izumi H, Takahashi M, Uramoto H, et al.: Monocarboxylate transporters 1 and 4 are involved in the invasion activity of human lung cancer cells. *Cancer science* 2011; 102(5): 1007–13.
37. Pértega-Gomes N, Vizcaíno JR, Miranda-Gonçalves V, et al.: Monocarboxylate transporter 4 (MCT4) and CD147 overexpression is associated with poor prognosis in prostate cancer. *BMC Cancer* 2011; 11: 312.
38. Hao J, Chen H, Madigan MC, et al.: Co-expression of CD147 (EMMPRIN), CD44v3-10, MDR1 and monocarboxylate transporters is associated with prostate cancer drug resistance and progression. *Br J Cancer* 2010; 103(7): 1008–18.
39. Pertega-Gomes N, Felisbino S, Massie CE, et al.: A glycolytic phenotype is associated with prostate cancer progression and aggressiveness: a role for monocarboxylate transporters as metabolic targets for therapy. *J Pathol* 2015; 236(4): 517–30.
40. Baek G, Tse YF, Hu Z, et al.: MCT4 defines a glycolytic subtype of pancreatic cancer with poor prognosis and unique metabolic dependencies. *Cell Rep* 2014; 9(6): 2233–49.
41. Gerlinger M, Santos CR, Spencer-Dene B, et al.: Genome-wide RNA interference analysis of renal carcinoma survival regulators identifies MCT4 as a Warburg effect metabolic target. *J Pathol* 2012; 227(2): 146–56.

42. Dang CV, Hamaker M, Sun P, Le A, Gao P: Therapeutic targeting of cancer cell metabolism. *J Mol Med* 2011; 89(3): 205–12.
43. Vander Heiden, Matthew G: Targeting cancer metabolism: a therapeutic window opens. *Nat Rev Drug Discov* 2011; 10(9): 671–84.
44. Cheong H, Lu C, Lindsten T, Thompson CB: Therapeutic targets in cancer cell metabolism and autophagy. *Nat Biotechnol* 2012; 30(7): 671–8.
45. Porporato PE, Dhup S, Dadhich RK, Copetti T, Sonveaux P: Anticancer targets in the glycolytic metabolism of tumors: a comprehensive review. *Front Pharmacol* 2011; 2: 49.
46. Granja S, Pinheiro C, Reis RM, Martinho O, Baltazar F: Glucose Addiction in Cancer Therapy: Advances and Drawbacks. *Current Drug Metabolism* 2015; 16(3): 221–42.
47. Tennant DA, Durán RV, Gottlieb E: Targeting metabolic transformation for cancer therapy. *Nature Reviews Cancer* 2010; 10(4): 267–77.
48. Zhao Y, Butler EB, Tan M: Targeting cellular metabolism to improve cancer therapeutics. *Cell Death Dis* 2013; 4: e532.
49. Mazurek S, Boschek CB, Hugo F, Eigenbrodt E: Pyruvate kinase type M2 and its role in tumor growth and spreading. *Semin Cancer Biol* 2005; 15(4): 300–8.
50. Pelicano H, Martin DS, Xu R-H, Huang P: Glycolysis inhibition for anticancer treatment. *Oncogene* 2006; 25(34): 4633–46.
51. Floridi A, Paggi MG, D'Atri S, et al.: Effect of lonidamine on the energy metabolism of Ehrlich ascites tumor cells. *Cancer research* 1981; 41(11 Pt 1): 4661–6.
52. Madhok BM, Yeluri S, Perry SL, Hughes TA, Jayne DG: Targeting glucose metabolism: an emerging concept for anticancer therapy. *Am J Clin Oncol* 2011; 34(6): 628–35.
53. Ko YH, Verhoeven HA, Lee MJ, Corbin DJ, Vogl TJ, Pedersen PL: A translational study "case report" on the small molecule "energy blocker" 3-bromopyruvate (3BP) as a potent anticancer agent: from bench side to bedside. *J Bioenerg Biomembr* 2012; 44(1): 163–70.
54. Pedersen PL: 3-Bromopyruvate (3BP) a fast acting, promising, powerful, specific, and effective "small molecule" anti-cancer agent taken from labside to bedside: introduction to a special issue. *J Bioenerg Biomembr* 2012; 44(1): 1–6.
55. Miao P, Sheng S, Sun X, Liu J, Huang G: Lactate dehydrogenase A in cancer: a promising target for diagnosis and therapy. *IUBMB Life* 2013; 65(11): 904–10.
56. Fiume L, Manerba M, Vettraino M, Di Stefano G: Inhibition of lactate dehydrogenase activity as an approach to cancer therapy. *Future Med Chem* 2014; 6(4): 429–45.
57. Le A, Cooper CR, Gouw AM, et al.: Inhibition of lactate dehydrogenase A induces oxidative stress and inhibits tumor progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107(5): 2037–42.
58. Dwarakanath B, Jain V: Targeting glucose metabolism with 2-deoxy-D-glucose for improving cancer therapy. *Future Oncol* 2009; 5(5): 581–5.

59. Aft RL, Zhang FW, Gius D: Evaluation of 2-deoxy-D-glucose as a chemotherapeutic agent: mechanism of cell death. *Br J Cancer* 2002; 87(7): 805–12.
60. Meynet O, Bénéteau M, Jacquin MA, et al.: Glycolysis inhibition targets Mcl-1 to restore sensitivity of lymphoma cells to ABT-737-induced apoptosis. *Leukemia* 2012; 26(5): 1145–7.
61. Raez LE, Papadopoulos K, Ricart AD, et al.: A phase I dose-escalation trial of 2-deoxy-D-glucose alone or combined with docetaxel in patients with advanced solid tumors. *Cancer Chemother Pharmacol* 2013; 71(2): 523–30.
62. Dwarakanath BS, Singh D, Banerji AK, et al.: Clinical studies for improving radiotherapy with 2-deoxy-D-glucose: present status and future prospects. *J Cancer Res Ther* 2009; 5 Suppl 1: S21-6.
63. Zhan T, Digel M, Küch E-M, Stremmel W, Füllekrug J: Silybin and dehydrosilybin decrease glucose uptake by inhibiting GLUT proteins. *J Cell Biochem* 2011; 112(3): 849–59.
64. Fang J, Quinones QJ, Holman TL, et al.: The H<sup>+</sup>-linked monocarboxylate transporter (MCT1/SLC16A1): a potential therapeutic target for high-risk neuroblastoma. *Mol Pharmacol* 2006; 70(6): 2108–15.
65. Draoui N, Schicke O, Seront E, et al.: Antitumor activity of 7-aminocarboxycoumarin derivatives, a new class of potent inhibitors of lactate influx but not efflux. *Mol Cancer Ther* 2014; 13(6): 1410–8.
66. Doherty JR, Cleveland JL: Targeting lactate metabolism for cancer therapeutics. *J Clin Invest* 2013; 123(9): 3685–92.
67. Sonveaux P, Copetti T, De Saedeleer, Christophe J, et al.: Targeting the lactate transporter MCT1 in endothelial cells inhibits lactate-induced HIF-1 activation and tumor angiogenesis. *PLoS ONE* 2012; 7(3): e33418.
68. Sonveaux P, Végran F, Schroeder T, et al.: Targeting lactate-fueled respiration selectively kills hypoxic tumor cells in mice. *J Clin Invest* 2008; 118(12): 3930–42.
69. Colen CB, Seraji-Bozorgzad N, Marples B, Galloway MP, Sloan AE, Mathupala SP: Metabolic remodeling of malignant gliomas for enhanced sensitization during radiotherapy: an in vitro study. *Neurosurgery* 2006; 59(6): 1313-23; discussion 1323-4.
70. Murray CM, Hutchinson R, Bantick JR, et al.: Monocarboxylate transporter MCT1 is a target for immunosuppression. *Nat Chem Biol* 2005; 1(7): 371–6.
71. Ovens MJ, Davies AJ, Wilson MC, Murray CM, Halestrap AP: AR-C155858 is a potent inhibitor of monocarboxylate transporters MCT1 and MCT2 that binds to an intracellular site involving transmembrane helices 7-10. *Biochem. J.* 2010; 425(3): 523–30.
72. Guile SD, Bantick JR, Cheshire DR, et al.: Potent blockers of the monocarboxylate transporter MCT1: novel immunomodulatory compounds. *Bioorg Med Chem Lett* 2006; 16(8): 2260–5.

73. Cancer Research UK. NIH Webseite: A Phase I Trial of AZD3965 in Patients With Advanced Cancer - Full Text View - ClinicalTrials.gov. <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01791595> (last accessed on 16 September 2015).
74. Le Floch R, Chiche J, Marchiq I, et al.: Growth inhibition of glycolytic tumors by targeting basigin/lactate-H<sup>+</sup> symporters (MCTs): Metformin sensitizes MCT inhibition. *Cancer research* 2014; 72(8 Supplement): 3225.
75. Doherty JR, Yang C, Scott, Kristen E N, et al.: Blocking lactate export by inhibiting the Myc target MCT1 Disables glycolysis and glutathione synthesis. *Cancer research* 2014; 74(3): 908–20.
76. Le Floch R, Chiche J, Marchiq I, et al.: CD147 subunit of lactate/H<sup>+</sup> symporters MCT1 and hypoxia-inducible MCT4 is critical for energetics and growth of glycolytic tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108(40): 16663–8.
77. Polański R, Hodgkinson CL, Fusi A, et al.: Activity of the monocarboxylate transporter 1 inhibitor AZD3965 in small cell lung cancer. *Clin. Cancer Res.* 2014; 20(4): 926–37.
78. Drugs.com: <https://www.drugs.com/pro/diclofenac.html>.
79. OMIKRON GmbH: Chemikalienlexikon. <http://www.chemikalienlexikon.de/cheminfo/diclolex.htm>.
80. Cha YI, DuBois RN: NSAIDs and cancer prevention: targets downstream of COX-2. *Annu Rev Med* 2007; 58: 239–52.
81. Zelenay S, van der Veen AG, Böttcher JP, et al.: Cyclooxygenase-Dependent Tumor Growth through Evasion of Immunity. *Cell* 2015; 162(6): 1257–70.
82. Ulrich M, Drecoll U, Stockfleth E: Emerging drugs for actinic keratosis. *Expert Opin Emerg Drugs* 2010; 15(4): 545–55.
83. Gottfried E, Lang SA, Renner K, et al.: New aspects of an old drug--diclofenac targets MYC and glucose metabolism in tumor cells.
84. Braun FK, Al-Yacoub N, Plötz M, Möbs M, Sterry W, Eberle J: Nonsteroidal anti-inflammatory drugs induce apoptosis in cutaneous T-cell lymphoma cells and enhance their sensitivity for TNF-related apoptosis-inducing ligand. *J Invest Dermatol* 2012; 132(2): 429–39.
85. Chirasani SR, Leukel P, Gottfried E, et al.: Diclofenac inhibits lactate formation and efficiently counteracts local immune suppression in a murine glioma model. *Int. J. Cancer* 2013; 132(4): 843–53.
86. Laneuville O, Breuer DK, Dewitt DL, Hla T, Funk CD, Smith WL: Differential inhibition of human prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and -2 by nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *JPET* 1994; 217(2): 927–34.

87. Zhai X-J, Yu Y, Chen F, Lu Y-N: Comparative bioavailability and tolerability of single and multiple doses of 2 diclofenac sodium sustained-release tablet formulations in fasting, healthy chinese male volunteers. *Curr Ther Res Clin Exp* 2013; 75: 53–8.
88. Mermelstein F, Hamilton DA, Wright C, Lacouture PG, Ramaiya A, Carr DB: Single-dose and multiple-dose pharmacokinetics and dose proportionality of intravenous and intramuscular HP $\beta$ CD-diclofenac (Dyloject) compared with other diclofenac formulations. *Pharmacotherapy* 2013; 33(10): 1012–21.
89. 200px-Lumiracoxib\_Structural\_Formula\_V.1.svg.png (PNG-Grafik, 200 × 197 Pixel). [https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/0/09/Lumiracoxib\\_Structural\\_Formula\\_V.1.svg/200px-Lumiracoxib\\_Structural\\_Formula\\_V.1.svg.png](https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/0/09/Lumiracoxib_Structural_Formula_V.1.svg/200px-Lumiracoxib_Structural_Formula_V.1.svg.png) (last accessed on 18 December 2018).
90. Wikimedia Foundation Inc.: 2-(1-(4-chlorobenzoyl)-5-methoxy-2-methyl-1H-indol-3-yl)acetic acid 200 - Indometacin. <https://de.wikipedia.org/w/index.php?oldid=180155067> (last accessed on 18 December 2018).
91. Wikimedia Foundation Inc.: Ketoprofen-Enantiomere Strukturformeln - Ketoprofen. <https://de.wikipedia.org/w/index.php?oldid=181694562> (last accessed on 18 December 2018).
92. Hull MA, Gardner SH, Hawcroft G: Activity of the non-steroidal anti-inflammatory drug indomethacin against colorectal cancer. *Cancer Treatment Reviews* 2003; 29(4): 309–20.
93. Lynch NR, Castes M, Astoin M, Salomon JC: Mechanism of inhibition of tumour growth by aspirin and indomethacin. *Br J Cancer* 1978; 38(4): 503–12.
94. Gelin J, Andersson C, Lundholm K: Effects of indomethacin, cytokines, and cyclosporin A on tumor growth and the subsequent development of cancer cachexia. *Cancer research* 1991; 51(3): 880–5.
95. Pollard M, Luckert PH: Indomethacin treatment of rats with dimethylhydrazine-induced intestinal tumors. *Cancer Treat Rep* 1980; 64(12): 1323–7.
96. Pollard M, Luckert PH: Treatment of Chemically-Induced Intestinal Cancers with Indomethacin. *Experimental Biology and Medicine* 1981; 167(2): 161–4.
97. Narisawa T, Sato M, Tani M, Kudo T, Takahashi T, Goto A: Inhibition of development of methylnitrosourea-induced rat colon tumors by indomethacin treatment. *Cancer research* 1981; 41(5): 1954–7.
98. Lundholm K, Gelin J, Hyltander A, et al.: Anti-inflammatory treatment may prolong survival in undernourished patients with metastatic solid tumors. *Cancer research* 1994; 54(21): 5602–6.
99. Al-Saleem T, Sabri Ali Z, Qassab M: SKIN CANCERS IN XERODERMA PIGMENTOSUM: RESPONSE TO INDOMETHACIN AND STEROIDS. *The Lancet* 1980; 316(8188): 264–5.

100. Mertens WC, Bramwell VHC, Gwadry-Sridhar F, Romano W, Banerjee D, Lala PK: Effect of indomethacin plus ranitidine in advanced melanoma patients on high-dose interleukin-2. *The Lancet* 1992; 340(8816): 397–8.
101. Panje WR: Regression of Head and Neck Carcinoma With a Prostaglandin-Synthesis Inhibitor. *Archives of Otolaryngology - Head and Neck Surgery* 1981; 107(11): 658–63.
102. Yoshinaga K, Teramura M, Iwabe K, et al.: Anti-lymphoma effect of naproxen and indomethacin in a patient with relapsed diffuse large B-cell lymphoma. *Am. J. Hematol.* 2001; 66(3): 220–3.
103. Informationszentrum im Kompetenznetz „Akute und chronische Leukämien“: Blut und Blutbildung. [https://www.kompetenznetz-leukaemie.de/content/patienten/leukaemien/blut\\_und\\_blutbildung/](https://www.kompetenznetz-leukaemie.de/content/patienten/leukaemien/blut_und_blutbildung/) (last accessed on 8 January 2019).
104. Wang R, Green DR: The immune diet: meeting the metabolic demands of lymphocyte activation. *F1000 Biol Rep* 2012; 4: 9.
105. van der Windt, Gerritje J W, Pearce EL: Metabolic switching and fuel choice during T-cell differentiation and memory development. *Immunol Rev* 2012; 249(1): 27–42.
106. Wang R, Dillon CP, Shi LZ, et al.: The transcription factor Myc controls metabolic reprogramming upon T lymphocyte activation. *Immunity* 2011; 35(6): 871–82.
107. Wang R, Green DR: Metabolic reprogramming and metabolic dependency in T cells. *Immunol Rev* 2012; 249(1): 14–26.
108. Jacobs SR, Herman CE, MacIver NJ, et al.: Glucose Uptake Is Limiting in T Cell Activation and Requires CD28-Mediated Akt-Dependent and Independent Pathways. *The Journal of Immunology* 2008; 180(7): 4476–86.
109. Pearce EL: Metabolism in T cell activation and differentiation. *Curr Opin Immunol* 2010; 22(3): 314–20.
110. Pearce EL, Poffenberger MC, Chang C-H, Jones RG: Fueling immunity: insights into metabolism and lymphocyte function. *Science* 2013; 342(6155): 1242454.
111. Frauwirth KA, Riley JL, Harris MH, et al.: The CD28 Signaling Pathway Regulates Glucose Metabolism. *Immunity* 2002; 16(6): 769–77.
112. Renner K, Singer K, Koehl GE, et al.: Metabolic Hallmarks of Tumor and Immune Cells in the Tumor Microenvironment. *Front Immunol* 2017; 8: 248.
113. Rathmell JC, Elstrom RL, Cinalli RM, Thompson CB: Activated Akt promotes increased resting T cell size, CD28-independent T cell growth, and development of autoimmunity and lymphoma. *Eur J Immunol* 2003; 33(8): 2223–32.
114. Finlay D, Cantrell DA: Metabolism, migration and memory in cytotoxic T cells. *Nat Rev Immunol* 2011; 11(2): 109–17.

115. Renner K, Geiselhöringer A-L, Fante M, et al.: Metabolic plasticity of human T cells: Preserved cytokine production under glucose deprivation or mitochondrial restriction, but 2-deoxy-glucose affects effector functions. *Eur J Immunol* 2015; 45(9): 2504–16.
116. Chang C-H, Curtis JD, Maggi LB, et al.: Posttranscriptional control of T cell effector function by aerobic glycolysis. *Cell* 2013; 153(6): 1239–51.
117. Wahl DR, Byersdorfer CA, Ferrara, James L M, Opipari AW, Glick GD: Distinct metabolic programs in activated T cells: opportunities for selective immunomodulation. *Immunol Rev* 2012; 249(1): 104–15.
118. Cham CM, Gajewski TF: Glucose Availability Regulates IFN- Production and p70S6 Kinase Activation in CD8+ Effector T Cells. *The Journal of Immunology* 2005; 174(8): 4670–7.
119. Peng M, Yin N, Chhangawala S, Xu K, Leslie CS, Li MO: Aerobic glycolysis promotes T helper 1 cell differentiation through an epigenetic mechanism. *Science* 2016; 354(6311): 481–4.
120. Tripmacher R, Gaber T, Dziurla R, et al.: Human CD4(+) T cells maintain specific functions even under conditions of extremely restricted ATP production. *Eur J Immunol* 2008; 38(6): 1631–42.
121. Gubser PM, Bantug GR, Razik L, et al.: Rapid effector function of memory CD8+ T cells requires an immediate-early glycolytic switch. *Nat Immunol* 2013; 14(10): 1064–72.
122. Clemente CG, Mihm MC, Bufalino R, Zurrida S, Collini P, Cascinelli N: Prognostic value of tumor infiltrating lymphocytes in the vertical growth phase of primary cutaneous melanoma. *Cancer* 1996; 77(7): 1303–10.
123. Naito Y, Saito K, Shiiba K, et al.: CD8+ T Cells Infiltrated within Cancer Cell Nests as a Prognostic Factor in Human Colorectal Cancer. *Cancer Res* 1998; 58(16): 3491–4.
124. Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, et al.: Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science* 2006; 313(5795): 1960–4.
125. de Visser, Karin E, Eichten A, Coussens LM: Paradoxical roles of the immune system during cancer development. *Nat Rev Cancer* 2006; 6(1): 24–37.
126. Shankaran V, Ikeda H, Bruce AT, et al.: IFN $\gamma$  and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* 2001; 410(6832): 1107–11.
127. Zhou G, Lu Z, McCadden JD, Levitsky HI, Marson AL: Reciprocal changes in tumor antigenicity and antigen-specific T cell function during tumor progression. *J Exp Med* 2004; 200(12): 1581–92.
128. Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ: Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science* 2011; 331(6024): 1565–70.

129. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD: The three Es of cancer immunoediting. *Annu Rev Immunol* 2004; 22: 329–60.
130. Vollmar A, Dingermann T, Zündorf I: *Immunologie: Grundlagen und Wirkstoffe ; mit 216 Tabellen*. 2nd ed. Stuttgart: Wiss. Verlagsges. 2013.
131. Löb S, Königsrainer A, Zieker D, et al.: IDO1 and IDO2 are expressed in human tumors: levo- but not dextro-1-methyl tryptophan inhibits tryptophan catabolism. *Cancer Immunology, Immunotherapy* 2009; 58(1): 153–7.
132. Uyttenhove C, Pilotte L, Théate I, et al.: Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Nat Med* 2003; 9(10): 1269–74.
133. Brandacher G, Perathoner A, Ladurner R, et al.: Prognostic value of indoleamine 2,3-dioxygenase expression in colorectal cancer: effect on tumor-infiltrating T cells. *Clin. Cancer Res.* 2006; 12(4): 1144–51.
134. Keibler MA, Wasylenko TM, Kelleher JK, Iliopoulos O, Vander Heiden MG, Stephanopoulos G: Metabolic requirements for cancer cell proliferation. *Cancer Metab* 2016; 4: 16.
135. Dröge W, Eck H-P, Betzler M, Näher H: Elevated plasma glutamate levels in colorectal carcinoma patients and in patients with acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). *Immunobiology* 1987; 174(4-5): 473–9.
136. Dröge W, Eck H-P, Betzler M, Schlag P, Drings P, Ebert W: Plasma glutamate concentration and lymphocyte activity. *J Cancer Res Clin Oncol* 1988; 114(2): 124–8.
137. Singer K, Kastenberger M, Gottfried E, et al.: Warburg phenotype in renal cell carcinoma: high expression of glucose-transporter 1 (GLUT-1) correlates with low CD8(+) T-cell infiltration in the tumor. *Int. J. Cancer* 2011; 128(9): 2085–95.
138. Chang C-H, Qiu J, O'Sullivan D, et al.: Metabolic Competition in the Tumor Microenvironment Is a Driver of Cancer Progression. *Cell* 2015; 162(6): 1229–41.
139. Brand A, Singer K, Koehl GE, et al.: LDHA-Associated Lactic Acid Production Blunts Tumor Immunosurveillance by T and NK Cells. *Cell Metab.* 2016; 24(5): 657–71.
140. Kroeger M, Walenta S, Rofstad EK, Mueller-Klieser W: Growth rates or radiobiological hypoxia are not correlated with local metabolite content in human melanoma xenografts with similar vascular network. *Br J Cancer* 1995; 72(4): 912–6.
141. Schwickert G, Walenta S, Sundfør K, Rofstad EK, Mueller-Klieser W: Correlation of High Lactate Levels in Human Cervical Cancer with Incidence of Metastasis. *Cancer Res* 1995; 55(21): 4757–9.
142. Fischer K, Hoffmann P, Voelkl S, et al.: Inhibitory effect of tumor cell–derived lactic acid on human T cells. *Blood* 2007; 109(9): 3812–9.

143. Mandler AN, Hu B, Prinz PU, Kreutz M, Gottfried E, Noessner E: Tumor lactic acidosis suppresses CTL function by inhibition of p38 and JNK/c-Jun activation. *Int. J. Cancer* 2012; 131(3): 633–40.
144. Kreutz M, Gottfried E, Kunz-Schughart L, et al.: Tumor-Derived Lactic Acid Modulates Dendritic Cell Activation and Differentiation. *Blood* 2004; 104(11): 4246.
145. Dietl K, Renner K, Dettmer K, et al.: Lactic Acid and Acidification Inhibit TNF Secretion and Glycolysis of Human Monocytes. *The Journal of Immunology* 2010; 184(3): 1200–9.
146. Husain Z, Huang Y, Seth P, Sukhatme VP: Tumor-Derived Lactate Modifies Antitumor Immune Response: Effect on Myeloid-Derived Suppressor Cells and NK Cells. *The Journal of Immunology* 2013; 191(3): 1486–95.
147. Colegio OR, Chu N-Q, Szabo AL, et al.: Functional polarization of tumour-associated macrophages by tumour-derived lactic acid. *Nature* 2014; 513(7519): 559–63.
148. Ekberg H, Qi Z, Pahlman C, et al.: The specific monocarboxylate transporter-1 (MCT-1) inhibitor, AR-C117977, induces donor-specific suppression, reducing acute and chronic allograft rejection in the rat. *Transplantation* 2007; 84(9): 1191–9.
149. Pahlman C, Qi Z, Murray CM, et al.: Immunosuppressive properties of a series of novel inhibitors of the monocarboxylate transporter MCT-1. *Transpl Int* 2013; 26(1): 22–9.
150. Altman BJ, Dang CV: Normal and cancer cell metabolism: lymphocytes and lymphoma. *FEBS J.* 2012; 279(15): 2598–609.
151. Fabian C, Koetz L, Favaro E, Indraccolo S, Mueller-Klieser W, Sattler, Ulrike G A: Protein profiles in human ovarian cancer cell lines correspond to their metabolic activity and to metabolic profiles of respective tumor xenografts. *FEBS J.* 2012; 279(5): 882–91.
152. Moreno-Sánchez† R, Bravo† C, Vásquez† C, Ayala, GuadalupeSilveira†, Luis H., Martínez-Lavín M: Inhibition and uncoupling of oxidative phosphorylation by nonsteroidal anti-inflammatory drugs: Study in mitochondria, submitochondrial particles, cells, and whole heart. *Biochemical Pharmacology* 1999, 1999: 743–52.
153. Marchiq I, Albregues J, Granja S, Gaggioli C, Pouysségur J, Simon M-P: Knock out of the BASIGIN/CD147 chaperone of lactate/H<sup>+</sup> symporters disproves its pro-tumour action via extracellular matrix metalloproteases (MMPs) induction. *Oncotarget* 2015; 6(28): 24636–48.
154. Ždralović M, Brand A, Di Ianni L, et al.: Double genetic disruption of lactate dehydrogenases A and B is required to ablate the "Warburg effect" restricting tumor growth to oxidative metabolism. *J Biol Chem* 2018; 293(41): 15947–61.
155. Cheong J-H, Park ES, Liang J, et al.: Dual inhibition of tumor energy pathway by 2-deoxyglucose and metformin is effective against a broad spectrum of preclinical cancer models. *Mol Cancer Ther* 2011; 10(12): 2350–62.

156. Ben Sahra I, Tanti J-F, Bost F: The combination of metformin and 2-deoxyglucose inhibits autophagy and induces AMPK-dependent apoptosis in prostate cancer cells. *Autophagy* 2010; 6(5): 670–1.
157. Gottfried E, Rogenhofer S, Waibel H, et al.: Pioglitazone modulates tumor cell metabolism and proliferation in multicellular tumor spheroids. *Cancer Chemother Pharmacol* 2011; 67(1): 117–26.
158. Granja S, Marchiq I, Le Floch R, Moura CS, Baltazar F, Pouyssegur J: Disruption of BASIGIN decreases lactic acid export and sensitizes non-small cell lung cancer to biguanides independently of the LKB1 status. *Oncotarget* 2015; 6(9): 6708–21.
159. Marchiq I, Pouyssegur J: Hypoxia, cancer metabolism and the therapeutic benefit of targeting lactate/H(+) symporters. *J Mol Med* 2016; 94(2): 155–71.
160. Tramèr MR, Moore AR, Reynolds JMD, McQuay HJ: Quantitative estimation of rare adverse events which follow a biological progression: A new model applied to chronic NSAID use. *Pain* 2000; 85(1): 169–82.
161. Dziurla R, Gaber T, Fangradt M, et al.: Effects of hypoxia and/or lack of glucose on cellular energy metabolism and cytokine production in stimulated human CD4+ T lymphocytes. *Immunol Lett* 2010; 131(1): 97–105.
162. Chang C-H, Pearce EL: Emerging concepts of T cell metabolism as a target of immunotherapy. *Nat Immunol* 2016; 17(4): 364–8.
163. Ho P-C, Bihuniak JD, Macintyre AN, et al.: Phosphoenolpyruvate Is a Metabolic Checkpoint of Anti-tumor T Cell Responses. *Cell* 2015; 162(6): 1217–28.
164. Pardoll DM: The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer* 2012; 12(4): 252–64.
165. Hamanishi J, Mandai M, Matsumura N, Abiko K, Baba T, Konishi I: PD-1/PD-L1 blockade in cancer treatment: perspectives and issues. *Int J Clin Oncol* 2016; 21(3): 462–73.
166. Kelderman S, Heemskerk B, van Tinteren H, et al.: Lactate dehydrogenase as a selection criterion for ipilimumab treatment in metastatic melanoma. *Cancer Immunology, Immunotherapy* 2014; 63(5): 449–58.
167. Diem S, Kasenda B, Spain L, et al.: Serum lactate dehydrogenase as an early marker for outcome in patients treated with anti-PD-1 therapy in metastatic melanoma. *Br J Cancer* 2016; 114(3): 256–61.
168. Pilon-Thomas S, Kodumudi KN, El-Kenawi AE, et al.: Neutralization of Tumor Acidity Improves Antitumor Responses to Immunotherapy. *Cancer research* 2016; 76(6): 1381–90.

169. Tang H, Wang Y, Chlewicki LK, et al.: Facilitating T Cell Infiltration in Tumor Microenvironment Overcomes Resistance to PD-L1 Blockade. *Cancer Cell* 2016; 29(3): 285–96.
170. Cascone T, McKenzie JA, Mbofung RM, et al.: Increased Tumor Glycolysis Characterizes Immune Resistance to Adoptive T Cell Therapy. *Cell Metab.* 2018; 27(5): 977-987.e4.

# Danksagung

Ich bedanke mich bei der AG Kreutz, die mir bei Fragen und allen sonstigen Belangen tatkräftig zur Seite gestanden hat.

Mein besonderer Dank gilt natürlich Steffi, mit deren Geduld auch die kompliziertesten Versuche gelangen.

Außerdem möchte ich mich ganz besonders bei Kathrin und Marina bedanken, die mich geduldig in die komplexe Thematik eingearbeitet haben und sich immer Zeit für Fragen oder Korrekturen nahmen.

Zuletzt danke ich meinen Eltern und meinem Schorschi, ohne die das alles wohl nicht möglich gewesen wäre.