AUS DEM LEHRSTUHL FÜR NEUROLOGIE
PROF. DR. MED. RALF LINKER
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSTIÄT REGENSBURG

Combined Modulation of Tumor Metabolism by Metformin and Diclofenac in Glioma

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
Der Universität Regensburg

Vorgelegt von
Valeria Gerthofer

2020

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR NEUROLOGIE
PROF. DR. MED. RALF LINKER
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSTIÄT REGENSBURG

Combined Modulation of Tumor Metabolism by Metformin and Diclofenac in Glioma

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
Der Universität Regensburg

Vorgelegt von
Valeria Gerthofer

2020

Dekan: Prof. Dr. Dipl. phys. Dirk Hellwig

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Peter Hau
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Martin Proescholdt

Tag der mündlichen Prüfung: 14.12.2020

Inhaltsverzeichnis

1. Deutsche Adaption der veröffentlichten Originalarbeit- Kombinierte Beeinflussung des Tumormetabolismus durch Metformin und Diclofenac beim Glioblastom 3

1.1. Einleitung 3

1.2. Material und Methoden 4

1.2.1. Ethikvotum 4

1.2.2. Tumorzelllinien 5

1.2.3. Proliferationsassay 5

1.2.4. Migrationsassay 6

1.2.5. Proteinisolierung und Western-Blot 6

1.2.6. LDH-Aktivitätsmessung 7

1.2.7. Messung der Sauerstoffkonzentration und des pH-Wertes in der Zellkultur 7

1.2.8. Extrazelluläre Laktatkonzentration 8

1.2.9. Kombinationsindex 8

1.2.10. Immunzytochemie 8

1.2.11. Statistik 9

1.3. Ergebnisse 9

1.3.1. BTICs exprimieren Nestin und SOX 9

1.3.2. Die kombinierte Behandlung mit Metformin und Diclofenac schränkt Zellproliferation und -migration ein 9

1.3.3. Metformin, Diclofenac und die gering dosierte kombinierte Behandlung haben keine zytotoxischen Effekte 13

1.3.5. Die kombinierte Behandlung hat keinen additiven Einfluss auf mTor- oder STAT3-Signalweg 16

1.4. Diskussion und Einbettung in die aktuelle Datenlage 18

1.4.1. Metformin als Therapeutikum in der Onkologie- epidemiologische und präklinische Erkenntnisse 18

1.4.2. Metformin in der Kombinationstherapie mit klassischen Chemotherapeutika 19

1.4.3. Metformin als Kombinationspartner in der Modulation des Tumormetabolismus 21

1.4.4. Kombinierte Modulation des Tumormetabolismus durch Metformin und Diclofenac 22

1.4.5. Metformin im Gesamtkontext der Systemerkrankung „Krebs“ 25

1.4.6. Metformin als Therapeutikum in der Onkologie- „drug repurposing“ 28

1.5. Zusammenfassung 29

1.6. Anhang 30

1.6.1. Zusätzliche Abbildungen 30

1.6.2. Abkürzungen 37

1.6.3. Abbildungsverzeichnis 39

1.7. Literatur 40

2. Originalpublikation (englisch) 50

3. Danksagung 67

1. Deutsche Adaption der veröffentlichten Originalarbeit- Kombinierte Beeinflussung des Tumormetabolismus durch Metformin und Diclofenac beim Glioblastom

1.1. Einleitung

Gliome sind primäre Hirntumoren, die aus Gliazellen oder entsprechenden Vorläuferzellen entstehen. In der WHO-Klassifikation der ZNS-Tumoren wird abhängig von histologischen und molekularen Kriterien zwischen verschiedenen Entitäten und vier Malignitätsgraden unterschieden[1]. Insbesondere das Glioblastom (WHO-Grad IV) zeichnet sich durch eine schlechte Prognose mit einer 5-Jahresüberlebensrate von weniger als 5% aus und zählt damit nicht nur zu den häufigsten, sondern auch zu den bösartigsten Hirntumoren, die in den meisten Fällen als primäre ZNS-Tumore entstehen. Patienten, die im Rahmen von klinischen Studien behandelt werden, überleben durchschnittlich zwischen 16,6 und 26,3 Monate nach Erstdiagnose[2].

Hirntumor-initiierende Zellen („brain tumor initiating cells“, BTICs) sind Vorläuferzellen, die sich durch stammzelltypische Eigenschaften wie Selbsterneuerung, die Fähigkeit, Zellklone zu bilden und Pluripotenz auszeichnen[3]. Diese Zellen sind dabei nicht nur an der Tumorentstehung beteiligt, sondern auch am Fortschreiten und Wiederauftreten der Erkrankung[4–6].

Metformin (1,1-Dimethylbiguanidhydrochlorid, https://www.drugs.com/metformin.html) ist bis zum heutigen Tag eines der am häufigsten eingesetzten Medikamente in der Behandlung des Diabetes mellitus Typ 2 (T2DM)[7]. Neben antihyperglykämischer Wirkung durch Hemmung der Glukoneogenese und Steigerung der peripheren Glukoseaufnahme insbesondere in das muskuloskelettale System konnten dem Biguanid antineoplastische Effekte nachgewiesen werden[8,9]. So konnte gezeigt werden, dass die Einnahme von Metformin im Rahmen einer diabetischen Erkrankung das Risiko, an bestimmten Krebsarten zu erkranken, verringern kann[10]. In in vitro-Studien konnten nicht nur bei humane Glioblastom- (GBM) Linien, sondern auch bei Gliom-initiierende Zellen antiproliferative sowie migrationshemmende Effekte nachgewiesen werden[11–13].

Metformin entfaltet seine Wirkung durch Hemmung der mitochondrialen Atmungskette[14]. Als Reaktion auf sinkende Energiereserven in der Zelle wird die Adenosinmonophosphat-Kinase (AMPK) als eine Art „Energiesensor“ aktiviert[15,16] und die Serin/Threonin-Kinase „mammalian target of rapamycin“ (mTOR) inhibiert[12].

Folglich kommt es zur Aktivierung verschiedener Rettungsmechanismen, die in gesteigerter Glykolyse und damit einhergehender vermehrter Laktatproduktion resultieren[17].

In den zu diesem Thema veröffentlichten Arbeiten konnten die erwünschten antineoplastischen Wirkungen allerdings nur durch hohe Metformindosierungen erzielt werden[18]. Eine signifikante Reduktion des Gliomrisikos durch eine im Rahmen der antidiabetischen Therapie eingesetzten Dosierung konnte bisher nicht nachgewiesen werden[19].

Für die therapeutische Wirkung im Rahmen einer tumorspezifischen Systemtherapie, einschließlich antiproliferativer und migrations-hemmender Effekte, können unterschiedlichen Wirkmechanismen verantwortlich gemacht werden und müssen daher von einer fraglichen protektiven Wirkung auf die Glominzidenz, zum Beispiel als Nebeneffekt einer antidiabetischen Therapie, unterschieden werden.

Diclofenac, ein nicht-steroidales Antirheumatikum (NSAR), das hauptsächlich für seine analgetischen Wirkungen bekannt ist, hemmt die Glykolyse in Tumorzellen[20]. In verschiedenen epidemiologischen Studien konnte gezeigt werden, dass der Einsatz von COX-2-Hemmern das Risiko, an Krebsarten zu erkranken, die mit chronischen Entzündungsprozessen assoziiert sind, reduzieren kann[21–25]. Neben verschiedenen COX-abhängigen und unabhängigen Wirkmechanismen wird Diclofenac als möglicher Inhibitor zellwandständiger Laktattransporter diskutiert. Infolge dessen kommt es zu intrazellulärem Laktatanstieg, Hemmung der Glykolyse, Reduktion der Glukoseaufnahme und schlussendlich zur Inhibition der mitochondrialen sowie der glykolytischen ATP-Produktion[26–28].

Das primäre Ziel dieser Arbeit war es, zu untersuchen, ob durch die Hemmung der mitochondrialen Atmungskette und der Glykolyse durch die Kombination von Metformin und Diclofenac die beschriebenen inhibitorischen Effekte auf BTICs und Gliomzelllinen (TCs) verstärkt werden können.

1.2. Material und Methoden

1.2.1. Ethikvotum

Die Studie wurde durch die Ethikkommission der Universität Regensburg (Nr. 11-103-0182) genehmigt, schriftliche Einverständniserklärungen der Patienten waren vorhanden.

Die Diagnosen und dazugehörige WHO-Grade der betroffenen und hier aufgeführten Patienten wurden durch das Institut für Neuropathologie der Universitätsklinik Regensburg (Prof. Dr. Riemenschneider) bestimmt. Neben den standardmäßig durchgeführten histopathologischen Untersuchungen wurden die Präparate auf Isocitratdehydrogenase-1 (IDH1) -Mutation und O-6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT)- Promotor-Methylierungsstatus getestet. Klinische Parameter wie Alter, Geschlecht, Behandlung und Gesamtüberleben (nach den RANO-Kriterien) waren für sämtliche Patienten vorliegend.

1.2.2. Tumorzelllinien

BTIC-8, -11, -13 und -18 sind kultivierte Glioblastom-Vorläuferzellen [siehe dazu[13,29]], die durch mechanische sowie enzymatische Zerkleinerung, Waschgänge und Filterung aus primären Tumorresektaten gewonnen wurden. Die isolierten BTICs wurden als Einzelzellsuspension eingefroren und in den Passagen 12-25 verwendet. Die BTICs wurden in serumfreien Kulturmedien (RHB-A®) mit Wachstumsfaktoren (jeweils 20 ng/ml EGF und FGF (Miltenyi Biotech)) bei 37°C, 5% CO_2 und 95% Luftfeuchtigkeit in einem Standard-Gewebekultur-Inkubator aufbewahrt. Die stammzellähnlichen Eigenschaften der BTICs wurden u.a. in einem immunkomprimierten Mausmodell verifiziert.
Die Gliomzelllinie U87 stammt aus der American Type Culture Collection (Manassas, USA), während HTZ-349 als primäre Tumorzellkultur an der Universitätsklinik Würzburg aus dem Resektat eines humanen Glioblastoms gewonnen wurde[30,31]. Die Tumorzellen wurden in „Dulbeccos modified Eagles-Medium“ (DMEM mit 1 g/l Glucose; Sigma-Aldrich, Deutschland) mit 10% „fetal calf serum“ (FCS; Biochrom, Deutschland) unter den oben genannten Bedingungen in einem Standard-Gewebekultur-Inkubator gehalten. Alle Experimente wurden unter Verwendung von DMEM mit 10% FCS für TCs bzw. 2% B27, 0,01% EGF und FGF für BTICs durchgeführt.

1.2.3. Proliferationsassay

Die Zellproliferation wurde mittels Kristallviolettfärbung quantifiziert. Zusammengefasst wurden die Zellen mit einer Dichte von $2{,}5\times10^3$ Zellen/ml in 200 µl/Zellkulturgefäß mit und ohne vorhergehende Lamininbeschichtung ausgewertet.

Nach 48 bis 72 Stunden wurden die Zellen mit spezifischen Konzentrationen von Metformin, Diclofenac, beiden Medikamenten oder Kontrollmedien behandelt. Die Proliferation wurde nach 0, 48 bzw. 96 Stunden bestimmt. Hierzu wurde das Behandlungsmedium durch eine 20%ige Methanol-Lösung mit 0,5% Kristallviolett ersetzt und nach 10-minütiger Färbung durch die Zugabe von 0,1 M Natriumcitrat in 50% Ethanol zu einer homogenen Lösung verdünnt und die Fluoreszenz gemessen (VarioSkan Flash Multimode Reader, Thermo Scientific, USA). Nach Subtraktion der Hintergrundfluoreszenz wurden die Ergebnisse auf die 0-Stunden-Werte normalisiert. Die Experimente wurden mit fünf bis sechs Replikaten durchgeführt und zweimal wiederholt.

1.2.4. Migrationsassay

Zur Bestimmung der Zellmigration wurden Zellsphäroide erzeugt. Hierfür wurden $2{,}5\times10^3$ Zellen in Agarose-beschichtete Zellkulturgefäße (1% Agarose in PBS) ausgesät und über 48 Stunden kultiviert, um die Bildung von Sphäroiden zu ermöglichen. Die Sphäroide wurden anschließend in Zellkulturgefäße mit den entsprechenden Arzneimitteln bzw. Kontrollmedien überführt. Die Zellmigration wurde nach 0, 24 und 48 Stunden bestimmt, wobei 24 Stunden als ein früher Zeitpunkt gewählt wurde, um Proliferationseffekte zu vermeiden. Die von Zellen bedeckte Fläche wurden fotografiert, manuell umrandet (Freihandauswahlmodul, ImageJ-Software, NIH, USA) und vermessen. Die Versuche wurden ebenfalls mit fünf bis sechs Replikaten durchgeführt und zweimal wiederholt.

1.2.5. Proteinisolierung und Western-Blot

Um die Konzentration von (p)mTOR, (phosphoryliertem) „signal transducer and activator of transcription“ ((p)STAT3) und Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) zu messen, wurden Zelllysate mit „radioimmunoprecipitation assay (RIPA)-Puffer“ erstellt. 30µg der Zelllysate wurden anschließend in Laemmli-Puffer verdünnt, auf 10%igem „sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)-Gel“ aufgetrennt und durch Semi-Dry- oder wet-Blotting auf Nitrocellulosemembranen übertragen. Die Membranen wurden für eine Stunde mit 5% Milchpulver bzw. 5% „bovine serum albumin“ (BSA) in 0,02% „Tris-buffered saline with Tween“ (TBST) geblockt. Anschließend wurden die

Membranen mit monoklonalen Antikörpern gegen STAT-3 (Nr. 9145), pSTAT-3 (Nr. 4904, Nr. 9145), mTOR (Nr. 2983), pmTOR (Nr. 5536) (jeweils Cell Signaling, New England Biolabs GmbH, Deutschland) und GAPDH2 (sc-48167, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland) in Trockenmilch (1%) bei 4°C über Nacht inkubiert. Für BTIC-13 wurde für phosphorylierte und nicht-phosphorylierte Proteine dieselbe Membran verwendet. Die Proteinexpression wurde durch Chemolumineszenz (ECL Western Blot Bright, Biozym, Deutschland) bestimmt und die Intensität der Proteinbanden mit ImageJ unter Verwendung des Gelanalysemoduls gemessen. Die Proteinexpression von zwei bis drei Western-Blots wurde schließlich nach Normalisierung auf Beladungs- und Behandlungskontrolle unter Verwendung der GraphPad Prism-Software (Version 6 und 7, GraphPad Software, USA) berechnet.

1.2.6. LDH-Aktivitätsmessung

Zur Messung der Laktatdehydrogenase (LDH)-Aktivität wurde ein LDH-Zytotoxizitätsassay (Promega, Mannheim, Deutschland) durchgeführt. Dieser Test basiert auf folgender enzymatischen Kopplungsreaktion: LDH oxidiert Laktat, um Nicotinamid Adenin Dinucleotid Hydrid (NADH) zu erzeugen, welches dann mit Pyruvat und einem Farbstoff reagiert und gelbe Fluoreszenz erzeugt. Die LDH-Aktivität wurde nach 24 und 48 Stunden bei einer Absorption von 490nm quantifiziert (VarioSkan Flash Multimode Reader, Thermo Scientific, USA). Natriumoxamat (25 mM) wurde als Positivkontrolle verwendet.

1.2.7. Messung der Sauerstoffkonzentration und des pH-Wertes in der Zellkultur

Der SensorDish Reader (SDR, PreSens Precision Sensing, Regensburg, Deutschland) ist ein Sauerstoff- und pH-Messgerät. Lumineszierende Farbstoffe, die in den Boden einer 24-well-Schale integriert sind, fungieren hierbei als Sensoren. Die lumineszierenden Eigenschaften der Farbstoffe hängen von der aktuell in den Zellkulturgefäßen vorherrschenden Sauerstoffkonzentration ab, außerdem verändert sich die Intensität der Fluoreszenz in Abhängigkeit des aktuellen pH-Wertes.
Die Farbsignale werden vom SensorDish Reader registriert und anhand gespeicherter Kalibrierungsparameter quantifiziert. Die Zellen wurden unter Berücksichtigung ihres stereotypen Sauerstoffverbrauchs, d.h. 1,5 (BTIC 18) oder 3×10^5 (BTIC 11, BTIC 13, BTIC 8, U87 und HTZ349) Zellen/Zellkulturgefäß, ausgesät und in 1 ml Medium

inkubiert. Nach 24 Stunden wurde das Medium durch die jeweiligen Behandlungen ersetzt und die Sauerstoffkonzentration über 24 Stunden gemessen.

1.2.8. Extrazelluläre Laktatkonzentration

Die extrazellulären Laktatspiegel wurden in Kooperation mit dem Institut für funktionelle Genomik der Universität Regensburg (Prof. Peter Oefner, Dr. Katja Dettmer-Wilde) massenspektrometrisch gemessen.

1.2.9. Kombinationsindex

Der „Ting Chao-Chous Kombinationsindex“ (KI) wurde mithilfe der CompuSyn-Software (www.combosyn.com) berechnet. Der Kombinationsindex ermöglicht die näherungsweise Differenzierung zwischen additiven, synergistischen oder antagonistischen Wirkungen einer Arzneimittelkombination anhand einer Dosis-Wirkungs-Kurve für die einzelnen Wirkstoffe und die kombinierte Behandlung. Zur Bestimmung der Dosis-Wirkungs-Kurve wurden vier Dosierungen für Metformin (3 × 0,01mM/Tag; 0,1mM; 1mM und 10mM) bzw. drei Dosierung für Diclofenac (0,05mM; 0,1mM und 0,2mM) sowie entsprechende Arzneimittelkombinationen (3 × 0,01mM/Tag + 0,05mM; 3 × 0,01mM/Tag + 0,1mM; 3 × 0,01mM/Tag + 0,2mM; 0,1mM + 0,05mM; 0,1mM + 0,1mM; 0,1mM + 0,2mM, 1mM + 0,05mM; 1mM+ 0,1mM und 1mM + 0,2mM) verwendet[32].

1.2.10. Immunzytochemie

„4′,6-Diamidin-2-Phenylindol“ (DAPI), Nestin, „sex determining region Y-box 2“ (SOX-2), Monocarboxylat-Transporter (MCT)-1 und MCT-4 wurden immunzytochemisch untersucht. Nach Aussaat von 2–5 × 10^5 bzw. 5–10 × 10^3 (U87) Zellen/Zellkulturgefäß und 48-stündiger Behandlung mit o.g. Wirkstoffen und entsprechenden Kontrollen wurden die Überstände entfernt und die Zellen mit 4% Paraformaldehyd (441244, Sigma-Aldrich) fixiert. Nach Waschgängen und Zugabe von Blockierungspuffer (PBS, 10% Eselserum Nr. S30-100, Merck-Millipore, 1% BSA Nr. 82-100-6, Merck-Millipore, 0,1% Triton X-100 Nr. T8787) , Sigma Aldrich) wurden die Deckgläser mit primären Antikörpern (Maus-Anti-Nestin # MAB5326, Merck-Millipore, 1: 500; Ziegen-Anti-Sox-2 # sc-17320, Santa Cruz, 1: 500; Maus-Anti-MCT-1 # sc-365501, Santa Cruz, 1:50;

Kaninchen-Anti-MCT-4 # sc-50329, Santa Cruz, 1:50) über Nacht bei 4°C inkubiert, anschließen erneut gewaschen und für eine Stunde mit sekundären Antikörpern (Alexa Fluor® 568 Esel Anti-Maus # A-10037, Life Technologies, 1: 500; Alexa Fluor® 488 Esel Anti-Kaninchen # A-21206, Life Technologies, 1: 1000; Alexa Fluor® 488 Esel) Anti-Ziege Nr. A-11055, Life Technologies, 1: 1000) und DAPI (Nr. D9542, Sigma-Aldrich, 1: 1000) zur Kernfärbung inkubiert und nach weiteren Waschgängen mit Prolong Gold (Nr. P96930, Invitrogen) fixiert. Die Fluoreszenzmikroskopie wurde mithilfe des Zeiss Axio Observer.Z1-Mikroskops (Visitron Systems GmbH) durchgeführt.

1.2.11. Statistik

Die Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen (Mittelwerte und SDs) wurden mittels two way-ANOVA mit dem Tukey-Test in einem 95% -Konfidenzintervall bestimmt (p=0,0332 (*), p=0,0021 (**), p=0,0002 (***), p=<0,0001 (****)). Nach Normalisierung auf den Nullwert wurde jede Behandlung/Kontrolle mit jeder anderen Behandlung/Kontrolle verglichen. Die Daten wurden mit der GraphPad Prism-Software (Version 6 und 7, GraphPad Software, USA) analysiert und graphisch dargestellt.

1.3. Ergebnisse

1.3.1. BTICs exprimieren Nestin und SOX

Es wurde gezeigt, dass Nestin, oft in Kombination mit SOX und anderen Stammzellmarkern, auf tumorinitiierenden Zellen unterschiedlicher Entität exprimiert wird und als Marker für stammzelltypische Eigenschaften, wie zum Beispiel Selbsterneuerung und die Fähigkeit zur Tumorbildung, dient[33,34]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde BTIC-18 positiv für beide Marker getestet, während BTIC-13 vorrangig Nestin exprimiert (Abbildung SL2).

1.3.2. Die kombinierte Behandlung mit Metformin und Diclofenac schränkt Zellproliferation und -migration ein

Mögliche proliferations- sowie migrationshemmende Effekte der entsprechenden Kontrollmedien (Medium und Dimethylsulfoxid (DMSO)) wurden ausgeschlossen

(Abbildung SL3). Die zellteilungs- und migrationshemmende Wirkung einer hochdosierten Metformin- bzw. Diclofenacbehandlung (Metformin 10mM, Diclofenac 0,2mM) konnte bestätigt werden[13,35]. Um zu überprüfen, ob durch eine Kombination beider Substanzen in geringeren Dosierungen ähnliche Effekte erzielt werden können, wurden Proliferations- und Migrationsassays mit unterschiedlichen Dosiskombinationen beider Medikamente durchgeführt (Metformin: 3x0,01mM/Tag; 0,1mM; 1mM; Diclofenac: 0,05mM; 0,1mM; 0,2mM; Abbildung SL4). Im Vergleich zur Kontrollbehandlung führte die Kombination aus 1mM Metformin und 0,2mM Diclofenac in allen untersuchten Zelllinien zu einer signifikant reduzierten Zellproliferation. Verglichen mit einer Monobehandlung Metformin konnte eine signifikante Effektsteigerung bei BTICs sowie den Zelllinien nachgewiesen werden. Bei BTIC-13, -11 und U87 war der antiproliferative Einfluss mit der hochdosierten Metforminbehandlung vergleichbar und sogar ausgeprägter (Abbildung SL5).
Im Vergleich zur hochdosierten Diclofenacbehandlung konnte bei BTIC-11 und -13 durch die Kombinationsbehandlung eine signifikante Reduktion der Zellteilungsrate gezeigt werden (Abbildung 1).

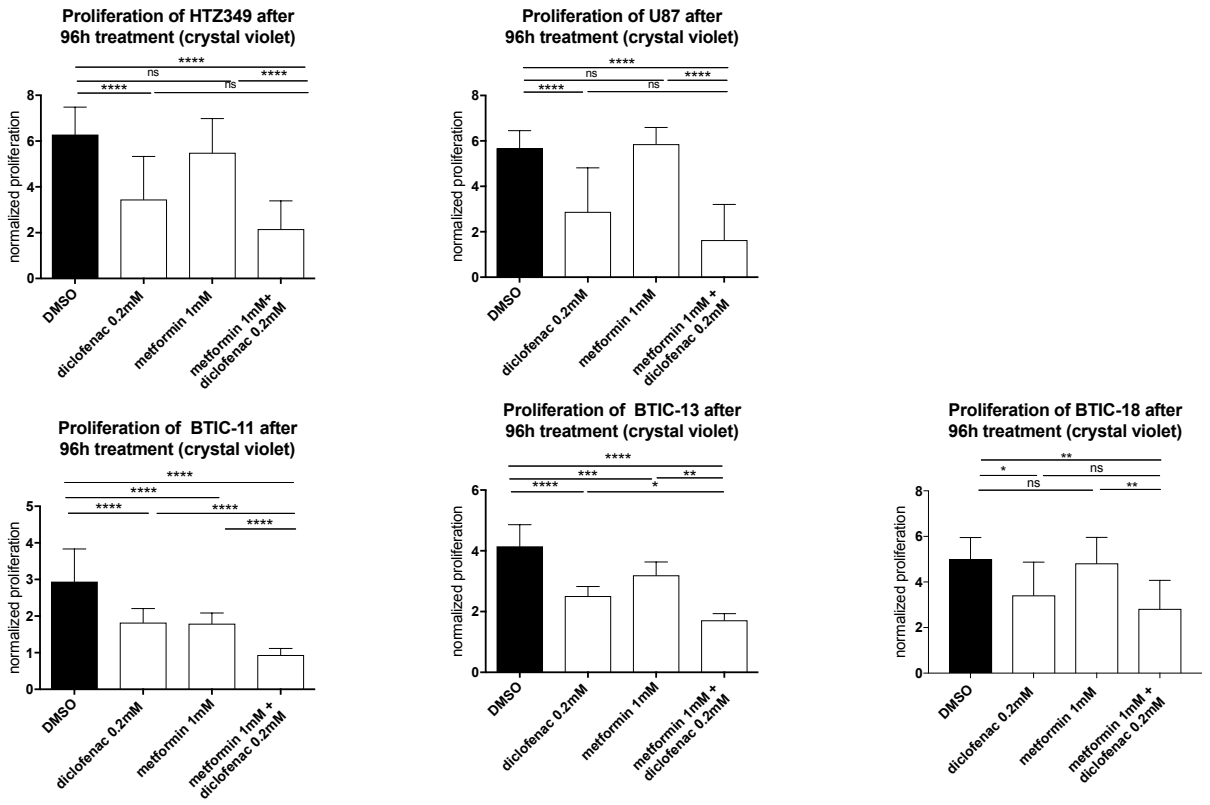
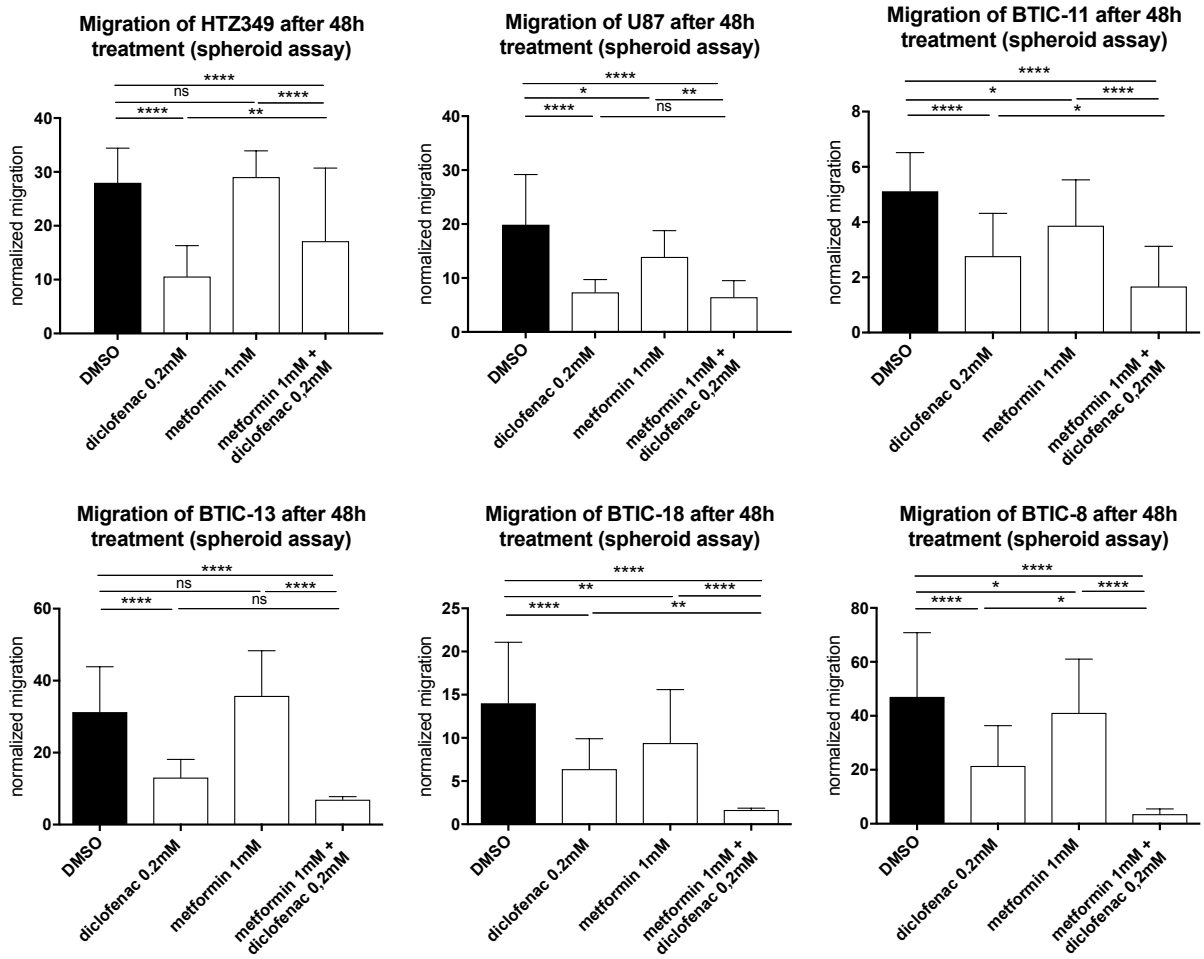


Abbildung 1

Die Auswirkungen von Metformin, Diclofenac und beiden Wirkstoffen auf Proliferation wurden unter Verwendung einer Kristallviolettfärbung nach 96 Stunden untersucht. Die Ergebnisse sind als Mittelwert ± Standardabweichung angegeben und wurden durch two way-ANOVA analysiert und paarweise verglichen, d.h. Metforminbehandlung vs. Kombinierte Behandlung, (p = 0,0332 (*), p = 0,0021 (**), p = 0,0002 (***), p ≤ 0,0001 (****).

Migrationshemmende Effekte der kombinierten Behandlung wurden bei sämtlichen untersuchten Zellen festgestellt. Bei BTIC-8, -11 und -18 wurde die Zellmigration durch die kombinierte Behandlung im Vergleich zu den Einzelbehandlungen signifikant eingeschränkt. Bei BTIC-13 und U87 war die Kombination aus Metformin und Diclofenac effektiver als die hochdosierte Metformin-Behandlung (Abbildung 2, SL5).



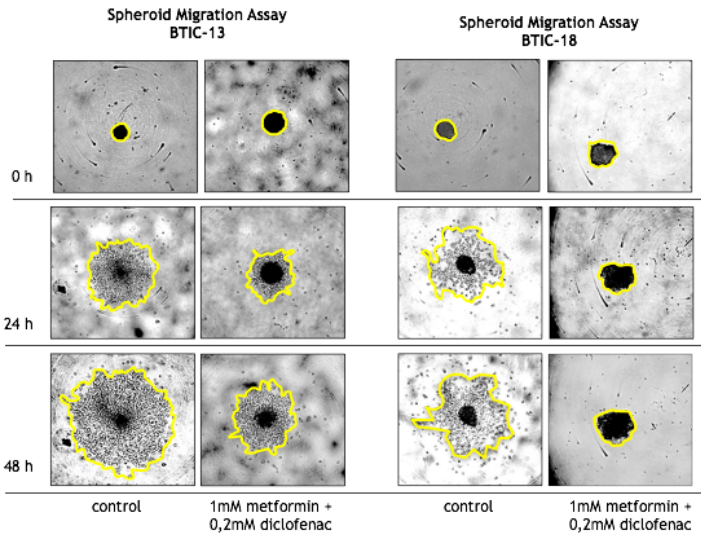


Abbildung 2

Es wurden Sphäroid-Assays verwendet, um die migrationshemmenden Wirkungen zu nach 48 Stunden nachzuweisen. Die Ergebnisse sind als Mittelwert ± Standardabweichung angegeben und wurden durch two way-ANOVA analysiert und paarweise verglichen, d.h. Metforminbehandlung vs. Kombinierte Behandlung, (p = 0,0332 (*), p = 0,0021 (**), p = 0,0002 (***), p ≤ 0,0001 (****).

Der Kombinationsindex wurde mithilfe der CompuSyn-Software entsprechend der Programmempfehlungen berechnet. Ein KI<1 impliziert hierbei synergistische Effekte, KI=1 additive Effekte und KI>1 antagonistische Effekte. Bei der Berechnung des

Kombinationsindex wurden alle getesteten Dosiskombinationen berücksichtigt. Während die Kombinationen aus niedrig dosiertem Metformin und Diclofenac weder Proliferation und Migration signifikant beeinflussten (insbesondere bei den BTICs, Abbildung SL4), ließen sich mit Hilfe des Kombinationsindex sowohl bei den Tumorzelllinien (HTZ349 KI=0.83 und U87 KI=0.79) als auch bei den BTICs (BTIC-13 KI=0,95, BTIC-18 KI=0,77, BTIC-11 KI=0,99 und BTIC-8 KI= 0,74) synergistisch-antiproliferative Effekte nachweisen. Eine synergistische Migrationshemmung zeigte sich in allen getesteten Zellen mit Ausnahme von BTIC-13 (HTZ349 KI=0,38, U87 KI=0,56, BTIC-13 KI=>1, BTIC-18 KI=0,68, BTIC-11 KI=0,62 und BTIC-8 KI=0,17, Tabelle 1).

	CI-proliferation	**CI-migration**	**effect- proliferation**	**effect- migration**
HTZ349- laminin	0.83699	0.38254	synergistic	synergistic
BTIC-13-laminin	0.95719	>1	synergistic	antagonistic
BTIC-18- laminin	**0.77541**	0.68924	synergistic	synergistic
U87- laminin	0.7953	0.56451	synergistic	synergistic
BTIC-11-laminin	0.99912	0.62748	synergistic	synergistic
BTIC-8+laminin	0.74232	0.17014	synergistic	synergistic

Tabelle 1

Kombinationsindex (CI) berechnet mit der CompuSyn-Software. CI <1indiziert synergistische Effekte, CI = 1 additive Effekte und CI> 1 antagonistische Effekte.

1.3.3. Metformin, Diclofenac und die gering dosierte kombinierte Behandlung haben keine zytotoxischen Effekte

Wird die Zellproliferation mithilfe des Kristallviolettassays quantifiziert, kann das Ergebnis durch unterschiedliche Hafteigenschaften der entsprechenden Zellen beeinflusst werden. Zum einen können die erforderlichen Waschschritte zu einem Verlust nicht-adhäsiver vitaler Zellen führen, andererseits können Zellen mit ausgeprägter Haftkraft auch im avitalen Zustand verbleiben. Aus diesem Grund wurde die Kristalviolettfärbung mit und ohne Lamininbeschichtung durchgeführt und durch einen Zellzytotoxizitätstest ergänzt. Laminin fungiert als extrazelluläres Matrixglykoprotein und Hauptbestandteil der Basallamina, das Adhäsion und Zellproliferation unterstützt. Nach Lamininbeschichtung war das Ansprechen auf die

Behandlung weniger stark ausgeprägt, was einen Einfluss der Zelladhäsion auf die Behandlungsempfindlichkeit impliziert. Dies ließ sich insbesondere bei den BTICs darstellen.

Da BTIC-8 nahezu ausschließlich sphäroides Wachstumsverhalten zeigt, konnte die Proliferation nur mit Lamininbeschichtung untersucht werden (Abbildung SL6).

Um zytotoxische Behandlungseffekte auszuschließen, wurde ein LDH-Zytotoxizitätstest ergänzt. Verglichen mit den Kontrollen wurde nach 48-stündiger Behandlung kein signifikanter Anstieg der LDH-Aktivität gemessen (Abbildung SL7).

Zusammengefasst kann ein Einfluss der Behandlungen mit Metformin, Diclofenac und der Wirkstoffkombination auf die Adhäsionseigenschaften der Zellen nicht ausgeschlossen werden, zusätzlich zytotoxische Effekte waren nicht nachweisbar.

1.3.4. Die Kombination aus Metformin und Diclofenac senkt die extrazellulären Laktatspiegel im Vergleich zur Metforminbehandlung

Die Auswirkungen auf den Sauerstoffverbrauch sind von den jeweiligen Zellen abhängig

Wir konnten bestätigen, dass hochdosiertes Metformin (10 mM) den Sauerstoffverbrauch von BTICs und TCs bereits vor Eintreten ersichtlicher antiproliferativer Effekten senkt (Abbildung SL8). Die extrazellulären Laktatwerte waren nach 48-stündiger Exposition zwischen 2,5 und 10-mal höher als in der Mediumkontrolle (Abbildung SL9).

Die extrazellulären Laktatspiegel wurden außerdem zu einem frühen Zeitpunkt getestet: Im Vergleich zur Kontrolle waren diese nach 24-stündiger Behandlung mit einer geringen Dosis Metformin (1 mM) viermal höher. Anschließend wurden die Auswirkungen einer Diclofenac-bzw. einer Kombinationsbehandlung auf die extrazelluläre Laktatkonzentration und den Sauerstoffverbrauch untersucht. Im Vergleich zur DMSO-Kontrolle war nach 24-stündiger Diclofenac-Behandlung eine tendenziell verringerte, allerdings nicht signifikant reduzierte Laktatkonzentration festzustellen. Die Kombination aus Metformin und Diclofenac wirkte dem extrazellulären Lactatanstieg und dem damit einhergehenden pH-Abfall entgegen, der unter alleiniger Behandlung mit Metformin zu beobachten war (Abbildung 3, Abbildung SL9, beispielhaft dargestellt für U87).

Die Auswirkungen auf den Sauerstoffverbrauch nach Einzel- und Kombinationsbehandlung waren heterogen. Die Metforminbehandlung führte verglichen mit der DMSO-Kontrolle zu einem reduzierten Sauerstoffverbrauch in BTICs und TCs, wobei dosisabhängige Effekte gezeigt werden konnten. Nach Diclofenacbehandlung zeigten BTIC-11 einen geringeren Sauerstoffverbrauch, U87 und BTIC-13 hingegen einen erhöhten Verbrauch, bei HTZ349 und BTIC-18 war keine eindeutige Veränderung zu detektierten. Die kombinierte Behandlung senkte den Sauerstoffverbrauch bei HTZ349, U87, BTIC-13 und BTIC-11. Nach 20 Stunden war

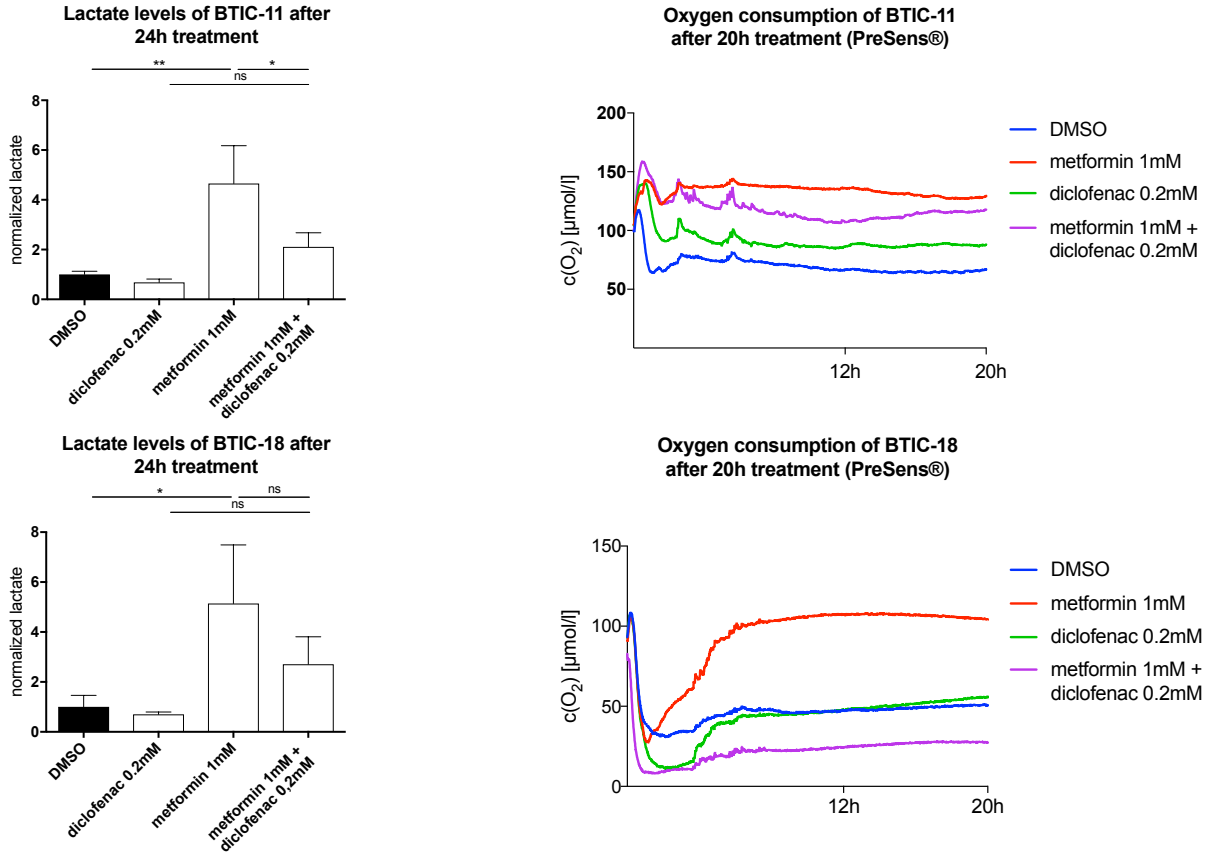


Abbildung 3

Extrazelluläre Laktatspiegel nach 24-stündiger Behandlung
Die Sauerstoffkonzentration in den Zellkulturen wurde mit dem SDR SensorDish Reader (PreSens Precision Sensing, Regensburg, Deutschland) für 20 Stunden gemessen. Die Zellen wurden unter Berücksichtigung ihres stereotypen Sauerstoffverbrauchs in unterschiedlichen Mengen ausgesät. Die Messungen wurden in 60-Sekunden-Intervallen durchgeführt. Die Ergebnisse sind als Mittelwert ± Standardabweichung angegeben und wurden durch two way-ANOVA analysiert und paarweise verglichen, d.h. Metforminbehandlung vs. Kombinierte Behandlung, (p = 0,0332 (*), p = 0,0021 (**), p = 0,0002 (***), p ≤ 0,0001 (****)

die vorherrschende Sauerstoffkonzentration unabhängig von der Behandlung vergleichbar. Eine additive Hemmung der Zellatmung durch die

Kombinationsbehandlung konnte nicht gezeigt werden. Bei BTIC-18 wurde nach Kombinationsbehandlung im Vergleich zur DMSO-Kontrolle eine reduzierte Sauerstoffkonzentration gemessen, was auf einen Anstieg des Sauerstoffverbrauchs hinweist (Abbildung 3B, Abbildung SL8). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass sowohl die untersuchten Hirntumor-initiierenden Zellen, als auch die differenzierten Glioblastomzelllinien mit individuellen Rettungsmechanismen auf die kombinierte Behandlung und die damit verbundenen metabolischen Störungen reagieren.

1.3.5. Die kombinierte Behandlung hat keinen additiven Einfluss auf mTor- oder STAT3-Signalweg

Um mögliche Wirkmechanismen der unterschiedlichen Behandlungen auf Proteinebene zu näher zu betrachten, wurden mithilfe von Western Blots insbesondere diejenigen Signalwege untersucht, die bekannterweise von Metformin oder Diclofenac beeinflusst werden. Unter anderem konnte Seliger et al. zeigen, dass eine Metformin-Behandlung zu einer dosisabhängigen Aktivierung von der AMP-abhängigen Kinase (AMPK) führt[18]. Folglich, aber auch unabhängig davon, wird die Serin/Threonin-Kinase mTOR inhibiert. STAT3 wird nach Exposition mit Metformin dosisabhängig gehemmt[35]. Leidgens et al. fanden heraus, dass STAT3 (insbesondere bei TCs) durch Diclofenac inaktiviert wird[29].

Die dosisabhängige Deaktivierung von mTOR und STAT3 durch Metformin konnte sowohl bei TCs als auch bei BTICs reproduziert werden (Abbildung 4). Die Behandlung mit Diclofenac hatte keinen Einfluss auf den Aktivitätszustand von mTOR. Nach kombinierter Behandlung mit beiden Wirkstoffen waren die pmTOR-Spiegel ähnlich denen nach Behandlung mit 1 mM Metformin. Bei BTIC-13 führte die Kombinationsbehandlung zu einer Inaktivierung von mTOR (Abnahme von pmTOR), die mit der Wirkung von hochdosiertem Metformin (10 mM, Abbildung 4) vergleichbar war. Bei U87 bewirkte Diclofenac eine Inaktivierung von STAT3, wohingegen in den anderen getesteten Zellen die pSTAT3-Spiegel im Vergleich zur DMSO-Kontrolle keine signifikanten Veränderungen zeigten. Bei U87, BTIC-13 und BTIC-18 führte die kombinierte Behandlung mit Metformin und Diclofenac tendenziell zur Deaktivierung von STAT3 (Abnahme von pSTAT3), ohne Signifikanz zu erreichen. Im Vergleich zu

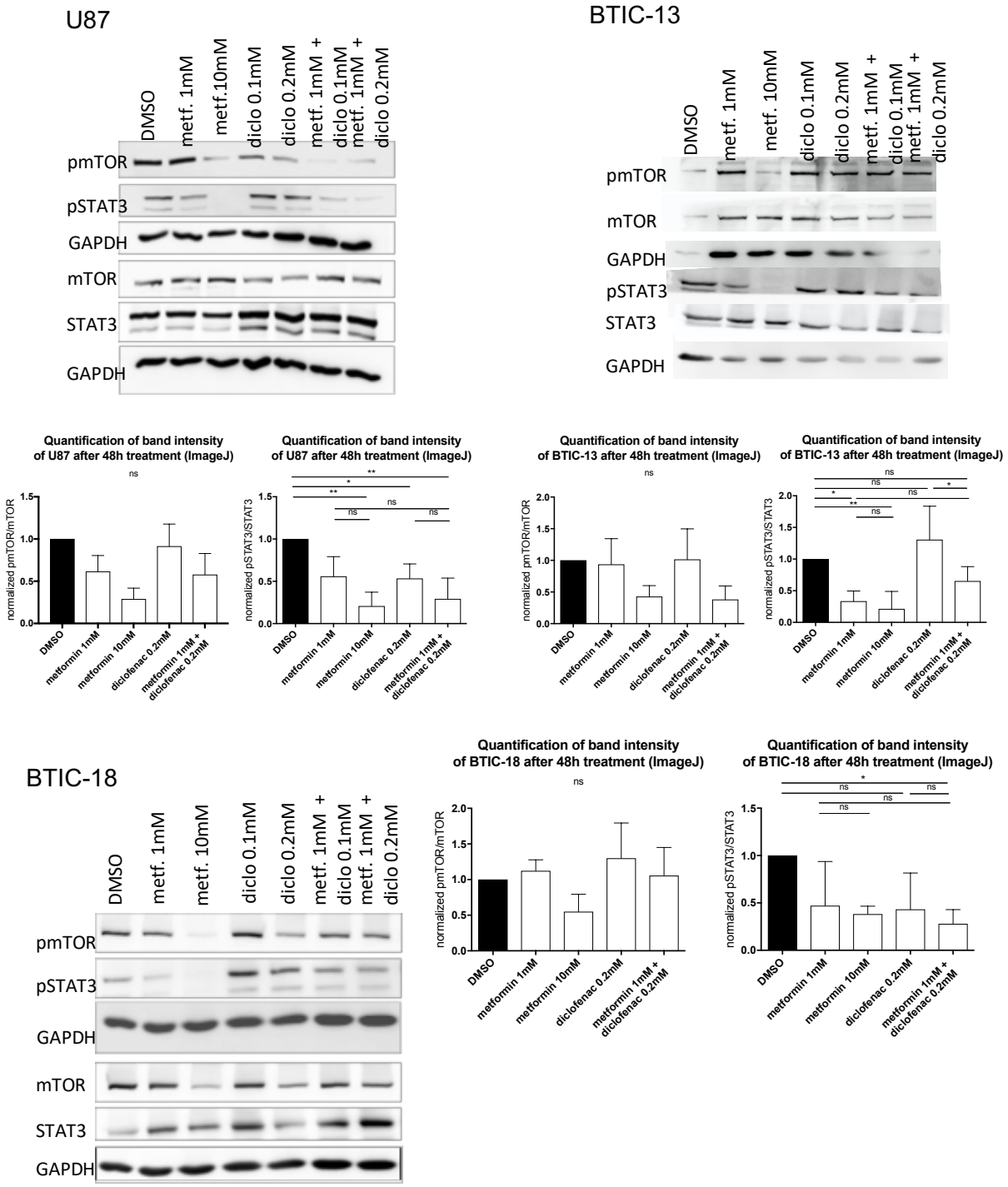


Abbildung 4

(p) mTOR, (p) STAT3 und GAPDH wurden in einer Western-Blot-Analyse unter Verwendung spezifischer monoklonaler Antikörper für STAT3, phosphoryliertes STAT3 (pSTAT3), mTOR, phosphoryliertes mTOR (pmTOR) (alle Cell Signaling, New England Biolabs GmbH, Frankfurt, Deutschland) und GAPDH2 (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland) in Trockenmilch (1 %) untersucht. Die Expression wurde durch Chemolumineszenz gemessen.
Die Intensität der Proteinbanden wurde mithilfe der ImageJ-Software bestimmt und Proteinmenge anhand von mindestens zwei Replikaten nach Normalisierung auf Beladungs- und Behandlungskontrolle berechnet.

den Einzelbehandlungen mit Metformin und Diclofenac konnten der Wirkstoffkombination keine additiven Effekte nachgewiesen werden.

1.4. Diskussion und Einbettung in die aktuelle Datenlage

1.4.1. Metformin als Therapeutikum in der Onkologie- epidemiologische und präklinische Erkenntnisse

In einer Vielzahl epidemiologischer Studien konnte eine Metforminexposition mit einem reduzierten Risiko an verschiedene Krebsarten, wie Leber-, Darm-, Bauchspeicheldrüsen-, Magen- und Speiseröhrenkrebs, zu erkranken, assoziiert werden[10]. Daneben existieren allerdings zahlreiche maligne Erkrankungen, die von einer Metformineinnahme offenbar nicht beeinflusst werden. Seliger et al. stellten fest, dass die Wahrscheinlichkeit, an einem Gliom zu erkranken, durch die Behandlung mit Metformin im Rahmen der Diabetes-Therapie nicht signifikant gesenkt wird[19].
Neben den epidemiologischen Zusammenhängen zwischen Metforminexposition und dem Malignomrisiko wurden in zahlreichen in vitro- und in vivo-Studien antineoplastische Wirkungen des Arzneimittels beobachtet. Betrachtet man Gehirntumor-initiierende, stammzellähnliche Zellen, inhibiert Metformin Migration und Proliferation durch Induktion von Apoptose, Autophagie und Differenzierung [12,13,15,36,37,38]. Würth et al. zeigten, dass Metformin bis zu einer Dosierung von 10mM seine antiproliferative Wirkung insbesondere auf CD 133 exprimierende BTICs ausübt, ohne dabei zytotoxisch zu wirken[12]. Vor nun mehr 20 Jahren gelang es Owen et al. nachzuweisen, dass Metformin die mitochondriale Atmungskette und dadurch die Glukoneogenese hemmt[14]. Bei BTICs ist die Inhibition von Proliferation und Migration auf eine Hemmung des Komplexes I der Atmungskette zurückzuführen[11,18]. Um zu überleben, sind die Zellen gezwungen, alternative Wege der ATP-Produktion zu aktivieren. Hierzu zählt unter anderem eine gesteigerte Glykolyse, die zu einem Absinken des pH-Wertes im Zellkulturmedium führt[37]. Die Aktivierung dieser metabolischen Rettungsmechanismen, die Entwicklung von Vorläuferzellen in differenzierte Gehirntumorzellen, sowie die Unterdrückung einer Immunreaktion werden durch die Aktivierung der AMPK[7,12,15,16,39,40] und die nachgeschaltete Inhibition von mTOR[11,13,18] reguliert. Zu berücksichtigen bleibt, dass zum Beispiel beim Plattenepithelkarzinom des Kopf-Hals-Bereichs nicht alle zellulären Subtypen mit einer AMPK-Aktivierung auf oxidativen Stress reagieren. Laut Wu et al. exprimiert eine

bestimmte Zellpopulation die NADH-Dehydrogenase, NDI1, die einer Blockade der Atmungskette und damit einer gesteigerten AMPK-Aktivität entgegenwirkt[41]. Darüber hinaus ist bekannt, dass der mTOR-Signalweg auch AMPK-unabhängig aktiviert werden kann. So konnten Liu et al. bereits 2014 eine mTOR-bedingte Inhibition des Zellwachstums bei gleichbleibender AMPK-Aktivität nachweisen[42].
Eine Behandlung mit Metformin resultiert in einer Deaktivierung von STAT3[35]. STAT3 ist für die Fähigkeit, neue Tumore zu bilden, Invasionskapazität, das Zellüberleben und Fortschreiten des Zellzyklus mitverantwortlich[43,44]. Folglich induziert Metformin Apoptose sowie Autophagie und blockiert dadurch den Tumorprogress[45–47].
Dass die Metformineinnahme in der Behandlung des Typ II Diabetes mellitus keine protektive Wirkung auf die Glominzidenz zeigt, könnte durch unterschiedliche molekulare Mechanismen erklärt werden, die im Rahmen einer therapeutisch-onkologischen Anwendung in höherer Dosierung zum Tragen kommen. Die Federal Drug Administration (FDA) empfiehlt für die tägliche Behandlung des Typ II Diabetes mellitus eine Dosis von bis zu 2550 mg Metformin pro Tag (https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2017/020357s037s039,021202s021s023lbl.pdf). Mit dieser Dosierung können Wirkstoffkonzentrationen von etwa 40 µM in der Pfortader und im Liquor bzw. nach Überwinden der Bluthirnschranke 10 µM in der Hirnmasse erreicht werden. In Mausmodellen mit Langzeit-Metformin-Konsum konnte im Serum eine Wirkstoffkonzentration von bis zu 5 mM gemessen werden, was die Lebensdauer der Mäuse verlängerte[48–50]. In den meisten früheren in vitro-Studien wurde Metformin allerdings in noch höheren Dosierungen verwendet[38]. Einige Autoren argumentieren, dass den beschriebenen Effekten, insbesondere im Hinblick auf eine mögliche antineoplastische Anwendung, unterschiedliche Wirkmechanismen zu Grunde liegen, die zwar einzeln betrachtet nicht ausreichend effektiv sind, aber summiert unter Voraussetzung einer entsprechenden Dosierung im Rahmen einer tumorspezifischen Therapie die gewünschte Wirkung erzielen könnten.

1.4.2. Metformin in der Kombinationstherapie mit klassischen Chemotherapeutika

In der Fachinformation zu Metformin werden Übelkeit, Erbrechen, Durchfall, Abdominalschmerz und Appetitlosigkeit als die häufigsten Nebenwirkungen aufgezeigt. Als schwerwiegende Komplikationen werden die Laktatazidose, die

insbesondere im Zuge einer akuter Nierenfunktionsverschlechterung auftritt, sowie in seltenen Fällen ein Vitamin B12- Mangel genannt (siehe z.B. https://www.hexal.biz/praeparate/dokumente/fi/metformin_hx_fi.pdf).

Um die Dosis eines einzelnen Medikaments und damit auch potenzielle Nebenwirkungen zu reduzieren, wird Metformin mit verschiedenen pharmakologischen Partnern kombiniert und vor allem zusammen mit klassischen Chemotherapeutika angewandt. Metformin und Temozolomid, ein alkylierendes Chemotherapeutikum, das nach dem Stupp-Protokoll ein fester Bestandteil in der systemischen Glioblastomtherapie ist [51], hemmen synergistisch die Proliferation von Gehirntumor-initiierenden und differenzierten Gliomzellen in vitro und in vivo. Valtorta et al. beschrieben, dass die Kombination aus Metformin und Temozolomid die Resistenzbildung beim Glioblastoma multiforme reduziert[52]. Derzeit werden mehrere klinische Studien durchgeführt, in denen ein möglicher Nutzen von Metformin in Kombination mit den klassischen Therapien (Temozolomid, Radiotherapie) in unterschiedlicher Therapiesequenz untersucht wird (u.a. NCT01430351, NCT02149459, NCT02780024, NCT03243851, NCT03151772, https://clinicaltrials.gov).

Nach Aldea et al. wirkt Metformin in Kombination mit Sorafenib selektiv antiproliferativ auf BTICs und differenzierte Glioblastomzellen, wobei Sorafenib als Zytostatikum auch die Proliferation gesunder Zellen beeinflusst[53]. In verschiedenen Arbeiten ließ sich nachweisen, dass die antiproliferative Wirkung auf Tumorzellen unterschiedlicher Entität durch die Kombination von Metformin mit klassischen Chemotherapeutika verstärkt werden kann. Zhu et al. beispielsweise behandelten Cholangiokarzinomzellen mit Metformin und Gemcitabine oder Cisplatin, Peng et al. verwendeten das Biguanid in Kombination mit Gefitinib beim Urothelkarzinom der Blase und Harada et al. zeigten, dass Metformin in Kombination mit 5-FU den Progress beim Plattenepithelkarzinom unterschiedlicher Lokalisation verlangsamt [54–56]. In den oben aufgeführten Experimenten wurde größtenteils eine Dosis von 1mM Metformin verwendet, die im Vergleich zur antidiabetischen Therapie als „hohe Dosierung“ betrachtet werden kann, da die mitochondriale Atmungskette in gesunden Hepatozyten bereits ab einer Dosis von 50–100 µM inhibiert wird[14,57].

1.4.3. Metformin als Kombinationspartner in der Modulation des Tumormetabolismus

Als weitere mögliche Kombinationspartner werden Wirkstoffe diskutiert, die, ähnlich wie Metformin, in den Metabolismus der Krebszelle eingreifen.

1956 stellte Otto Warburg fest, dass maligne entartete Zellen die benötigte Energie trotz ausreichender Sauerstoffversorgung hauptsächlich über die Glykolyse generieren. Dieser metabolische Wechsel vom oxidativen zum glykolytischen Weg der ATP-Erzeugung wird heute als „Warburg-Effekt“ bezeichnet[58]. Da als Reaktion auf eine Metformin-Exposition Glykolyse und folglich Laktatproduktion verstärkt aktiviert werden, scheinen Inhibitoren dieser Stoffwechselwege geeignete pharmakologische Kombinationspartner zu sein.

Dichloracetat (DCA) beispielsweise wirkt als Inhibitor der Pyruvatdehydrogenasekinase (PDK) dem beschriebenen Warburg-Effekt entgegen und zwingt die Zellen zur ATP-Produktion über die mitochondriale Zellatmung. Folglich kann die Zelle zum einen nicht ausreichend Energie zur Verfügung stellen, zum anderen wird weniger Laktat produziert, was einer für das Tumorwachstum und Invasionsvermögen erforderlichen Azidose im Tumorgewebe gegensteuert. Letztendlich kommt es zur vermehrten Bildung proapoptotischer Faktoren und damit zum Zelltod[59]. Kolesnik et al. konnten zeigen, dass DCA in Kombination mit Metformin im Vergleich zur Monotherapie die Glukoseaufnahme in Gliomzellen hemmt, Apoptose induziert und die Lebensfähigkeit der Zellen um bis zu 40% reduziert[60]. Jiang et al. kombinierten Phenformin, ein stark wirksames Metforminanalogon mit nachgewiesenen antitumorösen Eigenschaften, mit DCA und konnte in vitro synergistisch-zytotoxische Effekte auf Gliomstammzellen nachweisen, im Mausmodell führte eine niedrigdosierte Kombination zu einem Vorteil im Gesamtüberleben verglichen mit den Monotherapien[61].

Ähnlich hierzu wird eine kombinierte Therapie aus Metformin und Deoxyglukose diskutiert. Deoxyglukose ist ein verändertes Glukosemolekül, bei dem eine Hydroxygruppe durch eine Hydrogengruppe ersetzt wurde. Die Substanz inhibiert die Glykolyse und verhindert dadurch den Warburg-Effekt. Im Rahmen mehrerer präklinischer Arbeiten konnten unter anderem Kim et al. beim Glioblastom eine Wirkverstärkung durch die kombinierte Therapie im Vergleich zur Monotherapie nachweisen[62–65].

Saber et al. zeigten, dass Metformin in Kombination mit 5-Aminosalicylacid die Proliferationsrate von Darmkrebs- und Melanomzellen senkt. Metformin kombiniert mit Oxamat, bekannt als Inhibitor der Laktatdehydrogenase (LDH) und damit indirekt der Glykolyse, verzögert den Tumorprogress im Mausmodell [66,67].

1.4.4. Kombinierte Modulation des Tumormetabolismus durch Metformin und Diclofenac

In dieser Arbeit wurde das häufig als Analgetikum verwendete NSAR Diclofenac als vielversprechender Kombinationspartner betrachtet. Neben seiner entzündungshemmenden und analgetischen Wirkung (www.drugs.com/pro/diclofenac.html) wurden Diclofenac und anderen NSARs antineoplastische Wirkungen durch Cyclooxygenase-abhängige (COX) und unabhängige Mechanismen nachgewiesen[24,68–70]. Unter anderem untersuchten Cha und Taketo et al. die wichtige Rolle von COX-2 und dem Produkt Prostaglandin E2 (PGE2) bei der Tumorentstehung, Angiogenese, Migration, Invasion, Tumorprogression, Hemmung der Apoptose und die hieraus resultierende inhibitorische Wirkung verschiedener NSAR[22,23,71–73]. Chirasani et al. zeigten in einem Maus-Modell, dass Diclofenac die Laktatbildung von Gliomzellen ab einer Dosis von 0,1 mM inhibiert[20]. Nach Gottfried et al. beeinflusst Diclofenac die Glukoseaufnahme und Laktatsekretion, indem es nicht nur die Expression der hierfür verantwortlichen Laktattransporter über das Myelocytomatose-Gen (MYC) verhindert, sondern auch direkt den Transport aus der Zelle hemmt[26]. Nach Sasaki et al. ist Diclofenac von den vier getesteten NSARs der wirksamste Glykolyse-Inhibitor[74].

Ein konstanter Laktatausfluss ist wichtig, um intrazelluläre Übersäuerung zu vermeiden und eine kontinuierliche ATP-Produktion über die Glykolyse zu gewährleisten, die grundsätzlich auf einem Konzentrationsgradienten von Laktat und Protonen zwischen intra- und extrazellulärem Kompartiment beruht[75].

Ein epidemiologischer Zusammenhang zwischen der Einnahme von NSARs und einem reduzierten Gliomrisiko konnte bisher nur im Rahmen einer Metaanalyse hergestellt werden[76]. Die einzeln zu diesem Thema durchgeführten retrospektiven Studien zeigten keine Senkung der Gliominzidenz durch entsprechende Medikation[77–79].

Da Veiga Moreira et al. konnten 2019 die genannte These anhand einer präklinischen Arbeit beim Lungenkarzinom (LL2, „Lewis lung cancer“) untermauern und den Benefit einer metabolischen Kombinationstherapie nachweisen. Hier wurden die Auswirkungen einer Therapie mit METABLOC in Kombination mit Metformin und Diclofenac untersucht. METABLOC ist ein Kombinationspräparat bestehend aus dem Pyruvatdehydrogenase-Inhibitor alpha-Liponsäure (ALA) und dem ATP-Citratlyase-Inhibitor Hydroxycitrat (HCA), die eine entscheidende Rolle in den metabolischen Anpassungsprozessen der Krebszellen spielen. Durch Hemmung der Glykolyse und des Laktatefflux inhibiert die Kombination mit hochdosierten Metformin (25mg/KG) und Diclofenac das Tumorwachstum in vitro sowie in einem Wachstumsmodell signifikant[80]. Dabei konnte Effekte dargestellt werden, die bis zu zweifach stärker als eine klassische Systemtherapie mit Cisplatin waren.

Zum ersten Mal konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass Metformin in Kombination mit Diclofenac Proliferation und Migration in primären Hirntumor-initiierenden Zellen und humanen Gliomzellen hemmt.

Im Versuchsaufbau mit Lamininbeschichtung waren die antiproliferativen Effekte bei den BTICs im Vergleich zu den differenzierten Tumorzellen schwächer ausgeprägt. Laminin beeinflusst als Bestandteil der extrazellulären Matrix nicht nur die Zelladhäsion, sondern verändert auch die Stammzelleigenschaften tumorinitiierender Zellen. Qin et al. untersuchten die Rolle des extrazellulären Matrixproteins als Regulator für stammzellähnlicher Eigenschaften, wie zum Beispiel den epithelial-mesenchymalen Übergang, Dedifferenzierung und metastatisches Potenzial, sodass auch in diesem Versuchsaufbau eine mögliche Veränderung stammzellähnlichen Eigenschaften durch die Zugabe von Laminin nicht ausgeschlossen werden kann[81,82]. Hierzu passend konnte nachgewiesen werden, dass die Proliferation von U87 und HTZ349 als differenzierte Gliomzellen unabhängig von einer Lamininzugabe war. Darüber hinaus kann ein Einfluss der künstlich erzeugten Einzelzellschicht normalerweise sphäroid wachsender Zellen auf zelluläre Programme für Proliferation, Migration und Adhäsion nicht ausgeschlossen werden.

Eine gesteigerte LDH-Aktivität wurde unabhängig von der Behandlung nicht festgestellt, sodass zytotoxische Behandlungseffekte ausgeschlossen werden konnten und damit die Möglichkeit, dass ein stärkeres Therapieansprechen ohne Laminin auf vermehrten Zelltod und den damit verbundenen Adhäsionsverlust zurückzuführen ist.

Wir konnten bestätigen, dass Metformin den zellulären Sauerstoffverbrauch senkt und die extrazellulären Laktatspiegel erhöht. Dies kann als Hinweis auf die zunehmende Energiegewinnung mittels Glykolyse als metabolischer Rettungsmechanismus interpretiert werden.

Diclofenac führt zu einer geringfügigen Reduktion der Laktatkonzentration im extrazellulären Medium. Im Vergleich zu früheren Arbeiten, die die Hemmung der Laktatproduktion durch NSARs untersuchten, war die Laktat-senkende Effekt durch Diclofenac in dieser Arbeit deutlich schwächer ausgeprägt. Dies könnte durch die Tatsache begründet werden, dass BTICs insbesondere in einer sauerstoffreichen Zellkultur auf die mitochondriale ATP-Produktion angewiesen sind und die glykolytische Energiegewinnung, anders als bei differenzierten Tumorzellen, nur eine untergeordnete Rolle spielt. Im Einzelnen betrachtet zeichnet sich vor allem BTIC-18 durch einen hohen Sauerstoffverbrauch aus. Dementsprechend führte die Behandlung mit Metformin bei diesen Zellen zu einer starken Hemmung des Sauerstoffkonsums, während Diclofenac die extrazellulären Laktatspiegel nicht signifikant veränderte. Die Kombination beider Medikamente reduzierte die extrazellulären Laktatspiegel im Vergleich zur Monobehandlung mit Metformin.

Auf Signalwegebene führte die kombinierte Behandlung bei der differenzierten Gliomzelllinie zu einer STAT3-Deaktivierung (Abnahme der pSTAT3-Spiegel), wohingegen bei den BTICs der Aktivierungszustand von STAT3 im Vergleich zur Einzelbehandlung keine signifikanten Änderungen zeigte.

Zusammenfassend liefert diese Arbeit Daten, dass eine Kombination aus erhöhten intrazellulären Laktatspiegeln durch Hemmung der mitochondrialen Zellatmung und Blockade der Glykolyse in additiv antiproliferativer und -migratorischer Wirkung auf BTIC- und Gliomzelllinien resultiert. Diese Effekte lassen sich hierbei nicht ausreichend anhand der typischerweise von Metformin beeinflussten Signalwege erklären. Da derzeit angenommen wird, dass Diclofenac die extrazellulären Laktatspiegel nicht nur durch direkte Hemmung der zuständigen zellwandständigen Transporter, sondern auch über eine veränderte Genexpression senkt, sind weitere Studien erforderlich, um mögliche additive Effekte auf Ebene dieser Signalwege zu untersuchen. Insbesondere Signalwege, die an Migration und Metastasenbildung beteiligt sind, wie zum Beispiel „nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells“ (NF-κB) oder SMAD, sollten genauer betrachtet werden.

BTICs können anhand des genetischen Expressionsprofils in verschiedene Subtypen unterteilt werden. Hierbei können proliferative von zur Migration tendierenden Populationen unterschieden werden[83–85]. Diese verschiedenen Subtypen könnten auf unterschiedliche Weise auf die in dieser Arbeit verwendete Wirkstoffkombination reagieren. Aus der menschlichen Nabelschnur isolierte mesenchymale Stammzellen zeigten nach einer Behandlung mit 50 mM Metformin beispielsweise eine nur um 20% reduzierte Lebensfähigkeit[12]. Nach Seliger et al. scheint insbesondere der proneurale Subtyp von einer Metformineinnahme zu profitieren[86].

Seliger et al. konnten nachweisen, dass Metformin im Rahmen einer Diabeteserkrankung zu einer Verlängerung des progressionsfreien und des Gesamtüberlebens bei Patienten mit hochgradigen Gliomen führt (WHO III)[86]. In einer gepoolten Analyse dreier prospektiver multizentrischer klinischer Studien, in der der Einfluss einer Metformineinnahme auf das Outcome von Patientin mit neu diagnostiziertem Glioblastom (WHO IV) untersucht wurde, wurden diesbezüglich keine signifikanten Unterschiede festgestellt. So scheinen insbesondere Grad III- Gliome von einer Metformineinnahme zu profitierten, was unter anderem durch den IDH1-Mutationsstatus der Gliomzellen erklärt werden kann. IDH1-Mutationen bedingen über die Transformation von Ketoglutarat zu Hydroxyglutarat und damit eine Funktionsstörung Ketoglutarat-abhängiger Enzyme eine DNA-Hypermethylierung und Aktivierung von Onkogenen[90–92]. Da Glioblastome nur in etwa 5% der Fälle eine IDH1-Mutation aufweisen, ist bei dieser Patientengruppe ein weniger ausgeprägter Benefit zu erwarten. Des weiteren muss Augenmerk auf die Tatsache geworfen werden, dass primäre Hirntumoren, die unter Metformineinnahme entstanden sind, bereits entsprechende Resistenzmechanismen entwickelt haben könnten.[86]

Um mögliche Unterschiede in den Behandlungseffekten abhängig von den oben aufgeführten zellulären Subtypen zu untersuchen, sind weitere Projekte notwendig.

1.4.5. Metformin im Gesamtkontext der Systemerkrankung „Krebs“

Darüber hinaus muss bedacht werden, dass Metformin, insbesondere in Kombination mit Diclofenac, im menschlichen Organismus nicht nur über einen einzigen biochemischen Stoffwechselweg agiert.

In präklinischen Studien und insbesondere im Rahmen von in vitro- Experimenten können die systemischen Effekte einer Therapie nicht ausreichend untersucht werden.

In therapeutischen Dosierungen kann das Risiko einer Laktatkrise relevanter sein als in der Behandlung von Diabetikern. Die Wirkungen von Metformin können abhängig von der Expositionsdauer variieren, die in diesem experimentellen Setting nicht weiter beachtet wurden[87,88]. Um den genauen Wirkmechanismus der Kombinationsbehandlung und zusätzliche Auswirkungen auf die Tumorumgebung, einschließlich Angiogenese und Immunsystem, sowie auf den gesamten (menschlichen) Körper zu untersuchen, werden in vivo-Modelle sowie klinische Studien benötigt.

Ganzheitlich betrachtet, darf zum Beispiel die primär antihyperglykämische Metforminwirkung im Gesamtkontext einer Krebserkrankung, deren Voranschreiten unter anderem durch eine kontinuierliche Hyperglykämie begünstigt wird, nicht vernachlässigt werden. Insbesondere im Rahmen einer fortgeschrittenen Gliomerkrankung ist eine symptomorientierte Steroidtherapie selten verzichtbar und oftmals ursächlich für erhöhte Blutglukosespiegel. Bereits 2013 gelang es Welch et al. zu zeigen, dass in einer entsprechenden Situation die regelmäßige Metformineinnahme einer Hyperglykämie entgegenwirken und zu einer Verbesserung des Outcomes beitragen kann[89].

Metformin hat zudem immunmodulatorische Eigenschaften.

Das Biguanid beeinflusst unter anderem sogenannte Tumor-assoziierte Makrophagen (TAM) und verhindert die Ausbildung eines „antiinflammatorischen Phänotyps“. Hierbei handelt es sich um eine modifizierte Art von Makrophagen, die typischerweise in der direkten Umgebung der malignen Zellen zu finden sind und so Wachstum, Invasion und Angiogenese des Tumors unterstützen und die lokale Immunantwort unterdrücken[93–97].

In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass Metformin AMPK-vermittelt zu einer Phosphorylierung von „programmed death-ligand-1“ (PDL-1) führt und damit den T-Zell-vermittelten Tumorzelltod begünstigt[98–100]. Checkpointinhibitoren, wie zum Beispiel Ipilimumab, Nivolumab, Pembrolizumab und Atezolizumab, sind inzwischen ein wichtiger Bestandteil in der Therapie verschiedenster Malignome mit nachgewiesener PD(L)-1-Expression und werden u.a. in der Behandlung des malignen Melanoms, des Mammakarzinom, des kleinzelligen und nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms, des Blasenkarzinoms, des Nierenzellkarzinoms, des klassischen Hodgkin-Lymphoms, des Plattenepithelkarzinoms des Kopf-Hals-Bereichs, des

Zervixkarzinom, des Hepatozellulären Karzinoms und des Magenkarzinoms eingesetzt (siehe hierzu https://www.ema.europa.eu/en/medicines).
Entsprechende Erfolge konnten in der Immuntherapie des Glioblastoms im Rahmen klinischer Studien bis zum heutigen Tag nicht erzielt werden (u.a. CheckMate 143- anti-PD1 vs Bevazizumab[101], laufende Studien: CheckMate 498- anti-PD1+ Radiotherapie vs. TMZ + RT, CheckMate 548- TMUZ + RT +/- anti-PD1). Hierfür können mehrere Eigenschaften des Glioblastoms als ursächlich betrachtet werden. Das Glioblastom bedingt eine systemische sowie intratumorale Immunsuppression [102]. So finden sich im Mikroenvironment des Glioms unter anderem die bereits beschriebenen Tumor-assoziierten Makrophagen vom sogenannten „anti-inflammatorischen“ Subtyp, die den Tumorprogress fördern und eine adäquate Immunabwehr verhindern. Aus anderen Entitäten ist bekannt, dass vor allem Tumore mit hoher Mutationslast gut auf eine Immuntherapie ansprechen, Glioblastome zeichnen sich jedoch üblicherweise durch eine geringe Mutationslast aus[103]. Höhergradige Gliome sind oft in sich heterogen, was die Entstehung von Zellklonen, die beispielsweise gegenüber einer anti-PD1-Therapie resistent sind, begünstigt[104,105]. Aus diesem Grund werden derzeit mehrere Phase I-Studien durchgeführt, in denen eine duale Checkpointinhibition beim Glioblastom untersucht werden soll[106].
Im Rahmen einer retrospektiven Studie aus dem Jahr 2018 konnte ein tendenziell besseres Outcome (Ansprechrate, progressionsfreies und Gesamtüberleben) für Melanompatienten nachgewiesen werden, die neben der Checkpointinhibition zusätzlich mit Metformin behandelt wurden. Afzal et al. führten diesen Effekt auf eine Wirkungssteigerung der PDL1-Blockade durch Metformin zurück[107]. Im Mikroenvironment eines Tumors mit hohem Sauerstoffverbrauch werden oftmals hypoxische Bedingungen vorgefunden, die zu einer Einschränkung der T-Zellaktivität beitragen und damit einer PDL1-Inhibition entgegenwirken. Durch Hemmung der Atmungskette bedingt Metformin einen Anstieg der lokalen Sauerstoffkonzentration und damit eine Wirkungssteigerung der genannten Checkpoininhibitoren[108]. Aktuell werden mehrere Phase II- Studien zu einer kombinierten Behandlung mit o.g. Checkpointinhibitoren und Metformin bei unterschiedlichen Entitäten durchgeführt (NCT03994744, NCT03800602, NCT03048500, NACT04114136, clinicaltrials.com), dies könnte in Zukunft auch einen Ansatzpunkt in der Immuntherapie des Glioblastoms darstellen.

1.4.6. Metformin als Therapeutikum in der Onkologie- „drug repurposing“

Wie Chen et al. in einem Review zu den aktuellen klinisch-onkologischen Einsatzgebieten von Metformin darstellen, wird die Anwendung des Biguanids im Sinne eines „drug repurposings“ derzeit unter anderem beim Lungen-, Prostata-, Mamma-, Endometrium- und Schilddrüsenkarzinom sowie beim malignen Melanom überprüft[93]. In der NeuroOnkologie wird der Einsatz von Metformin, wie bereits beschrieben, vor allen in Kombination mit Temozolomid und Radiotherapie klinisch erprobt[109].

Der Begriff des „drug repurposing“ (Medikamentenrepositionierung) beschreibt den Einsatz bereits zugelassener Medikamente in einem von der ursprünglich vorgesehenen Indikation abweichenden Anwendungsgebiet. Da das Sicherheitsprofil dieser Medikamente allermeist bereits über Jahre erprobt wurde, können auf schnelle und häufig kostengünstige Art und Weise präklinisch oder epidemiologisch generierte Thesen im Rahmen klinischer Studien verifiziert werden. Wissenschaftler des Broad Institute von MIT und Harvard sowie des Dana-Farber Cancer Institute stellen seit 2017 die Online-Datenbank „Drug Repurposing Hub“ zur Verfügung. Hier werden derzeit über 6000 bereits existierende Medikamente, die von der FDA zugelassen sind oder sich in klinischen Studien als sicher erwiesen haben und in von der ursprünglichen Indikation abweichenden Einsatzgebieten Vorteile gezeigt haben, aufgeführt[110]. Erwähnt werden muss, dass oftmals Unklarheit über die in klinischen Studien einzusetzenden Therapieregime, d.h. Dosis, Fraktionierung und Applikationsart, herrscht. Nach Chen et al. wurden in den oben genannten Studien beispielsweise Metformin-Dosierung von 250mg/Tag bis zu 1700mg/Tag angewandt. Wie bereits mehrfach erwähnt, basieren die präklinischen Erkenntnisse zum therapeutischen Einsatz in der Onkologie meist auf Arbeiten mit deutlich höheren Dosierungen, sodass auch bei Anwendung „alter“ Medikamente in höheren Dosierungen neuartige bzw. stärker ausgeprägte Nebenwirkungen beim Einsatz im Menschen zu erwarten sind.

Zusammengefasst scheint die Kombinationstherapie aus Metformin und Diclofenac in der Systemtherapie des höhergradigen Glioms zwar vielversprechend, aber nicht uneingeschränkt und universal nutzbringend zu sein. Folglich muss im Rahmen weiterer Forschungsarbeiten und laufender klinischer Studien eine Subgruppe definiert werden, die besonders von der genannten Therapie profitiert.

Sollten die im Rahmen dieser Arbeit aufgeführte in vitro- Wirkungen mit einem akzeptablen Nebenwirkungsspektrum belegt werden können, könnte die Kombination aus Metformin und Diclofenac einen erfolgsversprechenden Ansatz für zukünftige klinische Studien in der Therapie des Glioblastoms darstellen.

1.5. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob durch eine kombinierte Behandlung mit Metformin, einem Standardtherapeutikum in der Therapie des Diabetes mellitus Typ 2, und Diclofenac, einem vor allem aufgrund einer analgetischen Wirkung häufig verwendeten NSAR, additive oder sogar synergistische antitumoröse Wirkungen auf Hirntumor-initiierende Zellen (BTIC-8, -11, -13 und -18) und Gliomzelllinien (TCs, U87 und HTZ349) erreicht werden können. Neben funktionellen Effekten, einschließlich Auswirkungen auf Proliferation und Migration, metabolischen Effekten, unter anderem Sauerstoffverbrauch und extrazellulärer Laktatspiegel, wurden Auswirkungen auf die durch Metformin beeinflussten Signalwege (STAT3 und mTOR) näher betrachtet.
Die kombinierte Behandlung mit Metformin und Diclofenac führt zu einer Proliferations- sowie Migrationshemmung bei BTICs und TCs. Die Veränderungen der in dieser Arbeit betrachteten Signalwege erklären die synergistischen Effekte dabei nicht ausreichend. Es konnte gezeigt werden, dass Metformin den zellulären Sauerstoffverbrauch der BTICs hemmt und zu einer Erhöhung der extrazellulären Laktatspiegel führt, was auf eine zunehmende glykolytische ATP-Produktion, im Sinne eines metabolischen Rettungsmechanismus, hinweist. Die kombinierte Behandlung inhibierte den Metformin-induzierten Laktatanstieg.
Die Kombinationstherapie aus Metformin und Diclofenac könnte eine vielversprechende neue Strategie in der Behandlung des Glioblastoms, im Sinne des drug repurposing, darstellen. Eine kombinierte Behandlung kann dabei die erforderlichen Dosierungen der einzelnen Wirkstoffe verringern und einer Aktivierung metabolischer Rettungsmechanismen entgegenwirken. Um den genauen Wirkmechanismus der kombinierten Therapie zu verstehen, müssen weitere Signalwege untersucht werden, wobei insbesondere den durch Diclofenac beeinflussten Signalwegen Beachtung geschenkt werden muss. Die in vitro beobachteten Wirkungen und damit verbundenen Nebenwirkungen müssen durch in vivo-Versuche und schließlich klinische Studien bestätigt werden.

1.6. Anhang

1.6.1. Zusätzliche Abbildungen

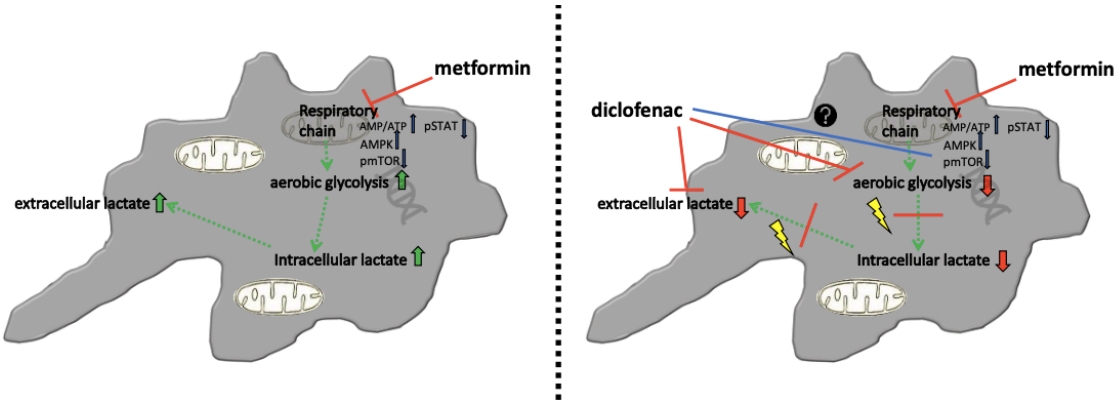


Abbildung SL 1

Grafische Zusammenfassung des erwarteten Wirkmechanismus der kombinierten Behandlung mit Metformin und Diclofenac

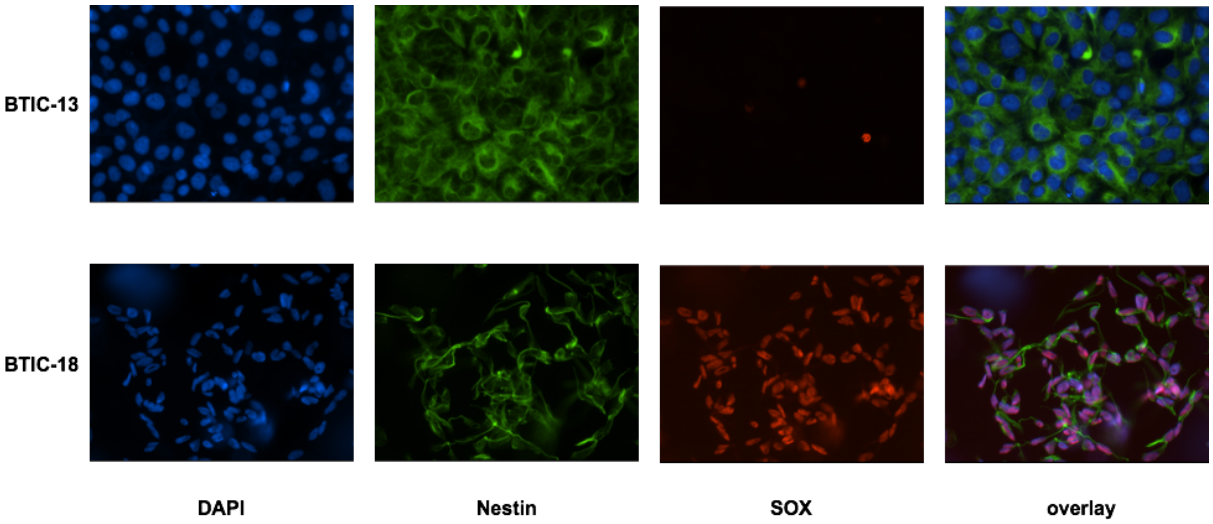


Abbildung SL 2

Immunzytochemische Expression der Stammzellmarker Nestin und SOX

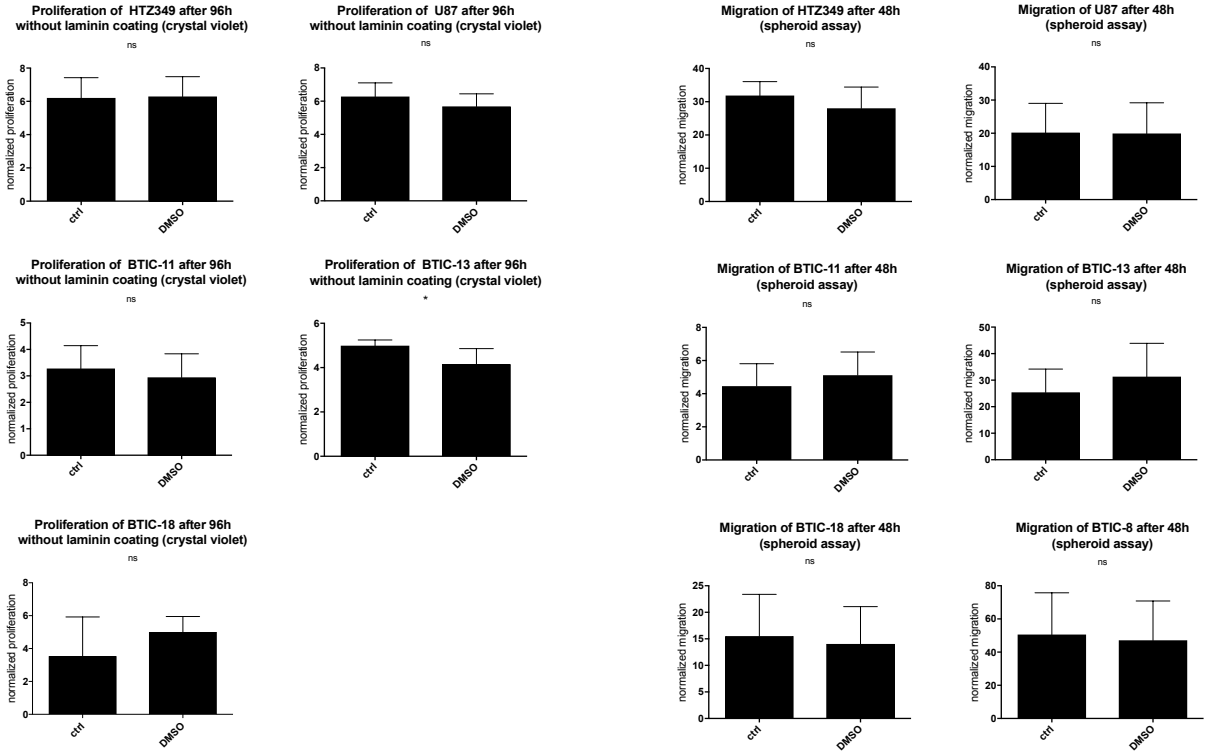


Abbildung SL 3

Mögliche Auswirkungen der Medium- und DMSO-Kontrolle auf die Proliferation wurden unter Verwendung von Kristallviolettfärbung nach 96 Stunden untersucht

Sphäroid-Assays wurden verwendet, um migrationshemmende Wirkungen zu einem Zeitpunkt von 48 Stunden zu analysieren. Die Ergebnisse sind als Mittelwert ± Standardabweichung angegeben und wurden durch two way-ANOVA analysiert und paarweise verglichen, d.h. Mediumkontrolle vs. DMSO-Kontrolle, (p = 0,0332 (*), p = 0,0021 (**), p = 0,0002 (***), p ≤ 0,0001 (****).

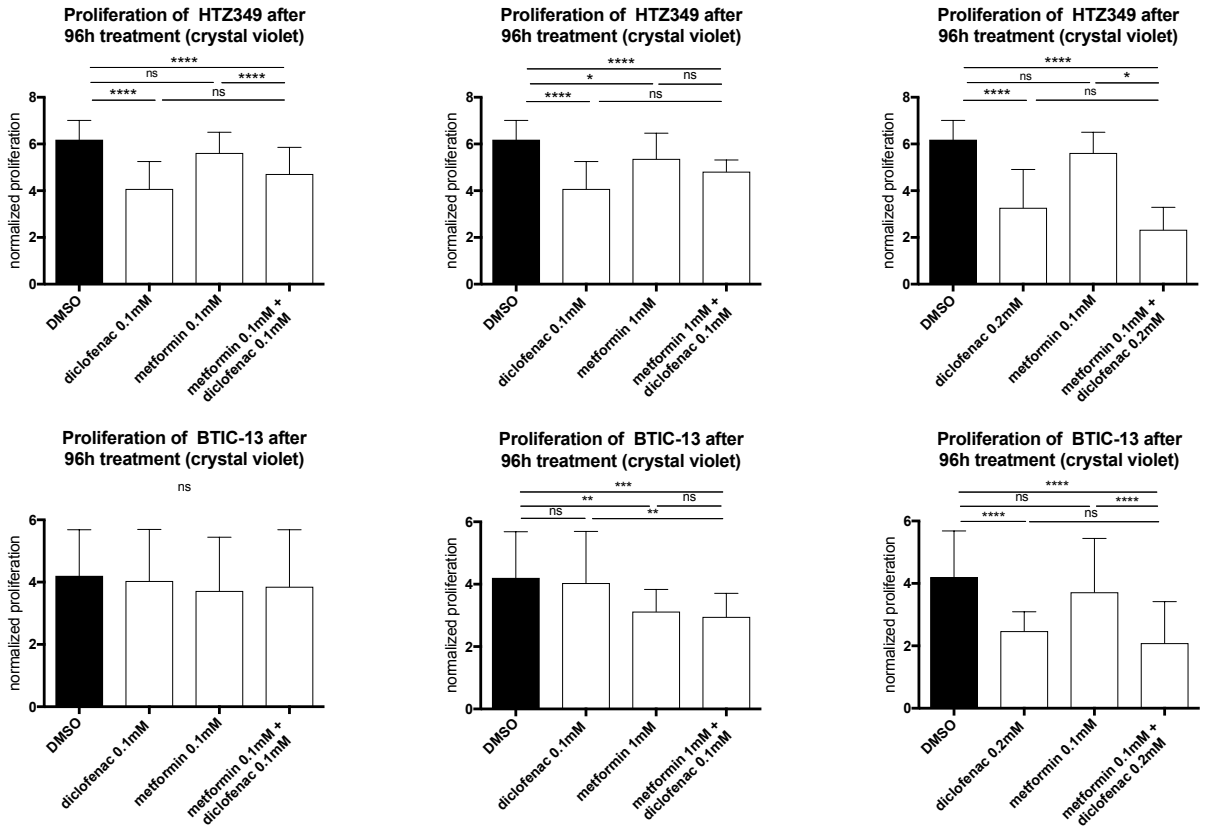


Abbildung SL 4

Die Zellproliferation von HTZ349 und BTIC-13 nach 96-stündiger Behandlung mit verschiedenen Dosierungen von Metformin, Diclofenac und beiden Wirkstoffen wurde unter Verwendung von Kristallviolettfärbung untersucht. Im Vergleich zur Einzelbehandlung mit Diclofenac wurde keine zusätzliche Hemmung der Proliferation gezeigt. Die Ergebnisse sind als Mittelwert ± Standardabweichung angegeben und wurden durch two way-ANOVA analysiert und paarweise verglichen, d.h. Metforminbehandlung vs. Kombinierte Behandlung, (p = 0,0332 (*), p = 0,0021 (**), p = 0,0002 (***), p ≤ 0,0001 (****).

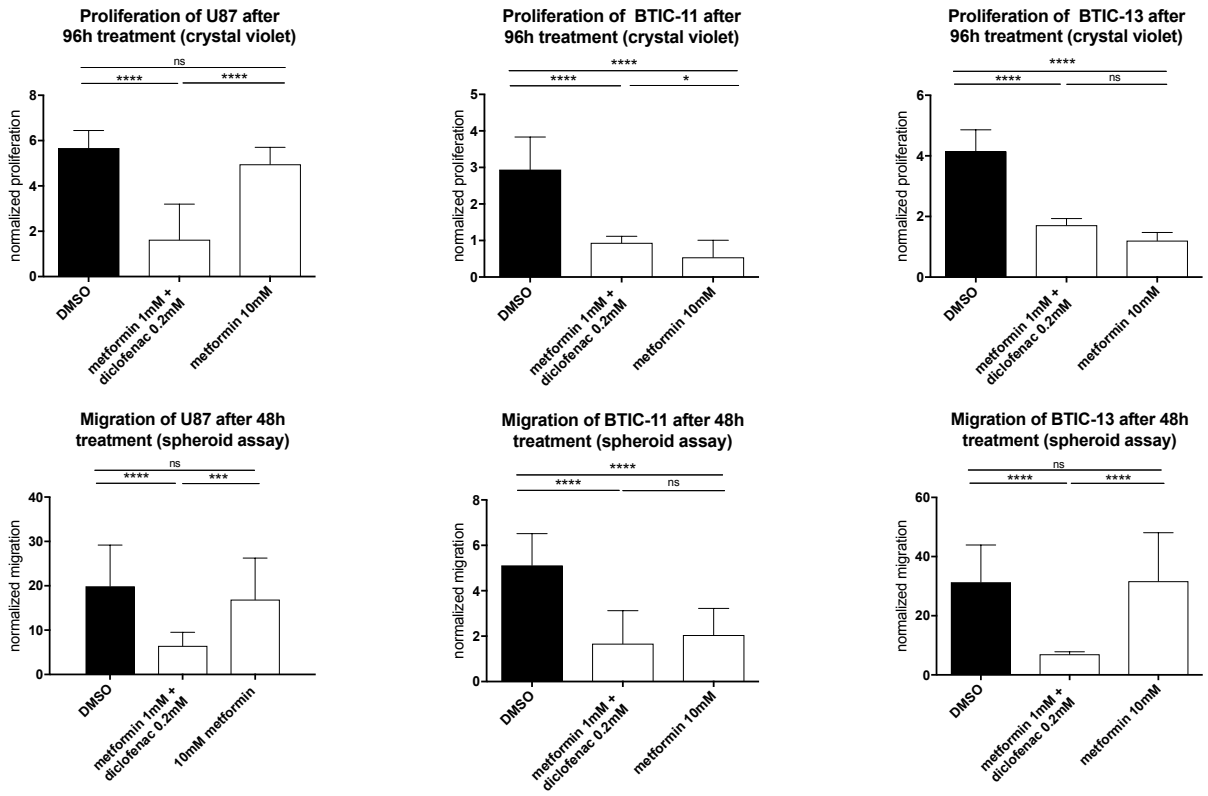


Abbildung SL 5

Die Auswirkungen von Metformin, Diclofenac und beiden Wirkstoffen auf die Proliferation wurden unter Anwendung einer Kristallviolettfärbung nach 96 Stunden untersucht. Sphäroid-Assays wurden verwendet, um die migrationshemmende Wirkung nach 48 Stunden zu analysieren. Die Ergebnisse sind als Mittelwert ± Standardabweichung angegeben und wurden durch two way-ANOVA analysiert und paarweise verglichen, d.h. Metforminbehandlung vs. Kombinierte Behandlung, (p = 0,0332 (*), p = 0,0021 (**), p = 0,0002 (***), p ≤ 0,0001 (****).

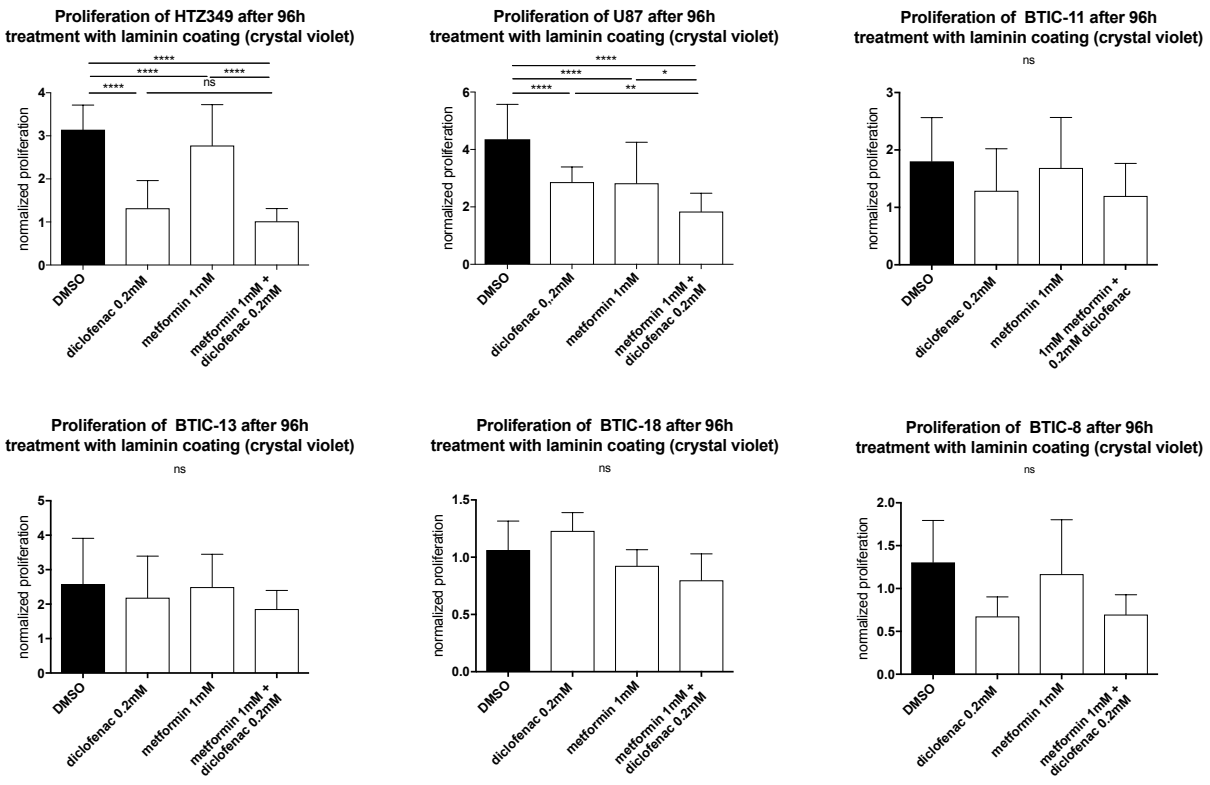


Abbildung SL 6

Die Auswirkungen von Metformin, Diclofenac und beiden Wirkstoffen auf die Proliferation wurden mittels Kristallviolettfärbung 96 Stunden nach Lamininbeschichtung und Behandlungsbeginn untersucht. Die Ergebnisse sind als Mittelwert ± Standardabweichung angegeben und wurden durch two way-ANOVA analysiert und paarweise verglichen, d.h. Metforminbehandlung vs. Kombinierte Behandlung, (p = 0,0332 (*), p = 0,0021 (**), p = 0,0002 (***), p ≤ 0,0001 (****).

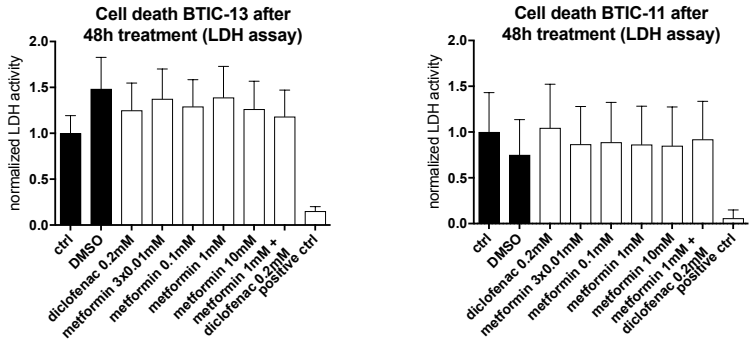


Abbildung SL 7

Zur Messung der LDH-Enzymaktivität wurde der LDH-Zytotoxizitätsassay durchgeführt. Die Zellen wurden 24 Stunden vor der Behandlung mit 2,5 × 10 3 Zellen/ well in 200ul serumfreiem Medium/well ausgesät und entweder mit den angegebenen Konzentrationen von Metformin, Diclofenac oder einer Kombination von beiden inkubiert. Als Positivkontrolle wurde NaOxamat (25 mM) verwendet. 48 Stunden später wurde die LDH-Aktivität gemessen

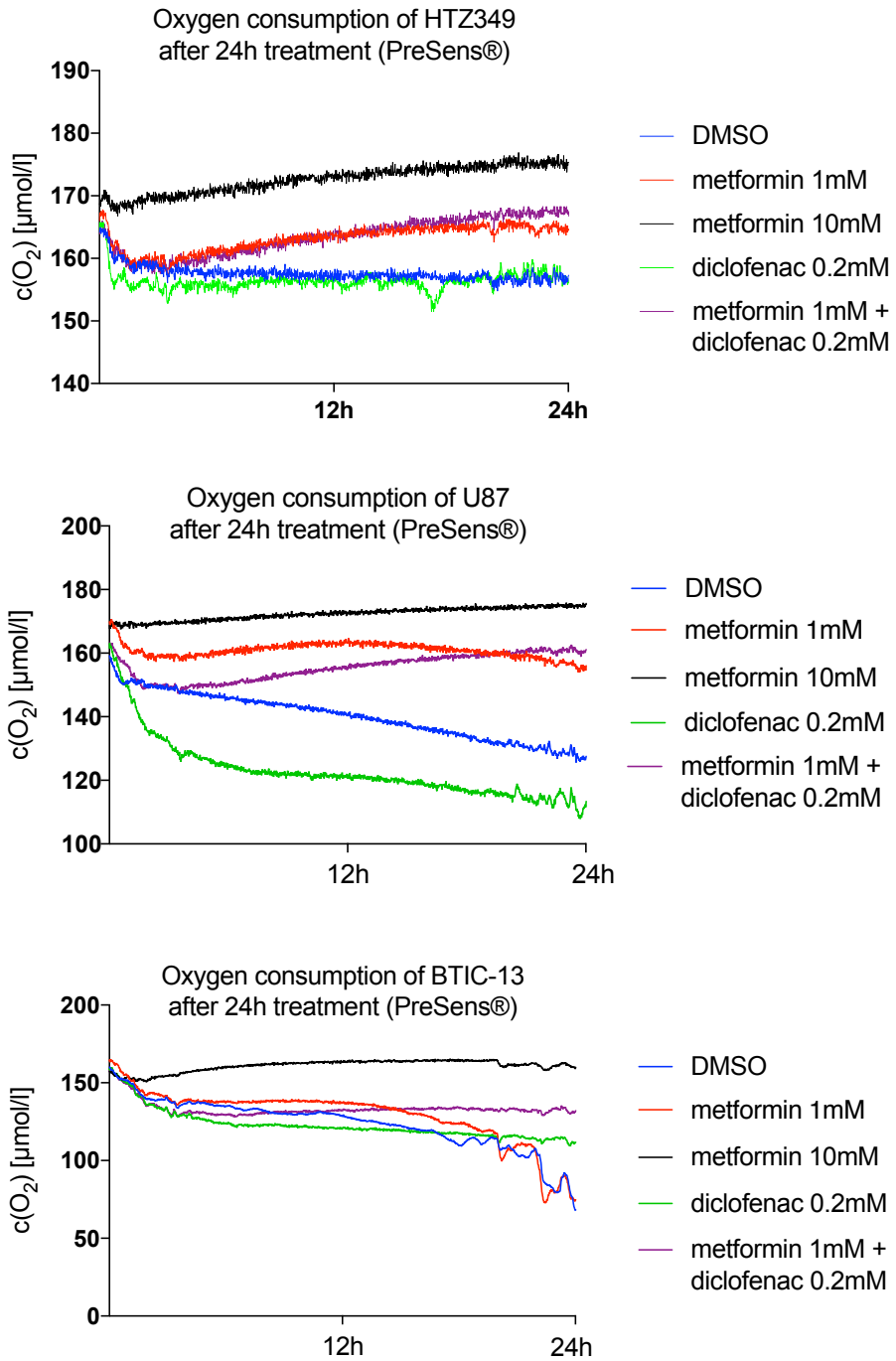


Abbildung SL 8

Die Sauerstoffkonzentration in den Zellkulturen wurde mit dem SDR SensorDish Reader (PreSens Precision Sensing, Regensburg, Deutschland) 24 Stunden lang gemessen. Die Zellen wurden unter Berücksichtigung ihres stereotypen Sauerstoffverbrauchs in unterschiedlichen Mengen ausgesät. Die Messungen wurden in Intervallen von 60 s durchgeführt.

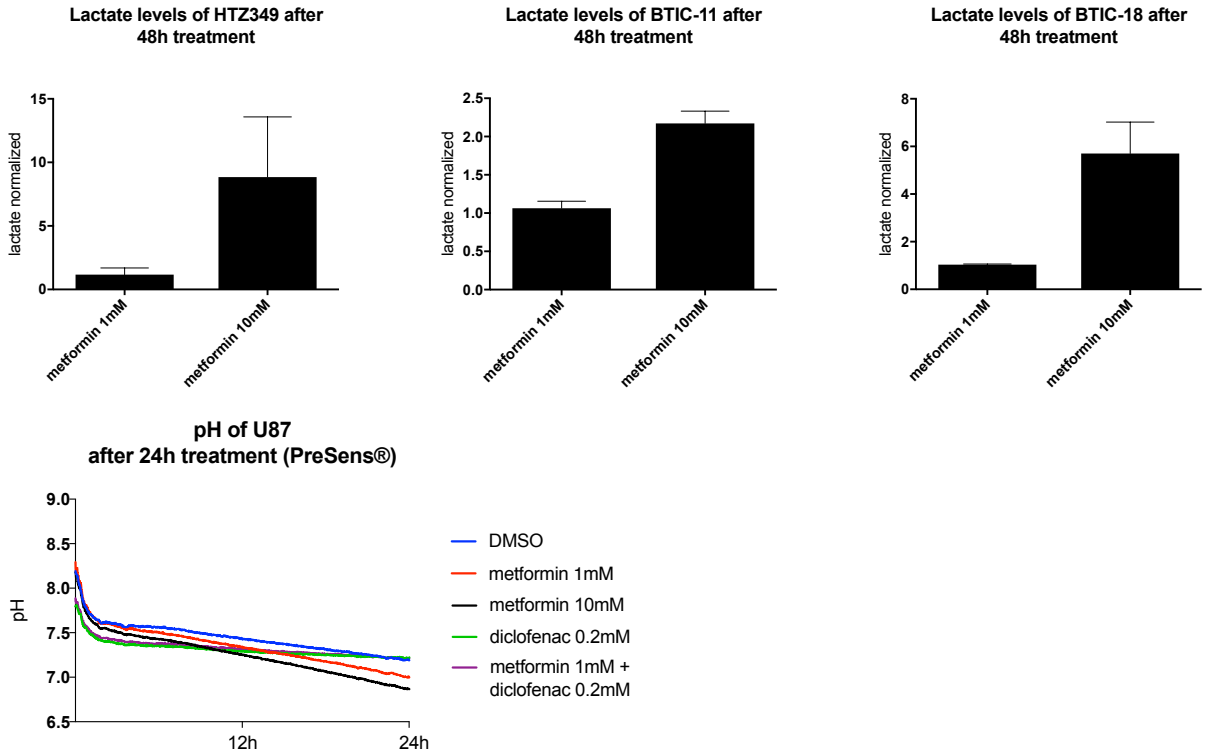


Abbildung SL 9

Extrazelluläre Laktatspiegel nach 48-stündiger Behandlung mit hoch- und geringdosiertem Metformin. Die Ergebnisse sind als Mittelwert ± Standardabweichung angegeben und wurden durch two way-ANOVA analysiert und paarweise verglichen, d.h. Metforminbehandlung vs. Kombinierte Behandlung, (p = 0,0332 (*), p = 0,0021 (**), p = 0,0002 (***), p ≤ 0,0001 (****).

pH-Werte nach Metformin- und Diclofenac-Behandlung (beispielhaft für U87 gezeigt).

1.6.2. Abkürzungen

ALA	Alpha-Liponsäure
AMP	Adenosinmonophosphat
(p)AMPK	(phosphorylierte) Adenosinmonophosphat-Kinase
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovine serum albumin
BTICs	Brain tumo iniitiating cells, Hirntumor-iniitierende Zellen
COX	Cyclooxygenase
DAPI	4′,6-Diamidin-2-Phenylindol
DCA	Dichloracetat
DMEM	Dulbeccos modified Eagles-Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
FDA	Federal Drug Administration
FCS	Fetal calf serum
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GBM	Glioblastom
HCA	Hydroxyzitronensäure
IDH-1	Isocitratdehydrogenase 1
LDH	Laktatdehydrogenase
KI	Kombinationsindex
MCT	Monocarboxylat-Transporter
(p)mTOR	(Phosphorylated) mammalian target of rapamycin
MYC	Myelocytomatose-Gen
MGMT	O-6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase
NADH	Nicotinamid Adenin Dinucleotid Hydrid
NF-κB	Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NSAR	Nichtsteroidales Antirheumatikum
PBS	Phosphate buffered saline, phosphate-gepufferte Salzlösung
PDK	Pyruvatdehydrogenasekinase
PDL-1	Programmed death ligand-1
PGE2	Prostaglandin E2
RIPA	Radioimmunoprecipitation assay

SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SOX-2	Sex determining region Y-box 2
(p)STAT3	(Phosphorylated) signal transducer and activator of transcription”
T2DM	Typ 2- Diabetes mellitus
TAM	Tumor-assoziierte Makrophagen
TBST	Tris-buffered saline with Tween
TC	Tumorzellkultur

1.6.3. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1- Proliferation nach Einzel- und Kombinationsbehandlung 11
Abbildung 2- Migration nach Einzel- und Kombinationsbehandlung 12
Tabelle 1- Kombinationsindex 18
Abbildung 3- Extrazelluläre Laktatlevel und Sauerstoffverbrauch nach Einzel- und Kombinationsbehandlung 15
Abbildung 4- (p)mTOR- und (p)STAT nach Einzel- und Kombinationsbehandlung 17

Abbildung SL 1- Graphische Darstellung des Wirkmechanismus 30
Abbildung SL 2- Immunhistochemische Färbung der Stammzellmarker Nestin und SOX 30
Abbildung SL 3- Proliferation und Migration: Medium/DMSO-Kontrolle 31
Abbildung SL 4- Proliferation nach unterschiedlich dosierter Einzel- und Kombinationsbehandlung 32
Abbildung SL 5- Proliferation und Migration nach Kombinationsbehandlung im Vergleich zur hochdosierten Metforminbehandlung 33
Abbildung SL 6- Proliferation mit Lamininbeschichtung nach Einzel- und Kombinationsbehandlung 34
Abbildung SL 7- LDH Aktivität nach Einzel- und Kombinationsbehandlung 34
Abbildung SL 8- Sauerstoffverbrauch nach 24h nach Einzel- und Kombinationsbehandlung 35
Abbildung SL 9- Extrazelluäre Laktatkonzentration und pH-Werte nach Einzel- und Kombinationsbehandlung 36

1.7. Literatur

1. Louis DN, Arie Perry, Reifenberger G, et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol*. 2016;131(6):803-820. doi:10.1007/s00401-016-1545-1
2. Stupp R, Hegi ME, Gorlia T, et al. Cilengitide combined with standard treatment for patients with newly diagnosed glioblastoma with methylated MGMT promoter (CENTRIC EORTC 26071-22072 study): a multicentre, randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2014;15(10):1100-1108. doi:10.1016/S1470-2045(14)70379-1
3. Das S, Srikanth M, Kessler JA. Cancer stem cells and glioma. *Nat Clin Pract Neurol*. 2008;4(8):427-435. doi:10.1038/ncpneuro0862
4. Galli R, Binda E, Orfanelli U, et al. Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma. *Cancer Res*. 2004;64(19):7011-7021. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-1364
5. Vescovi AL, Galli R, Reynolds BA. Brain tumour stem cells. *Nat Rev Cancer*. 2006;6(6):425-436. doi:10.1038/nrc1889
6. Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, et al. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res*. 2003;63(18):5821-5828.
7. Goodarzi MO, Bryer-Ash M. Metformin revisited: re-evaluation of its properties and role in the pharmacopoeia of modern antidiabetic agents. *Diabetes Obes Metab*. 2005;7(6):654-665. doi:10.1111/j.1463-1326.2004.00448.x
8. Aljofan M, Riethmacher D. Anticancer activity of metformin: a systematic review of the literature. *Future Sci OA*. 2019;5(8):FSO410-FSO410. doi:10.2144/fsoa-2019-0053
9. Grzybowska M, Bober J, Olszewska M. [Metformin - mechanisms of action and use for the treatment of type 2 diabetes mellitus]. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*. 2011;65:277-285. doi:10.5604/17322693.941655
10. Franciosi M, Lucisano G, Lapice E, Strippoli GFM, Pellegrini F, Nicolucci A. Metformin therapy and risk of cancer in patients with type 2 diabetes: systematic review. *PLoS ONE*. 2013;8(8):e71583. doi:10.1371/journal.pone.0071583
11. Sesen J, Dahan P, Scotland SJ, et al. Metformin Inhibits Growth of Human Glioblastoma Cells and Enhances Therapeutic Response. *PLOS ONE*. 2015;10(4):e0123721. doi:10.1371/journal.pone.0123721

12. Würth R, Pattarozzi A, Gatti M, et al. Metformin selectively affects human glioblastoma tumor-initiating cell viability. *Cell Cycle*. 2013;12(1):145-156. doi:10.4161/cc.23050
13. Seliger C, Meyer A-L, Renner K, et al. Metformin inhibits proliferation and migration of glioblastoma cells independently of TGF-β2. *Cell Cycle*. 2016;15(13):1755-1766. doi:10.1080/15384101.2016.1186316
14. Owen MR, Doran E, Halestrap AP. Evidence that metformin exerts its anti-diabetic effects through inhibition of complex 1 of the mitochondrial respiratory chain. *Biochem J*. 2000;348(Pt 3):607-614.
15. Sato A, Sunayama J, Okada M, et al. Glioma-initiating cell elimination by metformin activation of FOXO3 via AMPK. *Stem Cells Transl Med*. 2012;1(11):811-824. doi:10.5966/sctm.2012-0058
16. Zakikhani M, Dowling R, Fantus IG, Sonenberg N, Pollak M. Metformin is an AMP kinase-dependent growth inhibitor for breast cancer cells. *Cancer Res*. 2006;66(21):10269-10273. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-1500
17. Andrzejewski S, Gravel S-P, Pollak M, St-Pierre J. Metformin directly acts on mitochondria to alter cellular bioenergetics. *Cancer & Metabolism*. 2014;2(1):12. doi:10.1186/2049-3002-2-12
18. Seliger C, Renner K, Kreutz M, et al. P17.39TURN OLD INTO NEW: METFORMIN AS ANTINEOPLASTIC AGENT IN GLIOBLASTOMA. *Neuro Oncol*. 2014;16(Suppl 2):ii96. doi:10.1093/neuonc/nou174.368
19. Seliger C, Ricci C, Meier CR, et al. Diabetes, use of antidiabetic drugs, and the risk of glioma. *Neuro-oncology*. 2016;18(3):340-349. doi:10.1093/neuonc/nov100
20. 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):843-853. doi:10.1002/ijc.27712
21. Cha YI, DuBois RN. NSAIDs and cancer prevention: targets downstream of COX-2. *Annu Rev Med*. 2007;58:239-252. doi:10.1146/annurev.med.57.121304.131253
22. Taketo MM. Cyclooxygenase-2 inhibitors in tumorigenesis (part I). *J Natl Cancer Inst*. 1998;90(20):1529-1536.
23. Taketo MM. Cyclooxygenase-2 inhibitors in tumorigenesis (Part II). *J Natl Cancer Inst*. 1998;90(21):1609-1620.
24. Harris RE, Beebe-Donk J, Doss H, Burr Doss D. Aspirin, ibuprofen, and other

non-steroidal anti-inflammatory drugs in cancer prevention: a critical review of non-selective COX-2 blockade (review). *Oncol Rep*. 2005;13(4):559-583.
25. Abnet CC, Freedman ND, Kamangar F, Leitzmann MF, Hollenbeck AR, Schatzkin A. Non-steroidal anti-inflammatory drugs and risk of gastric and oesophageal adenocarcinomas: results from a cohort study and a meta-analysis. *Br J Cancer*. 2009;100(3):551-557. doi:10.1038/sj.bjc.6604880
26. Gottfried E, Lang SA, Renner K, et al. New aspects of an old drug--diclofenac targets MYC and glucose metabolism in tumor cells. *PLoS ONE*. 2013;8(7):e66987. doi:10.1371/journal.pone.0066987
27. Miranda-Gonçalves V, Honavar M, Pinheiro C, et al. Monocarboxylate transporters (MCTs) in gliomas: expression and exploitation as therapeutic targets. *Neuro-oncology*. 2013;15(2):172-188. doi:10.1093/neuonc/nos298
28. Colen CB, Shen Y, Ghoddoussi F, et al. Metabolic targeting of lactate efflux by malignant glioma inhibits invasiveness and induces necrosis: an in vivo study. *Neoplasia*. 2011;13(7):620-632.
29. Leidgens V, Seliger C, Jachnik B, et al. Ibuprofen and Diclofenac Restrict Migration and Proliferation of Human Glioma Cells by Distinct Molecular Mechanisms. *PLoS One*. 2015;10(10). doi:10.1371/journal.pone.0140613
30. Bogdahn U, Apfel R, Hahn M, et al. Autocrine Tumor Cell Growth-inhibiting Activities from Human Malignant Melanoma. *Cancer Res*. 1989;49(19):5358-5363.
31. Arslan F, Bosserhoff A-K, Nickl-Jockschat T, Doerfelt A, Bogdahn U, Hau P. The role of versican isoforms V0/V1 in glioma migration mediated by transforming growth factor-β2. *Br J Cancer*. 2007;96(10):1560-1568. doi:10.1038/sj.bjc.6603766
32. Chou T-C. Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method. *Cancer Res*. 2010;70(2):440-446. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-1947
33. Neradil J, Veselska R. Nestin as a marker of cancer stem cells. *Cancer Sci*. 2015;106(7):803-811. doi:10.1111/cas.12691
34. Iacopino F, Angelucci C, Piacentini R, et al. Isolation of Cancer Stem Cells from Three Human Glioblastoma Cell Lines: Characterization of Two Selected Clones. *PLoS One*. 2014;9(8). doi:10.1371/journal.pone.0105166
35. Leidgens V, Proske J, Rauer L, et al. Stattic and metformin inhibit brain tumor initiating cells by reducing STAT3-phosphorylation. *Oncotarget*. 2016;8(5):8250-8263. doi:10.18632/oncotarget.14159

36. Beckner ME, Gobbel GT, Abounader R, et al. Glycolytic glioma cells with active glycogen synthase are sensitive to PTEN and inhibitors of PI3K and gluconeogenesis. *Laboratory Investigation*. 2005;85(12):1457. doi:10.1038/labinvest.3700355
37. Isakovic A, Harhaji L, Stevanovic D, et al. Dual antiglioma action of metformin: cell cycle arrest and mitochondria-dependent apoptosis. *Cell Mol Life Sci*. 2007;64(10):1290-1302. doi:10.1007/s00018-007-7080-4
38. Gritti M, Würth R, Angelini M, et al. Metformin repositioning as antitumoral agent: selective antiproliferative effects in human glioblastoma stem cells, via inhibition of CLIC1-mediated ion current. *Oncotarget*. 2014;5(22):11252-11268. doi:10.18632/oncotarget.2617
39. Zhou G, Myers R, Li Y, et al. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J Clin Invest*. 2001;108(8):1167-1174.
40. Nerstedt A, Johansson A, Andersson CX, Cansby E, Smith U, Mahlapuu M. AMP-activated protein kinase inhibits IL-6-stimulated inflammatory response in human liver cells by suppressing phosphorylation of signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3). *Diabetologia*. 2010;53(11):2406-2416. doi:10.1007/s00125-010-1856-z
41. Wu X, Yeerna H, Goto Y, et al. Metformin inhibits progression of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma by acting Directly on Carcinoma Initiating Cells. *Cancer Res*. Published online January 1, 2019:canres.3525.2018. doi:10.1158/0008-5472.CAN-18-3525
42. Liu X, Chhipa RR, Pooya S, et al. Discrete mechanisms of mTOR and cell cycle regulation by AMPK agonists independent of AMPK. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(4):E435-E444. doi:10.1073/pnas.1311121111
43. Henriksson M, Lüscher B. Proteins of the Myc network: essential regulators of cell growth and differentiation. *Adv Cancer Res*. 1996;68:109-182.
44. Hirano T, Ishihara K, Hibi M. *Roles of STAT3 in Mediating the Cell Growth, Differentiation and Survival Signals Relayed through the IL-6 Family of Cytokine Receptors*. Vol 19.; 2000. doi:10.1038/sj.onc.1203551
45. Tan X-L, Bhattacharyya KK, Dutta SK, et al. Metformin suppresses pancreatic tumor growth with inhibition of NFκB/STAT3 inflammatory signaling. *Pancreas*. 2015;44(4):636-647. doi:10.1097/MPA.0000000000000308
46. Pan Q, Yang G-L, Yang J-H, et al. Metformin can block precancerous

progression to invasive tumors of bladder through inhibiting STAT3-mediated signaling pathways. *J Exp Clin Cancer Res*. 2015;34:77. doi:10.1186/s13046-015-0183-0

47. Deng X-S, Wang S, Deng A, et al. Metformin targets Stat3 to inhibit cell growth and induce apoptosis in triple-negative breast cancers. *Cell Cycle*. 2012;11(2):367-376. doi:10.4161/cc.11.2.18813

48. Martin-Montalvo A, Mercken EM, Mitchell SJ, et al. Metformin improves healthspan and lifespan in mice. *Nature Communications*. 2013;4:2192. doi:10.1038/ncomms3192

49. He L, Wondisford FE. Metformin Action: Concentrations Matter. *Cell Metabolism*. 2015;21(2):159-162. doi:10.1016/j.cmet.2015.01.003

50. Łabuzek K, Suchy D, Gabryel B, Bielecka A, Liber S, Okopień B. Quantification of metformin by the HPLC method in brain regions, cerebrospinal fluid and plasma of rats treated with lipopolysaccharide. *Pharmacol Rep*. 2010;62(5):956-965.

51. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med*. 2005;352(10):987-996. doi:10.1056/NEJMoa043330

52. Valtorta S, Dico AL, Raccagni I, et al. Metformin and temozolomide, a synergic option to overcome resistance in glioblastoma multiforme models. *Oncotarget*. 2017;8(68):113090-113104. doi:10.18632/oncotarget.23028

53. Aldea MD, Petrushev B, Soritau O, et al. Metformin plus sorafenib highly impacts temozolomide resistant glioblastoma stem-like cells. *J BUON*. 2014;19(2):502-511.

54. Zhu H-Q, Ma J-B, Song X, et al. Metformin potentiates the anticancer activities of gemcitabine and cisplatin against cholangiocarcinoma cells in vitro and in vivo. *Oncol Rep*. 2016;36(6):3488-3496. doi:10.3892/or.2016.5187

55. Peng M, Huang Y, Tao T, et al. Metformin and gefitinib cooperate to inhibit bladder cancer growth via both AMPK and EGFR pathways joining at Akt and Erk. *Sci Rep*. 2016;6:28611. doi:10.1038/srep28611

56. Harada K, Ferdous T, Harada T, Ueyama Y. Metformin in combination with 5-fluorouracil suppresses tumor growth by inhibiting the Warburg effect in human oral squamous cell carcinoma. *Int J Oncol*. 2016;49(1):276-284. doi:10.3892/ijo.2016.3523

57. El-Mir MY, Nogueira V, Fontaine E, Avéret N, Rigoulet M, Leverve X. Dimethylbiguanide inhibits cell respiration via an indirect effect targeted on the respiratory chain complex I. *J Biol Chem*. 2000;275(1):223-228.
58. Warburg O. On the origin of cancer cells. *Science*. 1956;123(3191):309-314.
59. Tataranni T, Piccoli C. Dichloroacetate (DCA) and Cancer: An Overview towards Clinical Applications. Singh K, ed. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2019;2019:8201079. doi:10.1155/2019/8201079
60. R.E. Kavetsky Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology, NAS of Ukraine, Kyiv 03022, Ukraine, Kolesnik DL*, Pyaskovskaya ON, et al. Metformin enhances antitumor action of sodium dichloroacetate against glioma C6. *exp-oncology*. Published online June 2019. doi:10.32471/exp-oncology.2312-8852.vol-41-no-2.13064
61. Jiang W, Finniss S, Cazacu S, et al. Repurposing phenformin for the targeting of glioma stem cells and the treatment of glioblastoma. *Oncotarget*. 2016;7(35):56456-56470. doi:10.18632/oncotarget.10919
62. Kim EH, Lee J-H, Oh Y, et al. Inhibition of glioblastoma tumorspheres by combined treatment with 2-deoxyglucose and metformin. *Neuro Oncol*. 2017;19(2):197-207. doi:10.1093/neuonc/now174
63. Pelicano H, Martin DS, Xu R-H, Huang P. Glycolysis inhibition for anticancer treatment. *Oncogene*. 2006;25(34):4633-4646. doi:10.1038/sj.onc.1209597
64. Defenouillère Q, Verraes A, Laussel C, Friedrich A, Schacherer J, Léon S. The induction of HAD-like phosphatases by multiple signaling pathways confers resistance to the metabolic inhibitor 2-deoxyglucose. *Sci Signal*. 2019;12(597):eaaw8000. doi:10.1126/scisignal.aaw8000
65. Ciavardelli D, Rossi C, Barcaroli D, et al. Breast cancer stem cells rely on fermentative glycolysis and are sensitive to 2-deoxyglucose treatment. *Cell Death Dis*. 2014;5(7):e1336-e1336. doi:10.1038/cddis.2014.285
66. Saber MM, Galal MA, Ain-Shoka AA, Shouman SA. Combination of metformin and 5-aminosalicylic acid cooperates to decrease proliferation and induce apoptosis in colorectal cancer cell lines. *BMC Cancer*. 2016;16. doi:10.1186/s12885-016-2157-9
67. Chaube B, Malvi P, Singh SV, Mohammad N, Meena AS, Bhat MK. Targeting metabolic flexibility by simultaneously inhibiting respiratory complex I and lactate generation retards melanoma progression. *Oncotarget*. 2015;6(35):37281-37299.

68. Harris RE, Beebe-Donk J, Alshafie GA. Reduction in the risk of human breast cancer by selective cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors. *BMC Cancer*. 2006;6:27. doi:10.1186/1471-2407-6-27
69. Valle BL, D'Souza T, Becker KG, et al. Non-steroidal anti-inflammatory drugs decrease E2F1 expression and inhibit cell growth in ovarian cancer cells. *PLoS ONE*. 2013;8(4):e61836. doi:10.1371/journal.pone.0061836
70. Johnsen JI, Lindskog M, Ponthan F, et al. NSAIDs in neuroblastoma therapy. *Cancer Lett*. 2005;228(1-2):195-201. doi:10.1016/j.canlet.2005.01.058
71. Wang D, Dubois RN. Prostaglandins and cancer. *Gut*. 2006;55(1):115-122. doi:10.1136/gut.2004.047100
72. Marnett LJ, DuBois RN. COX-2: a target for colon cancer prevention. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2002;42:55-80. doi:10.1146/annurev.pharmtox.42.082301.164620
73. Gupta RA, Dubois RN. Colorectal cancer prevention and treatment by inhibition of cyclooxygenase-2. *Nat Rev Cancer*. 2001;1(1):11-21. doi:10.1038/35094017
74. Sasaki S, Futagi Y, Ideno M, et al. Effect of diclofenac on SLC16A3/MCT4 by the Caco-2 cell line. *Drug Metab Pharmacokinet*. 2016;31(3):218-223. doi:10.1016/j.dmpk.2016.03.004
75. Vellonen K-S, Häkli M, Merezhinskaya N, Tervo T, Honkakoski P, Urtti A. Monocarboxylate transport in human corneal epithelium and cell lines. *Eur J Pharm Sci*. 2010;39(4):241-247. doi:10.1016/j.ejps.2009.12.006
76. Zhang T, Yang X, Liu P, et al. Association between nonsteroidal anti-inflammatory drugs use and risk of central nervous system tumors: a dose-response meta analysis. *Oncotarget*. 2017;8(60):102486-102498. doi:10.18632/oncotarget.21829
77. Daugherty SE, Moore SC, Pfeiffer RM, et al. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and glioma in the NIH-AARP Diet and Health Study cohort. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2011;4(12):2027-2034. doi:10.1158/1940-6207.CAPR-11-0274
78. Gaist D, García-Rodríguez LA, Sørensen HT, Hallas J, Friis S. Use of low-dose aspirin and non-aspirin nonsteroidal anti-inflammatory drugs and risk of glioma: a case-control study. *Br J Cancer*. 2013;108(5):1189-1194. doi:10.1038/bjc.2013.87
79. Seliger C, Schaertl J, Gerken M, et al. Use of statins or NSAIDs and survival of patients with high-grade glioma. *PLOS ONE*. 2018;13(12):e0207858.

doi:10.1371/journal.pone.0207858
80. da Veiga Moreira J, Hamraz M, Abolhassani M, Schwartz L, Jolicœur M, Peres S. Metabolic therapies inhibit tumor growth in vivo and in silico. *Scientific Reports*. 2019;9(1):3153. doi:10.1038/s41598-019-39109-1
81. Li Y, Li Y, Yang T, et al. Clinical significance of EML4-ALK fusion gene and association with EGFR and KRAS gene mutations in 208 Chinese patients with non-small cell lung cancer. *PLoS One*. 2013;8(1):e52093-e52093. doi:10.1371/journal.pone.0052093
82. Niibori-Nambu A, Midorikawa U, Mizuguchi S, et al. Glioma Initiating Cells Form a Differentiation Niche Via the Induction of Extracellular Matrices and Integrin αV. *PLOS ONE*. 2013;8(5):1-13. doi:10.1371/journal.pone.0059558
83. Giese A, Bjerkvig R, Berens ME, Westphal M. Cost of Migration: Invasion of Malignant Gliomas and Implications for Treatment. *Journal of Clinical Oncology*. 2003;21(8):1624-1636. doi:10.1200/JCO.2003.05.063
84. Verhaak RGW, Hoadley KA, Purdom E, et al. Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell*. 2010;17(1):98-110. doi:10.1016/j.ccr.2009.12.020
85. Wang Q, Hu B, Hu X, et al. Tumor Evolution of Glioma-Intrinsic Gene Expression Subtypes Associates with Immunological Changes in the Microenvironment. *Cancer Cell*. 2017;32(1):42-56.e6. doi:10.1016/j.ccell.2017.06.003
86. Seliger C, Luber C, Gerken M, et al. Use of metformin and survival of patients with high-grade glioma. *International Journal of Cancer*. 2019;144(2):273-280. doi:10.1002/ijc.31783
87. Lunetta M, DiMauro M. Different effect of acute and chronic oral metformin administration on glucose and insulin response to bread and to pasta in non-insulin dependent diabetic patients. *Diabetes Res Clin Pract*. 1996;33(1):53-58.
88. Rena G, Hardie DG, Pearson ER. The mechanisms of action of metformin. *Diabetologia*. 2017;60(9):1577-1585. doi:10.1007/s00125-017-4342-z
89. Welch MR, Grommes C. Retrospective analysis of the effects of steroid therapy and antidiabetic medication on survival in diabetic glioblastoma patients. *CNS Oncol*. 2013;2(3):237-246. doi:10.2217/cns.13.12
90. Dang L, White DW, Gross S, et al. Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate. *Nature*. 2009;462(7274):739-744.

doi:10.1038/nature08617
91. Chowdhury R, Yeoh KK, Tian Y-M, et al. The oncometabolite 2-hydroxyglutarate inhibits histone lysine demethylases. *EMBO reports*. 2011;12(5):463-469. doi:10.1038/embor.2011.43
92. Molenaar RJ, Verbaan D, Lamba S, et al. The combination of IDH1 mutations and MGMT methylation status predicts survival in glioblastoma better than either IDH1 or MGMT alone. *Neuro Oncol*. 2014;16(9):1263-1273. doi:10.1093/neuonc/nou005
93. Chen K, Li Y, Guo Z, Zeng Y, Zhang W, Wang H. Metformin: current clinical applications in nondiabetic patients with cancer. *Aging*. 2020;12. doi:10.18632/aging.102787
94. Incio J, Tam J, Rahbari NN, et al. PlGF/VEGFR-1 Signaling Promotes Macrophage Polarization and Accelerated Tumor Progression in Obesity. *Clin Cancer Res*. Published online February 9, 2016. doi:10.1158/1078-0432.CCR-15-1839
95. Ding X, Ma M, Teng J, et al. Exposure to ALS-FTD-CSF generates TDP-43 aggregates in glioblastoma cells through exosomes and TNTs-like structure. *Oncotarget; Vol 6, No 27*. Published online 2015. Accessed January 1, 2015. https://www.oncotarget.com/article/4680/
96. Takenaka MC, Gabriely G, Rothhammer V, et al. Control of tumor-associated macrophages and T cells in glioblastoma via AHR and CD39. *Nature Neuroscience*. 2019;22(5):729-740. doi:10.1038/s41593-019-0370-y
97. Mantovani A, Marchesi F, Malesci A, Laghi L, Allavena P. Tumour-associated macrophages as treatment targets in oncology. *Nat Rev Clin Oncol*. 2017;14(7):399-416. doi:10.1038/nrclinonc.2016.217
98. Cha J-H, Yang W-H, Xia W, et al. Metformin Promotes Antitumor Immunity via Endoplasmic-Reticulum-Associated Degradation of PD-L1. *Mol Cell*. 2018;71(4):606-620.e7. doi:10.1016/j.molcel.2018.07.030
99. Verdura S, Cuyàs E, Martin-Castillo B, Menendez JA. Metformin as an archetype immuno-metabolic adjuvant for cancer immunotherapy. *OncoImmunology*. 2019;8(10):e1633235. doi:10.1080/2162402X.2019.1633235
100. Dreher L-S, Hoppe T. ERADicate Tumor Progression with Metformin. *Molecular Cell*. 2018;71(4):481-482. doi:10.1016/j.molcel.2018.08.001
101. Filley AC, Henriquez M, Dey M. Recurrent glioma clinical trial, CheckMate-

143: the game is not over yet. *Oncotarget*. 2017;8(53):91779-91794. doi:10.18632/oncotarget.21586
102. Razavi S-M, Lee KE, Jin BE, Aujla PS, Gholamin S, Li G. Immune Evasion Strategies of Glioblastoma. *Front Surg*. 2016;3:11-11. doi:10.3389/fsurg.2016.00011
103. Goodman AM, Kato S, Bazhenova L, et al. Tumor Mutational Burden as an Independent Predictor of Response to Immunotherapy in Diverse Cancers. *Mol Cancer Ther*. Published online January 1, 2017:molcanther.0386.2017. doi:10.1158/1535-7163.MCT-17-0386
104. Mahlokozera T, Vellimana AK, Li T, et al. Biological and therapeutic implications of multisector sequencing in newly diagnosed glioblastoma. *Neuro Oncol*. 2018;20(4):472-483. doi:10.1093/neuonc/nox232
105. Patel AP, Tirosh I, Trombetta JJ, et al. Single-cell RNA-seq highlights intratumoral heterogeneity in primary glioblastoma. *Science*. 2014;344(6190):1396-1401. doi:10.1126/science.1254257
106. Medikonda R, Dunn G, Rahman M, Fecci P, Lim M. A review of glioblastoma immunotherapy. *Journal of Neuro-Oncology*. Published online April 6, 2020. doi:10.1007/s11060-020-03448-1
107. Afzal MZ, Mercado RR, Shirai K. Efficacy of metformin in combination with immune checkpoint inhibitors (anti-PD-1/anti-CTLA-4) in metastatic malignant melanoma. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*. 2018;6(1):64. doi:10.1186/s40425-018-0375-1
108. Scharping NE, Menk AV, Whetstone RD, Zeng X, Delgoffe GM. Efficacy of PD-1 Blockade Is Potentiated by Metformin-Induced Reduction of Tumor Hypoxia. *Cancer Immunol Res*. 2017;5(1):9-16. doi:10.1158/2326-6066.CIR-16-0103
109. Seliger C, Hau P. Drug Repurposing of Metabolic Agents in Malignant Glioma. *Int J Mol Sci*. 2018;19(9):2768. doi:10.3390/ijms19092768
110. Corsello SM, Bittker JA, Liu Z, et al. The Drug Repurposing Hub: a next-generation drug library and information resource. *Nat Med*. 2017;23(4):405-408. doi:10.1038/nm.4306

2. Originalpublikation (englisch)

International Journal of
Molecular Sciences

MDPI

Article

Combined Modulation of Tumor Metabolism by Metformin and Diclofenac in Glioma

Valeria Gerthofer [1], Marina Kreutz [2], Kathrin Renner [2], Birgit Jachnik [1], Katja Dettmer [3], Peter Oefner [3], Markus J. Riemenschneider [4], Martin Proescholdt [4], Arabel Vollmann-Zwerenz [1], Peter Hau [1,†] and Corinna Seliger [1,*,†]

1 Department of Neurology and Wilhelm Sander-NeuroOncology Unit, University Hospital Regensburg, Franz-Josef-Strauss-Allee 11, 93053 Regensburg, Germany; Valeriagerthofer@web.de (V.G.); Birgitt.Jachnik@ukr.de (B.J.); Arabel.Vollmann@ukr.de (A.V.-Z.); Peter.Hau@ukr.de (P.H.)
2 Department of Internal Medicine III, University Hospital Regensburg, Franz-Josef-Strauss-Allee 11, 93053 Regensburg, Germany; Marina.Kreutz@ukr.de (M.K.); Kathrin.Renner-Sattler@ukr.de (K.R.)
3 Institute of Functional Genomics, University of Regensburg, Universitätsstraße 31, 93053 Regensburg, Germany; Katja.Dettmer@ukr.de (K.D.); Peter.Oefner@ukr.de (P.O.)
4 Department of Neuropathology, University Hospital Regensburg, Franz-Josef-Strauss-Allee 11, 93053 Regensburg, Germany; Markus.Riemenschneider@ukr.de (M.J.R.); Martin.Proescholdt@ukr.de (M.P.)
* Correspondence: corinna.seliger@ukr.de; Tel.: +0941-941-88845
† Equal contribution.

Received: 15 July 2018; Accepted: 28 August 2018; Published: 31 August 2018

Abstract: Glioblastoma remains a fatal diagnosis. Previous research has shown that metformin, which is an inhibitor of complex I of the respiratory chain, may inhibit some brain tumor initiating cells (BTICs), albeit at dosages that are too high for clinical use. Here, we explored whether a combined treatment of metformin and diclofenac, which is a non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID) shown to inhibit glycolysis by interfering with lactate efflux, may lead to additive or even synergistic effects on BTICs (BTIC-8, -11, -13 and -18) and tumor cell lines (TCs, U87, and HTZ349). Therefore, we investigated the functional effects, including proliferation and migration, metabolic effects including oxygen consumption and extracellular lactate levels, and effects on the protein level, including signaling pathways. Functional investigation revealed synergistic anti-migratory and anti-proliferative effects of the combined treatment with metformin and diclofenac on BTICs and TCs. Signaling pathways did not sufficiently explain synergistic effects. However, we observed that metformin inhibited cellular oxygen consumption and increased extracellular lactate levels, indicating glycolytic rescue mechanisms. Combined treatment inhibited metformin-induced lactate increase. The combination of metformin and diclofenac may represent a promising new strategy in the treatment of glioblastoma. Combined treatment may reduce the effective doses of the single agents and prevent metabolic rescue mechanisms. Further studies are needed in order to determine possible side effects in humans.

Keywords: glioma; BTICs; metformin; diclofenac; lactate

1. Introduction

Gliomas are primary brain tumors derived from glial cells or glial precursor cells. The 2016 World Health Organization (WHO) Classification of Tumors of the Central Nervous System differentiates between several entities and four different malignancy grades according to histological and molecular criteria [1]. High-grade gliomas, especially glioblastomas (GBMs, WHO grade IV), rank among the most common and malignant primary brain tumors. GBMs are associated with a poor

prognosis. Less than 5% of patients survive five years after being diagnosed; overall survival ranges between 14.6–26.3 months in patients treated within clinical studies [2].

Brain tumor initiating cells (BTICs) represent cancer stem-like progenitor cells, which are characterized by self-renewal, clonogenicity, pluripotency, and the ability to form new tumors after orthotopic implantation [3]. BTICs are not only involved in tumor initiation, they are also involved in progression and recurrence [4–6].

Metformin (1,1-dimethylbiguanide hydrochloride, https://www.drugs.com/metformin.html) is the most frequently prescribed drug in the treatment of type-2 diabetes (T2DM) [7]. Besides its anti-diabetic and indirect hypoglycemic effects, it was found that the biguanide drug has antineoplastic effects, and may reduce the risk of several cancer types in diabetic patients [8]. *In vitro* studies disclosed anti-proliferative and anti-migratory effects not only on human glioblastoma (GBM) lines [9], but also glioma-initiating cells [10,11]. Metformin unfolds its action by the inhibition of complex I of the respiratory chain [12]. The adenosin monophosphate/adenosine triphosphate-ratio (AMP/ATP) increases, and AMP-kinase is activated [13,14], whereas the mammalian target of rapamycin (mTOR) is inhibited [10]. In response, rescue mechanisms such as increased glycolysis, and thereby lactate production, are activated [15]. However, most BTICs only respond to high dosages of metformin [16]. The use of metformin in the treatment of T2DM is not significantly associated with a reduced risk of glioma, as recently described by Seliger et al. [17]. Therapeutic effects, including anti-proliferative as well as anti-migratory effects on tumor cells, may underlie different mechanisms of action, and thus have to be distinguished from the questionable protective effects on glioma incidence.

Diclofenac, a non-steroidal anti-inflammatory drug, which is mainly known for its analgesic effects, may inhibit the glycolysis of tumor cells [18]. Epidemiological studies have revealed that the risk of cancer types associated with chronic inflammatory processes may be reduced partly by COX-2 inhibitors [19–23]. In addition to different COX-dependent and independent mechanisms of action, diclofenac is studied as a possible inhibitor of the outward transport of lactate [24]. As a consequence, glucose uptake is reduced, and mitochondrial as well as glycolytic ATP production is inhibited [24–26].

The primary aim of our study was to investigate if a combined impairment of mitochondrial respiration and glycolysis by metformin and diclofenac could lead to increased inhibitory effects on BTICs (Figure S1).

2. Results

2.1. Stem Cell-Like BTICs Express Nestin and SOX

Using immunocytochemistry, we showed the expression of cancer stem cell markers Nestin and SOX on BTICs. Nestin, which is often expressed in combination with SOX and other stem cell markers, was shown to be expressed on the initiating cells of different tumor types, and was supposed to be a marker for stem cell features such as their self-renewal capacity and tumorigenicity [27,28]. Whereas BTIC-18 was tested positive for Nestin and SOX, BTIC-13 mainly expressed Nestin (Figure S2).

2.2. Combined Treatment of Metformin and Diclofenac Impairs Cell Proliferation and Migration

The effects of metformin, diclofenac, and both agents combined with proliferation were investigated using crystal violet staining at 48-h (data not shown) and 96-h time points. Spheroid assays were used to analyze the anti-migratory effects at 24-h (data not shown) and 48-h time points. The early time point was performed to avoid confounding due to excessive proliferation. Metformin was dissolved in medium, whereas diclofenac was dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO), so we performed medium and DMSO controls. Neither control exerted anti-proliferative or anti-migratory effects (Figure S3). After the confirmation of previously described anti-proliferative and anti-migratory effects of high-dose metformin (10 mM, data not shown) and diclofenac (0.2 mM) [11,29], we investigated whether similar effects might be obtained at lower doses by combining both agents. Therefore, we performed proliferation and migration assays applying different doses of metformin

(3 × 0.01 mM/day, 0.1 mM, 1 mM) in combination with increasing doses of diclofenac (0.05 mM, 0.1 mM, 0.2 mM, as shown in Figure S4). Compared to DMSO control, the combination of 1 mM of metformin and 0.2 mM of diclofenac significantly reduced cell proliferation in all cells. Comparing the combination to sole metformin treatment, significant effects were observed for both BTICs and TCs. In BTIC-13, BTIC-11, and U87, the anti-proliferative effects of the combined treatment were comparable to high-dosed metformin treatment (10 mM) or treatment that was even more pronounced (Figure S5). Compared to diclofenac treatment, the combined treatment showed a significant reduction of proliferation in BTIC-11 and BTIC-13 (Figure 1). The combination of metformin and diclofenac showed significant anti-migratory effects in all BTIC and TC lines. In BTIC-11, BTIC-18, and BTIC-8, migration was reduced significantly compared to sole metformin as well as to sole diclofenac treatment. In U87 and BTIC-13, the combined treatment led to a slight reduction of migration compared even to high-dosed metformin treatment (Figure 2 and Figure S5), but not compared to diclofenac treatment. Although HTZ349 showed a reduced anti-migratory response upon combined treatment versus 0.2 mM of diclofenac alone in this analysis, the calculation of the combination index (CI) indicated overall synergistic effects. We calculated the CI using CompuSyn software according to the program's recommendations. Thereby, CI < 1 indicates synergistic effects, CI = 1 additive effects, and CI > 1 indicates antagonistic effects. In the calculation of the combination index, we included all of the tested dosage combinations of diclofenac and metformin. Even though (especially in BTICs) low dosages of metformin and diclofenac didn't significantly affect proliferation and migration (Figure S4), synergistic effects on proliferation were reached in all of the TC lines (HTZ349 0.83 and U87 0.79) as well as all of the BTICs (BTIC-13 0.95, BTIC-18 0.77, BTIC-11 0.99, and BTIC-8 0.74), according to Ting Chao Chou's combination index. Regarding migration, synergistic effects were calculated in all of the tested cells except BTIC-13 (HTZ349 0.38, U87 0.56, BTIC-13 >1, BTIC-18 0.68, BTIC-11 0.62, and BTIC-8 0.17, as shown in Table 1).

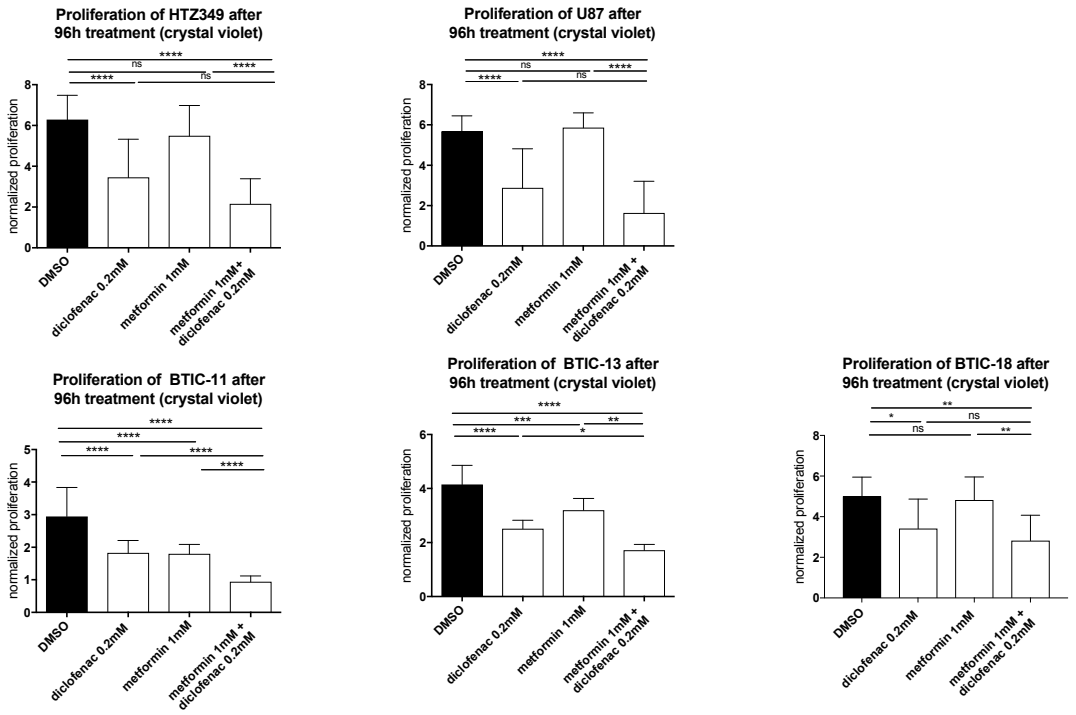


Figure 1. The effects of metformin, diclofenac, and both agents on proliferation were investigated using crystal violet staining at a 96-h time point. Results are expressed as mean ± SD, and were analyzed by two-way ANOVA, $p = 0.0332$ (*), $p = 0.0021$ (**), $p = 0.0002$ (***), $p \leq 0.0001$ (****) compared pairwise, i.e., the metformin-treated versus metformin and diclofenac conditions.

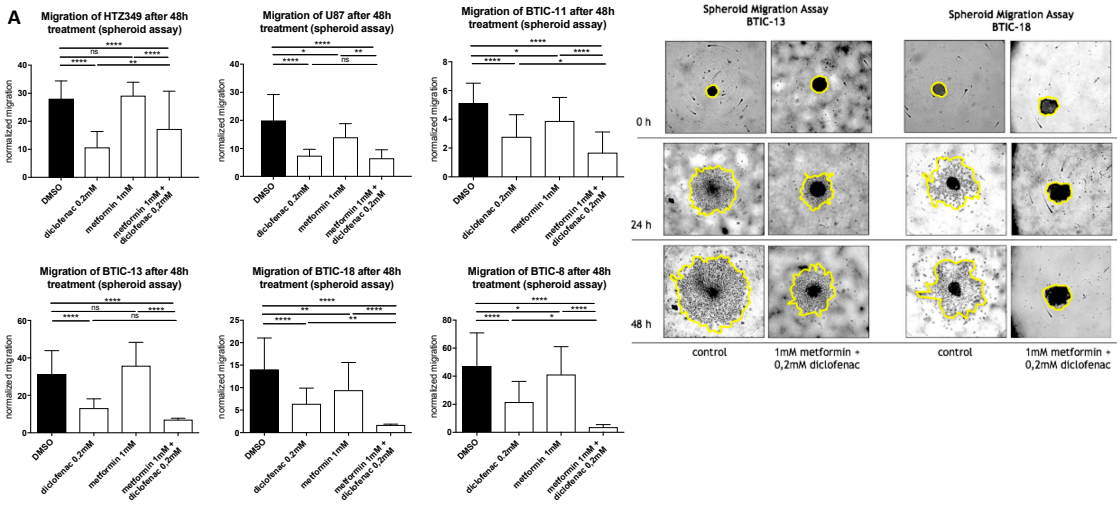


Figure 2. (**A**,**B**) Spheroid assays were used to analyze the anti-migratory effects at a 48-h time point. Results are expressed as mean ± SD and were analyzed by two-way ANOVA, $p = 0.0332$ (*), $p = 0.0021$ (**), $p = 0.0002$ (***), and $p \leq 0.0001$ (****) compared pairwise, i.e., the metformin-treated versus metformin and diclofenac condition.

Table 1. Combination index (CI) using CompuSyn software. Thereby, CI < 1 indicates synergistic effects, CI = 1 additive effects, and CI > 1 antagonistic effects.

	CI-Proliferation	CI-Migration	Effect-Proliferation	Effect-Migration
HTZ 349-laminin	0.83699	0.38254	synergistic	synergistic
BTIC-13-laminin	0.95719	>1	synergistic	antagonistic
BTIC-18-laminin	0.77451	0.68924	synergistic	synergistic
U87-aminin	0.7953	0.56451	synergistic	synergistic
BTIC-11-laminin	0.99912	0.62748	synergistic	synergistic
BTIC-8-laminin	0.74232	0.17014	synergistic	synergistic

2.3. Metformin, Diclofenac, and Combined Treatment at Low Doses Do Not Increase Cell Death

Measuring cell proliferation using crystal violet staining includes possible confounding by cell attachment and cell death, because several washing steps may lead to the loss of non-adherent cells. Therefore, we performed crystal violet staining on all cell lines with and without laminin coating of the flasks, and added a cell cytotoxicity assay. Laminin is an extracellular matrix glycoprotein and one of the main components of basal lamina that is known to support adhesion and cell proliferation. When seeded with laminin, the treatment response was less efficient, indicating that cell attachment also has an impact on treatment sensitivity, especially in BTICs. As BTIC-8 tends to grow only in spheres, proliferation could only be investigated with laminin coating (Figure S6). However, laminin coating itself may also change pivotal cell characteristics such as progenitor features in BTICs, and the artificial monolayer of cells normally growing fully or partly in spheres may influence cellular programs for proliferation, migration, and adhesion.

To rule out cytotoxic treatment effects, we afterwards performed a lactate dehydrogenase (LDH) cytotoxicity assay. Compared to medium and the DMSO control, no significant increase in LDH activity was measured after 48 h of treatment (Figure S7). We concluded that metformin, diclofenac, and the drug combination might reduce the cells' attachment ability without causing cell death.

2.4. Combined Treatment of Metformin and Diclofenac Reduces Extracellular Lactate Levels Compared to Metformin Treatment. Effects on Oxygen Consumption Differ between Cell Lines

Using the PreSens assay®, we were able to confirm that high-dosed metformin (10 mM) decreased oxygen consumption in BTIC and TC cell lines before any obvious alterations in proliferation (Figure S8). Extracellular lactate levels were between 2.5–10 times higher after 48 h of exposure to 10 mM of metformin (Figure S9). Furthermore, extracellular lactate levels were tested at an early time point (24 h). Compared to the control, extracellular lactate levels were four times higher after 24 h of treatment with a low dose of metformin (1 mM). Then, we investigated the changes in extracellular lactate levels and oxygen consumption after exposure to diclofenac and the combination of both drugs. Compared to the DMSO control, diclofenac treatment (24 h) caused a non-significant reduction of extracellular lactate levels. The combination of metformin and diclofenac counteracted the lactate increase in extracellular lactate and concomitant drop in pH that had been observed under the sole treatment with metformin (Figure 3A, Figure S9 exemplarily shown for U87).

Regarding oxygen consumption, the effects of single and combined treatment were heterogeneous. After 20 h, metformin decreased oxygen consumption in BTICs as well as TCs compared to the DMSO control; dose-dependent effects could be shown. Dependent on the individual BTICs or TCs, diclofenac either decreased (BTIC-11) or increased oxygen consumption (U87, slight time-dependent decrease in BTIC-13), or did not show any alteration (BTIC-18, HTZ349). Combined treatment led to decreased oxygen consumption in HTZ349, U87, BTIC-13, and BTIC-11. After 20 h, oxygen levels were similar to those after the single treatment. An additive inhibitory effect on cell respiration after combined treatment could not be shown. In BTIC-18, a lower oxygen concentration compared to DMSO was measured, indicating an increase in oxygen consumption (Figure 3B, SL8). Those findings suggest the individual cell rescue mechanisms of each cell line after combined treatment.

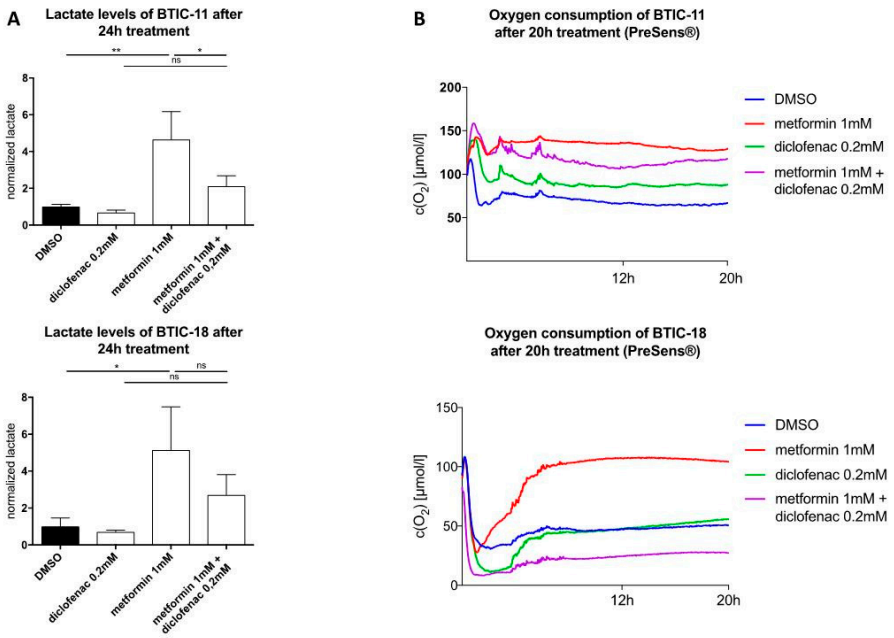


Figure 3. (**A**) Extracellular lactate levels after 24 h of treatment; (**B**) Oxygen concentration in the cell cultures were measured using the SDR SensorDish Reader (PreSens Precision Sensing, Regensburg, Germany) for 20 h. Cells were seeded considering their stereotypic oxygen consumption in different amounts. Measurements were performed in 60-s intervals. Results are expressed as mean ± SD and were analyzed by two-way ANOVA, $p = 0.0332$ (*), $p = 0.0021$ (**), compared pairwise, i.e., the metformin-treated versus metformin and diclofenac condition.

2.5. Combined Treatment Doesn't Lead to Additive Effects on MTor or STAT3 (Signal Transducer and Activator of Transcription 3) Signaling Pathways

Furthermore, we performed Western blots of the signaling pathways known to be affected by metformin or diclofenac. Seliger et al. and others before were able to show that metformin treatment results in a dose-dependent activation of AMPK, which is an AMP-dependent kinase that is involved in the enzymatic regulation of cellular energy shortages [16]. Subsequently, but also independently, the serine/threonine-kinase mTOR, which is known to be suppressed by AMPK, is inhibited. As previously shown, STAT3 (Signal Transducer and Activator of Transcription 3) is inhibited in a dose-dependent manner after exposure to metformin [30]. Leidgens et al. found that (at least in TCs) STAT3 is also inactivated by diclofenac treatment [29].

The dose-dependent deactivation of mTOR and STAT3 by metformin could be reproduced in TCs as well as in BTICs (Figure 4). Diclofenac treatment did not show any influences on mTOR activation. Regarding the combined treatment with both agents, pmTOR levels were similar to those of treatment with 1 mM of metformin, whereas in BTIC-13, the decrease of pmTOR was comparable to the effect of high-dosed metformin (10 mM, Figure 4). In U87, diclofenac reduced the activation of STAT3 (phosphorylation), whereas in the other tested cells, pSTAT3 levels did not show any significant alterations compared to the DMSO control. In U87, BTIC-13, and BTIC-18, combined treatment with metformin and diclofenac led to the deactivation of STAT3 without reaching significance. Compared to single treatment with metformin and diclofenac, no additive effects were shown.

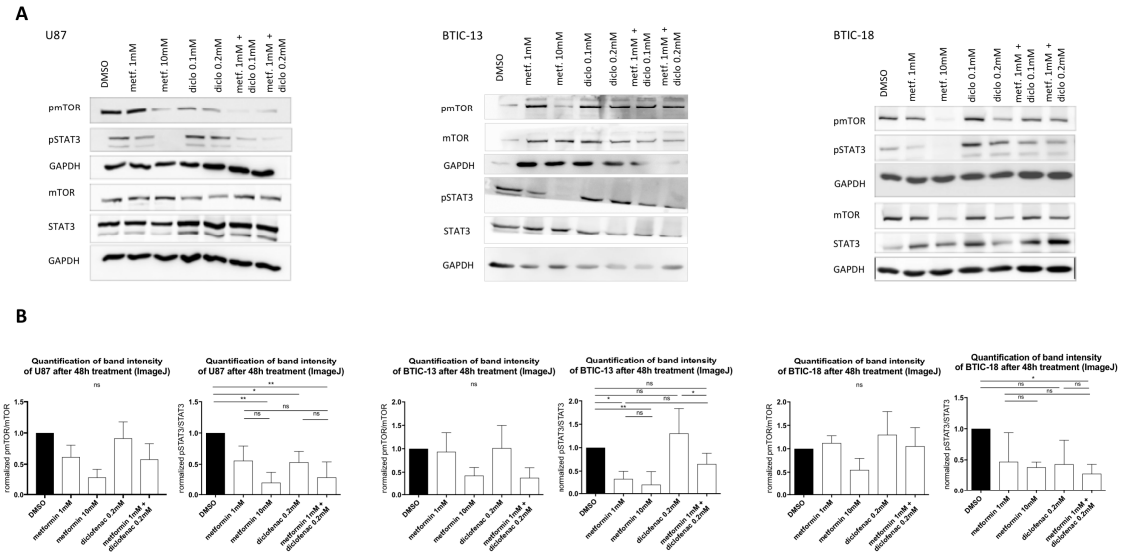


Figure 4. (**A**) Protein levels of the (phosphorylated) mammalian target of rapamycin (p)mTOR, (phosphorylated) signal transducer and activator of transcription 3 (p)STAT3 and GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) were investigated using Western blot analysis with specific monoclonal antibodies for STAT3, phosphorylated STAT3 (pSTAT3), mTOR, phosphorylated mTOR (pmTOR) (all Cell Signaling, New England Biolabs GmbH, Frankfurt, Germany), and GAPDH2 (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany) in dry milk (1%) overnight at 4 °C. Expression was measured by chemoluminescence. (**B**) The intensity of protein bands was determined using ImageJ software, and the protein regulation of at least two replicates was calculated by normalization to loading control and treatment control. Results are expressed as mean ± SD and were analyzed by two-way ANOVA, $p = 0.0332$ (*), $p = 0.0021$ (**), compared pairwise, i.e., the metformin-treated versus metformin and diclofenac condition.

3. Discussion

For the first time, we showed that metformin in combination with diclofenac reduced migration and proliferation in primary human brain tumor initiating cells, as well as in human glioma cells. The effects on BTICs were weaker after coating with laminin. Besides a possible cell attachment effect, laminin is also known to modify the stem-cell characteristics of cancer stem cells. For instance, Qin et al. reviewed the role of the extracellular matrix protein as a regulator of cancer stem cell properties such as epithelial–mesenchymal transition, dedifferentiation, and metastatic potential [31]. According to that, we showed that the proliferation of U87 and HTZ349 as differentiated glioma cells was inhibited, regardless of laminin addition.

As LDH activity was not increased after the treatment, we ruled out cytotoxic effects and the possibility that stronger treatment response without laminin coating might be due to cell death and thereby a loss of adherence.

We were able to confirm that metformin treatment reduced oxygen consumption and increased extracellular lactate levels, indicating intensified energy generation via glycolysis, whereas diclofenac only slightly reduced lactate. The reduction of extracellular lactate levels by diclofenac was less pronounced in comparison with previous publications exploring the inhibition of cellular lactate production by NSAIDs. This might be because BTICs especially frequently rely on mitochondrial ATP production in an oxygen-rich cell culture environment. Regarding the different BTICs used in this study, particularly untreated BTIC-18 consumed high amounts of oxygen. In accordance, metformin treatment led to a strong inhibition of oxygen consumption, whereas diclofenac did not alter extracellular lactate levels significantly. The combination of both drugs reduced extracellular lactate levels compared to single metformin treatment. Regarding cell-signaling pathways, the combined treatment led to a reduction of activated (phosphorylated) STAT3 in U87, whereas in BTICs, the combination did not alter phosphorylated STAT3 (pSTAT3) levels compared to the single treatment with metformin or diclofenac.

A large number of epidemiological studies revealed that exposure to metformin was associated with a reduction of the risk of different cancer types such as liver, colorectal, pancreatic, stomach, and esophageal cancer [8]. However, there were also numerous malignancies that did not benefit from metformin exposure. Seliger et al. showed that metformin treatment did not significantly reduce the risk of glioma [17]. Besides epidemiological associations between metformin and the risk of cancer, the drug's antineoplastic effects have been observed in many in vitro and in vivo studies. Regarding brain tumor initiating cells, metformin inhibited migration [32] and proliferation by inducing apoptosis, autophagy, and differentiation [10,11,13,33,34]. Würth et al. demonstrated that metformin exerts its anti-proliferative effects, especially on CD 133-expressing BTICs, without causing cell death up to 10 mM [10]. In addition, metformin showed anticancer effects in many in vivo experiments. More than 15 years ago, Owen et al. were able to show that metformin inhibited the mitochondrial respiratory chain, and thereby restrained gluconeogenesis in a time-dependent manner [12]. In BTICs, impaired proliferation and migration was also due to an inhibition of complex I of the respiratory chain [9,16]. In order to survive, malignant cells need to activate alternative ways of ATP production, similar to increased glycolysis resulting in dropping pH values in the cell culture medium [33]. The activation of metabolic rescue mechanisms, the differentiation of progenitor cell-like brain tumor initiating cells into non-tumorigenic cells, as well as the suppression of inflammatory response, are exerted through the activation of AMP-dependent kinase (AMPK) [7,10,13,14,35,36] and the downstream inhibition of mTOR [9,11,16]. Furthermore, metformin treatment exerts its effects partly through the deactivation of STAT3 [30]. STAT3 has been shown to be essential to maintain the tumor-initiating capacity, invasion capacity, cell survival, and cell cycle progression [37,38]. Metformin subsequently induces apoptosis and autophagy, and blocks tumor progression [39–41]. That the use of metformin in the treatment of T2DM did not show protective effects on glioma incidence might be explained by different underlying molecular mechanisms compared to therapeutic use in cancer treatment.

In daily T2DM treatment, a drug dose of up to 2550 mg metformin/day is recommended by the Federal Drug Administration (FDA) (https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2017/020357s037s039,021202s021s023lbl.pdf), and with those doses, drug levels of around 40 μM can be measured in the portal vein and cerebrospinal fluid, and 10 μM can be measured in brain tissue, whereas in mouse models with long-term metformin use and intensified dosages, metformin concentrations of up to 5 mM could be reached in the serum, which extended the lifespan of mice [42–44]. Although in most of the prior in vitro studies (among others, Gritti et al.) metformin was used in even higher dosages [34], some authors have argued that metformin may have several effects that are individually small but collectively effective at achieving the desired effect. To reduce the individual drug doses, metformin is currently combined with different pharmacological partners or used in combination with classical chemotherapeutics in order to reduce drug doses and possibly side effects by maintaining anticancer effects. Metformin and temozolomide, which is an alkylating agent used in the treatment of WHO grade IV glioma according to the Stupp protocol [45], synergistically inhibited the proliferation of brain tumor-initiating and differentiated glioma cells in vitro and in vivo. Recently, Valtorta et al. showed that the combined treatment of metformin and temozolomide helped to overcome resistance in glioblastoma multiforme [46]. According to Aldea et al., metformin in combination with sorafenib exerted selective anti-proliferative effects in BTICs and non-stem glioblastoma cells, whereby sorafenib also affected the proliferation of normal cells [47]. Several studies showed that anti-proliferative effects on different types of cancer could be potentiated by combining metformin with classic chemotherapeutic drugs. For example, Zhu et al. treated cholangiocarcinoma cells with metformin and gemcitabine or cisplatin, Peng et al. used the biguanide in combination with gefitinib on bladder cancer cells, and Harada et al. demonstrated that metformin in combination with 5-FU (fluorouracil) suppressed tumor progression in squamous cell carcinoma [48–50]. We used a dose of 1 mM of metformin in most of our assays, which can still be considered as high, because complex 1 in hepatocytes was started to be inhibited at doses as low as 50–100 μM of metformin [12,51]. Furthermore, in recent experiments, 1 mM of metformin has been shown to be associated with increased cell apoptosis in HUVEC (human umbilical vein endothelial cells) [52].

In 1956, Otto Warburg revealed that cancer cells provided their energy mainly by upregulating glycolysis despite sufficient oxygen supply in the tumor microenvironment [53]. Today, this metabolic switch from the oxidative to the glycolytic pathway is known as the Warburg effect. As metformin promotes glycolysis and in consequence lactate production as a rescue mechanism, glycolysis-blocking agents seem to be suitable pharmacological partners. Saber et al. showed that metformin in combination with 5-aminosalicylacid decreased the proliferation of colorectal cancer and in melanoma, the combination of metformin and oxamate, known as an inhibitor of LDH and thereby glycolysis, retarded tumor progression in mice [54,55].

In this study, we considered the frequently used NSAID diclofenac as a promising combination partner. Besides its anti-inflammatory and analgesic capacities (www.drugs.com/pro/diclofenac.html), diclofenac and other NSAIDs have been shown to exert antineoplastic effects by COX-dependent and independent mechanisms [22,56–58]. Among others, Cha and Taketo reviewed the important role of COX-2 and its product PGE2 in tumorigenesis, including angiogenesis, migration, invasion, tumor progression, the inhibition of apoptosis, and in consequence, the inhibitory effects of NSAIDs [20,21,59–61]. Chirasani et al. demonstrated in a murine glioma model that diclofenac inhibited lactate formation beginning at a dosage of 0.1 mM [18]. According to Gottfried et al., diclofenac may affect glucose uptake and lactate secretion not only by reducing the gene expression of responsible transporters via MYC, but also by inhibiting lactate efflux [24]. Sasaki et al. demonstrated that out of the four tested NSAIDs, diclofenac was the most potent inhibitor of glycolysis [62].

Constant lactate efflux is essential to avoid intracellular acidification and guarantee continuous ATP production via glycolysis relying on a concentration gradient of lactate and protons between the intracellular compartment and the tumor microenvironment [63].

In summary, we provide data that suggest that a combination of increased intracellular lactate levels due to the inhibition of mitochondrial respiration and a blockage of glycolysis exerts additive anti-proliferative and anti-migratory effects of metformin and diclofenac in BTIC and glioma cell lines. These effects are not explained by the direct effects of metformin on candidate signaling pathways. As diclofenac is assumed to reduce extracellular lactate levels not only by the direct inhibition of outward transport, but also by influencing gene expression, further studies are needed to investigate the possible additive effects on those signal pathways.

As especially anti-migratory effects were shown, it might be interesting to observe how signal pathways that are involved in migration and metastasis formation, i.e., NF-kappaB (Nuclear Factor kappa B) or SMAD, are affected by the combined treatment. Furthermore, in vivo, BTICs can be differed into a proliferative and migrative subtypes [64]. Those different subtypes might react in different ways to the combined treatment used in this study. Human mesenchymal stem cells isolated from the umbilical cord only showed a 20% reduction of viability after being treated with 50 mM of metformin, but we don't know how healthy cells are affected by the combined treatment [10]. Impairing mitochondrial respiration and glycolysis might affect other cells beyond cancer cells. Control cell lines, i.e. astrocytes, are needed, as a therapy used in cancer treatment is expected to be active on pathological cells while not affecting normal cells. Furthermore, metformin, especially in combination with diclofenac, doesn't exert its effects on the human body only by impairing a single biochemical pathway. Used in therapeutic dosages, the risk of causing a lactic acid crisis might be more relevant than in diabetic treatment. Besides, the effects of metformin may vary according to short-term or long-term exposure, which we did not further check in our experimental setting [65,66]. In order to investigate not only the exact mechanism of a combination of metformin and diclofenac, but also its effects on the tumor microenvironment, including angiogenesis and the immune system, as well as the whole (human) body, in vivo models are needed. If these models can substantiate the effects we show here, future clinical trials may investigate metformin in combination with diclofenac in patients with glioblastoma.

4. Materials and Methods

4.1. Ethics Statement

The local neuropathology department determined the patients' diagnoses and WHO grade, and routine histopathology was accompanied by testing for *IDH1* mutation (by Sanger or Pyrosequencing) and *MGMT* promoter methylation status (by MethyQESD [67]). Clinical parameters such as age, gender, type of treatment, and overall survival (according to the RANO criteria) were available for all patients. The ethics committee of the University of Regensburg, Regensburg, Germany (No° 11-103-0182) approved the study, and all of the patients gave written informed consent.

4.2. Tumor Cell Lines

BTIC-8, -11, -13, and -18 are primary tumor cell cultures derived from the same human glioblastoma, as described before [11,29]. For the enrichment of BTICs, tumor specimens were mechanically or enzymatically dissociated, washed with PBS (Phosphate-buffered saline), and passed through a cell strainer with a 30-µm pore size to obtain a single cell suspension. After isolation, BTICs were frozen and used at different time points in passages 12–25. BTICs were maintained in RHB-A-based serum-free culture media supplemented with 20 ng/mL of the mitogens EGF (Epidermal Growth Factor) and FGF (Fibroblast Growth Factor) (both Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Germany), at 37 °C, 5% CO_2, 95% humidity in a standard tissue culture incubator. The progenitor features of BTIC lines were verified by clonogenicity assays, and partly by tumor take assays in an immunocompromised mouse model.

Human high-grade glioma cell line U87 was obtained from the American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA). HTZ349 is a primary tumor cell culture derived from the resection of

a human glioblastoma established at the university clinic in Würzburg, Germany, as described before [68]. Tumor cells were maintained as monolayer cultures in Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM with 1 g/L of glucose; Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany), supplemented with 10% fetal calf serum (FCS; Biochrom, Berlin, Germany) at 37 °C, 5% CO_2, 95% humidity in a standard tissue culture incubator. All of the experiments were performed using Dulbecco's Modified Eagles Medium, supplemented with 10% fetal calf serum for TCs, 2% of B27, and 0.01% of EGF and FGF for BTICs.

4.3. Proliferation Assay

Proliferation was assessed using crystal violet staining. Briefly, cells were seeded at densities of 2.5×10^3 cells/mL in a 200 µL/well. In addition, proliferation was also assessed with laminin coating. Therefore, non-adherent as well as adherent cells were seeded on laminin-coated wells and incubated for at least 2 h. After 48 h to 72 h, the media was renewed, and cells (at least five replicates) were treated with specific concentrations of metformin, diclofenac, a combination of both, or control media. Proliferation was measured at 0 h, 48 h, and 96 h, respectively. Medium was exchanged with 0.5% of crystal violet in a 20% methanol solution, and cells were stained for 10 min. After washing and drying, the crystal violet was diluted into a homogenous solution by the addition of 0.1 M sodium citrate in 50% ethanol, and measured at 550 nm (VarioSkan Flash Multimode Reader, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). For all of the assays, background fluorescence was subtracted, and values were normalized to the 0 h values. Assays were performed in five or six replicates and repeated twice.

4.4. Migration Assay

Tumor spheroids were generated by seeding 2.5×10^3 cells onto agarose-coated wells (1% agarose in 1 × PBS), as described [11,29]. Cells were cultured for 48 h to allow spheroid formation. Mature spheroids were transferred into non-coated 96-well plates containing the corresponding drugs. Cell migration was monitored at 0 h, 24 h, and 48 h, taking into account the earliest time point when migration was measurable to prevent the dilution of results by proliferation effects. The area covered by cells was measured by tracing the covered area manually (freehand selection module, ImageJ software, version 1.50i, NIH, USA). Assays were performed in five to six replicates and repeated twice.

4.5. Protein Isolation and Western Blot

To investigate the protein levels of (p)mTOR, (p)STAT3, and GAPDH, whole-cell lysates were prepared with RIPA buffer (radioimmunoprecipitation assay buffer). For Western blot analysis, 30 µg of total cell lysates were diluted in Laemmli buffer, separated on a 10% SDS-PAGE gel, and transferred to nitrocellulose membranes by semi-dry blotting or wet blotting. The membranes were blocked with 5% milk powder or 5% BSA (bovine serum albumin) in 0.02% Tween in TBS (Tris-buffered saline) for 1 h. Membranes were incubated with specific monoclonal antibodies for STAT3 (#9145), phosphorylated STAT3 (#4904) (pSTAT3) (#9145), mTOR (#2983), phosphorylated mTOR (pmTOR) (#5536) (all Cell Signaling, New England Biolabs GmbH, Germany), and GAPDH2 (sc-48167) (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany) in dry milk (1%) overnight at 4 °C. For U87 and BTIC-18, we used different membranes for phosphorylated and unphosphorylated proteins. For BTIC-13, the same membrane was used for (p)mTOR and (p)STAT3. After incubation with the first antibody (phosphorylated), expression was measured; afterwards, the membranes were stripped and incubated with the secondary antibody (unphosphorylated). Expression was measured by chemoluminescence (ECL Western Blot Bright, Biozym, Germany). Intensities of protein bands were measured with ImageJ software using the gel analyze module, and protein regulation of two or three Western blots each was calculated by normalization to loading and treatment control using GraphPad Prism software (Version 6 and 7, GraphPad Software, La Jolla, CA, USA).

4.6. LDH Activity Measurement

To check for LDH enzyme activity, the LDH cytotoxicity assay (Promega, Mannheim, Germany) was performed. The assay is based on an enzymatic coupling reaction: LDH oxidizes lactate in order to generate NADH, which then reacts with pyruvate and a dye to generate a yellow color. LDH activity was quantified with a plate reader (VarioSkan Flash Multimode Reader, Thermo Scientific, USA) at 490-nm absorption. In summary, cells were seeded 24 h prior to treatment with 2.5×10^3 cells/well in 200 µL of serum-free media/well, and incubated with either the indicated concentrations of metformin, diclofenac, or a combination of both; NaOxamat (25 mM) was used as a positive control. Then, 24 h and 48 h later, LDH activity was measured.

4.7. Online Measurement of Oxygen Concentration and PH Levels in Cell Culture

The SDR SensorDish Reader (PreSens Precision Sensing, Regensburg, Germany) is a 24-channel oxygen and pH meter. Therefore, luminescent dyes integrated at the bottom of a 24-well multidish function as sensors. The lifetime of those dyes depends on the oxygen concentration in each well. Depending on the pH levels, the fluorescent dyes change their intensity over time.

The signals are read out non-invasively by the SensorDish Reader and converted using calibration parameters stored in the software. Cells were seeded considering their stereotypic oxygen consumption in different amounts, i.e., 1.5 (BTIC-18) or 3×10^5 (BTIC-11, BTIC-13, BTIC-8, U87, and HTZ349) cells/well and incubated in 1 mL of medium. After 24 h, medium was exchanged and cells were treated with metformin, diclofenac, or a combination of both agents. Afterwards, the SensorDish Reader was used in the incubator for the whole duration of the 24-h treatment period.

4.8. Extracellular Lactate Levels

Extracellular lactate was measured using mass spectrometry, as described [69].

4.9. Combination Index

Ting Chao Chou's combination index was automatically calculated using CompuSyn software (www.combosyn.com). The combination index allows differing between additive, synergistic, or antagonistic effects of a drug combination using the dose-effect curve for each drug and the combined treatment. Therefore, the dose-effect parameters of each drug alone, as well as in combination, are needed in order to determine the CI value.

Four data points of 3×0.01 mM, 0.1 mM, 1 mM, and 10 mM, and three data points of 0.05 mM, 0.1 mM, and 0.2 mM were used to determine the dose-effect curve of metformin and diclofenac. Furthermore, $3 \times 0.01 + 0.05$, $3 \times 0.01 + 0.1$, $3 \times 0.01 + 0.2$, 0.1 + 0.05, 0.1 + 0.1, + 0.2, 1 + 0.05, 1 + 0.1, and 1 + 0.2 were used in combination analysis.

Detailed procedures of automated dose-effect analysis for the quantification/simulation of synergism or antagonism are given in the User's Guide for CompuSyn [70].

4.10. Immunocytochemistry

For the staining of DAPI (4′,6-Diamidin-2-phenylindol), Nestin and SOX 2–5×10^5 (U87: 5–10×10^3) cells/well were seeded in laminin-coated coverslips. Supernatants were removed 48 h after treatment, and cells were fixed with 4% paraformaldehyde (441244, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany) for 10 min. After threefold washing with PBS and blocking with blocking buffer (PBS, 10% donkey serum #S30-100, Merck-Millipore, Darmstadt, Germany, 1% BSA #82-100-6, Merck-Millipore, Darmstadt, Germany, 0.1% Triton X-100 #T8787, Sigma Aldrich, Taufkirchen, Germany) for 2 h, coverslips were incubated with primary antibodies diluted in blocking buffer (mouse anti-Nestin #MAB5326, Merck-Millipore, Darmstadt, Germany ,1:500; goat anti-sox-2 #sc-17320, Santa Cruz, Dallas, TX, USA, 1:500; mouse anti-MCT-1 #sc-365501, Santa Cruz, Dallas, TX, USA, 1:50; rabbit anti-MCT-4 #sc-50329, Santa Cruz, Dallas, TX, USA, 1:50) at 4 °C overnight,

washed with blocking buffer three times before incubation with secondary antibodies (Alexa Fluor® 568 donkey anti mouse #A-10037, Life technologies, Darmstadt, Germany, 1:500; Alexa Fluor® 488 donkey anti-rabbit #A-21206, Life technologies, Darmstadt, Germany, 1:1000; Alexa Fluor® 488 donkey anti-goat #A-11055, Life technologies, Darmstadt, Germany, 1:1000), and DAPI (#D9542, Sigma-Aldrich, 1:1000) for nuclear staining for 1 h. Coverslips were also washed three times with blocking buffer and PBS, respectively, before they were mounted with Prolong Gold (# P96930 , Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and dried overnight. Fluorescence microscopy was performed using the Zeiss Axio Observer.Z1 microscope (Zeiss Axio Observer.Z1, Visitron Systems GmbH, Puchheim, Germany).

4.11. Statistics

Analyses of significant differences between treatment groups (mean values and SDs) were performed by two-way ANOVA with Tukey's multiple comparisons test with a 95% confidence interval, $p = 0.0332$ (*), $p = 0.0021$ (**), $p = 0.0002$ (***), $p \leq 0.0001$ (****). After being normalized, every treatment/control was compared to every other treatment/control. Data were analyzed using GraphPad Prism software (version 6 and 7, GraphPad Software, USA).

Supplementary Materials: The following are available online at http://www.mdpi.com/1422-0067/19/9/2586/s1, Figure S1: Graphical abstract summarizing the expected mechanism of action of combined metformin and diclofenac treatment, Figure S2: Immunocytochemical expression of cancer stem cell-markers Nestin and SOX, Figure S3: (**A**) The effects of medium control and DMSO on proliferation were investigated using crystal violet staining at a 96 h time point. (**B**) Spheroid assays were used to analyze anti-migratory effects at a 48 h time point, Figure S4: Cell proliferation of HTZ349 and BTIC-13 after 96 h treatment with different dosages of metformin, diclofenac and both agents was investigated using crystal violet staining, Figure S5: The effects of metformin, diclofenac and both agents on proliferation were investigated applying crystal violet staining at a 96-h time point, Figure S6: The effects of metformin, diclofenac and both agents on proliferation were investigated applying crystal violet staining at a 96 h time point after laminin coating, Figure S7: To measure LDH enzyme activity, the LDH-cytotoxicity assay was performed, Figure S8: Oxygen concentration in the cell cultures was measured using the SDR SensorDish Reader (PreSens Precision Sensing, Regensburg, Germany) for 24 h, Figure S9: (**A**) Extracellular lactate levels after 48 h of treatment with high and low dose metformin. (**B**) pH-levels after metformin and diclofenac treatment (exemplarily shown for U87).

Author Contributions: Conceptualization, M.K., K.R., P.H. and C.S.; Data curation, B.J.; Formal analysis, V.G., K.R. and B.J.; Investigation, V.G., M.K., B.J., P.O. and M.P.; Methodology, V.G., M.K., K.R., B.J., K.D., P.O., M.J.R., A.V.-Z. and C.S.; Project administration, P.H. and C.S.; Resources, K.D., M.J.R., M.P., P.H. and C.S.; Software, K.R. and K.D.; Supervision, P.O., M.J.R., A.V.-Z., P.H. and C.S.; Validation, P.O. and C.S.; Visualization, V.G.; Writing-original draft, V.G. and C.S.; Writing-review & editing, M.K., K.R., B.J., K.D., P.O., M.J.R., M.P., A.V.-Z. and P.H.

Funding: German Cancer Aid (Deutsche Krebshilfe)

Acknowledgments: We thank the German Cancer Aid (Deutsche Krebshilfe) for financial support to V.G. and P.H.

Conflicts of Interest: No potential conflicts of interest were disclosed.

References

1. Louis, D.N.; Perry, A.; Reifenberger, G.; von Deimling, A.; Figarella-Branger, D.; Cavenee, W.K.; Ohgaki, H.; Wiestler, O.D.; Kleihues, P.; Ellison, D.W. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: A summary. *Acta Neuropathol.* **2016**, *131*, 803–820. [CrossRef] [PubMed]
2. Stupp, R.; Hegi, M.E.; Gorlia, T.; Erridge, S.C.; Perry, J.; Hong, Y.-K.; Aldape, K.D.; Lhermitte, B.; Pietsch, T.; Grujicic, D.; et al. CENTRIC study team Cilengitide combined with standard treatment for patients with newly diagnosed glioblastoma with methylated MGMT promoter (CENTRIC EORTC 26071-22072 study): A multicentre, randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* **2014**, *15*, 1100–1108. [CrossRef]
3. Das, S.; Srikanth, M.; Kessler, J.A. Cancer stem cells and glioma. *Nat. Clin. Pract. Neurol.* **2008**, *4*, 427–435. [CrossRef] [PubMed]
4. Galli, R.; Binda, E.; Orfanelli, U.; Cipelletti, B.; Gritti, A.; De Vitis, S.; Fiocco, R.; Foroni, C.; Dimeco, F.; Vescovi, A. Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma. *Cancer Res.* **2004**, *64*, 7011–7021. [CrossRef] [PubMed]

5. Vescovi, A.L.; Galli, R.; Reynolds, B.A. Brain tumour stem cells. *Nat. Rev. Cancer* **2006**, *6*, 425–436. [CrossRef] [PubMed]
6. Singh, S.K.; Clarke, I.D.; Terasaki, M.; Bonn, V.E.; Hawkins, C.; Squire, J.; Dirks, P.B. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res.* **2003**, *63*, 5821–5828. [PubMed]
7. Goodarzi, M.O.; Bryer-Ash, M. Metformin revisited: Re-evaluation of its properties and role in the pharmacopoeia of modern antidiabetic agents. *Diabetes Obes. Metab.* **2005**, *7*, 654–665. [CrossRef] [PubMed]
8. Franciosi, M.; Lucisano, G.; Lapice, E.; Strippoli, G.F.M.; Pellegrini, F.; Nicolucci, A. Metformin therapy and risk of cancer in patients with type 2 diabetes: Systematic review. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e71583. [CrossRef] [PubMed]
9. Sesen, J.; Dahan, P.; Scotland, S.J.; Saland, E.; Dang, V.-T.; Lemarié, A.; Tyler, B.M.; Brem, H.; Toulas, C.; Moyal, E.C.-J.; et al. Metformin Inhibits Growth of Human Glioblastoma Cells and Enhances Therapeutic Response. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0123721. [CrossRef] [PubMed]
10. Würth, R.; Pattarozzi, A.; Gatti, M.; Bajetto, A.; Corsaro, A.; Parodi, A.; Sirito, R.; Massollo, M.; Marini, C.; Zona, G.; et al. Metformin selectively affects human glioblastoma tumor-initiating cell viability. *Cell Cycle* **2013**, *12*, 145–156. [CrossRef] [PubMed]
11. Seliger, C.; Meyer, A.-L.; Renner, K.; Leidgens, V.; Moeckel, S.; Jachnik, B.; Dettmer, K.; Tischler, U.; Gerthofer, V.; Rauer, L.; et al. Metformin inhibits proliferation and migration of glioblastoma cells independently of TGF-β2. *Cell Cycle* **2016**, *15*, 1755–1766. [CrossRef] [PubMed]
12. Owen, M.R.; Doran, E.; Halestrap, A.P. Evidence that metformin exerts its anti-diabetic effects through inhibition of complex 1 of the mitochondrial respiratory chain. *Biochem. J.* **2000**, *348*, 607–614. [CrossRef] [PubMed]
13. Sato, A.; Sunayama, J.; Okada, M.; Watanabe, E.; Seino, S.; Shibuya, K.; Suzuki, K.; Narita, Y.; Shibui, S.; Kayama, T.; et al. Glioma-initiating cell elimination by metformin activation of FOXO3 via AMPK. *Stem Cells Transl. Med.* **2012**, *1*, 811–824. [CrossRef] [PubMed]
14. Zakikhani, M.; Dowling, R.; Fantus, I.G.; Sonenberg, N.; Pollak, M. Metformin is an AMP kinase-dependent growth inhibitor for breast cancer cells. *Cancer Res.* **2006**, *66*, 10269–10273. [CrossRef] [PubMed]
15. Andrzejewski, S.; Gravel, S.-P.; Pollak, M.; St-Pierre, J. Metformin directly acts on mitochondria to alter cellular bioenergetics. *Cancer Metab.* **2014**, *2*, 1–4. [CrossRef] [PubMed]
16. Seliger, C.; Renner, K.; Kreutz, M.; Meyer, A.; Jachnik, B.; Bogdahn, U.; Vollmann-Zwerenz, A.; Hau, P. P17.39turn Old into New: Metformin as Antineoplastic Agent in Glioblastoma. *Neuro-Oncol.* **2014**, *16*, ii96. [CrossRef]
17. Seliger, C.; Ricci, C.; Meier, C.R.; Bodmer, M.; Jick, S.S.; Bogdahn, U.; Hau, P.; Leitzmann, M.F. Diabetes, use of antidiabetic drugs, and the risk of glioma. *Neuro-Oncol.* **2016**, *18*, 340–349. [CrossRef] [PubMed]
18. Chirasani, S.R.; Leukel, P.; Gottfried, E.; Hochrein, J.; Stadler, K.; Neumann, B.; Oefner, P.J.; Gronwald, W.; Bogdahn, U.; Hau, P.; et al. Diclofenac inhibits lactate formation and efficiently counteracts local immune suppression in a murine glioma model. *Int. J. Cancer* **2013**, *132*, 843–853. [CrossRef] [PubMed]
19. Cha, Y.I.; DuBois, R.N. NSAIDs and cancer prevention: Targets downstream of COX-2. *Annu. Rev. Med.* **2007**, *58*, 239–252. [CrossRef] [PubMed]
20. Taketo, M.M. Cyclooxygenase-2 Inhibitors in Tumorigenesis (Part I). *J. Natl. Cancer Inst.* **1998**, *90*, 1529–1536. [CrossRef] [PubMed]
21. Taketo, M.M. Cyclooxygenase-2 inhibitors in tumorigenesis (Part II). *J. Natl. Cancer Inst.* **1998**, *90*, 1609–1620. [CrossRef] [PubMed]
22. Harris, R.E.; Beebe-Donk, J.; Alshafie, G.A. Reduction in the risk of human breast cancer by selective cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors. *BMC Cancer* **2006**, *6*, 27. [CrossRef] [PubMed]
23. Abnet, C.C.; Freedman, N.D.; Kamangar, F.; Leitzmann, M.F.; Hollenbeck, A.R.; Schatzkin, A. Non-steroidal anti-inflammatory drugs and risk of gastric and oesophageal adenocarcinomas: Results from a cohort study and a meta-analysis. *Br. J. Cancer* **2009**, *100*, 551–557. [CrossRef] [PubMed]
24. Gottfried, E.; Lang, S.A.; Renner, K.; Bosserhoff, A.; Gronwald, W.; Rehli, M.; Einhell, S.; Gedig, I.; Singer, K.; Seilbeck, A.; et al. New aspects of an old drug—iclofenac targets MYC and glucose metabolism in tumor cells. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e66987. [CrossRef] [PubMed]
25. Colen, C.B.; Shen, Y.; Ghoddoussi, F.; Yu, P.; Francis, T.B.; Koch, B.J.; Monterey, M.D.; Galloway, M.P.; Sloan, A.E.; Mathupala, S.P. Metabolic targeting of lactate efflux by malignant glioma inhibits invasiveness and induces necrosis: An in vivo study. *Neoplasia* **2011**, *13*, 620–632. [CrossRef] [PubMed]

26. Miranda-Gonçalves, V.; Honavar, M.; Pinheiro, C.; Martinho, O.; Pires, M.M.; Pinheiro, C.; Cordeiro, M.; Bebiano, G.; Costa, P.; Palmeirim, I.; et al. Monocarboxylate transporters (MCTs) in gliomas: Expression and exploitation as therapeutic targets. *Neuro-Oncol.* **2013**, *15*, 172–188. [CrossRef] [PubMed]
27. Neradil, J.; Veselska, R. Nestin as a marker of cancer stem cells. *Cancer Sci.* **2015**, *106*, 803–811. [CrossRef] [PubMed]
28. Iacopino, F.; Angelucci, C.; Piacentini, R.; Biamonte, F.; Mangiola, A.; Maira, G.; Grassi, C.; Sica, G. Isolation of Cancer Stem Cells from Three Human Glioblastoma Cell Lines: Characterization of Two Selected Clones. *PLoS ONE* **2014**, *9*. [CrossRef] [PubMed]
29. Leidgens, V.; Seliger, C.; Jachnik, B.; Welz, T.; Leukel, P.; Vollmann-Zwerenz, A.; Bogdahn, U.; Kreutz, M.; Grauer, O.M.; Hau, P. Ibuprofen and Diclofenac Restrict Migration and Proliferation of Human Glioma Cells by Distinct Molecular Mechanisms. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0140613. [CrossRef] [PubMed]
30. Leidgens, V.; Proske, J.; Rauer, L.; Moeckel, S.; Renner, K.; Bogdahn, U.; Riemenschneider, M.J.; Proescholdt, M.; Vollmann-Zwerenz, A.; Hau, P.; et al. Stattic and metformin inhibit brain tumor initiating cells by reducing STAT3-phosphorylation. *Oncotarget* **2016**, *8*, 8250–8263. [CrossRef] [PubMed]
31. Qin, Y.; Rodin, S.; Simonson, O.E.; Hollande, F. Laminins and cancer stem cells: Partners in crime? *Semin. Cancer Biol.* **2017**, *45*, 3–12. [CrossRef] [PubMed]
32. Beckner, M.E.; Gobbel, G.T.; Abounader, R.; Burovic, F.; Agostino, N.R.; Laterra, J.; Pollack, I.F. Glycolytic glioma cells with active glycogen synthase are sensitive to PTEN and inhibitors of PI3K and gluconeogenesis. *Lab. Investig.* **2005**, *85*, 1457. [CrossRef] [PubMed]
33. Isakovic, A.; Harhaji, L.; Stevanovic, D.; Markovic, Z.; Sumarac-Dumanovic, M.; Starcevic, V.; Micic, D.; Trajkovic, V. Dual antiglioma action of metformin: Cell cycle arrest and mitochondria-dependent apoptosis. *Cell. Mol. Life Sci.* **2007**, *64*, 1290–1302. [CrossRef] [PubMed]
34. Gritti, M.; Würth, R.; Angelini, M.; Barbieri, F.; Peretti, M.; Pizzi, E.; Pattarozzi, A.; Carra, E.; Sirito, R.; Daga, A.; et al. Metformin repositioning as antitumoral agent: Selective antiproliferative effects in human glioblastoma stem cells, via inhibition of CLIC1-mediated ion current. *Oncotarget* **2014**, *5*, 11252–11268. [CrossRef] [PubMed]
35. Zhou, G.; Myers, R.; Li, Y.; Chen, Y.; Shen, X.; Fenyk-Melody, J.; Wu, M.; Ventre, J.; Doebber, T.; Fujii, N.; et al. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J. Clin. Investig.* **2001**, *108*, 1167–1174. [CrossRef] [PubMed]
36. Nerstedt, A.; Johansson, A.; Andersson, C.X.; Cansby, E.; Smith, U.; Mahlapuu, M. AMP-activated protein kinase inhibits IL-6-stimulated inflammatory response in human liver cells by suppressing phosphorylation of signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3). *Diabetologia* **2010**, *53*, 2406–2416. [CrossRef] [PubMed]
37. Henriksson, M.; Lüscher, B. Proteins of the Myc network: Essential regulators of cell growth and differentiation. *Adv. Cancer Res.* **1996**, *68*, 109–182. [PubMed]
38. Hirano, T.; Ishihara, K.; Hibi, M. Roles of STAT3 in mediating the cell growth, differentiation and survival signals relayed through the IL-6 family of cytokine receptors. *Oncogene* **2000**, *19*, 2548–2556. [CrossRef] [PubMed]
39. Tan, X.-L.; Bhattacharyya, K.K.; Dutta, S.K.; Bamlet, W.R.; Rabe, K.G.; Wang, E.; Smyrk, T.C.; Oberg, A.L.; Petersen, G.M.; Mukhopadhyay, D. Metformin suppresses pancreatic tumor growth with inhibition of NFκB/STAT3 inflammatory signaling. *Pancreas* **2015**, *44*, 636–647. [CrossRef] [PubMed]
40. Pan, Q.; Yang, G.-L.; Yang, J.-H.; Lin, S.-L.; Liu, N.; Liu, S.-S.; Liu, M.-Y.; Zhang, L.-H.; Huang, Y.-R.; Shen, R.; et al. Metformin can block precancerous progression to invasive tumors of bladder through inhibiting STAT3-mediated signaling pathways. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **2015**, *34*, 77. [CrossRef] [PubMed]
41. Deng, X.-S.; Wang, S.; Deng, A.; Liu, B.; Edgerton, S.M.; Lind, S.E.; Wahdan-Alaswad, R.; Thor, A.D. Metformin targets Stat3 to inhibit cell growth and induce apoptosis in triple-negative breast cancers. *Cell Cycle* **2012**, *11*, 367–376. [CrossRef] [PubMed]
42. Łabuzek, K.; Suchy, D.; Gabryel, B.; Bielecka, A.; Liber, S.; Okopień, B. Quantification of metformin by the HPLC method in brain regions, cerebrospinal fluid and plasma of rats treated with lipopolysaccharide. *Pharmacol. Rep.* **2010**, *62*, 956–965. [CrossRef]
43. Martin-Montalvo, A.; Mercken, E.M.; Mitchell, S.J.; Palacios, H.H.; Mote, P.L.; Scheibye-Knudsen, M.; Gomes, A.P.; Ward, T.M.; Minor, R.K.; Blouin, M.-J.; et al. Metformin improves healthspan and lifespan in mice. *Nat. Commun.* **2013**, *4*, 1–9. [CrossRef] [PubMed]

44. He, L.; Wondisford, F.E. Metformin Action: Concentrations Matter. *Cell Metab.* **2015**, *21*, 159–162. [CrossRef] [PubMed]
45. Stupp, R.; Mason, W.P.; van den Bent, M.J.; Weller, M.; Fisher, B.; Taphoorn, M.J.B.; Belanger, K.; Brandes, A.A.; Marosi, C.; Bogdahn, U.; et al. European Organisation for Research and Treatment of Cancer Brain Tumor and Radiotherapy Groups; National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N. Engl. J. Med.* **2005**, *352*, 987–996. [CrossRef] [PubMed]
46. Valtorta, S.; Dico, A.L.; Raccagni, I.; Gaglio, D.; Belloli, S.; Politi, L.S.; Martelli, C.; Diceglie, C.; Bonanomi, M.; Ercoli, G.; et al. Metformin and temozolomide, a synergic option to overcome resistance in glioblastoma multiforme models. *Oncotarget* **2017**, *8*, 113090–113104. [CrossRef] [PubMed]
47. Aldea, M.D.; Petrushev, B.; Soritau, O.; Tomuleasa, C.I.; Berindan-Neagoe, I.; Filip, A.G.; Chereches, G.; Cenariu, M.; Craciun, L.; Tatomir, C.; et al. Metformin plus sorafenib highly impacts temozolomide resistant glioblastoma stem-like cells. *J. BUON Off. J. Balk. Union Oncol.* **2014**, *19*, 502–511.
48. Zhu, H.-Q.; Ma, J.-B.; Song, X.; Gao, H.-J.; Ma, C.-Q.; Chang, H.; Li, H.-G.; Liu, F.-F.; Lu, J.; Zhou, X. Metformin potentiates the anticancer activities of gemcitabine and cisplatin against cholangiocarcinoma cells in vitro and in vivo. *Oncol. Rep.* **2016**, *36*, 3488–3496. [CrossRef] [PubMed]
49. Peng, M.; Huang, Y.; Tao, T.; Peng, C.-Y.; Su, Q.; Xu, W.; Darko, K.O.; Tao, X.; Yang, X. Metformin and gefitinib cooperate to inhibit bladder cancer growth via both AMPK and EGFR pathways joining at Akt and Erk. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 1–10. [CrossRef] [PubMed]
50. Harada, K.; Ferdous, T.; Harada, T.; Ueyama, Y. Metformin in combination with 5-fluorouracil suppresses tumor growth by inhibiting the Warburg effect in human oral squamous cell carcinoma. *Int. J. Oncol.* **2016**, *49*, 276–284. [CrossRef] [PubMed]
51. El-Mir, M.Y.; Nogueira, V.; Fontaine, E.; Avéret, N.; Rigoulet, M.; Leverve, X. Dimethylbiguanide inhibits cell respiration via an indirect effect targeted on the respiratory chain complex I. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 223–228. [CrossRef] [PubMed]
52. Bakhashab, S.; Ahmed, F.; Schulten, H.-J.; Ahmed, F.W.; Glanville, M.; Al-Qahtani, M.H.; Weaver, J.U. Proangiogenic Effect of Metformin in Endothelial Cells Is via Upregulation of VEGFR1/2 and Their Signaling under Hyperglycemia-Hypoxia. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 293. [CrossRef] [PubMed]
53. Warburg, O. On the origin of cancer cells. *Science* **1956**, *123*, 309–314. [CrossRef] [PubMed]
54. Saber, M.M.; Galal, M.A.; Ain-Shoka, A.A.; Shouman, S.A. Combination of metformin and 5-aminosalicylic acid cooperates to decrease proliferation and induce apoptosis in colorectal cancer cell lines. *BMC Cancer* **2016**, *16*. [CrossRef] [PubMed]
55. Chaube, B.; Malvi, P.; Singh, S.V.; Mohammad, N.; Meena, A.S.; Bhat, M.K. Targeting metabolic flexibility by simultaneously inhibiting respiratory complex I and lactate generation retards melanoma progression. *Oncotarget* **2015**, *6*, 37281–37299. [CrossRef] [PubMed]
56. Harris, R.E.; Beebe-Donk, J.; Doss, H.; Burr Doss, D. Aspirin, ibuprofen, and other non-steroidal anti-inflammatory drugs in cancer prevention: A critical review of non-selective COX-2 blockade (review). *Oncol. Rep.* **2005**, *13*, 559–583. [CrossRef] [PubMed]
57. Valle, B.L.; D'Souza, T.; Becker, K.G.; Wood, W.H.; Zhang, Y.; Wersto, R.P.; Morin, P.J. Non-steroidal anti-inflammatory drugs decrease E2F1 expression and inhibit cell growth in ovarian cancer cells. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e61836. [CrossRef] [PubMed]
58. Johnsen, J.I.; Lindskog, M.; Ponthan, F.; Pettersen, I.; Elfman, L.; Orrego, A.; Sveinbjörnsson, B.; Kogner, P. NSAIDs in neuroblastoma therapy. *Cancer Lett.* **2005**, *228*, 195–201. [CrossRef] [PubMed]
59. Wang, D.; Dubois, R.N. Prostaglandins and cancer. *Gut* **2006**, *55*, 115–122. [CrossRef] [PubMed]
60. Marnett, L.J.; DuBois, R.N. COX-2: A target for colon cancer prevention. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2002**, *42*, 55–80. [CrossRef] [PubMed]
61. Gupta, R.A.; Dubois, R.N. Colorectal cancer prevention and treatment by inhibition of cyclooxygenase-2. *Nat. Rev. Cancer* **2001**, *1*, 11–21. [CrossRef] [PubMed]
62. Sasaki, S.; Futagi, Y.; Ideno, M.; Kobayashi, M.; Narumi, K.; Furugen, A.; Iseki, K. Effect of diclofenac on SLC16A3/MCT4 by the Caco-2 cell line. *Drug Metab. Pharmacokinet.* **2016**, *31*, 218–223. [CrossRef] [PubMed]
63. Vellonen, K.-S.; Häkli, M.; Merezhinskaya, N.; Tervo, T.; Honkakoski, P.; Urtti, A. Monocarboxylate transport in human corneal epithelium and cell lines. *Eur. J. Pharm. Sci. Off. J. Eur. Fed. Pharm. Sci.* **2010**, *39*, 241–247. [CrossRef] [PubMed]

64. Giese, A.; Bjerkvig, R.; Berens, M.E.; Westphal, M. Cost of Migration: Invasion of Malignant Gliomas and Implications for Treatment. *J. Clin. Oncol.* **2003**, *21*, 1624–1636. [CrossRef] [PubMed]
65. Lunetta, M.; DiMauro, M. Different effect of acute and chronic oral metformin administration on glucose and insulin response to bread and to pasta in non-insulin dependent diabetic patients. *Diabetes Res. Clin. Pract.* **1996**, *33*, 53–58. [CrossRef]
66. Rena, G.; Hardie, D.G.; Pearson, E.R. The mechanisms of action of metformin. *Diabetologia* **2017**, *60*, 1577–1585. [CrossRef] [PubMed]
67. Dietmaier, W.; Lorenz, J.; Riemenschneider, M.J. [Molecular diagnostics in neuropathology]. *Pathol.* **2015**, *36*, 171–180. [CrossRef]
68. Bogdahn, U.; Apfel, R.; Hahn, M.; Gerlach, M.; Behl, C.; Hoppe, J.; Martin, R. Autocrine Tumor Cell Growth-inhibiting Activities from Human Malignant Melanoma. *Cancer Res.* **1989**, *49*, 5358–5363. [PubMed]
69. Assmann, N.; O'Brien, K.L.; Donnelly, R.P.; Dyck, L.; Zaiatz-Bittencourt, V.; Loftus, R.M.; Heinrich, P.; Oefner, P.J.; Lynch, L.; Gardiner, C.M.; et al. Srebp-controlled glucose metabolism is essential for NK cell functional responses. *Nat. Immunol.* **2017**, *18*, 1197–1206. [CrossRef] [PubMed]
70. Chou, T.-C. Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method. *Cancer Res.* **2010**, *70*, 440–446. [CrossRef] [PubMed]

© 2018 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

3. Danksagung

Zunächst bedanke ich mich bei der Deutschen Krebshilfe, die mich im Rahmen des Mildred Scheel Programms bei meiner Doktorarbeit unterstützt hat.

Ich bedanke mich bei meinem Doktorvater Prof. Peter Hau und meiner Betreuerin PD Corinna Seliger, die mir nicht nur während der Zeit im Labor, sondern auch in der nun doch langen Zeit danach mit Rat und Tat zur Seite gestanden sind. Vielen Dank für die konstruktive Kritik, Verbesserungsvorschläge und vor allem Geduld in den letzten Jahren.

Ich bedanke mich bei dem gesamten Laborteam der NeuroOnko, bei Annabel, Sylvia, Annette, Judith und Lisa, insbesondere aber bei Birgit, die nicht nur meine Zellkulturen gepäppelt hat, sondern mir auch in der ein oder anderen Western Blot-Krise den Rücken freigehalten hat.

Ein großer Dank an meine F.R.I.E.N.D.S, die mein Leben in Regensburg zu dem machen, was es ist. Einen kurzen, aber kräftigen Applaus an die Hüttencrew, die mich als Wahl-Regensburgerin trotzdem jedes Mal wieder mit offenen Armen in der Heimat empfangen haben. AMORE.

Danke Leni für Korrektur und Durchsicht der Arbeit.

Abschließend ein ganz besonderer Dank an meine Eltern und meinen Bruder Matthias, die mich in allem und immer unterstützen und mir meinen bisherigen Lebensweg ermöglicht haben. Danke für den Rückhalt, das Dr. med. vor Gerthofer ist für euch.