

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

Einfluss von Diclofenac-verwandten Substanzen auf CD4⁺ T-Zellen im Vergleich zu entarteten Zellen

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von

Lisa Aigle

2020

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

Einfluss von Diclofenac-verwandten Substanzen auf CD4⁺ T-Zellen im Vergleich zu entarteten Zellen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von

Lisa Aigle

2020

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung:

Prof. Dr. Dirk Hellwig

PD Dr. Kathrin Renner-Sattler

Prof. Dr. Peter Hau

09.02.2021

Für meine Eltern und Großeltern

Inhaltsangabe

Inhaltsangabe VI

Abbildungsverzeichnis VIII

Tabellenverzeichnis X

1. Einleitung 1

1.1 Tumormetabolismus 1

1.2 Nichtsteroidale Antirheumatika 2

 1.2.1 Einfluss der NSAR auf den Tumormetabolismus 3

 1.2.2 Substanzen mit struktureller Ähnlichkeit zu dem NSAR Diclofenac 5

1.3 Die Immunotherapie: Die Rolle des Immunsystems in der Tumorbekämpfung 7

 1.3.1 Immunantwort auf entartete Zellen 8

 1.3.2 Die T-Zellen und ihre Rolle in der Tumorthherapie 8

1.4 Zielsetzung dieser Arbeit 13

2. Material und Methoden 15

2.1 Material 15

 2.1.1 Geräte 15

 2.1.2 Verbrauchsmedien 16

 2.1.3 Chemikalien und Kits 17

 2.1.4 Gemischte Medien und Puffer 18

 2.1.5 Antikörper Durchflusszytometrie 19

 2.1.6 Software und Datenbanken 19

2.2 Methoden 19

 2.2.1 Zellkultur 19

 2.2.2 Funktionelle Analysen 24

 2.2.3 Statistische Auswertung 28

3. Ergebnisse 30

3.1 Diclofenacamid und ML36 30

 3.1.1 Diclofenacamid und ML36 - Laktatproduktion, Proliferation und Apoptose
in Tumorzellen und humanen CD4⁺ T-Zellen 30

 3.1.2 Diclofenacamid und ML36 - Wirkung auf die Funktionen humaner CD4⁺ T-
Zellen 35

3.1.3	Diclofenacamid und ML36 - Wirkung auf humane CD4 ⁺ T-Zellen in der MLR	37
3.2	Das NSAR Lumiracoxib	41
3.2.1	Lumiracoxib – Wirkung auf humane CD4 ⁺ T-Zellen.....	41
3.3	Das NSAR Diflunisal	44
3.3.1	Diflunisal - Wirkung auf humane CD4 ⁺ T-Zellen	45
3.3.2	Diflunisal - Wirkung auf humane CD4 ⁺ T-Zellen in der MLR.....	47
3.4	Das NSAR Ketoprofen	49
3.4.1	Ketoprofen - Wirkung auf humane CD4 ⁺ T-Zellen	49
4.	Diskussion	51
4.1	Das Potential der NSAR in der Tumorthherapie	52
4.2	Die Rolle der Carboxylgruppe des Diclofenacs bei der MCT-Inhibition.....	55
4.3	Der Effekt verschiedener NSAR auf die T-Zell-Funktionen in humanen T-Zellen	57
4.4	Perspektiven: NSAR zur Unterstützung der Immunotherapie?	59
5.	Zusammenfassung.....	62
	Abstract.....	64
	Publikationen	66
6.	Literaturverzeichnis	67
	Danksagung.....	76
	Eidesstattliche Erklärung.....	77

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Synthese von Diclofenac aus dem Vorläufermolekül Diclofenacamid..	5
Abbildung 2. Strukturformeln der in dieser Arbeit verwendeten NSAR.	7
Abbildung 3: Modell zur T-Zellaktivierung.	10
Abbildung 4: Mikroskopische Aufnahmen von C7H2.	20
Abbildung 5: Exemplarische Darstellung der durchflusszytometrischen Analyse mit dem FlowJo Programm.....	25
Abbildung 6: Anti-CD4 ⁺ - und CD4 Isotyp- Messung nach Isolation von CD4 ⁺ T-Zellen.	26
Abbildung 7: Apoptosemessung mit Annexin V/7-AAD Färbung.	27
Abbildung 8: Schematische Darstellung ELISA.	28
Abbildung 9: Diclofenac inhibiert die Laktatsekretion und die Proliferation in den Tumorzelllinien Mellm und C7H2.....	31
Abbildung 10: Diclofenacamid und ML36 zeigen keinen Effekt auf die Laktatsekretion in Tumorzellen und CD4 ⁺ T-Zellen.	32
Abbildung 11: Diclofenacamid und ML36 reduzieren die Proliferation in Tumorzellen, jedoch nicht in T-Zellen.....	33
Abbildung 12: ML36 und Diclofenacamid induzieren Apoptose in Tumorzellen, wobei die Viabilität von T-Zellen nicht beeinflusst ist	34
Abbildung 13: Einfluss von Diclofenacamid und ML36 auf die Zytokinsekretion in CD4 ⁺ T-Zellen.....	36
Abbildung 14: Einfluss von Diclofenacamid und ML36 auf die Expression der Aktivierungsmarker CD25 und CD69 von CD4 ⁺ T-Zellen nach 48 Std.	37
Abbildung 15: Die Wirkung von Diclofenacamid und ML36 auf die Laktatproduktion, Proliferation und Apoptose in humanen T-Zellen in der MLR.	38
Abbildung 16. Lumiracoxib reduziert die Laktatsekretion sowie die Proliferation und fördert trendmäßig die Apoptose in C7H2 Zellen.....	41
Abbildung 17: Lumiracoxib hat trotz geringer Laktatinhibition keinen Einfluss auf Proliferation oder Viabilität primärer CD4 ⁺ T-Zellen.....	42
Abbildung 18: Einfluss von Lumiracoxib auf die Zytokinsekretion und Aktivierungsmarker primärer CD4 ⁺ T-Zellen nach 48 Std.....	43
Abbildung 19: Diflunisal verringert die Laktatproduktion, reduziert die Proliferation und fördert die Apoptose in C7H2 Zellen, nicht jedoch in primären CD4 ⁺ T-Zellen.	45

Abbildung 20: Diflunisal verringert die Zytokinsekretion von CD4 ⁺ T-Zellen ab einer Konzentration von 0,4 mM, beeinflusst aber nicht die Expression der Aktivierungsmarker.....	46
Abbildung 21: Diflunisal reduziert die Laktatsekretion, sowie die Proliferation, induziert jedoch keine Apoptose bei CD4 ⁺ T-Zellen in der MLR.....	47
Abbildung 22: Ketoprofen beeinflusst geringfügig die Laktatsekretion und die Proliferation aber nicht die Apoptose in CD4 ⁺ T-Zellen.....	49
Abbildung 23: Ketoprofen zeigt keine Wirkung auf die Zytokinsekretion und die Expression der Aktivierungsmarker CD25 und CD69 in CD4 ⁺ T-Zellen.	50
Abbildung 24: Mögliche Beteiligung der Carboxylgruppen an der MCT Inhibition. .	57

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Auflistung der verwendeten Geräte	15
Tabelle 2: Auflistung der verwendeten Verbrauchsmedien	16
Tabelle 3: Auflistung der verwendeten Chemikalien und Kits	17
Tabelle 4: Auflistung verwendeter Medien und Puffer.....	18
Tabelle 5: Verwendete Antikörper für die Durchflusszytometrie.....	19
Tabelle 6: Verwendete Software und Datenbanken	19
Tabelle 7: Behandlung der Tumorzelllinie C7H2.....	20
Tabelle 8: Behandlung der CD4 ⁺ T-Zellen.	22
Tabelle 9: Reifungsprotokoll dendritischer Zellen	23
Tabelle 10: Mastermix Apoptose.....	27
Tabelle 11: Zytokinsekretion von T-Zellen aus der MLR unter Behandlung mit Diclofenacamid und ML36.	40
Tabelle 12: Zytokinsekretion und Aktivierungsmarker Expression von T-Zellen aus der MLR unter Behandlung mit Diflunisal.	48

1. Einleitung

1.1 Tumormetabolismus

Tumorzellen zeichnen sich durch eine hohe Proliferationsrate und damit einhergehend einem erhöhten Glukose- und Glutaminstoffwechsel aus. Bereits Otto Warburg beschrieb im Jahre 1956 die Eigenschaft von Tumorzellen, Glukose auch unter aeroben Bedingungen zu Laktat zu metabolisieren, um ihren erhöhten Energiebedarf zu decken (1). Die Umwandlung von Glukose über Pyruvat zu Laktat unter suffizienter Sauerstoffzufuhr wird als „aerobe Glykolyse“ oder auch „Warburg-Effekt“ bezeichnet und führt zur Generierung von zwei Molekülen Adenosintriphosphat (ATP). Im Gegensatz dazu hat die Verstoffwechslung von Pyruvat in den Mitochondrien über den Citratzyklus und anschließender oxidativen Phosphorylierung eine weitaus bessere Bilanz, wobei 36 Moleküle ATP entstehen (2). Obwohl es sich bei der aeroben Glykolyse also um die energetisch ineffektivere Variante handelt, gleicht der schnellere Umsatz diesen Nachteil aus. Diese Veränderung des Zellmetabolismus hin zu einem überwiegend glykolytischen Phänotyp stellt ein Merkmal von Tumorzellen dar (3,4) und scheint zu einem invasiven Tumorwachstum beizutragen (5). An der Regulation des erhöhten Glukosestoffwechsels sind Onkogene beteiligt, wie beispielsweise MYC oder BRAF, Hypoxie-induzierte Faktoren (HIF), der Verlust von Tumorsuppressorgenen wie p53, sowie Kinasen wie mTOR (engl. mechanistic Target of Rapamycin) (4). Um die erhöhte Glykolyse in Tumorzellen zu ermöglichen, wird die Aktivität von vielen glykolytischen Enzymen hochreguliert, insbesondere die der Laktatdehydrogenase (LDH) (6). Zudem kommt es zu einer erhöhten Expression von Transportproteinen wie den Glukose- (GLUT) und den Monocarboxylattransportern (MCT) (7). Das im Zellinneren entstehende Laktat wird im Ko-Transport mit Protonen über die MCTs aus der Tumorzelle geschleust, was zur Laktatakkumulation und gleichzeitig zur Verminderung des pH-Werts in der Tumorumgebung führt, im Folgenden kurz als Milchsäure bezeichnet (8).

Unterschiedliche Studien zeigen, dass eine Korrelation zwischen glykolytischer Aktivität von Tumoren und der Metastasierung und somit auch einer schlechteren Prognose der Patienten besteht (9,10). Deshalb stellt eine Inhibition des Glukosestoffwechsels eine vielversprechende Zielstruktur in der Krebstherapie dar.

Auf der Suche nach geeigneten anti-glykolytischen Substanzen, die das Tumorwachstum vermindern können, sind die nichtsteroidalen Antirheumatika (NSAR) in den Fokus der Forschung gerückt.

1.2 Nichtsteroidale Antirheumatika

Neben einer Vielzahl weiterer Vertreter der NSAR, sind Ibuprofen, Aspirin, Diclofenac, Ketoprofen, oder Coxibe häufig eingesetzte Medikamente in der Behandlung von Schmerzen oder Entzündungsreaktionen. NSAR wirken analgetisch, antiinflammatorisch, antipyretisch und hemmen die Thrombozytenaggregation. Diese Wirkung beruht auf der Inhibition des Enzyms Cyclooxygenase (COX). Es werden die Isotypen der Cyclooxygenase COX1 und COX2 unterschieden. Die COX1 wird in vielen Gewebearten konstitutiv exprimiert und ihre Endprodukte sind für den Erhalt physiologischer Funktionen des Körpers zuständig. Dahingegen bedarf es einer Stimulation durch Entzündungsmediatoren, Wachstumsfaktoren oder Onkogenen, um die Bildung der COX2 zu induzieren (11). Auch in Tumoren konnte bereits eine erhöhte COX2-Expression nachgewiesen werden (12).

Die COX katalysiert die Umsetzung der Arachidonsäure zu Prostaglandin G_2 (PGG_2). Nach Umwandlung des Zwischenprodukts PGG_2 zu PGH_2 , entstehen aus diesem unter anderem Prostaglandine (PG), Prostazykline (PGI_2) und Thromboxan (TXA_2) (11). Das produzierte PGE_2 führt im Magen zu einer Reduktion der Säurebildung und zu vermehrter Mukus- und Bikarbonat-Sekretion, was essenziell für den Schutz der Magenschleimhaut ist. In der Lunge hat es eine leicht bronchodilatatorische Wirkung. In der Niere hat PGE_2 eine gefäßerweiternde und durchblutungssteigernde Funktion (11). PGE_2 ist auch an der Entstehung von Entzündungsreaktionen beteiligt, indem es die Gefäßpermeabilität erhöht und nozizeptive Nervenendigungen sensibilisiert, sowie im Hypothalamus eine Steigerung der Körpertemperatur hervorruft (11). Des Weiteren hemmt PGE_2 die Interleukin-2 (IL-2) und die Interferon- γ (IFN γ) Bildung von T-Zellen (13,14), sowie die IL-1 und Tumornekrosefaktor (TNF) Freisetzung von Makrophagen (11). Somit fördert PGE_2 einerseits die Entzündungsreaktionen, kann die Immunantwort aber andererseits auch eingrenzen. Es konnte gezeigt werden, dass in verschiedenen Tumorentitäten sehr hohe PGE_2 Spiegel vorliegen, die eine Unterdrückung der Immunantwort zur Folge haben (15,16). Zudem regt PGE_2 die

Bildung von vaskulären endothelialen Wachstumsfaktoren an und fördert so die Angiogenese (17).

Prostazyklin ist neben PGE₂ für die Entstehung von Entzündungsreaktionen verantwortlich. Es wird vermehrt von Endothelzellen gebildet, führt zur Vasodilatation und gilt als ein starker endogener Thrombozytenaggregationshemmer (18).

Thromboxan A₂ wird hauptsächlich von Thrombozyten gebildet und ist entscheidend für die Thrombozytenaggregation. Zusätzlich führt es durch Kontraktion der glatten Muskulatur in den Gefäßen zu einer Vasokonstriktion und in der Lunge zur Bronchokonstriktion (19).

Die meisten Vertreter der NSAR hemmen nicht-selektiv COX1 und 2. Mit der Entdeckung der COX2, Anfang der 90er Jahre (11), entstand die Idee der selektiven COX2 Hemmung. Mit dem Einsatz von Coxiben, welche eine hohe Affinität zu COX2 aufweisen, können die typischen gastrointestinalen Nebenwirkungen, assoziiert mit der COX1 Hemmung, umgangen werden. Trotz der Reduktion von Ulcera ist der Einsatz von Coxiben aufgrund von kardiovaskulären und hepatotoxischen Nebenwirkungen nur nach strenger Indikationsstellung empfohlen (20).

1.2.1 Einfluss der NSAR auf den Tumormetabolismus

Verschiedene Studien zeigen, dass ein Zusammenhang zwischen der Einnahme von NSAR und dem verminderten Auftreten von Malignomen besteht. Das British Journal of Cancer veröffentlichte 2001 eine Metaanalyse über den Zusammenhang von Brustkrebs und der Einnahme von NSAR. Die Daten aus 14 Studien weisen darauf hin, dass eine regelmäßige Einnahme von NSAR (unabhängig von Dosis und genauem Präparat) mit einer Verringerung des Risikos an Brustkrebs zu erkranken assoziiert ist (21). Auch für andere Tumorarten, wie Kolorektal- und Ösophaguskarzinome, bestätigte sich ein protektiver Effekt bei regelmäßiger NSAR Einnahme (22–24). Einige Vertreter der Medikamentengruppe der NSAR haben nicht nur eine protektive Wirkung, sondern sind zudem in der Lage Tumorzellproliferation zu inhibieren. Bereits 1983 gab es Hinweise auf einen antiproliferativen Effekt von Indometacin, Aspirin und Diclofenac auf Fibrosarkome im Ratten-Modell (25,26).

Über den Mechanismus des antikanzerogenen Effekts der NSARs wird diskutiert. Lange wurde angenommen, dass diese Wirkung hauptsächlich auf die Inhibition der COX und damit einhergehend reduzierten PGE₂ Synthese zurückzuführen ist (27).

Weiterführende Arbeiten zeigten aber, dass einige NSAR neben der COX-Inhibition über weitere Wirkmechanismen verfügen, um Tumorzellen in ihren Stoffwechselwegen zu beeinflussen. Bellosillo und Kollegen beschrieben die Aspirin induzierte, COX- unabhängige Aktivierung von Caspasen, durch Einleitung von Cytochrome *c* Austritt aus den Mitochondrien, als Ursache von Apoptose in Tumorzelllinien (28). Auch der selektive COX2 Inhibitor Celecoxib war in der Lage Apoptose in Prostatakarzinomzellen zu induzieren. Hierbei wird angenommen, dass eine Inhibition der AKT-Aktivierung eine entscheidende Rolle spielt (29).

Diclofenac ist ein Vertreter der im onkologischen Kontext untersuchten NSAR (26). Als in der Klinik etabliertes Medikament wird es hauptsächlich zur Behandlung von Schmerzen des Bewegungsapparats eingesetzt. Bei der Behandlung der aktinischen Keratose, eine Präkanzerose der Haut, wird Diclofenac topisch angewendet. Diclofenac ist in der Lage den Glukosestoffwechsel und die Proliferation in unterschiedlichen Tumorzelllinien *in vitro* sowie in murinen Modellen zu inhibieren und Apoptose zu induzieren (26). Gottfried und Kollegen veröffentlichten 2013 Ergebnisse über eine COX unabhängige Reduktion der MYC Expression in Tumorzellen unter Behandlung mit Diclofenac (30). Eine Inaktivierung von MYC führt in verschiedenen Tumormodellen zur Veränderung des neoplastischen Phänotyps (30,31). Diclofenac reduziert die RNA-Expression von wichtigen glykolytischen Proteinen, wie die von GLUT-1, MCT1 und LDH-A und inhibiert so den Glukosemetabolismus in Tumorzellen (30). Zudem wird MYC-unabhängig der Laktat- und Protonentransport durch gleichzeitige Inhibition von MCT1 und MCT4 beeinträchtigt (32,33). Singer und Kollegen zeigten, dass in Bereichen von mit Diclofenac behandelten aktinischen Keratosen geringere Laktat Level, sowie eine größere Anzahl von dermalen CD8⁺ T-Zellen mit erhöhter IFN γ mRNA Expression nachweisbar sind. Dies weist auf eine aus der Behandlung mit Diclofenac resultierende, verbesserte Immunantwort in aktinischen Keratosen hin (34).

In Anlehnung an diese Ergebnisse wurden in der vorliegenden Arbeit Substanzen getestet, welche eine hohe strukturelle Ähnlichkeit zu Diclofenac aufweisen, um zu untersuchen ob sich unter den NSAR oder Diclofenac-verwandten Substanzen weitere potenzielle Krebstherapeutika befinden könnten.

1.2.2 Substanzen mit struktureller Ähnlichkeit zu dem NSAR Diclofenac

Diclofenacamid besitzt eine hohe strukturelle Ähnlichkeit zu Diclofenac. Als Prodrug unterscheidet sich Diclofenacamid darin, dass anstelle der Carboxylgruppe eine Amidbindung vorliegt. Durch alkalische Hydrolyse kann die Ringformation des Laktams gespalten und aus Diclofenacamid Diclofenac synthetisiert werden (35) (siehe Abbildung 1). Bei einem physiologisch im Magen vorliegenden pH von 1,2 sowie einem im Plasma vorherrschenden pH von 7,4 bleibt die Verbindung stabil, wie Chung und Kollegen 2009 zeigten (36). Diese *in vitro* Versuchsergebnisse lassen die Annahme zu, dass Diclofenacamid *in vivo* bei oraler Aufnahme auch nach Passage des Magendarmtrakts als Amid vorliegt und nicht zu Diclofenac metabolisiert wird. Diclofenacamid zeigte im murinen Modell einen antiinflammatorischer Effekt, der sich als vergleichbar mit dem von Diclofenac erwies, bei deutlich verringerter gastraler Ulkusbildung (36).

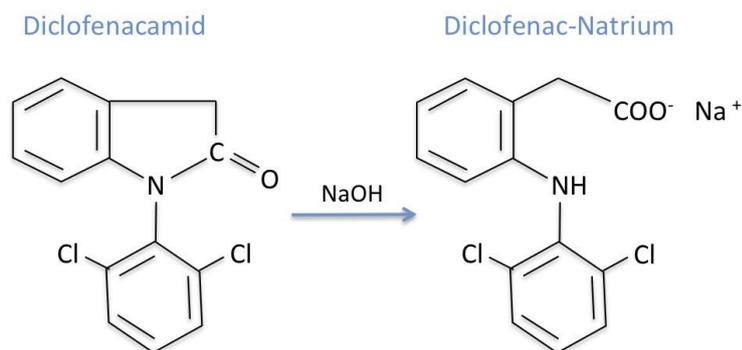


Abbildung 1: Synthese von Diclofenac aus dem Vorläufermolekül Diclofenacamid. Die Ringformation des Laktams wird durch alkalische Hydrolyse gespalten. Quelle: Eigene Darstellung in Anlehnung an (36).

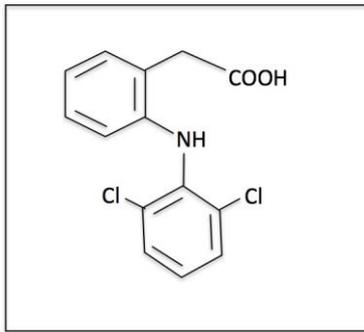
ML36 (Diclofenac-tert-butylester) ist eine weitere Substanz, die eine strukturelle Ähnlichkeit zu Diclofenac aufweist, jedoch keine freie Carboxylgruppe besitzt (Abbildung 2C). ML36 wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Sabine Amslinger (Lehrstuhl der organischen Chemie, Universität Regensburg) synthetisiert. Die Carboxylgruppe des Diclofenacs liegt in ML36 mit einem C4-Körper verestert vor. Sie wurde in dieser Arbeit verwendet, um die Rolle der freien Carboxylgruppe (COOH) von Diclofenac in der MCT Inhibition zu untersuchen. Bislang wurde ML36 nur in *in vitro* Experimenten untersucht. Eine Anwendung im murinen Modell ist zum Erstellungszeitpunkt dieser Arbeit noch nicht erfolgt.

Eine weitere in dieser Arbeit verwendete Substanz ist Lumiracoxib (Abbildung 2D), ein Vertreter der Coxibe. In der klinischen Anwendung wurde Lumiracoxib als Schmerzmedikament für die Behandlung von aktiven Knie- und Hüftgelenkarthosen in Deutschland eingesetzt. Aufgrund von schweren Leberschädigungen nach Einnahme, ordnete das Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte das Ruhen der Zulassung an. Die Europäische Kommission beschloss die Zulassung zur Schmerzmedikation vollständig zu widerrufen (37).

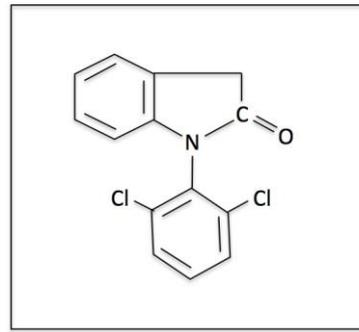
Ketoprofen, ein weiterer Vertreter der NSAR, wurde als Analogon von Ibuprofen entwickelt und wird in der oralen sowie parenteralen Schmerztherapie angewandt (38). Strukturell ähnelt es Diclofenac, allerdings handelt es sich hierbei um ein substituiertes Benzophenon und besitzt daher kein Stickstoffatom als Verbindung der aromatischen Ringe (Abbildung 2E). Ketoprofen ist ein unspezifischer COX-Inhibitor und weist eine analgetische, antipyretische und antiinflammatorische Wirkung auf.

Das NSAR Diflunisal ist ein Derivat der Salizylsäure und inhibiert ebenfalls unspezifisch COX 1 und 2 (Abbildung 2F). Es wird hauptsächlich zur Behandlung von Schmerzen bei Osteoarthritis und nach Operationen eingesetzt (39). Diflunisal wird in Deutschland in der Krebstherapie, im Rahmen eines individuellen Heilversuchs, der sogenannten „Diflu-Therapie“ in Kombination mit Aspirin und 4-Aminosalicylsäure eingesetzt (40). Dieses Therapiekonzept wurde an der Universität Freiburg von Prof. Dr. Werner Kreutz entwickelt und basiert auf zwei Prinzipien. Diflunisal induziert einerseits eine pH-abhängige Apoptose in Laktat-transportierenden Zellen. Des Weiteren verursacht es eine pH-abhängige Porenbildung in Krebszellen, welche zum Zelltod führt (41).

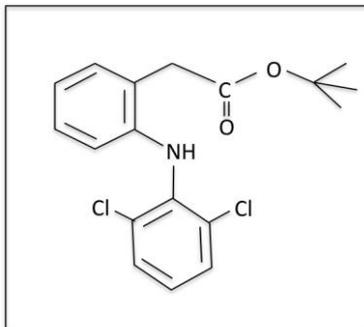
A Diclofenac



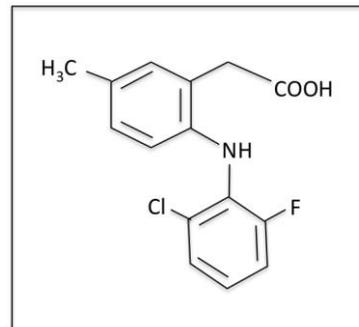
B Diclofenacamid



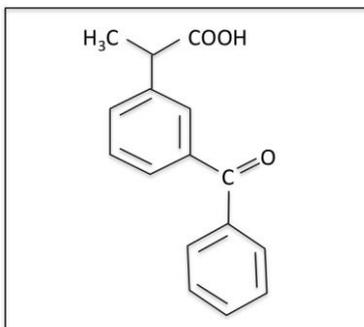
C ML36



D Lumiracoxib



E Ketoprofen



F Diflunisal

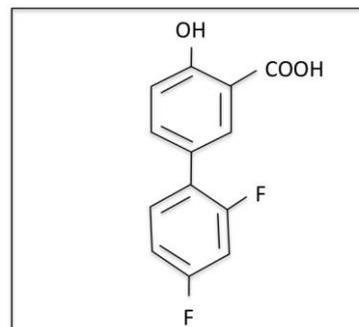


Abbildung 2. Strukturformeln der in dieser Arbeit verwendeten NSAR. Diclofenac in A (mit freier Carboxylgruppe); Diclofenacamid in B (die Carboxylgruppe ist hier Teil der Amidbindung); ML36 (Diclofenac-tert-butylester) in C (die Carboxylgruppe liegt hier in einem C4-Körper verestert vor); Lumiracoxib in D (mit freier Carboxylgruppe); Ketoprofen in E (mit freier Carboxylgruppe); Diflunisal in F (mit freier Carboxylgruppe in enger Beziehung zum aromatischen Ring) Quelle: Eigene Darstellung.

1.3 Die Immuntherapie: Die Rolle des Immunsystems in der Tumorbekämpfung

Das humane Immunsystem ist ein komplexes System aus verschiedenen Organen, Zellen und Molekülen, welches den Körper vor exogenen Pathogenen sowie vor körpereigenen, entarteten Zellen schützen soll. Die Idee Tumorerkrankungen mit Hilfe des eigenen Immunsystems zu bekämpfen ist schon sehr alt. 1867 beobachtete der Chirurg Wilhelm Busch den Rückgang eines Krebsleidens bei einer Patientin nach

einer Infektionskrankheit (42). In einer 1945 veröffentlichten Studie wird über die Arbeit von William Coley berichtet, der bei Sarkompatienten mit fieberhaften Erkrankungen oftmals eine Rückbildung des Krebsleidens beobachtete. Daraufhin entwickelte er das Coley-Toxin aus einer Bakterienmischung, was bei Krebserkrankungen eingesetzt wurde (43).

1.3.1 Immunantwort auf entartete Zellen

Die Immunantwort des Körpers auf entartete Zellen, das sogenannte „Immunoediting“, gliedert sich in die drei Phasen der Eliminierung (engl. *elimination*), des Gleichgewichts (engl. *equilibrium*) und des Entkommens (engl. *escape*) (44).

1957 stellten Sir Macfarlane Brunet und Lewis Thomas die Hypothese der „cancer immunosurveillance“ auf (45). Laut dieser erkennt das Immunsystem entartete Zellen anhand ihrer Tumorantigene und versucht sie zu eliminieren. Die Eliminierungsphase wird als erster Schritt des „Immunoeditings“ bezeichnet. Falls in der Eliminierungsphase nicht alle Tumorzellen getötet wurden, können sich diese vermehren und es bilden sich durch Mutationen Tumorzellvariationen mit geringerer Immunogenität. Die Gleichgewichtsphase beschreibt den Zustand zwischen Abtöten der Tumorzellen durch das Immunsystem und gleichzeitiger Tumorzellvermehrung. In der Phase des Entkommens vermehren sich die Zellen, welche in der Gleichgewichtsphase durch günstige Mutationen selektiert wurden und nicht mehr vom Immunsystem erkannt werden. Es kommt zum Wachstum des Tumors und klinische Symptome können auftreten.

1.3.2 Die T-Zellen und ihre Rolle in der Tumorthherapie

In den letzten Jahren wurde gezeigt, dass das Überleben von Patienten mit einer intakten und effizienten Immunantwort korreliert (46–48), daher ist es ein Ziel in der Antitumorthherapie die körpereigene Immunantwort zu fördern und zu unterstützen. Die T-Zellen sind ein essenzieller Bestandteil der Immunabwehr. Sie gehören zusammen mit den B-Zellen und den natürlichen Killerzellen einer Untergruppe der Leukozyten, den Lymphozyten an. Diese gehen aus lymphatischen Vorläuferzellen im Knochenmark hervor. Die Vorläufer der T-Zellen verlassen ihre Bildungsstätte, um für die Ausreifung und Differenzierung in den Thymus zu wandern. In der Rinde des Thymus erfolgt eine erneute Zellteilung zu Prä-T-Zellen und es werden verschiedene zellcharakteristische Oberflächenmarker wie der T-Zellrezeptor (TCR) sowie die

„Cluster of Differentiation“ 3 (CD3), CD4 und CD8 exprimiert. T-Zellen mit funktionellem TCR werden selektiert und können überleben. Im zweiten Selektionsschritt findet eine Interaktion zwischen T-Zellen und dendritischen Zellen statt. T-Zellen, die an den „Major Histocompatibility Complex“ 1 (MHCI) binden, differenzieren zu CD8⁺ Lymphozyten, wohingegen die Bindung an MHCII CD4⁺ Lymphozyten hervorbringt. Im Mark des Thymus kommen die CD4⁺ und CD8⁺ Lymphozyten in Kontakt mit Epithelzellen und nur diejenigen überleben, welche in der Lage sind zwischen fremden und körpereigenen Proteinen zu unterscheiden. Die entstandenen, naiven T-Zellen sind nun in der Lage Antigene und MHC-Moleküle spezifisch zu erkennen und eine Immunantwort auszulösen (49).

Aufgabe der CD8⁺ T-Zellen ist die Erkennung von auf MHCI präsentierten Antigenen. MHCI ist auf allen körpereigenen Zellen exprimiert. CD8⁺ T-Zellen werden auch als zytotoxische T-Zellen bezeichnet, da sie im Gegensatz zu den CD4⁺ T-Zellen in der Lage sind, unabhängig von anderen Immunzellen, in defekten Zellen, vor allem in viral infizierten Zellen und Tumorzellen, Apoptose auszulösen (49,50).

Die CD4⁺ T-Zellen besitzen eine wichtige Bedeutung bei der Infektionsabwehr. Für eine effektive Immunantwort ist die Aktivierung von T-Zellen essenziell. Der Komplex aus TCR und CD3 erkennt zunächst das passende Antigen mit Hilfe der MHC II Moleküle auf einer antigenpräsentierenden Zelle (engl. antigen presenting cell, APC) und interagiert mit dieser. Für eine Differenzierung zu Effektorzellen wird eine weitere Interaktion zwischen den kostimulatorischen Molekülen B7.1 (CD80) auf der APC und CD28 auf der Oberfläche der T-Zellen benötigt. Nach der Aktivierung wird das Zytokin IL-2 vermehrt sezerniert, sowie der dazugehörige IL2- Rezeptor (IL-2R) auf den T-Zellen exprimiert. Die Interaktion führt schließlich zur klonalen Expansion, Zellwachstum und trägt zum Überleben der T-Zellen bei (49).

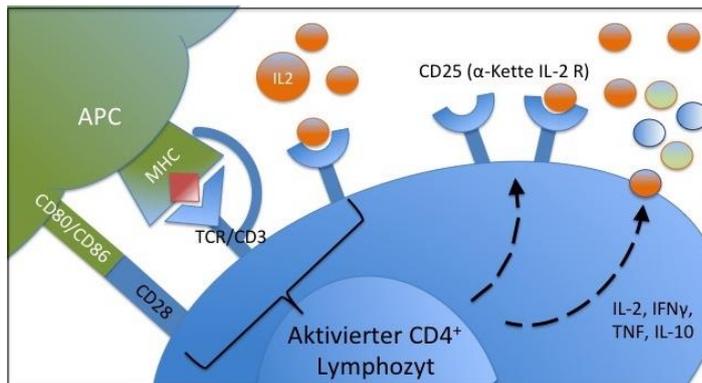


Abbildung 3: Modell zur T-Zellaktivierung. Die Interaktion zwischen TCR und MHC Molekülen einer APC bei gleichzeitiger B7.1/CD28 Kostimulation und IL-2 Stimulation ist für die T-Zellaktivierung essenziell. Die Aktivierung führt zu vermehrter Zytokinsekretion, sowie zur Expression des IL-2 Rezeptors und zur klonalen Expansion der Zellen. Quelle: Eigene Darstellung in Anlehnung an (49).

Der IL-2 Rezeptor besteht aus drei Untereinheiten: CD25, CD122 und CD132. CD122 sowie CD132 sind stets auf der Zelloberfläche vorhanden, wobei es erst bei Aktivierung der T-Zelle zur Expression von CD25 kommt. CD25, das als α -Kette des IL-2R bezeichnet wird, erhöht die Affinität des Rezeptors für IL-2 um das 10- bis 100-fache, ist selbst aber nicht an der Signaltransduktion beteiligt (51). CD25 gilt genauso wie CD69 als Aktivierungsmarker von T-Zellen. *In vivo* konnte die transiente Expression von CD69 in frühen Stadien der T-Zellaktivierung nachgewiesen werden, war jedoch auf ruhenden T-Zellen nicht exprimiert (52). CD69 fungiert als kostimulatorisches Molekül in der T-Zellaktivierung und Proliferation (53). Der Nachweis von CD25 und CD69 mit Hilfe der Durchflusszytometrie bietet daher die Möglichkeit den Aktivierungszustand von T-Zellen zu definieren. Aktivierte T-Zellen produzieren eine Reihe von Zytokinen, die für eine optimale Funktion der Immunantwort wichtig sind.

Abhängig von den auf sie einwirkenden Zytokinen differenzieren CD4⁺ T-Zellen zu den funktionell verschiedenen Subtypen der T-Helferzellen (T_{H1}, T_{H2}, T_{H17}) und regulatorischen T-Zellen (T_{reg}).

Aufgabe der T_{H1}-Zellen ist es intrazelluläre Pathogene zu bekämpfen. Sie bilden hauptsächlich die Zytokine IFN γ und IL-2. IFN γ aktiviert Makrophagen sowie NK-Zellen und reguliert die Immunglobulin-Produktion und den Ig-Klassenswitch in B-Zellen (54,55). Außerdem spielt es eine wichtige Rolle in der antitumoralen Immunantwort. Es verbessert die Antigenpräsentation über MHC I und II und induziert die Expression proapoptotischer Moleküle (56,57). Die IL-2 Level steigen bei Aktivierung von T_{H1}-

Zellen sehr schnell, aber nur kurzfristig an. IL-2 wirkt sowohl autokrin, als auch parakrin auf andere Immunzellen (58).

Neben der Produktion von zahlreichen proinflammatorischen Zytokinen, produzieren T_H1-Zellen aber auch entzündungsdämpfende Faktoren wie IL-10 um die Immunreaktion einzugrenzen. Als negative Rückkopplung hemmt IL-10 die Bildung von anderen Zytokinen der T_H1-Antwort. Gleichzeitig hat es einen positiven Effekt auf das Überleben, die Vermehrung und die Antikörperproduktion von B-Lymphozyten (59). Es ist eines der bedeutendsten antiinflammatorischen Zytokine und ist wichtig für die Entwicklung der Immuntoleranz. Ein Mangel an IL-10 kann daher mit der Entstehung autoimmuner Erkrankungen einhergehen (52).

T_H2-Zellen bilden IL-4, IL-5 und IL-13 und sind an der Abwehr von extrazellulären Parasiten beteiligt. Sie aktivieren Mastzellen und fördern in B-Zellen die Bildung von IgE-Antikörpern (60).

T_H17-Zellen kommen bei der Bekämpfung von extrazellulären Bakterien und Pilzen zum Einsatz. Ihre wichtigsten Zytokine sind IL-17 und IL-22. Sie wirken aktivierend unter anderem auf neutrophile Granulozyten und fördern in B-Lymphozyten den Antikörperwechsel hin zu IgG-Antikörpern.

Die T_{reg} (regulatorischen T-Zellen) bilden unter anderem IL-10 und regulieren die restlichen T-Zellen um überschießende Immunreaktionen und Autoimmunität zu verhindern (60). TNF als Entzündungsmediator spielt eine wichtige Rolle bei Differenzierung, Proliferation und Apoptose von Zellen (61). Die Produktion von TNF ist für eine Reihe von entzündungs-assoziierten Symptomen wie Vasodilatation, Ödembildung und Erhöhung der Körpertemperatur verantwortlich. Insbesondere ist es bei der Induktion von Apoptose in Tumorzellen von Bedeutung. Als Stimulantien für die TNF-Produktion gelten Lipopolysaccharide (LPS), virale, parasitäre und mykotische Antigene, Superantigene von Bakterien und Zytokinen wie GM-CSF, IL-1, IFN γ , TGF- β sowie TNF selbst (62).

In vielen Bereichen der Antitumor-Therapie spielen T-Zellen eine wichtige Rolle. Bei Stammzelltransplantationen ist die „graft versus leukemia reaction“ (deutsch: Transplantat-gegen-Leukämie Reaktion), im Gegensatz zur „graft-versus host disease“ (deutsch: Transplantat-gegen-Wirt Reaktion), ein erwünschter Effekt, um neoplastische Erkrankungen des Blutsystems zu heilen. Hierbei richtet sich die Immunantwort des Spenders gegen die entarteten Zellen des erkrankten Empfängers.

Bei T-Zell depletierten Transplantationen kann es dementsprechend häufiger zum wiederholten Auftreten der Krebserkrankung kommen (63).

Ein weiteres Beispiel ist der adoptive T-Zell Transfer. Hierbei werden dem Patienten T-Zellen entnommen und *ex vivo* Tumorantigen-spezifische T-Zellen generiert. Nach dem Reinfundieren dieser Zellklone wurden bereits therapeutische Erfolge bei Krebserkrankungen, wie bei metastasierten Melanomen erzielt (64,65).

Bei der CAR-T-Zell-Therapie (engl. Chimeric Antigen Receptor T Cells, kurz CARs) werden patienteneigene T-Zellen *ex vivo* mit einem chimären Antigenrezeptor versehen, welcher sich gegen tumorspezifische Oberflächenmoleküle richtet. Nach Reinfundieren der genetisch veränderten CARs proliferieren diese und führen zu einer langanhaltenden, gegen den Krebs gerichteten Immunreaktion (66). Die ersten beiden CAR-T-Zell-Produkte sind seit 2018 in Europa zugelassen, werden bei Patienten mit mehrfach rezidivierten oder therapierefraktären B-Zell-Malignomen eingesetzt und liefern in zahlreichen Studien vielversprechende Ergebnisse (67,68).

Ein weiteres Ziel in der Immuntherapie ist es die Aktivität des Immunsystems zu erhöhen. Die Immunantwort wird von kostimulatorischen und koinhibitorischen Signalwegen durch Interaktion von Oberflächenmarkern auf T-Zellen reguliert. Eine Bindung an CTLA-4 (engl. für cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4) und PD-1 (engl. für programmed cell death 1) führt zu einer Suppression der Immunantwort (69). Zudem können Tumorzellen inhibitorische Oberflächenmoleküle wie PD-L1 (engl. programmed cell death 1 ligand) exprimieren, um eine Immunantwort abzuschwächen oder zu inhibieren (70). Der Einsatz so genannter Checkpointinhibitoren führt zu einer gesteigerten Aktivität von T-Zellen und erhält die vom Tumor inhibierte Immunantwort aufrecht (71). Vertreter dieser Gruppe sind CTLA-4-Inhibitoren (Ipilimumab und Tremelimumab), PD-1-Antikörper (Nivolumab, Pembrolizumab u.a.), sowie PD-L1-Antikörper (Avelumab, Atezolizumab und Durvalumab).

Die Aktivität und das Überleben von T-Zellen wird jedoch nicht nur durch Bindung an inhibitorische Oberflächenmoleküle, sondern auch durch Nährstoffmangel und den niedrigen pH Wert im Tumormilieu reduziert (72,73). Die vorherrschend azide Umgebung entsteht aufgrund der hohen glykolytischen Aktivität der Tumorzellen und der damit verbundenen Akkumulation von Laktat, da dieses durch MCTs im Kotransport mit einem Proton aus der Tumorzelle geschleust wird. Daher könnte eine anti-glykolytische Therapie zu einer verbesserten T-Zellfunktion im Tumor führen.

Studien zeigen jedoch, dass nicht nur Tumorzellen, sondern auch aktivierte T-Zellen vom Glukose- bzw. Glutaminstoffwechsel abhängig sind (74,75). Die IFN γ Produktion in der T-Zelle ist von der Glykolyse abhängig. Es konnte gezeigt werden, dass erhöhte LDHA Level in Zusammenhang mit einem ebenfalls erhöhten intrazellulären Acetyl-CoA Spiegel und somit gesteigerter IFN γ Produktion stehen. Ursächlich dafür vermuten Peng und Kollegen den Zusammenhang zwischen erhöhter LDHA und verringerter Citratzyklusaktivität. Somit kann mehr Citrat aus den Mitochondrien zur Acetyl-CoA-Regeneration exportiert werden, welches wiederum die Acetylierung von Histonen und die damit verbundene Transkription von IFN γ erhöht (32,76).

Des Weiteren verhindert die glykolytische Aktivität, dass die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) an die mRNA für IFN γ bindet und somit die Translation unterdrückt (32,77). In anderen Studien allerdings konnte auch gezeigt werden, dass Glukoseentzug zwar die Proliferation humaner T-Zellen reduziert, jedoch keinen Einfluss auf deren Effektorfunktion hat. Die T-Zell Viabilität sowie die Sekretion von IFN γ , IL-2, IL-4 und IL-10 blieben unbeeinflusst, wohingegen TNF vermindert produziert wurde (78,79).

Ein kombinierter Einsatz von anti-glykolytischen Substanzen, welche der T-Zellfunktion nicht schaden, und T-Zellaktivierenden Substanzen ist ein vielversprechender Therapieansatz.

1.4 Zielsetzung dieser Arbeit

Immuntherapeutische Ansätze rücken seit Jahren mehr und mehr in den Fokus der Krebsbehandlung. Die Immunantwort zu verstärken und gleichzeitig die eigentlich ungünstigen Bedingungen im Tumor für T-Zellen zu verbessern, scheint eine vielversprechende Strategie in der Tumorthherapie darzustellen. Der MCT-Laktattransporter könnte eine mögliche Zielstruktur für eine glykolytische Inhibition darstellen (80).

Diclofenac wirkt inhibitorisch auf MCT1 und MCT4 und ist somit in der Lage die Glykolyse und die Laktatproduktion bzw. Sezernierung zu reduzieren (32,33), und damit auch die Ansäuerung im Tumor. Ziel dieser Arbeit ist die Aufklärung der Rolle der freien Carboxylgruppe (COOH) des Diclofenacs bei der Inhibition der MCT Transporter. Hierzu wurden die zwei Substanzen Diclofenacamid und ML36 eingesetzt, die eine hohe strukturelle Ähnlichkeit zu Diclofenac aufweisen, jedoch

keine freie Carboxylgruppe besitzen. Die Proliferation, die Viabilität und der Laktatstoffwechsel von Tumorzellen wurde in Anwesenheit von Diclofenacamid und ML36 analysiert.

Darüber hinaus stellte sich die Frage, ob sich in der Gruppe der NSAR weitere Medikamente befinden, die das Tumorwachstum verringern können. Deshalb wurden Tumorzelllinien mit den Medikamenten Lumiracoxib, Diflunisal und Ketoprofen behandelt. Um einen inhibitorischen Effekt auf humane T-Zellen auszuschließen, wurde zudem der Einfluss der genannten Substanzen auf CD4⁺ T-Zellen untersucht.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Table 1: Auflistung der verwendeten Geräte

Gerät	Hersteller, Ort
Brutschrank	Heraeus, Kendro Laboratory Products, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
CASY Model TT (Cell Counter & Analyse System)	Inovatis, Oltinger, CH
Durchflusszytometer (FACS Calibur)	Biosciences, Heidelberg, GER
Evos Mikroskop	Advanced Microscopy Group, Seattle, USA
Magnet für beads MACSIMAG Separator	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, GER
MidiMACS Separator	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, GER
Mikrotiterplatten-Washer (Wellwash 4 MK2)	Heraeus, Kendro Laboratory Products, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Multistep Pipette (Handy Step)	Brand GmbH & Co.KG, Wertheim, GER
Pipettboy (Corning- Stripettor)	Corning Inc., Corning, USA
Pipetten (Eppendorf reference)	Eppendorf Ag, Hamburg, GER
Präzisionswaage (Sartorius LP12005)	Sartorius AG, Gottigen, GER
Rotamax 120	Heidolph Instruments Labortechnik, Schwabbach, GER
Sterilbank (Lamin Air HA 2472)	Heraeus, Hanau, GER
Sterilbank HeraSafe	Heraeus, Kendro Laboratory Products, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Vortexer (Schüttelgerät)	Phoenix Instrument, Garbesn, GER
Vortexer (Vortex-Genie 2)	Scientific Industries, NY, USA
Zentrifuge	(Biofuge fresco) Heraeus, Osterode, GER

2.1.2 Verbrauchsmedien

Tabelle 2: Auflistung der verwendeten Verbrauchsmedien

Verbrauchsmedium	Hersteller, Ort
6 Well Cell Culture Cluster, Flat Bottom	Costar, Corning Inc., Corning, USA
96 Well-Microplates	R&D Systems, Minneapolis, USA
96 Well-Plates U-Bottom	Falcon, Corning Inc., NY, USA
CASY-Tubes	Hoffmann-LA Roche, Basel, CH
Desinfektionstücher: DESCO VIPES Vliestuchspender	Dr. Schuhmacher GmbH, Melsungen, GER
Disponsabel Scalpel No10	Feather Safety Razor Co., Osaka, JAP
FACS Tubes: 5 ml Polystyrene Round-Bottom Tubes	Corning Inc., Corning, USA
Filter System 0,22µm CA, low protein binding	Corning Inc., Corning, USA
Glaspipetten (1ml,2ml,5ml,10 ml,25ml,50ml)	Nerbe Plus GmbH, Winsen/Luhe, GER
Handschuhe (TouchNTuff)	Ansell, Brussels, BEL
Kanülen: Microlance 3, 20G	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, GER
MACS Separator Columns	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, GER
Micro Tubes, 1,5 ml	Brand GmbH & Co.KG, Wertheim, GER
Mikro-Schraubröhre 2ml	Sarstedt, Nümbrecht, GER
Multisteppipettenspitzen (Combitips advanced 5ml)	Eppendorf Ag, Hamburg, GER
Pipettenspitzen	Eppendorf Ag, Hamburg, GER
Reaktionsgefäß (50ml, 15ml)	Greiner Bio One GmbH, Frickenhausen, GER
Spritze 10 ml, Discardit II	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, GER
Tranfer-Pipette 3,5ml	Sarstedt, Nümbrecht, GER
Zellkulturflaschen (25cm ² , 75cm ²)	Corning Inc., Corning, USA

2.1.3 Chemikalien und Kits

Table 3: Auflistung der verwendeten Chemikalien und Kits

Chemikalie/Kit	Hersteller, Ort
AB-Serum (Spender Rh+,K-)	Blutspendedienst, Bayerisches Rotes Kreuz, GER
Annexin V Binding Puffer	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, GER
Aqua	B.Braun AG, Melsungen, GER
Arginin	Sigma-Aldrich, MO, USA
BSA	Sigma-Aldrich, MO, USA
CASY-Puffer	Beckman Coulter GmbH, Krefeld, GER
CD4 MicroBeads human	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, GER
Diclofenacamid	Santa Cruz Biotechnology, California, USA
Diflunisal	Sigma-Aldrich, MO, USA
DMSO	Sigma-Aldrich, MO, USA
DuoSet ELISA Human IFN γ	R&D Systems, Minneapolis, USA
DuoSet ELISA Human IL-10	R&D Systems, Minneapolis, USA
DuoSet ELISA Human IL-2	R&D Systems, Minneapolis, USA
DuoSet ELISA Human TNF α	R&D Systems, Minneapolis, USA
Dynabeads Human T-Activator CD3/CD28	Gibco by Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
EDTA (Ethyldiamin-Tetraessigsäure)	Fluka Chemie AG, Buchs, CH
Essential Aminoacids	Sigma-Aldrich, MO, USA
Ethanol (Rotipuran)	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe, GER
FACS clean	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, GER
FACS flow	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, GER
FACS rinse	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, GER
FCS	PAA Laboratories, Paching, AUT
Ficoll: Pancoll human	Pan-Biotech GmbH, Aidenbach, GER
Glutamin	Biochrom, Berlin, GER
H ₂ SO ₄ 96%	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe, GER

IL-2	Pepto Tech Germany, Hamburg, GER
Instabiles Glutamin, 200 mM	Pan-Biotech GmbH, Aidenbach, GER
Isopropanol, 70%	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, GER
Ketoprofen	Sigma-Aldrich, MO, USA
Lumiracoxib	Selleckchem, München, GER
Medium RPMI 1640	Gibco by Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Mercaptoethanol	Gibco by Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Methanol	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe, GER
ML36	AK Amslinger, Institute of Organic Chemistry, University of Regensburg, GER
PBS-Puffer	Sigma-Aldrich, MO, USA
Penicillin Streptomycin	Gibco by Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Sodium-Pyruvat	Sigma-Aldrich, MO, USA
Trypsin/EDTA	Pan-Biotech GmbH, Aidenbach, GER
Tween 20 (Polysorbatum 20)	Caesar & Loretz GmbH, Hilden, GER
Vitamine	Sigma-Aldrich, MO, USA

2.1.4 Gemischte Medien und Puffer

Table 4: Auflistung verwendeter Medien und Puffer

Bezeichnung	Grundsubstanz	Enthält
T-Zell Medium	RPMI 1640	2mM Instabiles Glutamin, 1mM Sodium-Pyruvat, 25.000U Pen/Strep, 1% Essential Aminoacids, 0,4% Vitamine, 0,05 mM β -Mercaptoethanol, 10% AB-Serum
Tumor Medium	RPMI 1640	2mM Instabiles Glutamin, 10% FCS
Monozyten Medium	RPMI 1640	1% Stabiles Glutamin, 1000U/ml Pen/Strep, 10% FCS (für DCs)
MACS-Puffer	PBS	1% FCS, 2mM EDTA
FACS-Puffer	PBS	2% FCS
Elisa Waschpuffer	PBS	0,05% Tween R20
Einfrriermedium	RPMI 1640	1% DMSO, 40% FCS

2.1.5 Antikörper Durchflusszytometrie

Table 5: Verwendete Antikörper für die Durchflusszytometrie. Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, GER

Spezifität	Isotyp	Klon	Konjugat	Herkunft
CD4	IgG1, κ	RPA-T4	PE	Maus
CD25	IgG1, κ	M-A251	PE-Cy 7	Maus
CD69	IgG1, κ	L78	PE	Maus
7-AAD	•	•	Phospholipid bindendes Protein	
Annexin V	•	•	FITC	

2.1.6 Software und Datenbanken

Table 6: Verwendete Software und Datenbanken

Software/Datenbank	Hyperlink
BD CellQuest Pro Software	https://www.bdbiosciences.com
CASY R excell software	http://www.ols-bio.de
Cochrane Library	http://www.cochranelibrary.com/
FlowJo	http://www.flowjo.com
GraphPad PRISM Version 6.0	http://www.graphpad.com
Microsoft Office 2011	https://www.microsoft.com
PubMed	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

2.2.1.1 Tumorzelllinie CCRF-CEM-C7H2 und Kultivierung

Bei der Tumorzelllinie CCRF-CEM-C7H2 (im Folgenden als C7H2 abgekürzt) handelt es sich um einen Subklon einer kindlichen akuten lymphatischen T-Zell Leukämie (T-ALL), die 1964 von einem dreijährigen kaukasischen Mädchen gewonnen wurde. Die Suspensionszellen wurden in Tumorzellmedium (Tabelle 4) im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert.

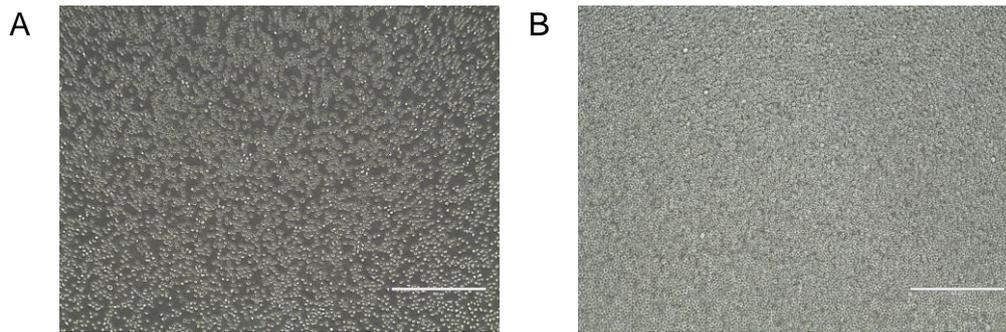


Abbildung 4: Mikroskopische Aufnahmen von C7H2. A: Tag 1 nach Neuaussaat von $0,3 \times 10^6$ /ml B: Tag 3 nach Neuaussaat von $0,3 \times 10^6$ /ml

Alle 2 bis 4 Tage wurden die Zellen mikroskopisch beurteilt, gezählt und mit einer Dichte von $0,2$ - $0,4 \times 10^6$ Zellen/ml in frischem Medium ausgesät.

Die Experimente der Tumorzellen wurden in 6-Well Platten (Costar, Corning Inc., Corning, USA) durchgeführt, wobei die Zellen mit einer Dichte von $0,3 \times 10^6$ Zellen/ml in je 5 ml mit entsprechenden Treatment (Tabelle 7) ausgesät wurden.

Tabelle 7: Behandlung der Tumorzelllinie C7H2. Substanzen in den verschiedenen eingesetzten Konzentrationen.

Zusatz	Eingesetzte Konzentrationen
Diclofenacamid (in Methanol gelöst)	0,05 mM; 0,1 mM; 0,2 mM
Methanol	0,2 mM
Diflunisal (gelöst in Arginin)	0,1 mM; 0,2 mM; 0,4 mM; 0,8 mM
Arginin	0,8 mM

Nach 48 Std. und 72 Std. Inkubationszeit mit entsprechendem Treatment erfolgte die mikroskopische Beurteilung der Zellen, Abnahme der Überstände und Apoptose Messung mittels Durchflusszytometrie. Die Experimente mit C7H2 waren nach 72 Std. beendet.

2.2.1.1.1 Auftauen und Einfrieren

Zur Langzeit-Kryokonservierung wurden die C7H2 in warmen Einfriermedium (Tabelle 4) resuspendiert, zügig bei -80°C eingefroren und am Folgetag in den Stickstofftank überführt. Zum Auftauen wurden die Zellen aus dem Stickstofftank bei Raumtemperatur aufgetaut und in Tumormedium gewaschen, um das DMSO zu entfernen. Anschließend wurde das Zellpellet in frischem Medium resuspendiert und mit einer Dichte von $0,2$ - $0,4 \times 10^6$ Zellen/ml ausgesät.

2.2.1.2 Humane CD4⁺ T-Zellen in der Zellkultur

Für die Gewinnung der T-Zellen wurde Blut von gesunden Spendern verwendet, denen mit Hilfe der Apherese periphere, mononukleäre Blutzellen (PMBCs) entnommen wurden (Ethikvotum Nr. 13-101-0238).

Eine weitere Quelle aus der MNCs bezogen wurden, war ein bei der Thrombozytenspende technisch bedingt entstehender, mit Restblut gefüllter Plastikkegel (Ethikvotum Nr. 13-101-0240). Das darin enthaltene Vollblut wurde mit einer mit 10 ml PBS gefüllten Spritze ausgespült und auf ein Gesamtvolumen von 60 ml mit PBS aufgefüllt. Je 30 ml der Suspension wurden in zwei 50 ml Reaktionsgefäße pipettiert, in denen bereits je 15 ml Ficoll (Pan-Biotech GmbH, Aidenbach, GER) vorgelegt waren. Nach Abtrennung der MNCs von den restlichen Bestandteilen des Vollblutes durch Dichtegradientenzentrifugation (2200 U/min, 20 min, bei Raumtemperatur) auf Ficoll, wurden die MNCs abgenommen. Anschließend folgten drei Waschvorgänge mit je 50 ml PBS. Zentrifugiert wurde dazwischen jeweils 8 min lang bei 4°C und 1300 U/min. Danach wurden die Zellen in 40 ml PBS aufgenommen und die Zellzahl bestimmt.

2.2.1.2.1 Isolation von CD4⁺ T-Zellen

Die Isolierung von CD4⁺ T-Zellen aus den MNCs basiert auf der MACS-Separationstechnik von Miltenyi Biotech. Bei diesem Verfahren werden T-Zellen mit magnetischen anti-CD4 MicroBeads markiert. Beim Durchlaufen eines Magneten, verbleiben die magnetisch markierten Zellen innerhalb einer Säule, während unmarkierte Zellen durchlaufen.

Nach Bestimmung der Zellzahl wurden die MNCs zentrifugiert, der Überstand entfernt, das Zellpellet in MACS-Puffer (Tabelle 4) resuspendiert (800 µl pro 10×10^8 Zellen) und 100 µl anti-CD4 MicroBeads hinzugefügt. Die Suspension wurde für 15 min im Kühlschrank inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 10 ml MACS Puffer gewaschen und in 500 µl MACS Puffer aufgenommen. Zur Vorbereitung der magnetischen Isolation von CD4⁺ T-Zellen wurde eine MACS Separator Column (Miltenyi Biotech GmbH, Bergisch Gladbach, GER) an dem Magneten (MidiMACS Separator, Miltenyi Biotech GmbH, Bergisch Gladbach, GER) angebracht, ein Reaktionsgefäß darunter platziert und die Säule einmal mit 5 ml MACS-Puffer gespült. Anschließend wurde die Zellsuspension auf die Säule aufgebracht. Beim Durchlaufen des Magnetfelds verblieben die mit anti-CD4 MicroBeads markierten Zellen aufgrund

der magnetischen Anziehungskraft in der Säule. Diese konnten nach Entnehmen der Säule aus dem Magneten mit 5 ml MACS Puffer ausgespült werden. Anschließend folgten nochmals 3 Waschschriffe. Nach Zentrifugation wurden die CD4⁺ T-Zellen in T-Zell-Medium aufgenommen und die Zellzahl bestimmt. Nach Überprüfung der Reinheit wurden die Zellen direkt für Experimente verwendet oder über Nacht im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

2.2.1.2.2 Stimulation, Kultivierung und Versuchsansätze für CD4⁺ T-Zellen

Die Kultivierung erfolgte in 96-Well Microplates (U-Bottom, R & D Systems, Minneapolis, USA) in T-Zellmedium bei einer Konzentration von 0.1x10⁶ Zellen/Well in 225 µl unter Zugabe von 50 U/ml IL-2 und verschiedener Treatments bei 37°C.

Die T- Zellen wurden mittels anti-CD3/CD28 Beads (Dynabeads Human T-Cell Activator CD3/CD28, Gibco by Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) mit einem Zell zu Bead Verhältnis von 1:1 aktiviert. Zur Kontrolle wurden zusätzlich unstimulierte T-Zellen mitgeführt. Die Zellen wurden in Anwesenheit verschiedener NSAR inkubiert. Zusätzlich zu den Kontroll-Ansätzen ohne Behandlung erfolgte eine Inkubation mit der höchsten eingesetzten Konzentration des entsprechenden Lösungsmittels der NSAR. Eine Übersicht der Treatments und eingesetzten Konzentrationen zeigt Tabelle 8.

Tabelle 8: Behandlung der CD4⁺ T-Zellen. Substanzen in den verschiedenen eingesetzten Konzentrationen

Zusatz	Eingesetzte Konzentrationen
Diclofenacamid (in Methanol gelöst)	0,05 mM; 0,1 mM; 0,2 mM
Diclofenac-tertbutylester (ML36) (in DMSO gelöst)	0,05 mM; 0,1 mM
Lumiracoxib (in DMSO gelöst)	0,05 mM; 0,1 mM; 0,2 mM
Ketoprofen (in Ethanol gelöst)	0,05 mM; 0,1 mM; 0,2 mM
Diflunisal (gelöst in Arginin)	0,1 mM; 0,2 mM; 0,4 mM; 0,8 mM

Nach dem Ernten der T-Zellen wurden die CD3/CD28 Dynabeads mit einem Magneten (MACSIMAG Separator, Miltenyi) entfernt. Zu den Zeitpunkten 48 Std., 72 Std. sowie nach sechs Tagen wurden die Zellen mikroskopisch beurteilt, die Proliferation mittels CASY Cell Counter bestimmt und Zellkulturüberstände genommen. In den Überständen nach 48 bzw 72 Std. erfolgte eine Bestimmung von IFN γ , TNF, IL-2 und IL-10 Produktion mittels ELISA (DuoSet ELISA Development System Human, R&D Systems, Minneapolis, USA) sowie eine Messung der Laktatkonzentration. Nach 48 Std. wurde die Expression der Aktivierungsmarker CD25 und CD69 auf den

stimulierten T-Zellen mittels Durchflusszytometrie (FACS Calibur, Biosciences, Heidelberg, GER) bestimmt. Die Viabilität der Zellen wurde nach 72 Std. und nach sechs Tagen bestimmt.

2.2.1.2.3 Gemischte Leukozytenreaktion

Um eine physiologischere Situation zu schaffen, die den Stimulations-Bedingungen *in vivo* nahekkommt, wurde eine Gemischte Leukozytenreaktion (engl. Mixed Leukozyte Reaktion= MLR) durchgeführt. Hierbei wurden CD4⁺ T-Zellen mit reifen dendritischen Zellen (DC) stimuliert und die Effekte der verschiedenen NSAR und Derivate evaluiert. Die Reifung der DCs erfolgte aus Monozyten, welche wiederum aus Leukapherisaten gesunder Spender gewonnen und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert wurden. Die Reifung der DCs aus Monozyten erfolgte gemäß des Reifungsprotokolls innerhalb von sechs Tagen. An Tag null wurden 20x10⁶ Monozyten aufgetaut und zügig in 10 ml Medium überführt. Nach Zentrifugation und Verwerfen des Überstandes wurden die Zellen in 30 ml frischem Medium aufgenommen und in eine Zellkulturflasche gegeben.

Tabelle 9: Reifungsprotokoll dendritischer Zellen

Zusatz	Menge zu 30 ml MD	Konzentration	Zugabe an Tag
IL-4	36 µl	144 U/ml	0
GMCSF	2,4 µl	224 U/ml	0
LPS	30 µl	100 ng/ml	4

Durch Zugabe von Granulocyte Macrophage Colony-stimulating Factor (GMCSF) (Berlex, Leverkusen, GER), und IL-4 (Promokine, Heidelberg, GER) an Tag 0 differenzierten die Monozyten zu unreifen DCs. Nach vier Tagen wurden die DCs durch die Zugabe von Lipopolysacchariden (LPS) (Alexis, Farmingdale, USA) zu reifen DCs (Tabelle 9). Nach sechs Tagen wurden die DCs geerntet und zur Stimulierung der CD4⁺ T-Zellen genutzt. Pro Well wurden 1x10⁵ CD4⁺ T-Zellen mit 1x10⁴ DCs in T-Zell Medium mit 50 U/ml IL-2 kokultiviert. Beim Ernten der T-Zellen aus der MLR war kein zusätzlicher Schritt zur Trennung von den DCs erforderlich, da sich diese nicht vom Boden des Wells ablösten.

2.2.2 Funktionelle Analysen

2.2.2.1 Bestimmung der Zellzahl mittels CASY System

Die Bestimmung der Zellzahl wurde mittels des automatischen Zellzählgerätes CASY Model TT Cell Counter & Analyse System (Innovatis, Oltinger, CH) durchgeführt. Die CASY-Technologie basiert auf der elektrischen Erfassung der Zellen beim Durchtritt durch eine Messpore. Zellen mit intakter Zellmembran schließen den elektrischen Strom aus und generieren ein Signal, welches vom Volumen der Zelle abhängt (Electrical Current Exclusion, ECE). Tote Zellen hingegen haben eine geschädigte Zellmembran, können den Strom nicht mehr ausschließen und werden mit dem Volumen ihres Zellkerns erfasst (81). So können die Anzahl und der Prozentsatz der lebenden und toten Zellen, sowie der Durchmesser der Zellen bestimmt werden. Für die Messung wurden je 50 µl Zellsuspension in ein Messröhrchen mit 10 ml vorgelegtem Puffer (Coulter Isoton II Diluent, Beckman Coulter) pipettiert.

2.2.2.2 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist ein Verfahren zur Analyse der Expression von Molekülen auf der Zelloberfläche sowie im Zellinneren, und dient zur Charakterisierung verschiedener Zelltypen in einer heterogenen Zellpopulation. Die Technik basiert auf der Emission von optischen Signalen, ausgehend von der Oberfläche einzelner Zellen, wenn diese einen Laserstrahl passieren (82). Die kombinierte Analyse von Forward und Side Scatter geben Rückschlüsse über Form, Größe und Komplexität von Zellen und ermöglichen die optische Trennung eines heterogenen Zellgemisches in Subpopulationen (Abbildung 5). Des Weiteren können Zellen auch hinsichtlich ihres Fluoreszenzsignals analysiert werden. Hierfür werden Oberflächenmarker und intrazelluläre Moleküle mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern angefärbt. Die für diese Arbeit verwendeten Antikörper sind in Tabelle 5 aufgeführt.

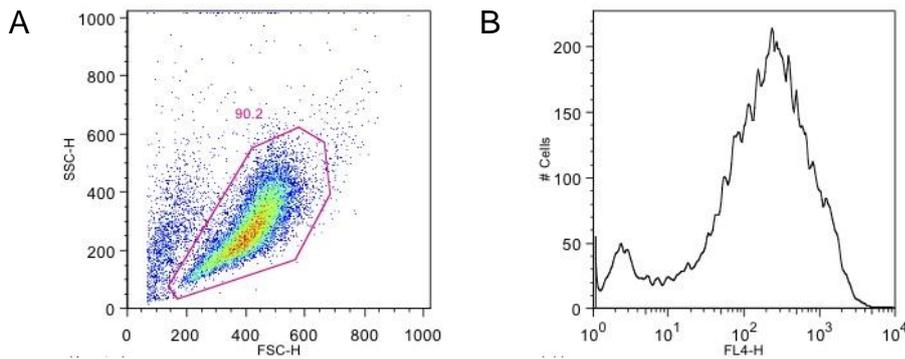


Abbildung 5: Exemplarische Darstellung der durchflusszytometrischen Analyse mit dem FlowJo Programm. A: Darstellung von Forward Scatter (x-Achse) und Side Scatter (y-Achse). Um ausschließlich viable Zellen zu analysieren wurde anhand der Größe und Granularität zwischen viablen und toten Zellen unterschieden (umkreister, markierter Bereich). B: Darstellung von CD25 positiven Zellen als Histogramm, welche im viablen Bereich liegen.

Zunächst wurden Zellen geerntet, im Falle von stimulierten Zellen von den Stimulationsbeads entfernt und in einem FACS-Tube zusammengeführt.

Die Zellen wurden in 1 ml FACS-Puffer gewaschen. Nach der Zentrifugation (1600 U, 4 min, 4°C) wurde der Überstand verworfen und die jeweiligen Antikörper bzw. der Antikörper-Mix wurde hinzugegeben und für 20 min. bei 4°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen erneut in 1 ml FACS-Puffer gewaschen und in 400 µl FACS-Puffer resuspendiert. Die Messungen wurde mit dem FACSCalibur Durchflusszytometer (Biosciences, Heidelberg, GER) durchgeführt. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mithilfe des Programmes Flowjo (FlowJo, LLC, Oregon, USA). Um das Ausmaß an unspezifischer Bindung der Primärantikörpern aufzuzeigen, wurden regelmäßig Negativkontrollen mit Isotyp-Kontrollantikörpern durchgeführt.

2.2.2.2.1 FACS-Analyse direkt nach Isolation- Kontrolle der Reinheit

Nach Isolation der CD4⁺ T-Zellen aus den MNCs wurde die Reinheit der gewonnenen Zellpopulation mittels FACS-Analyse überprüft. Hierfür wurden Färbungen mit einem anti-CD4⁺ Antikörper und der dazugehörigen CD4 Isotyp Kontrolle (IgG1, κ) durchgeführt (Tabelle 5) wie exemplarisch in Abbildung 6 dargestellt.

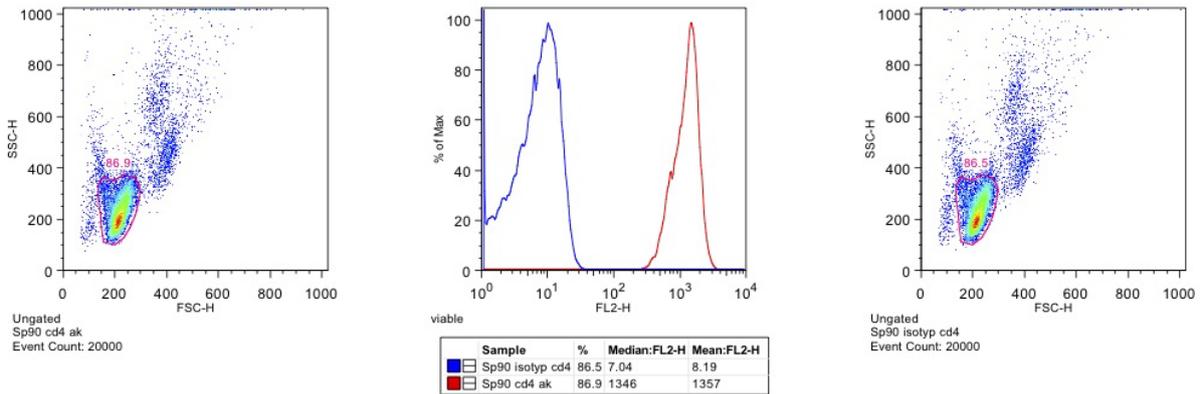


Abbildung 6: Anti-CD4⁺- und CD4 Isotyp- Messung nach Isolation von CD4⁺ T-Zellen. Linke Abbildung: CD4-Antikörpermessung, dargestellt im Forward Scatter (x-Achse) und Side Scatter (y-Achse). Im umkreist markierten Bereich (Gate) liegen die viablen Zellen. Mittlere Abbildung: Darstellung der Anti-CD4⁺- und CD4 Isotyp-Messung als Histogramm (nur Signale, die im gegateten Bereich liegen). Rechte Abbildung: CD4-Isotypmessung, dargestellt im Forward Scatter (x-Achse) und Side Scatter (y-Achse). Im umkreist markierten Bereich liegen die viablen Zellen.

2.2.2.2 Analyse der T-Zellaktivierung

Um den Aktivierungszustands der Zellen zu bestimmen wurde die Expression der Aktivierungsmarker CD25 und CD69 auf der Zelloberfläche mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Bei den mit anti-CD3/CD28 Dynabeads stimulierten T-Zellen erfolgte dies nach 48Std., bei den T-Zellen aus der MLR an Tag vier. Für die Doppelfärbung der Oberflächenmarker wurden pro FACS Tube 5 µl CD25 und 10 µl CD69 Antikörper (Tabelle 5) hinzugegeben.

2.2.2.2.3 Bestimmung der Viabilität mittels Apoptosefärbung

Die Viabilität der Zellen wurde bei den mit anti-CD3/CD28 Dynabeads stimulierten T-Zellen nach 72 Std. und sechs Tagen bestimmt. In der MLR erfolgte die Viabilitätsmessung nach vier und sechs Tagen. Die Viabilität der Zelllinie C7H2 wurde 48 Std. bzw. 72 Std. nach Zugabe der Treatments ermittelt. Die Apoptoserate wurde mittels Annexin V/7-AAD Färbung analysiert. Annexin V ist ein Ca²⁺-abhängiges Protein, das eine hohe Affinität zu Phosphatidylserinresten (PS) aufweist, welche an der Oberfläche von frühapoptotischen Zellen exprimiert wird. 7-Aminoactinomycin D (7-AAD) ist ein fluoreszierender Farbstoff, der selektiv an Guanosin/Cytosin-Bereiche der DNA bindet (83). Während des Zelltodes treten Veränderungen innerhalb der Zellmembran auf, die eine Durchlässigkeit für den Farbstoff zur Folge haben. Je mehr sich eine Zelle mit 7-AAD anfärben lässt, in einer desto weiter fortgeschrittenen Phase

der Apoptose bzw. in der sekundären Nekrose befindet sie sich (84) (Abbildung 7). Für die Doppelfärbung wurde ein Mastermix aus Annexin V und 7-AAD in H₂O und Annexin V Binding Buffer angefertigt (Tabelle 10), von dem 400 µl auf die Zellen gegeben wurde.

Tabelle 10: Mastermix Apoptose. Verwendete Substanz und Menge pro Färbung in einem FACS-Tube.

Menge pro Messung	Substanz
360µl	H2O
40µl	Annexin V Binding Buffer, 10x
5µl	Annexin V
20µl	7-AAD

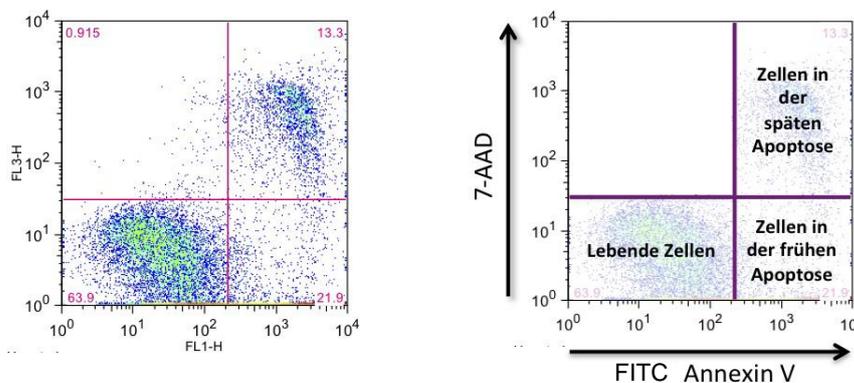


Abbildung 7: Apoptosemessung mit Annexin V/7-AAD Färbung. Mit FlowJo erstellte Abbildung von der Apoptosemessung und schematische Abbildung zur Verdeutlichung. Quelle: Eigene Darstellung.

2.2.2.3 Messung der Zytokinsekretion mittels Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) ist ein antikörperbasiertes Nachweisverfahren, dessen Funktionsweise eine enzymatische Farbreaktion zu Grunde liegt (siehe Abbildung 8). Die Konzentrationsbestimmung der Zytokine in den Kulturüberständen wurde unter Verwendung der Kits DuoSet ELISA Development System (R&D Systems, Minneapolis, USA) für IFN γ , TNF, IL-2 und IL-10 nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Eine 96-Well-Platte wurde über Nacht mit einem Erstantikörper (engl. Capture Antibody) beschichtet. Die Platte wurde mindestens eine Stunde lang mit Blockierungspuffer (1 % BSA) behandelt. Die Proben und der Standard wurden auf die Platte aufgetragen und zwei Stunden lang bei

Raumtemperatur inkubiert. Nach der anschließenden Inkubation mit dem Nachweisantikörper (engl. Detection Antibody) für weitere zwei Stunden wurde die Platte mit Streptavidin-HRP für 20 Minuten inkubiert. Nach einer weiteren 20-minütigen Inkubation mit der Substratlösung wurde die Reaktion mit einer Stopplösung beendet. Die Messung der optischen Dichte wurde mittels Plattenphotometer (MWG-Biotech, Ebersberg, GER) bei einer Wellenlänge von 450-540 nm vorgenommen.

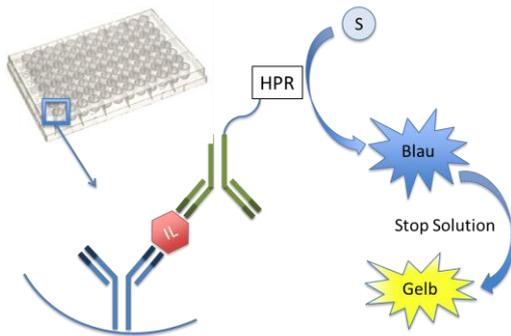


Abbildung 8: Schematische Darstellung ELISA. Dargestellt sind Capture Antibody (blau), IL= zu bestimmendes Zytokin (rot, eckig), Detection Antibody (grün), Enzym Streptavidin (HRP) und S=Substrat (hellblau, rund). Das nachzuweisende Antigen wird dabei mit einem an der 96-Well-Platte befestigten Erstantikörper (Capture Antibody) gebunden. Ein Zweitantikörper (Detection Antibody) welcher mit einem Enzym gekoppelt wird bindet ebenfalls an das Antigen. Das Enzym führt nach Zugabe von Substrat zu dessen enzymatischer Umsetzung und somit zur Entstehung eines Farbstoffprodukts, die Suspension im Well färbt sich blau. Nach Hinzufügen der Stop Solution ändert sich die Färbung auf gelb. Quelle:Eigene Darstellung.

2.2.2.4 Laktatmessung in Zellkulturüberständen

Die Messung der Laktatkonzentration in Zellkulturüberständen wurde im Institut für klinische Chemie des Universitätsklinikums Regensburg durchgeführt. Zur Analyse der Laktatproduktion von primären T-Zellen wurden die Zeitpunkte 48 Std. und 72 Std. gewählt. Bei den C7H2 wurden die Zellkulturüberstände bereits nach 12 Std. genommen. Die Überstände wurden bei -20°C bis zur Messung gelagert.

2.2.3 Statistische Auswertung

Die Daten wurden in Excel-Tabellen zusammengestellt und mittels Graphpad Prism statistisch ausgewertet und als Mittelwert \pm Standardfehlerfehler des Mittelwertes (Standard Error of the Mean, SEM) dargestellt. Die statistische Auswertung der Daten erfolgt mit dem Friedman-Test. Es handelt sich hierbei um ein nicht parametrisches Verfahren, da es keine Normalverteilung der Daten in den Stichproben voraussetzt.

Untersucht wurden drei oder mehr gepaarten Stichproben auf Gleichheit des Lageparameters. Wurde abweichend verfahren, ist dies in der Abbildungsbeschriftung vermerkt. Signifikante Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle wurde mit * gekennzeichnet, wobei $*p < 0,05$, $**p < 0,01$, $***p < 0,001$ entspricht.

3. Ergebnisse

Die vorliegende Dissertation konzentriert sich auf die Analyse der Wirkung von Diclofenac-verbundenen Substanzen auf die Tumorzelllinien C7H2 und Mellm. Um einen negativen Effekt auf gesunde Zellen ausschließen zu können, wurden außerdem primäre humane CD4⁺ T-Zellen mit den genannten Substanzen behandelt.

3.1 Diclofenacamid und ML36

Um zu untersuchen, ob die freie Carboxylgruppe von Diclofenac eine Rolle bei der MCT-Inhibition spielt, wurden Substanzen getestet, die strukturelle Ähnlichkeiten zu Diclofenac aufweisen, jedoch keine freie Carboxylgruppe besitzen. Die Wirkung der beiden Substanzen Diclofenacamid und ML36 auf die Tumorzelllinien C7H2 und Mellm, sowie auf primäre CD4⁺ T-Zellen wurde im Folgenden evaluiert.

3.1.1 Diclofenacamid und ML36 - Laktatproduktion, Proliferation und Apoptose in Tumorzellen und humanen CD4⁺ T-Zellen

Diclofenac ist ein potenter MCT-Inhibitor und ist in der Lage den Laktattransport in glykolytisch aktiven Zellen zu reduzieren (32,33). Diclofenac zeigt ab einer Konzentration von 0,2 mM eine statistisch signifikante Reduktion der Laktatproduktion in den Tumorzelllinien Mellm und C7H2 (Abbildung 9A, Daten der Arbeitsgruppe Kreuz), sowie in vergleichbarem Maße in CD4⁺ T-Zellen (32). Aufgrund dieser Resultate wurden Diclofenacamid und ML36 hinsichtlich ihrer Fähigkeit analysiert, die Laktatproduktion zu reduzieren, sowie Proliferationsarrest und Apoptose zu induzieren.

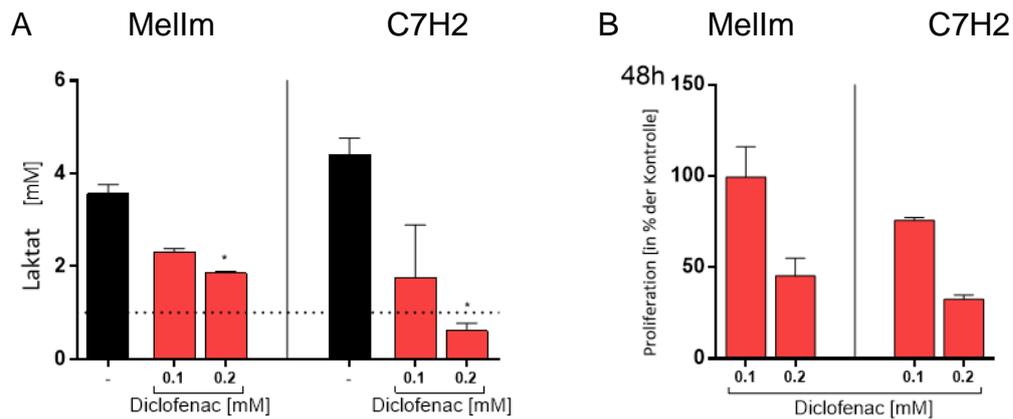


Abbildung 9: Diclofenac inhibiert die Laktatsekretion und die Proliferation in den Tumorzelllinien Mellm und C7H2. Die Tumorzellen wurden unter Zugabe von Diclofenac (0,1 mM und 0,2 mM) inkubiert. Die Laktatsekretion wurde in (A) photometrisch in den Überständen von Mellm nach 18 Std. und von C7H2 Zellen nach 12 Std. bestimmt. Die Zellzahl wurde mittels CASY Cell Counter in (B) nach 48 Std. bestimmt. Der Mittelwert \pm Standardfehler ist dargestellt ($n \geq 3$). In B wurde die Zellzahl auf die Kontrolle normalisiert. * zeigt einen signifikanten Unterschied im Vergleich zur Kontrolle (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$), ermittelt mit dem Friedman Test.

Im Gegensatz zu Diclofenac, zeigten weder Diclofenacamid noch ML36, die beide keine freie Carboxylgruppe besitzen, eine Wirkung auf die Laktatsezernierung in Tumorzellen (Abbildung 10A und 10B) und CD4⁺ T-Zellen (Abbildung 10C und 10D). Dies lässt vermuten, dass der freien Carboxylgruppe im Diclofenac eine entscheidende Rolle bei der Inhibition der MCT-Transporter zukommt.

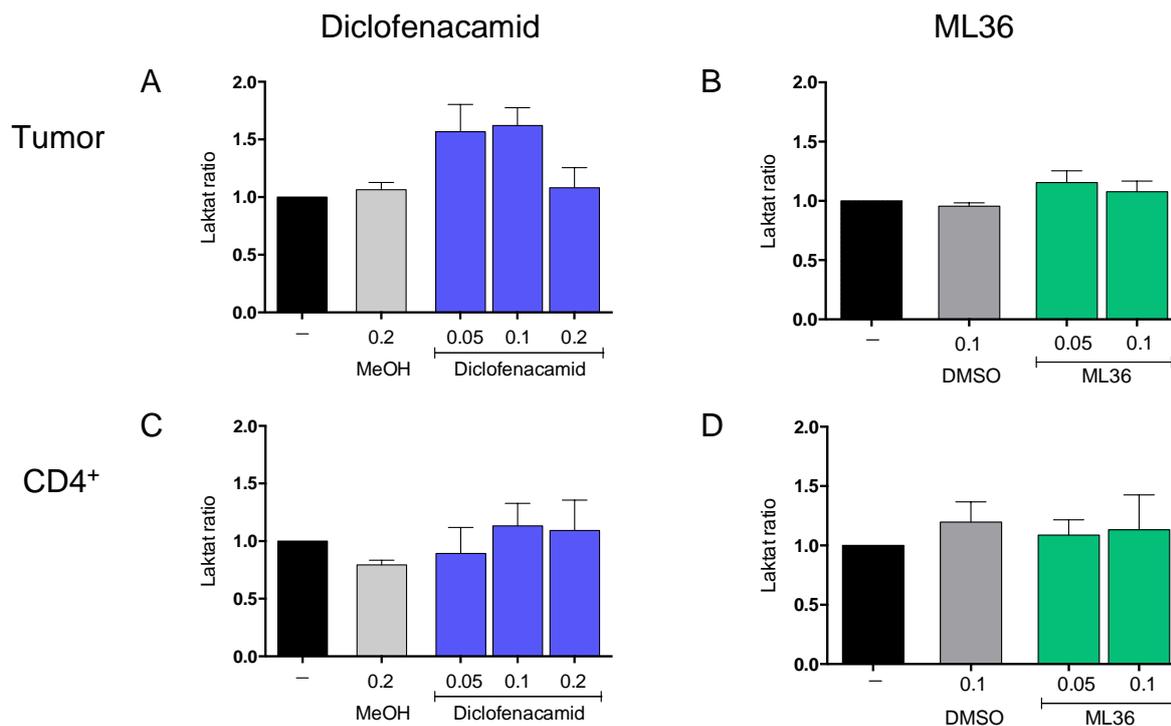


Abbildung 10: Diclofenacamid und ML36 zeigen keinen Effekt auf die Laktatsekretion in Tumorzellen und CD4⁺ T-Zellen. Die T-Zellen wurden mit anti-CD3/CD28 Beads in einer Zell zu Bead Ratio von 1:1 ausgesät. Die T- und Tumorzellen wurden unter Zugabe von Diclofenacamid (0,05 mM, 0,1 mM und 0,2 mM) und der Lösungsmittelkontrolle MeOH, bzw. von ML36 (0,05 mM und 0,1 mM) und der Lösungsmittelkontrolle DMSO inkubiert. Die Laktatkonzentration wurde photometrisch in den Überständen (A) von C7H2 Zellen nach 12 Std., (B) von MellM nach 18 Std. und (C, D) von CD4⁺ T-Zellen nach 48 Std. bestimmt. Der Mittelwert ist dargestellt, normalisiert auf die Kontrolle \pm Standardfehler (n=3). * zeigt einen signifikanten Unterschied im Vergleich zur Kontrolle (*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001), ermittelt mit dem Friedman Test.

In Vorarbeiten wurde gezeigt, dass Diclofenac bei einer Konzentration von 0,2 mM in der Lage ist, sowohl die Laktatproduktion als auch die Tumorzellproliferation, um die Hälfte zu reduzieren (Abbildung 9B). Obwohl durch Diclofenacamid und ML36 keine Inhibition der Laktatproduktion festgestellt wurde, reduzierten beide Substanzen nach 72 Std. die Proliferation der Tumorzellen. Bei einer Konzentration von 0,2 mM Diclofenacamid war die Proliferation signifikant eingeschränkt (Abbildung 11A), wobei nicht ausgeschlossen werden kann, dass diesem Effekt eine hohe Apoptoserate zugrunde liegt.

Im Gegensatz dazu wurde bei den CD4⁺ T-Zellen kein Diclofenacamid-abhängiger Proliferationsarrest nach 72 Std. beobachtet (Abbildung 11C). Allerdings war nach sechs Tagen die Proliferation um ein Drittel signifikant reduziert. (Daten nicht gezeigt) Eine signifikante Reduktion der T-Zellproliferation wurde bereits bei Diclofenac behandelten T-Zellen beobachtet (32).

ML36 zeigte nach 72 Std. eine stark proliferationshemmende Wirkung auf die MellM Zellen bereits bei einer Konzentration von 0,05 mM (Abbildung 11B). Dieses

Experiment wurde von Christina Brummer durchgeführt und zum Erstellungszeitpunkt dieser Arbeit noch nicht wiederholt. In den CD4⁺ T-Zellen wurde nach 72 Std. kein Proliferationsarrest induziert (Abbildung 11D). Allerdings wurde nach sechs Tagen die Proliferation trendmäßig reduziert (Daten nicht gezeigt).

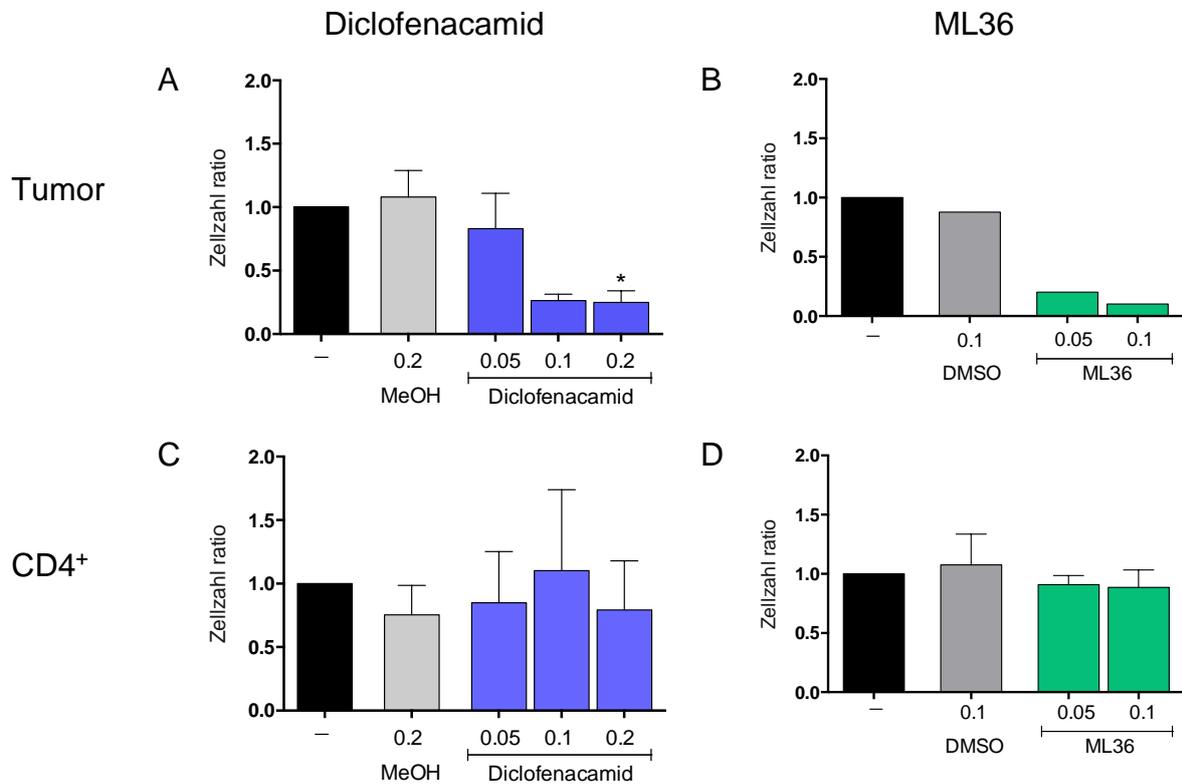


Abbildung 11: Diclofenacamid und ML36 reduzieren die Proliferation in Tumorzellen, jedoch nicht in T-Zellen. Die T-Zellen wurden mit anti-CD3/CD28 Beads in einer Zell zu Bead Ratio von 1:1 ausgesät. Die T-Zellen und Tumorzellen wurden unter Zugabe von Diclofenacamid (0,05 mM, 0,1 mM und 0,2 mM) und der Lösungsmittelkontrolle MeOH bzw. von ML36 (0,05 mM und 0,1 mM) und der Lösungsmittelkontrolle DMSO inkubiert. Die Zellzahl wurde mittels CASY Cell Counter nach 72 Std. (A) von C7H2, (B) von Mellm und (C, D) von T-Zellen bestimmt. In A, C und D der Mittelwert \pm Standardfehler ist dargestellt, normalisiert auf die Kontrolle ($n=3$). * zeigt einen signifikanten Unterschied im Vergleich zur Kontrolle (* $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$), ermittelt mit dem Friedman Test.

Neben der Fähigkeit die Proliferation zu reduzieren, waren sowohl Diclofenacamid als auch ML36 in der Lage Apoptose in den Tumorzelllinien hervorzurufen. Bereits nach 48 Std. wiesen die Tumorzellen bei einer Konzentration von 0,1 mM Diclofenacamid einen Trend zur reduzierten Viabilität auf. Nach 72 Std. waren nur noch 20% der Zellen viabel (Abbildung 12A). Der Effekt von Diclofenac war in den C7H2 geringer als in mit Diclofenacamid behandelten Zellen. Nach 72 Std. waren noch ca. 40% der Tumorzellen viabel. In den CD4⁺ T-Zellen löste Diclofenacamid, sogar in höheren Konzentrationen, weder nach 72 Std. (Abbildung 12C) noch nach sechs Tagen Apoptose aus (Daten nicht gezeigt).

Auch ML36 induzierte in Tumorzellen Apoptose. Bei 0,1 mM ML36 waren nur noch ca. 20% der Melanomzellen viabel (Abbildung 12B). Es ist zu beachten, dass dieses Experiment zum Erstellungszeitpunkt dieser Arbeit noch nicht wiederholt wurde. Im Gegensatz dazu, löste auch die höchste, eingesetzte ML36 Konzentration in primären CD4⁺ T-Zellen weder nach 72 Std. (Abbildung 12D), noch nach sechs Tagen (Daten nicht gezeigt) Apoptose aus.

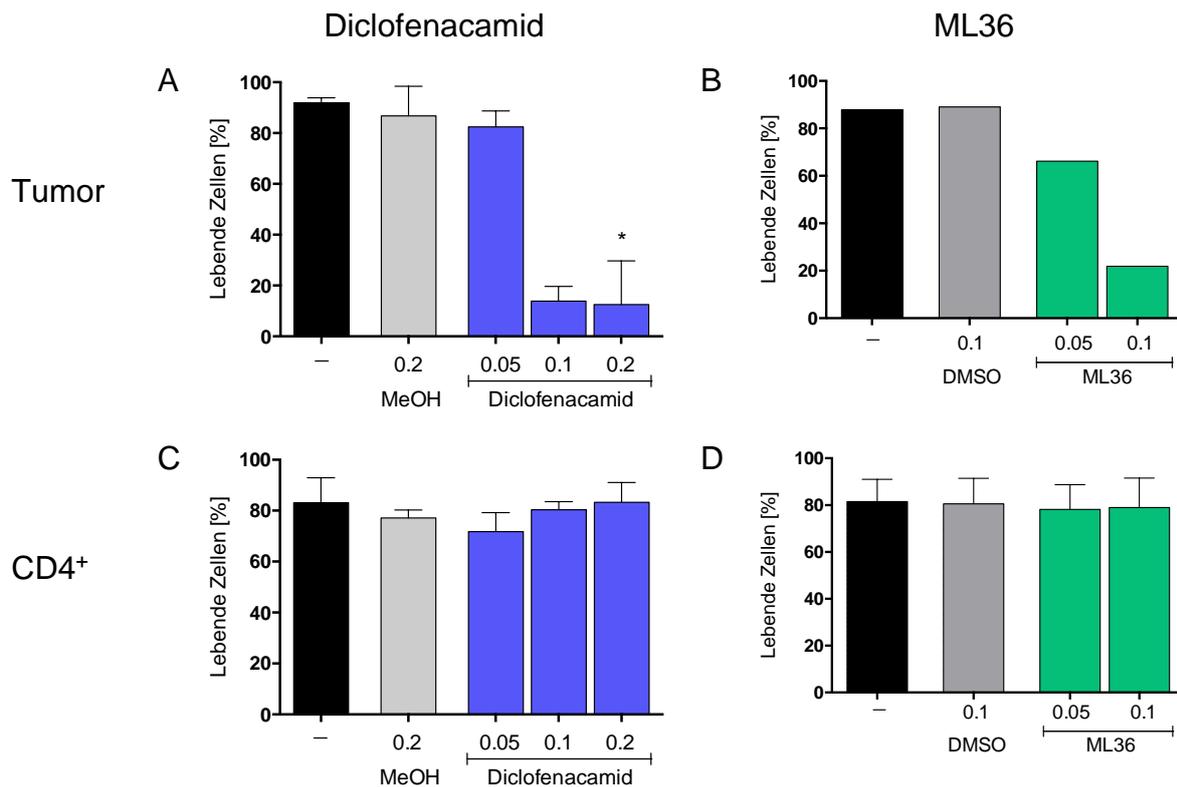


Abbildung 12: ML36 und Diclofenacamid induzieren Apoptose in Tumorzellen, wobei die Viabilität von T-Zellen nicht beeinflusst ist. Die T-Zellen wurden mit anti-CD3/CD28 Beads in einer Zell zu Bead Ratio von 1:1 ausgesät. Die T-Zellen und Tumorzellen wurden unter Zugabe von Diclofenacamid (0,05 mM, 0,1 mM und 0,2 mM) und der Lösungsmittelkontrolle MeOH bzw. von ML36 (0,05 mM und 0,1 mM) und der Lösungsmittelkontrolle DMSO inkubiert. Die Apoptosemessung (A) in C7H2, (B) in Melm und (C, D) in T-Zellen erfolgte nach 72 Std. mittels Annexin V/7-AAD Färbung und FACS Analyse. In A, C und D ist der Mittelwert \pm Standardfehler dargestellt (aus $n=3$). * zeigt einen signifikanten Unterschied im Vergleich zur Kontrolle (* $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$) ermittelt mit dem Friedman Test.

Zusammenfassend hatten Diclofenacamid und ML36 keine Auswirkungen auf die Laktatproduktion. Beide Substanzen inhibierten allerdings die Proliferation und lösten Apoptose in Tumorzellen aus, wobei beide Substanzen keine Effekte auf CD4⁺ T-Zellen zeigten.

3.1.2 Diclofenacamid und ML36 - Wirkung auf die Funktionen humaner CD4⁺ T-Zellen

Aufgrund von Proliferationsarrest und Induktion von Apoptose in Tumorzellen durch Diclofenacamid und ML36, scheinen sich beide Substanzen potenziell für die Tumorthherapie zu eignen. Um einen möglichen negativen Effekt auf Immunzellen zu evaluieren, wurden die T-Zellfunktionen unter Diclofenacamid und ML36 Behandlung untersucht. Hierzu wurden die Zytokinsekretion sowie der Aktivierungsstatus anhand der Expression der Aktivierungsmarker CD25 und CD69 in CD4⁺ T- Zellen analysiert. Bei einer Behandlung mit Diclofenacamid wurde eine trendmäßige Reduktion der IFN γ Sekretion ab einer Konzentration von 0,2 mM beobachtet (Abbildung 13A). Ähnliche Ergebnisse wurden für die IL-2 und TNF Sekretion erhalten (Abbildung 13C und E). Die IL-10 Produktion wurde durch die Zugabe von Diclofenacamid nicht beeinflusst (Daten nicht gezeigt).

Bei einer Behandlung mit ML36 wurde bei keinem der vier analysierten Zytokine eine signifikante Reduktion festgestellt (Abbildung 13B, D und F).

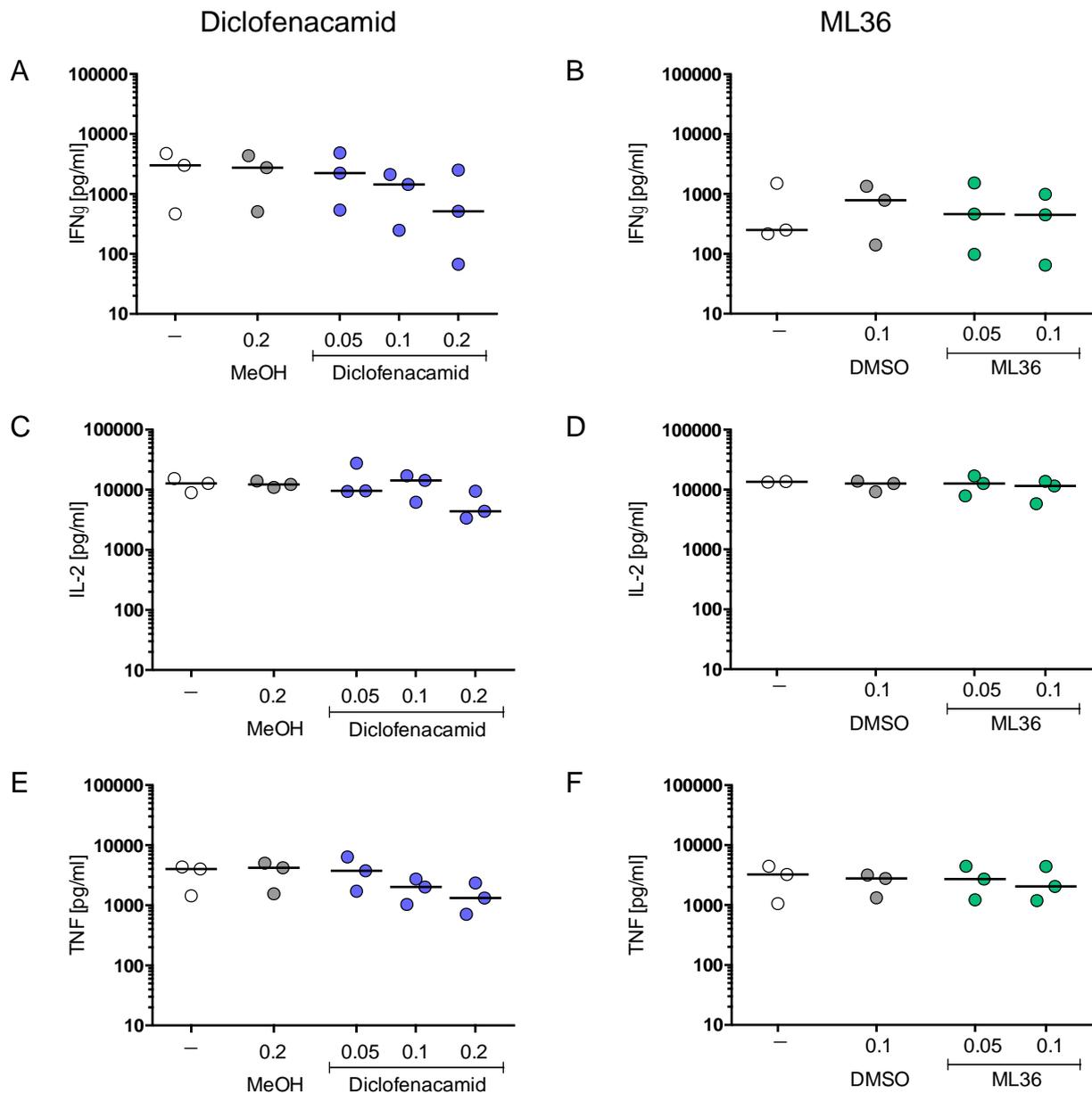


Abbildung 13: Einfluss von Diclofenacamid und ML36 auf die Zytokinsekretion in CD4⁺ T-Zellen. Die T-Zellen wurden mit anti-CD3/CD28 Beads in einer Zell zu Bead Ratio von 1:1 ausgesät und unter Zugabe von Diclofenacamid (0,05 mM, 0,1 mM und 0,2 mM) und der Lösungsmittelkontrolle MeOH, bzw. von ML36 (0,05 mM und 0,1 mM) und der Lösungsmittelkontrolle DMSO inkubiert. Die Zytokinkonzentrationen wurden in Zellkulturüberständen nach 48 Std mit ELISA bestimmt. Der Median aus den einzelnen Messungen ist dargestellt (n=3). * zeigt einen signifikanten Unterschied im Vergleich zur Kontrolle (*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001), ermittelt mit dem Friedman Test

Die Expression des Aktivierungsmarkers CD25 wurde unter Diclofenacamid-Behandlung nicht beeinflusst. Jedoch wurde die CD69-Expression mit steigender Diclofenacamid-Konzentration heraufreguliert. Eine Behandlung mit 0,2 mM Diclofenacamid führte zu einer signifikant höheren CD69 Expression (Abbildung 14A). Mit steigender ML36 Konzentration wurde die CD25-Expression reduziert. Mit einer Konzentration von 0,1 mM war der Unterschied zur Lösungsmittelkontrolle statistisch

signifikant. Die CD69 Expression nahm hingegen mit steigender ML36 Konzentration trendmäßig zu, war allerdings nicht statistisch signifikant (Abbildung 14B).

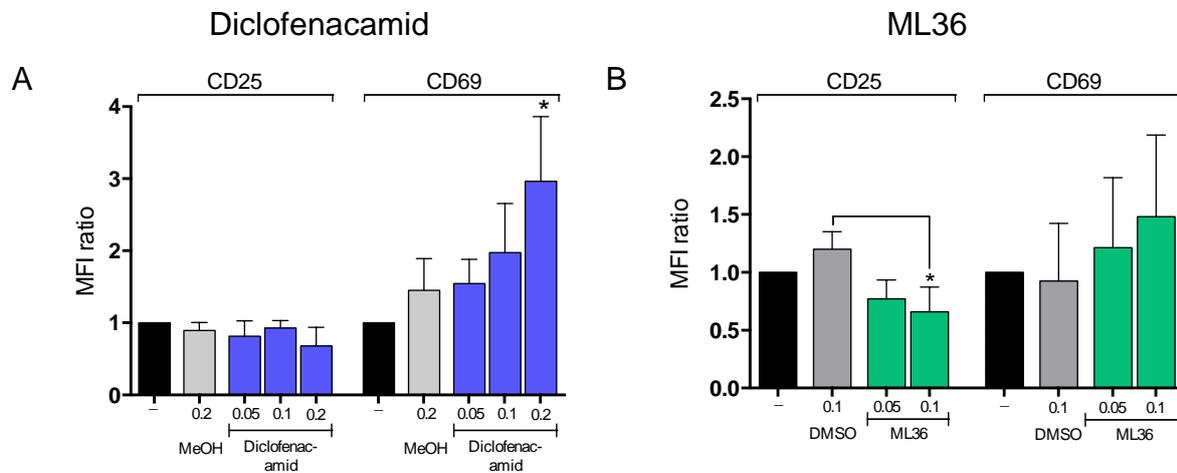


Abbildung 14: Einfluss von Diclofenacamid und ML36 auf die Expression der Aktivierungsmarker CD25 und CD69 von CD4⁺T-Zellen nach 48 Std. Die T-Zellen wurden mit anti-CD3/CD28 Beads in einer Zell zu Bead Ratio von 1:1 ausgesät und unter Zugabe von Diclofenacamid (0,05 mM, 0,1 mM und 0,2 mM) und der Lösungsmittelkontrolle MeOH, bzw. von ML36 (0,05 mM und 0,1 mM) und der Lösungsmittelkontrolle DMSO inkubiert. Die Expression der Oberflächenmarker wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Der Mittelwert ist dargestellt \pm Standardfehler, normalisiert auf die Kontrolle (n=3). * zeigt einen signifikanten Unterschied im Vergleich zur Kontrolle (*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001), ermittelt mit dem Friedman Test.

Obwohl beide Substanzen einen starken Effekt auf die Tumorzellen zeigten, wurde die Funktion humaner CD4⁺ T-Zellen unter Behandlung mit Diclofenacamid und ML36 weitestgehend erhalten.

3.1.3 Diclofenacamid und ML36 - Wirkung auf humane CD4⁺ T-Zellen in der MLR

Um den Effekt von Diclofenacamid und ML36 in einem Rahmen zu analysieren, der den physiologischen Bedingungen ähnelt, wurden die T-Zellfunktionen von CD4⁺ T-Zellen unter Stimulation mit dendritischen Zellen in einer MLR untersucht. Aufgrund der schwächeren Stimulation wurden andere Messzeitpunkte gewählt.

Im Gegensatz zu den mit anti-CD3/CD28 Dynabeads stimulierten CD4⁺ T-Zellen, wurde in der MLR eine titrationsabhängige Abnahme der Laktatsekretion unter der Diclofenacamid-Behandlung beobachtet, die bei 0,2 mM eine statistische Signifikanz aufwies (Abbildung 15A). Auch unter 0,1 mM ML36 war eine signifikante Reduktion zu verzeichnen (Abbildung 15B). Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, dass diese Laktatreduktion mit dem induzierten Proliferationsarrest im Zusammenhang

steht (Abbildung 15C und D). Da dieser Effekt in den anti-CD3/CD28 stimulierten CD4⁺ T-Zellen nicht auftrat, kann diskutiert werden, ob die Substanzen die Stimulationsfähigkeit der dendritischen Zellen herabsetzen. Weder durch Diclofenacamid noch durch ML36 wurde nach sechs Tagen Apoptose in den T-Zellen ausgelöst (Abbildung 15E und F).

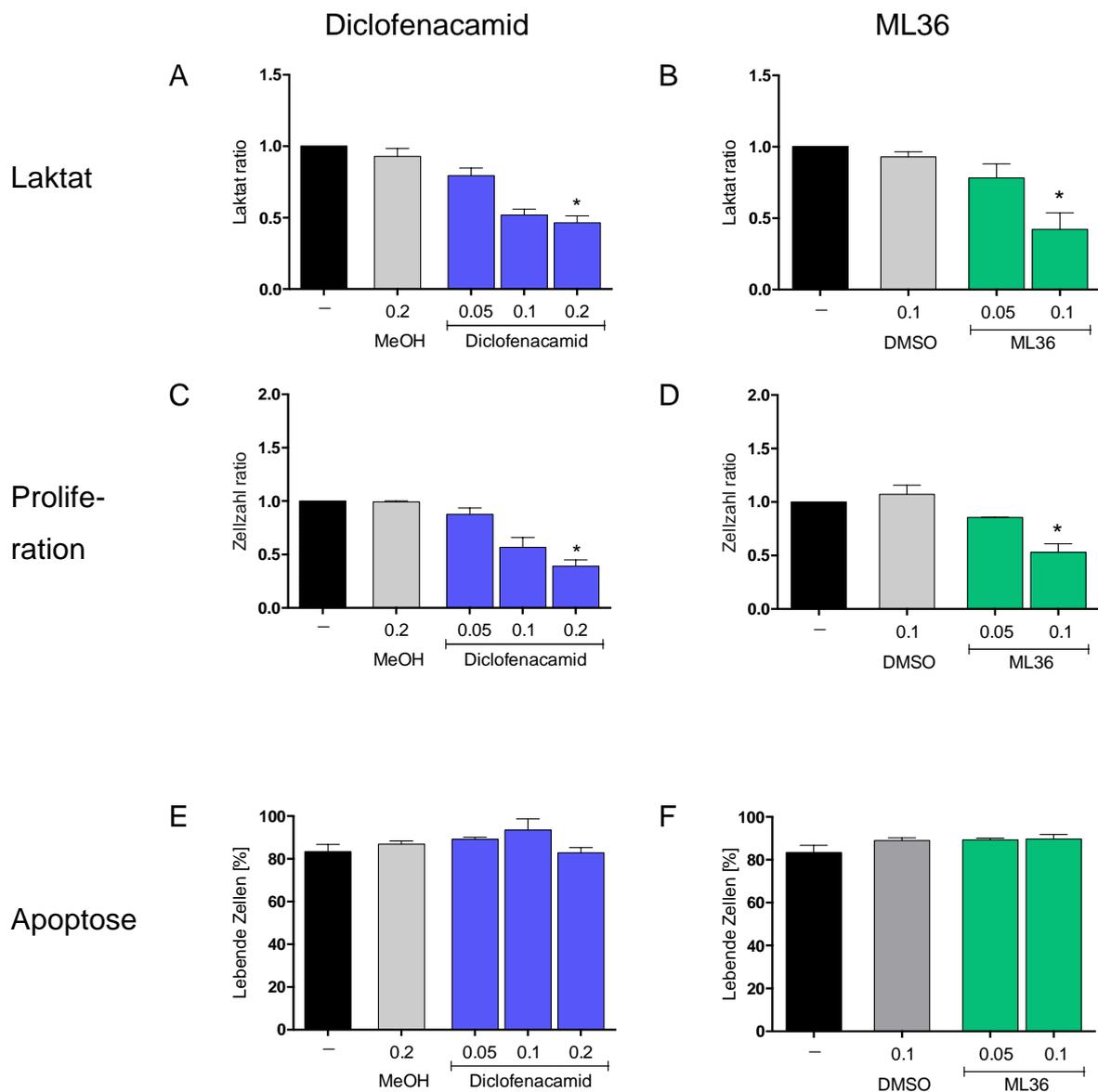


Abbildung 15: Die Wirkung von Diclofenacamid und ML36 auf die Laktatproduktion, Proliferation und Apoptose in humanen T-Zellen in der MLR. Dargestellt in (A) und (B) die Laktatproduktion nach vier Tagen, in (C) und (D) die Proliferation nach sechs Tagen und in (E) und (F) die Apoptoserate nach sechs Tagen bei CD4⁺T-Zellen aus der MLR. Die T-Zellen wurden mit dendritischen Zellen im Verhältnis 1:100 ko-kultiviert und unter Zugabe von Diclofenacamid (0,05 mM, 0,1 mM und 0,2 mM) und der Lösungsmittelkontrolle MeOH, bzw. von ML36 (0,05 mM und 0,1 mM) und der Lösungsmittelkontrolle DMSO inkubiert. Die Laktatkonzentration wurde in Zellkulturüberständen bestimmt. Die Proliferation wurde mittels CASY Cell Counter bestimmt. Die Apoptosemessung erfolgte mittels Annexin V/7-AAD Färbung und FACS Analyse. Der Mittelwert \pm Standardfehler ist dargestellt ($n=3$). In A-D wurden die Daten auf die Kontrolle normalisiert. * zeigt einen signifikanten Unterschied im Vergleich zur Kontrolle (* $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$) ermittelt mit dem Friedman Test.

Wie in den mit anti-CD3/CD28 stimulierten T-Zellen, führte Diclofenacamid auch in der MLR bei einer Konzentration von 0,1 mM bereits zu einer Reduktion der Zytokin Produktion. An Tag vier war die IFN γ Konzentration verglichen mit der Kontrolle auf 35% reduziert, wobei die Zellen ebenfalls um ein Drittel weniger proliferiert haben. Bei der Höchstkonzentration von 0,2 mM war die IFN γ Konzentration sogar auf 12% reduziert. Auch hier kann die verringerte Zellzahl eine Rolle spielen. Somit kann die verringerte Zytokinkonzentration zwar durch die verminderte Zellzahl bedingt sein, aber nicht ausschließlich dadurch erklärt werden. Während in den anti-CD3/CD28 stimulierten T-Zellen ab einer Behandlung von 0,2 mM Diclofenacamid die IL-2 Produktion nach 48 Std. verringert war, verhielten sich die T-Zellen in der MLR gegenläufig. Da auch bei Behandlung mit anderen Substanzen ein titrationsabhängiger IL-2 Anstieg in der MLR sichtbar war, stellt sich die Frage, ob dendritische Zellen für die Mehrproduktion des Zytokins verantwortlich sein könnten. Bei einer Behandlung mit ML36 zeigte sich in der MLR an Tag vier eine statistisch signifikante Erniedrigung des IFN γ Spiegels, von 662,1 pg/ml in der Kontrolle auf 15,8 pg/ml in den mit 0,1 mM behandelten Zellen (Tabelle 11). Auch nach sechs Tagen war die IFN γ Produktion unter Behandlung mit 0,1 mM ML36 statistisch signifikant reduziert (Daten nicht gezeigt). IL-2 wurde in den anti-CD3/CD28 stimulierten CD4⁺T-Zellen nur leicht reduziert. In der MLR hingegen konnte nach vier sowie nach sechs Tagen mit zunehmender Konzentration von ML36 eine Steigerung der IL-2 Produktion beobachtet werden. Eine leichte behandlungsabhängige Abnahme der TNF Konzentration war sowohl in den anti-CD3/CD28 stimulierten CD4⁺T-Zellen als auch in der MLR zu verzeichnen

Tabelle 11: Zytokinsekretion von T-Zellen aus der MLR unter Behandlung mit Diclofenacamid und ML36. Die T-Zellen wurden mit dendritischen Zellen im Verhältnis 1:100 ko-kultiviert und unter Zugabe von Diclofenacamid (0,05 mM, 0,1 mM und 0,2 mM) und der Lösungsmittelkontrolle MeOH, bzw. von ML36 (0,05 mM und 0,1 mM) und der Lösungsmittelkontrolle DMSO inkubiert. Die Zytokinkonzentrationen wurden in Zellkulturüberständen nach vier Tagen mit ELISA bestimmt. Der Mittelwert \pm Standardabweichung ist dargestellt (n=3). * zeigt einen signifikanten Unterschied im Vergleich zur Kontrolle (*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001) ermittelt mit dem Friedman Test.

In der MLR		IFN γ	IL-2	TNF
Diclofenacamid u. Lösungsmittel	Kontrolle	662 \pm 245	1545 \pm 610	431 \pm 136
	MeOH	571 \pm 81	1456 \pm 660	403 \pm 140
	0,05mM	568 \pm 230	1838 \pm 1169	315 \pm 139
	0,1mM	233 \pm 125	2254 \pm 805	147 \pm 118
	0,2mM	86 \pm 49	2108 \pm 877	130 \pm 96
ML36 u. Lösungsmittel	DMSO	308 \pm 83	1484 \pm 474	327 \pm 130
	0,05mM	129 \pm 34	1848 \pm 733	402 \pm 117
	0,1mM	15 \pm 3*	2066 \pm 256	110 \pm 128

Hinsichtlich der Aktivierungsmarker konnte das Ergebnis der mit anti-CD3/CD28 stimulierten T-Zellen in der MLR reproduziert werden. Der Aktivierungsmarker CD25 wurden unter der Behandlung mit 0,2 mM Diclofenacamid leicht, aber nicht signifikant reduziert. Eine signifikant erhöhte CD69-Expression war bei 0,2 mM Diclofenacamid zu beobachten (Daten nicht gezeigt).

Bei Behandlung mit 0,1 mM ML36 zeigte sich eine nicht signifikante Reduktion des Oberflächenmarkers CD25. Die CD69 Expression nahm hingegen bei beiden Arten der T-Zellstimulation mit steigender ML36 Konzentration zu (Daten nicht gezeigt).

Zusammenfassend wurden in der MLR ähnliche Ergebnisse zu den mit anti-CD3-CD28 Beads stimulierten Zellen erzielt. Allerdings war die Proliferation, die Laktatproduktion und die IFN γ Produktion humaner CD4⁺ T-Zellen in der MLR unter Behandlung mit 0,2 mM Diclofenacamid und 0,1 mM ML36 vermindert.

3.2 Das NSAR Lumiracoxib

Ähnlich dem Diclofenac, inhibiert auch Lumiracoxib die Aktivität von Laktattransportern in Tumorzellen. Die Daten zu den Tumorzellen wurden von Lisa Hacker erhoben und freundlicherweise zur Verfügung gestellt, um den Effekt im Vergleich zu humanen CD4⁺ T-Zellen zu verdeutlichen. Die Laktatproduktion in den C7H2 Zellen wurde nach 48 Std. bereits bei einer Konzentration von 0,1 mM signifikant reduziert (Abbildung 16A). Die Proliferation nach 72 Std. war bei 0,2 mM Lumiracoxib signifikant verringert (Abbildung 16B), wobei nur eine trendmäßig erhöhte Apoptoserate festgestellt wurde (Abbildung 16C).

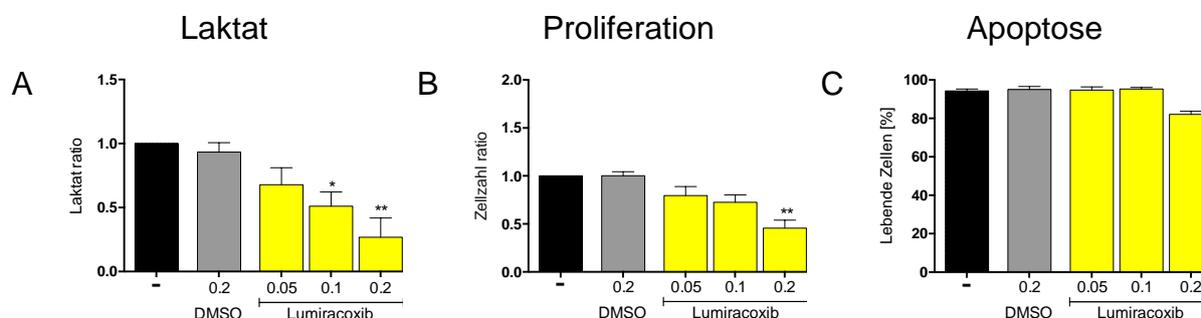


Abbildung 16. Lumiracoxib reduziert die Laktatsekretion sowie die Proliferation und fördert trendmäßig die Apoptose in C7H2 Zellen. Dargestellt in (A) die Laktatsekretion nach 48 Std, in (B) die Proliferation nach 72 Std und in (C) Apoptose nach 72 Std. Die Tumorzellen wurden unter Zugabe von Lumiracoxib (0,05 mM, 0,1 mM und 0,2 mM) und der Lösungsmittelkontrolle DMSO inkubiert. Die Laktatkonzentration wurde in Zellkulturüberständen bestimmt. Die Proliferation wurde mittels CASY Cell Counter bestimmt. Die Apoptosemessung erfolgte mittels Annexin V/7-AAD Färbung und FACS Analyse. Der Mittelwert \pm Standardfehler ist dargestellt ($n \geq 3$), in A und B wurden die Daten auf die Kontrolle normalisiert. Die Laktatkonzentration des reinen Mediums ist bereits von den Werten abgezogen. * zeigt einen signifikanten Unterschied im Vergleich zur Kontrolle (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$) ermittelt mit Kruska-Wallis Test Diese Ergebnisse wurden von Lisa Hacker erhoben und freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

3.2.1 Lumiracoxib – Wirkung auf humane CD4⁺ T-Zellen

Aufgrund der vielversprechenden Ergebnisse in den Tumorzelleexperimenten und um negative Effekte auf gesunde Zellen auszuschließen, wurde die Wirkung von Lumiracoxib auf die T-Zellfunktionen von humanen CD4⁺ T-Zellen untersucht. Es konnte eine trendmäßige Reduktion der Laktatproduktion beobachtet werden (Abbildung 17A). Auf die Proliferation und die Apoptose hatte Lumiracoxib keinen Einfluss (Abbildung 17B und C).

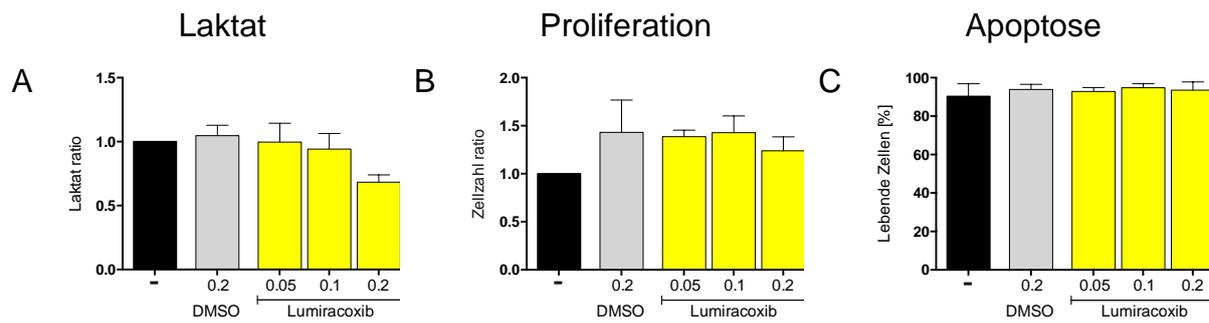


Abbildung 17: Lumiracoxib hat trotz geringer Laktatinhibition keinen Einfluss auf Proliferation oder Viabilität primärer CD4⁺ T-Zellen. Die T-Zellen wurden mit anti-CD3/CD28 Beads in einer Zell zu Bead Ratio von 1:1 ausgesät und unter Zugabe von Lumiracoxib (0,05 mM, 0,1 mM und 0,2 mM) und der Lösungsmittelkontrolle DMSO inkubiert. Die Laktatkonzentration in (A) wurde nach 48 Std. photometrisch in Zellkulturüberständen bestimmt. Die Proliferation nach 72 Std. in (B) wurde mittels CASY Cell Counter bestimmt. Die Apoptosemessung nach 72 Std. in (C) erfolgte mittels Annexin V/7-AAD Färbung und FACS Analyse. Der Mittelwert \pm Standardfehler ist dargestellt ($n=3$), in A und B wurden die Daten auf die Kontrolle normalisiert. Die Laktatkonzentration des reinen Mediums ist bereits von den Werten abgezogen. * zeigt einen signifikanten Unterschied im Vergleich zur Kontrolle (* $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$) ermittelt mit dem Friedman Test.

Die Produktion der Zytokine IFN γ , IL-2, TNF (Abbildung 18A-C) und IL-10 (Daten nicht gezeigt) wurden von Lumiracoxib nicht beeinflusst.

Die Expression von CD25 und CD69 wurde in den CD4⁺ T-Zellen unter Behandlung mit Lumiracoxib kaum beeinflusst. In der Lösungsmittelkontrolle war die CD25 Expression im Vergleich zur Kontrolle signifikant erhöht. Die Expression von CD69 stieg mit zunehmender Konzentration von Lumiracoxib an, lag im Durchschnitt aber unter dem Kontroll-Niveau (Abbildung 18D).

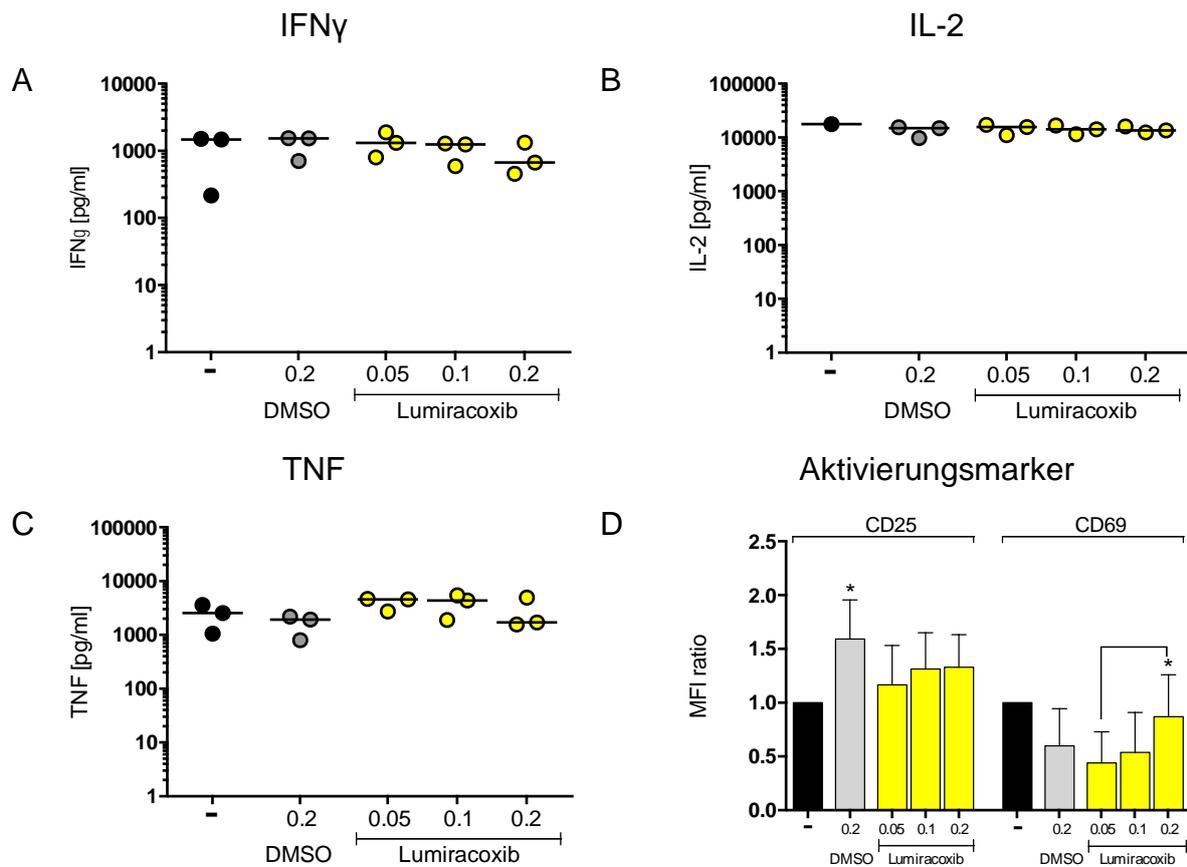


Abbildung 18: Einfluss von Lumiracoxib auf die Zytokinsekretion und Aktivierungsmarker primärer CD4⁺T-Zellen nach 48 Std. Die T-Zellen wurden mit anti-CD3/CD28 Beads in einer Zell zu Bead Ratio von 1:1 ausgesät und unter Zugabe von Lumiracoxib (0,05 mM, 0,1 mM und 0,2 mM) und der Lösungsmittelkontrolle DMSO inkubiert. Die Zytokinkonzentrationen von IFN γ in (A), IL-2 in (B) und TNF in (C) wurde in Zellkulturüberständen mit ELISA bestimmt. Die Expression der Oberflächenmarker in (D) wurde durchflusszytometrisch bestimmt. In A, B und C gezeigt sind die einzelnen Werte und der Median aus den einzelnen Messungen. In D ist der Mittelwert \pm Standardfehler dargestellt, normalisiert auf die Kontrolle (n=3). * zeigt einen signifikanten Unterschied im Vergleich zur Kontrolle (*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001) ermittelt mit dem Friedman Test.

Lumiracoxib reduziert die Laktatsekretion sowie die Proliferation und fördert trendmäßig die Apoptose in C7H2 Zellen. Allerdings zeigten sich bezüglich der T-Zell Funktionen unter Inkubation mit Lumiracoxib keine signifikanten Effekte.

3.3 Das NSAR Diflunisal

Im Vergleich zu den bereits beschriebenen Substanzen kann Diflunisal in einer höheren Dosis eingenommen werden. Die Wirkung von Diflunisal auf C7H2 wurde in den Konzentrationen 0,1 mM, 0,2 mM, 0,4 mM und 0,8 mM untersucht. Da eine Konzentration von 0,4 mM bereits so gravierende Effekte auf die Proliferation und die Viabilität der C7H2 Zellen aufwies, beschränkten sich weitere Experimente auf eine Höchstdosis von 0,4 mM Diflunisal.

Die Laktatproduktion wurde in den C7H2 Zellen durch Zugabe von Diflunisal gesenkt. Eine statistisch signifikante Reduktion konnte bei einer Konzentration von 0,4 mM im Vergleich zu 0,1 mM Diflunisal beobachtet werden (Abbildung 19A). Diflunisal wies eine proliferationshemmende Wirkung auf Tumorzellen auf, die ab 0,4 mM statistisch signifikant war (Abbildung 19C). Diflunisal zeigte eine stark zytotoxische Wirkung auf die C7H2 Zellen, wobei nach 72 Std. nur noch 28% der C7H2 Zellen viabel waren (Abbildung 19E).

Bei den CD4⁺T-Zellen konnte trendmäßig ein reduzierender Effekt auf die Laktatproduktion bei 0,4 mM festgestellt werden (Abbildung 19B). Nach 72 Std. zeigte sich in den CD4⁺ T-Zellen keine Beeinträchtigung der Proliferation (Abbildung 19D). Nach sechs Tagen war die Zellzahl allerdings unter der Behandlung mit Diflunisal um 50% reduziert (Daten nicht gezeigt). In den CD4⁺T-Zellen (Abbildung 19F) löste Diflunisal im Gegensatz zu den Ergebnissen mit den C7H2 Zellen auch in höherer Konzentration keine Apoptose aus.

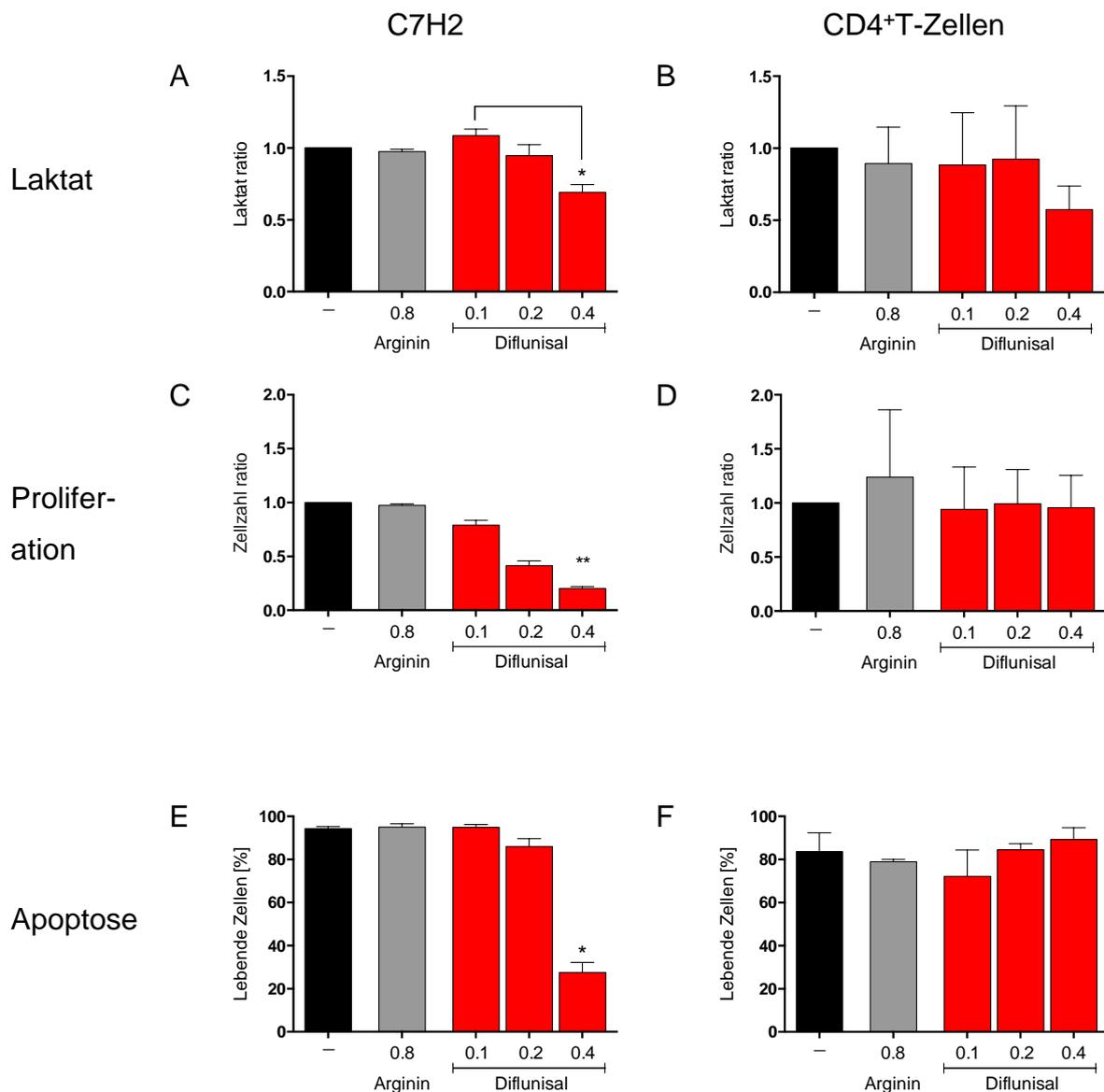


Abbildung 19: Diflunisal verringert die Laktatproduktion, reduziert die Proliferation und fördert die Apoptose in C7H2 Zellen, nicht jedoch in primären CD4⁺T-Zellen. Die T-Zellen wurden mit anti-CD3/CD28 Beads in einer Zell zu Bead Ratio von 1:1 ausgesät. Die T- und Tumorzellen wurden unter Zugabe von Diflunisal (0,1 mM, 0,2 mM und 0,4 mM) und der Lösungsmittelkontrolle Arginin inkubiert. Die Laktatkonzentration von C7H2 nach 24 Std. in (A) und T-Zellen nach 48 Std. in (B) wurde in Zellkulturüberständen bestimmt. Die Proliferation nach 72 Std. von C7H2 in (C) und T-Zellen in (D) wurde mittels CASY Cell Counter bestimmt. Die Apoptosemessung nach 72 Std. von C7H2 in (E) und T-Zellen in (F) erfolgte mittels Annexin V/7-AAD Färbung und FACS Analyse. Der Mittelwert \pm Standardfehler ist dargestellt ($n=3$), in A-D wurden die Daten auf die Kontrolle normalisiert. * zeigt einen signifikanten Unterschied im Vergleich zur Kontrolle (* $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$) ermittelt mit dem Friedman Test.

3.3.1 Diflunisal - Wirkung auf humane CD4⁺ T-Zellen

Im Gegensatz zu den vielversprechenden Daten der Proliferation und der Viabilität, reduzierte Diflunisal die Zytokinsekretion in den CD4⁺ T-Zellen. Eine Konzentration von 0,4 mM Diflunisal führte zu einer statistisch signifikanten Reduktion der IFN γ , IL-2 und

TNF Produktion (Abbildung 20A-D). Dagegen wurde die IL-10 Konzentration unter Behandlung mit Diflunisal nur leicht reduziert (Daten nicht gezeigt). Der Aktivierungsmarker CD25 wurde durch eine Behandlung mit Diflunisal nicht beeinflusst, wohingegen CD69 mit zunehmender Diflunisal-Konzentration vermehrt exprimiert wurde (Abbildung 20D).

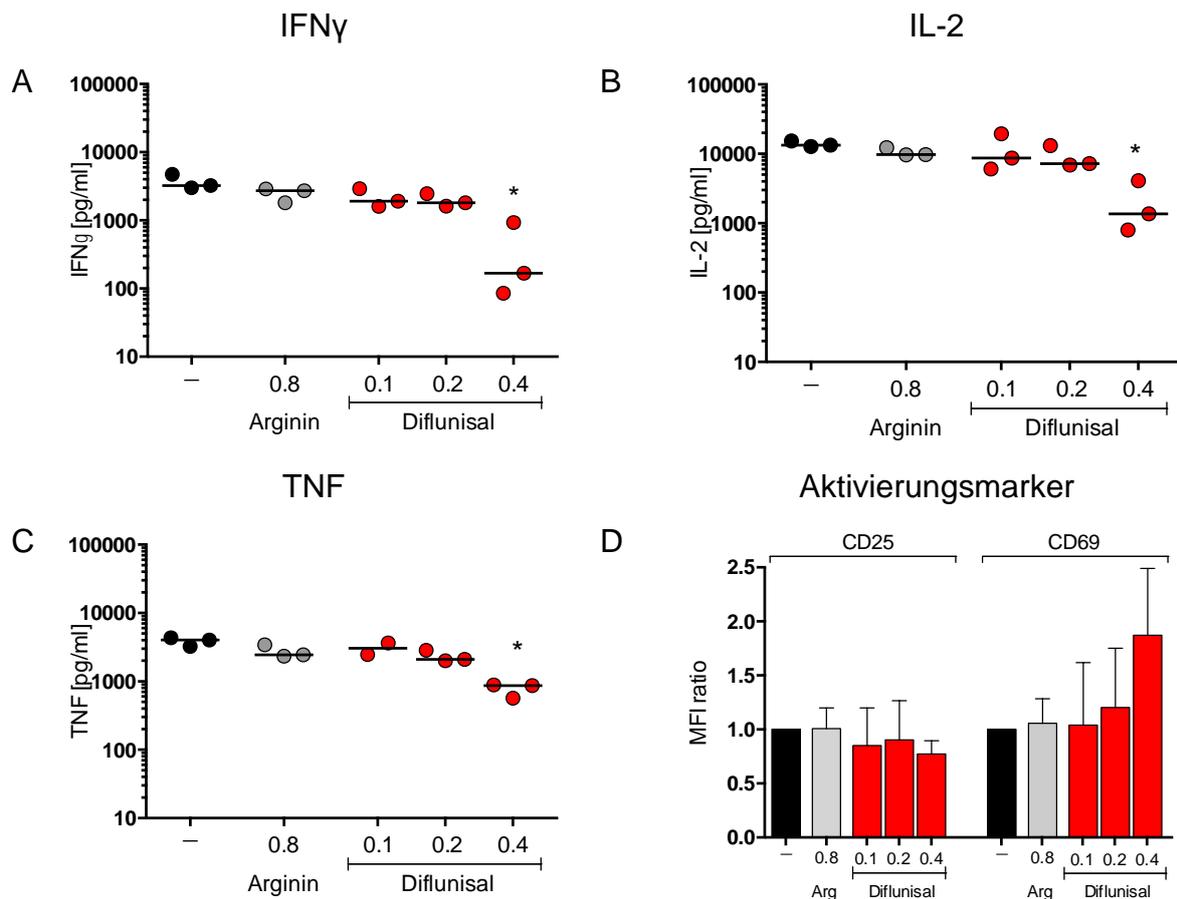


Abbildung 20: Diflunisal verringert die Zytokinsekretion von CD4⁺ T-Zellen ab einer Konzentration von 0,4 mM, beeinflusst aber nicht die Expression der Aktivierungsmarker. Die T-Zellen wurden mit anti-CD3/CD28 Beads in einer Zell zu Bead Ratio von 1:1 ausgesät und unter Zugabe von Diflunisal (0,1 mM, 0,2 mM und 0,4 mM) und der Lösungsmittelkontrolle Arginin inkubiert. Die Zytokinkonzentrationen von IFN γ in (A), IL-2 in (B) und TNF in (C) wurde in Zellkulturüberständen mit ELISA bestimmt. Die Expression der Oberflächenmarker in (D) wurde durchflusszytometrisch bestimmt. In A, B und C sind die einzelnen Werte und der Median aus den einzelnen Messungen gezeigt. In D ist der Mittelwert \pm Standardfehler dargestellt, normalisiert auf die Kontrolle (n=3). * zeigt einen signifikanten Unterschied im Vergleich zur Kontrolle (*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001) ermittelt mit dem Friedman Test.

Obwohl Diflunisal sich stark negativ auf das Tumorzellwachstum und die Viabilität auswirkt, zeigte sich kein Effekt auf die Proliferation der CD4⁺ T-Zellen. Allerdings kann die Immunantwort durch T-Zellen durch eine verringerte Zytokinproduktion vermindert sein.

3.3.2 Diflunisal - Wirkung auf humane CD4⁺ T-Zellen in der MLR

Die Wirkung von Diflunisal auf CD4⁺T-Zellen wurde zusätzlich in der MLR untersucht. Im Gegensatz zu den Ergebnissen der antiCD3/CD28 Stimulation, war die Laktatproduktion in der MLR nach vier Tagen bei einer Konzentration von 0,4 mM statistisch signifikant reduziert (Abbildung 21A), was allerdings auf die erniedrigte Zellzahl zurückzuführen sein könnte.

An Tag sechs war eine statistisch signifikante Reduktion der Proliferation zu beobachten (Abbildung 21B). Auch hier bleibt zu evaluieren, inwieweit dieser Effekt durch eine mögliche Beeinträchtigung der dendritischen Zellen hervorgerufen wurde. Konkordant mit den Ergebnissen bei der antiCD3/CD28-Stimulation induzierte 0,4 mM Diflunisal in den CD4⁺T-Zellen keine Apoptose (Abbildung 21C).

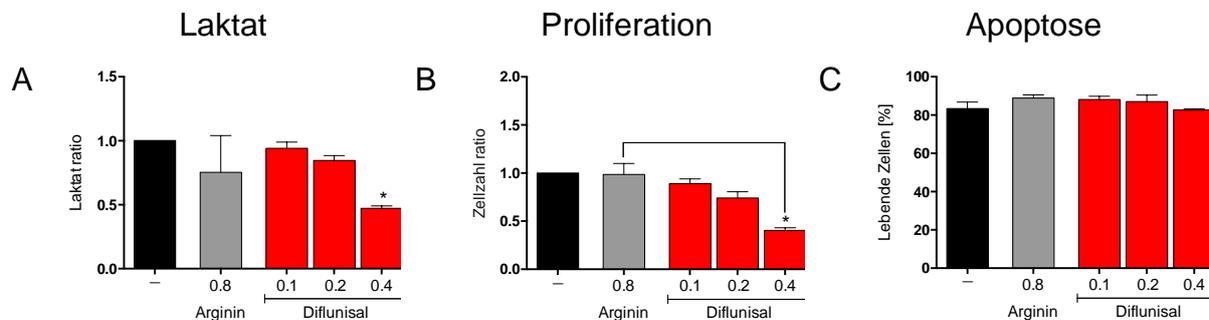


Abbildung 21: Diflunisal reduziert die Laktatsekretion, sowie die Proliferation, induziert jedoch keine Apoptose bei CD4⁺T-Zellen in der MLR. Die T-Zellen wurden mit dendritischen Zellen im Verhältnis 1:100 ko-kultiviert und unter Zugabe von Diflunisal (0,1 mM, 0,2 mM und 0,4 mM) und der Lösungsmittelkontrolle Arginin inkubiert. Die Laktatkonzentration in (A) wurde nach vier Tagen in Zellkulturüberständen bestimmt. Die Proliferation in (B) wurde nach sechs Tagen mittels CASY Cell Counter bestimmt. Die Apoptosemessung in (C) erfolgte nach sechs Tagen mittels Annexin V/7-AAD Färbung und FACS Analyse. Der Mittelwert \pm Standardfehler ist dargestellt ($n=3$) in A und B normalisiert auf die Kontrolle. * zeigt einen signifikanten Unterschied im Vergleich zur Kontrolle (* $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$) ermittelt mit dem Kruska-Wallis Test.

Wie in den mit anti-CD3/CD28 stimulierten CD4⁺T-Zellen konnte eine statistisch signifikante Reduktion der IFN γ Produktion nachgewiesen werden (Tabelle 12). Es zeigte sich an Tag vier sowie an Tag sechs eine signifikante Erniedrigung des IFN γ und TNF Spiegels bei einer Konzentration von 0,4 mM Diflunisal. Gegenläufig zu den mit anti-CD3/CD28 stimulierten CD4⁺T-Zellen wurde in der MLR mit zunehmender Konzentration von Diflunisal eine Steigerung der IL-2 Produktion beobachtet. Der Aktivierungsmarker CD25 wurde durch die Behandlung mit Diflunisal nicht beeinflusst. In der MLR zeigte sich eine Erhöhung von CD69 nach vier Tagen bei Behandlung mit 0,4 mM Diflunisal im Vergleich zur Arginin Kontrolle (Tabelle 12).

Tabelle 12: Zytokinsekretion und Aktivierungsmarker Expression von T-Zellen aus der MLR unter Behandlung mit Diflunisal. Die T-Zellen wurden mit dendritischen Zellen im Verhältnis 1:100 ko-kultiviert und unter Zugabe von Diflunisal (0,1 mM, 0,2 mM und 0,4 mM) und der Lösungsmittelkontrolle Arginin inkubiert. Die Zytokinkonzentrationen (IFN γ , IL-2 und TNF) wurden in Zellkulturüberständen nach vier Tagen mit ELISA bestimmt. Die Expression der Oberflächenmarker CD25 und CD69 wurde an Tag vier durchflusszytometrisch bestimmt. Der Mittelwert \pm Standardabweichung ist dargestellt (n=3). * zeigt einen signifikanten Unterschied im Vergleich zur Kontrolle (*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001) ermittelt mit dem Friedman Test.

Zytokine und Aktivierungsmarker	Kontrolle	Arginin 0,8 mM	Diflunisal 0,1 mM	Diflunisal 0,2 mM	Diflunisal 0,4 mM
IFN γ	662 \pm 245	412 \pm 180	620 \pm 148	504 \pm 123	228 \pm 125*
IL-2	1545 \pm 610	1305 \pm 988	1539 \pm 668	2143 \pm 769	2423 \pm 795
TNF	431 \pm 136	231 \pm 109	337 \pm 140	297 \pm 113	122 \pm 61*
CD25	689 \pm 112	722 \pm 141	698 \pm 178	762 \pm 159	805 \pm 105
CD69	6.88 \pm 0.96	6.62 \pm 0.85	6.77 \pm 0.11	7.6 \pm 0.58	10.13 \pm 1.04*

Die Ergebnisse der mit anti-CD3/CD28 stimulierten CD4⁺T-Zellen konnten in der MLR bestätigt werden. Der zusätzlich beobachtete negative Effekt auf die Proliferation und die Laktatkonzentration bei 0,4 mM Diflunisal könnte auf eine unzureichende Stimulation durch die gehemmten dendritischen Zellen hervorgerufen worden sein.

3.4 Das NSAR Ketoprofen

Ketoprofen hemmt als klassisches NSAR die COX1/2, wobei auch diese Substanz in seiner chemischen Struktur Diclofenac ähnelt. Allerdings zeigt Ketoprofen im Gegensatz zum Diclofenac keine Wirkung auf die Laktatproduktion, Proliferation oder Apoptose der C7H2 Zellen (Daten nicht gezeigt). Um einen COX-abhängiger Effekt auszuschließen, wurde Ketoprofen als Negativkontrolle in dieser Arbeit verwendet.

3.4.1 Ketoprofen - Wirkung auf humane CD4⁺ T-Zellen

Ähnlich zu den Ergebnissen für Tumorzellen, zeigte Ketoprofen keinen signifikanten Effekt auf die Laktatproduktion, Proliferation oder Apoptose in CD4⁺ T-Zellen (Abbildung 22A-C). Die Laktatproduktion und Proliferation sind geringfügig trendmäßig verringert. Auch bei höheren Konzentrationen, bei denen Diclofenac inhibierende Wirkung auf das Tumorwachstum zeigte, konnte kein signifikanter Effekt hervorgerufen werden.

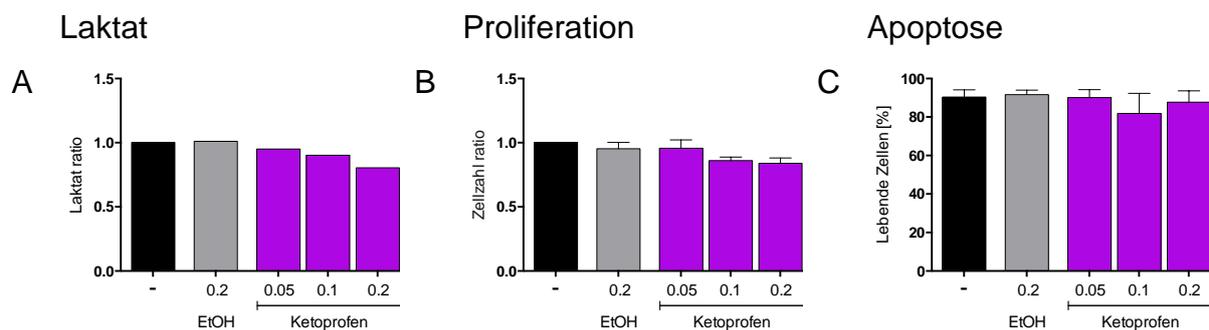


Abbildung 22: Ketoprofen beeinflusst geringfügig die Laktatsekretion und die Proliferation aber nicht die Apoptose in CD4⁺ T-Zellen. Die T-Zellen wurden mit anti-CD3/CD28 Beads in einer Zell zu Bead Ratio von 1:1 ausgesät und mit Ketoprofen (0,05 mM, 0,1 mM und 0,2 mM) und der Lösungsmittelkontrolle EtOH inkubiert. Die Laktatkonzentration in (A) wurde nach 72 Std. in Zellkulturüberständen bestimmt. Die Proliferation in (B) wurde nach 72 Std. mittels CASY Cell Counter bestimmt. Die Apoptosemessung in (C) erfolgte nach 72 Std. mittels Annexin V/7-AAD Färbung und FACS Analyse. der Mittelwert \pm Standardfehler ist dargestellt ($n=1$ für A, $n=3$ für B und C), in A und B wurden die Daten auf die Kontrolle normalisiert. Die Laktatkonzentration des reinen Mediums ist bereits von den Werten abgezogen. * zeigt einen signifikanten Unterschied im Vergleich zur Kontrolle (* $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$) ermittelt mit dem Friedman Test.

Zudem wurde die Produktion von den Zytokinen IFN γ (Abbildung 23A), IL-2 (Abbildung 23B), TNF (Abbildung 23C), sowie IL-10 (Daten nicht gezeigt) als auch die Expression der Aktivierungsmarker CD25 und CD69 durch die Zugabe von Ketoprofen nicht beeinflusst (Abbildung 23D).

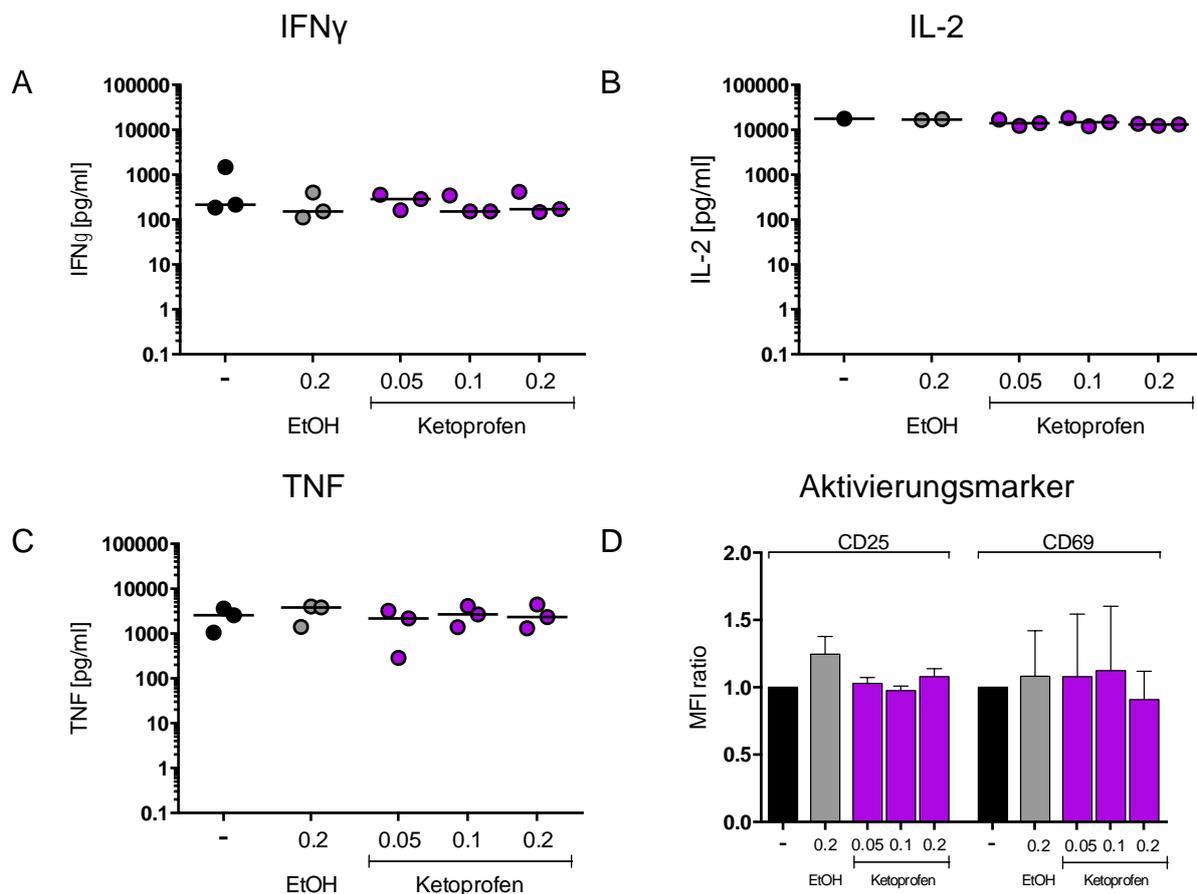


Abbildung 23: Ketoprofen zeigt keine Wirkung auf die Zytokinsekretion und die Expression der Aktivierungsmarker CD25 und CD69 in CD4⁺T-Zellen. Die T-Zellen wurden mit anti-CD3/CD28 Beads in einer Zell zu Bead Ratio von 1:1 ausgesät und mit Ketoprofen (0,05 mM, 0,1 mM und 0,2 mM) und der Lösungsmittelkontrolle EtOH inkubiert. Die Zytokinkonzentrationen von IFN γ in (A), IL-2 in (B) und TNF in (C) wurde in Zellkulturüberständen mit ELISA bestimmt. Die Expression der Oberflächenmarker in (D) wurde durchflusszytometrisch bestimmt. In A, B und C sind die einzelnen Werte und der Median aus den einzelnen Messungen gezeigt. In D ist der Mittelwert \pm Standardfehler normalisiert auf die Kontrolle dargestellt (n=3). * zeigt einen signifikanten Unterschied im Vergleich zu Kontrolle (*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001) ermittelt mit dem Friedman Test.

Das NSAR Ketoprofen zeigte weder auf Tumorzellen noch auf T-Zellen oder deren Funktionen einen Effekt. Der Einfluss auf das Tumorstadium der anderen NSAR scheint somit COX-unabhängig hervorgerufen zu werden.

4. Diskussion

Tumorerkrankungen stellen ein weltweites Gesundheitsproblem dar. Allein in Deutschland wurden im Jahr 2014 laut Schätzungen des Zentrums für Krebsregisterdaten am Robert-Koch-Institut 476 000 Tumorerkrankungen erstdiagnostiziert. Vielversprechende Ergebnisse in der Tumorthherapie konnten mit Hilfe von immunotherapeutischen Ansätzen erzielt werden. Im Gegensatz zu den Erfolgen bei Leukämien und Lymphomen, sind die Erfolgsaussichten bei soliden Tumoren allerdings begrenzt. Ein Lösungsansatz könnte eine zusätzliche anti-metabolische Therapie darstellen, um die vorherrschenden immunsuppressiven Bedingungen im Tumor zu verringern. Somit würden einerseits das Tumorwachstum durch die Inhibition der tumoreigenen Stoffwechselwege reduziert werden, während die Immunfunktion gleichzeitig erhalten bzw. sogar verstärkt werden könnte.

Unsere Gruppe und andere konnten mehrfach zeigen, dass vor allem Milchsäure zu einer Inhibition von T-Zellen (72,85,86), aber auch von anderen Zelltypen wie beispielsweise NK-Zellen oder Monozyten führen kann (87,88). Die für die Ausschleusung von Laktat benötigten MCT Transporter, welche Laktat im Kotransport mit einem Proton transportieren und somit zur Ansäuerung des extrazellulären Raums führen, sind auf einer Vielzahl von Tumorentitäten exprimiert. MCT1 wurde bereits auf gesunden Zellen als auch auf entarteten Zellen von kolorektalen, Brust-, Magen-, Gebärmutterhals- oder Gliom Tumoren nachgewiesen (89–91). MCT4 wurde vor allem auf glykolytisch aktiven Zellen detektiert, wozu aktivierte T-Zellen (32) aber auch Tumorzellen zählen, isoliert aus Nierenzellkarzinomen, Gebärmutterhals- oder Prostatakrebs. In klinischen Studien werden derzeit Inhibitoren untersucht, die hauptsächlich MCT1 und MCT2 blockieren. Gegenstand aktueller Forschung ist AZD3965, ein MCT1/2 Inhibitor der momentan in einer Phase I Studie bei Tumorpatienten getestet wird (89,92). Da Zellen in ihrem Stoffwechsel flexibel sind, kann jedoch die Effektivität von alleiniger MCT1/2 Inhibition durch häufig gleichzeitige Expression von MCT4 kompensiert werden (93,94). Die gleichzeitige Inhibition von MCT1/2 und MCT4, eine sogenannte pan-Inhibition ist somit essenziell für eine erfolgreiche Therapie. Eine mögliche Substanz könnte das Diclofenac darstellen, da es MCT1 und zugleich MCT4 blockiert (30,33) und zudem in der Lage ist Tumorwachstum *in vivo* zu reduzieren (30,95). Um aufzuklären, ob der Effekt von Diclofenac COX-abhängig ist und inwieweit Immunzellen beeinflusst werden, wurde in

dieser Arbeit die Funktionen von Tumorzellen und humanen T-Zellen in der Anwesenheit von verschiedenen NSAR untersucht.

4.1 Das Potential der NSAR in der Tumorthherapie

Trotz erfolgversprechender, neuer anti-Tumorthérapien lohnt es sich Substanzen mit langjährigem klinischem Einsatz auf ihre antiproliferative Wirkung zu untersuchen, was die Studie von Gottfried und Kollegen (2013) verdeutlicht (30). Deswegen wurden in dieser Arbeit weitere NSAR auf ihre mögliche anti-tumorale Wirkung getestet.

Im Gegensatz zu Diclofenac waren Diclofenacamid und ML36 nicht in der Lage die Laktatsekretion zu inhibieren. Jedoch reduzierten beide Substanzen die Viabilität und Proliferation der Tumorzellen. Dieser Effekt scheint somit MCT unabhängig zu sein. Da unter einer Behandlung mit Ketoprofen das Wachstum der Tumorzellen nicht eingeschränkt war, scheint der Effekt zudem COX-unabhängig zu sein. Es stellt sich die Frage, weshalb diese beiden Substanzen einen starken Effekt auf die C7H2 Zellen aufweisen. Ähnlich dem Diclofenac (30), könnten auch die Diclofenac-Derivate Diclofenacamid und ML36 möglicherweise die MYC-Expression beeinträchtigen.

Zu Diclofenacamid gibt es bis zum Erstellungszeitpunkt dieser Arbeit keine humanen Studien. Chung und Kollegen beschäftigten sich mit der pharmakologischen Wirksamkeit von Diclofenacamid im murinen Modell. Diclofenacamid hatte einen antiinflammatorischen Effekt, der sich als vergleichbar mit dem von Diclofenac erwies. Bezüglich der analgetischen Wirksamkeit zeigten die mit Diclofenac behandelten Ratten weniger Schmerzreaktion als die Vergleichsgruppe unter Behandlung mit Diclofenacamid. Um die Nebenwirkung der gastrointestinalen Ulzerogenität zu untersuchen, wurde als vergleichende Substanz Celecoxib verwendet, welches aufgrund der selektiven COX2 Hemmung als ulzeroprotektiv gilt. Im murinen Modell kam es bei Behandlung mit Diclofenacamid im Gegensatz zur Behandlung mit Diclofenac oder Celecoxib nicht zu Ulkusbildung (36).

Aufgrund der starken antiproliferativen und pro-apoptischen Eigenschaften in Tumorzellen stellt Diclofenacamid ein potenziell einsetzbares Tumorthérapeutikum dar.

Studien zu ML36 sind weder für das murine noch das humane System beschrieben, es wurden bislang nur in *in vitro* Studien getestet. Inwiefern ML36 eine Anwendung finden kann, ist erst nach weiteren Untersuchungen absehbar.

Wie Diclofenac ist auch Lumiracoxib dazu in der Lage MCT1 und MCT4 in *Xenopus laevis* Oozyten zu blockieren, jedoch mit deutlich höheren IC_{50} Werten (4,15 μ M bzw. 1,12 μ M) (32). Auch in dieser Arbeit reduzierte Lumiracoxib die Laktatakkumulation in der C7H2 Zelllinie. Die analgetischen, antipyretischen und antiinflammatorischen Eigenschaften sind dosisabhängig und vergleichbar mit denen von Diclofenac, wobei Lumiracoxib weniger gastrointestinale Nebenwirkungen aufweist (96). Obwohl es zur Behandlung von Schmerzen nebenwirkungsärmere Alternativen gibt, stellt Lumiracoxib mit seiner proliferationshemmenden und Laktat-inhibierenden Wirkung auf Tumorzellen ein vielversprechendes Medikament in der Krebstherapie dar.

Das NSAR Diflunisal ist ein Difluorphenyl-Derivat der Salizylsäure. Die analgetische, anti-pyretische und anti-inflammatorische Wirkung von Diflunisal wird auf die unselektive COX1/2 Hemmung zurückgeführt. Obwohl Diflunisal wie Diclofenac eine freie Carboxylgruppe besitzt, zeigten sich nur schwache inhibitorische Eigenschaften auf die Laktatsekretion bei C7H2 Zellen. Signifikant war die Reduktion des extrazellulären Laktats erst bei 0,4 mM, einer Konzentration, bei der die Zellzahl durch Proliferationsarrest und Apoptose bereits stark vermindert war. Diese Beobachtung bestätigt eine Studie, in der Diflunisal auch bei anderen Tumorzellen wie der AML-Zelllinien THP-1, U937 und KG-1 keine inhibitorische Wirkung auf die Laktatsekretion zeigte (97). Es konnte bereits in AML Zelllinien gezeigt werden, dass ab einer Konzentration von 0,4 mM Diflunisal Proliferationsarrest induziert wird, was laut Renner und Kollegen auf die Inhibition der oxidativen Phosphorylierung zurückzuführen sein könnte. Allerdings schienen die Zellen nicht in der Lage zu sein diese Stoffwechselblockade durch eine Hochregulation der Glykolyse kompensieren zu können, da es zu keiner erhöhten Laktatsekretion kam (97). Aufgrund der langen Halbwertszeit können bei Einnahme von 500 mg Diflunisal 2x täglich über einen Zeitraum von 11 Tagen Plasmaspiegel um die 0,8 mM erreicht werden (97). Renner und Kollegen zeigten, dass bei 0,8 mM Diflunisal die Proliferation in AML Zelllinien sowie primären Blasten einschränkt ist, wobei überraschenderweise Apoptose nur in Kombination mit Diclofenac und Metformin induziert werden konnte (97). Im Gegensatz dazu konnte in dieser Arbeit eine proapoptotische Wirkung auf die C7H2 Zellen beobachtet werden. Als möglichen Wirkmechanismus von Diflunisal auf die Proliferation verschiedener Tumorzelllinien wird eine c-Myc Destabilisierung diskutiert (97). Zudem veröffentlichten Shiraka und Kollegen, dass Diflunisal das Wachstum von Leukämiezellen in SCID Mäusen durch kompetitive Hemmung der CBP/p300

Acetyltransferase einschränkte (98). CBP/p300 ist an der Acetylierung von Transkriptionsregulatoren wie c-Myc beteiligt was wiederum zur Stabilisierung von c-Myc führt (99). In Patienten erzielte Diflunisal gute Ergebnisse bei der Behandlung von milden bis moderaten Schmerzen bei Osteoarthritis, bei postoperativer Anwendung und bei der Behandlung von Tumorschmerzen (39). Aufgrund von kardialen und vaskulären Nebenwirkungen ist es nur noch in bestimmten Ländern Europas erhältlich. Die Ergebnisse dieser Arbeit sowie veröffentlichte Studien (97) deuten darauf hin, dass ein Einsatz in der Tumorthherapie aufgrund der antiproliferativen Wirkung auf Tumorzellen, insbesondere in Kombination mit anderen Substanzen, vielversprechend ist.

Ketoprofen als starker COX Inhibitor wurde im selben Setting wie die anderen Substanzen untersucht, um mögliche COX-abhängige Effekte aufzuzeigen. In Tumorzellen konnte keine Wirkung auf die Laktatsekretion, die Proliferation oder die Viabilität beobachtet werden. Renner und Kollegen beschreiben einen geringen Effekt auf die Laktatsekretion in humanen CD8+ T-Zellen (32), wobei Ketoprofen für MCT1 einen IC_{50} -Wert von 89,16 μ M und für MCT4 einen IC_{50} von 108,62 μ M aufwies. Im Plasma des Patienten können diese hohen Konzentrationslevel nicht erreicht werden. Im Vergleich dazu liegt der IC_{50} Wert von Diclofenac um ca. ein Hundertfaches darunter.

Diese Ergebnisse liefern einen wichtigen Beitrag zur Klärung, wie NSARs auf Tumorzellen wirken. Die Experimente mit Ketoprofen als Negativkontrolle zeigen, dass die Inhibition des Tumorwachstums durch Diclofenac, Lumiracoxib und auch Diflunisal nicht auf eine COX Inhibition zurückzuführen ist.

Zusammenfassend stellt der erhöhte Stoffwechsel von Tumorzellen mit unterschiedlichen Wegen der Energiegewinnung eine wichtige Zielstruktur in der Antitumorthherapie dar. Verschiedene Tumorzellen sind in der Lage Blockaden in Stoffwechselwegen zu umgehen und kompensatorisch auf andere Energie-Zuführungswege umzustellen, um den erhöhten Zellumsatz zu erhalten (97). Daher ist eine Inhibition an unterschiedlichen Stellen des Tumormetabolismus ein erfolgsversprechender Ansatz. Dass NSAR interessante Kombinationspartner, beispielsweise mit Checkpointinhibitoren, sowohl bei soliden Tumoren als auch bei Leukämien darstellen, konnte bereits in mehreren Arbeiten gezeigt werden (97,100). Zur Schmerztherapie bei Tumorpatienten werden gemäß der Behandlungsleitlinien basierend auf dem WHO Stufenschema von 1996 Nicht-Opioide als Basis der

pharmakologischen Behandlung in der Stufe I eingesetzt (101). Hiernach werden leichte Schmerzen zunächst mit Analgetika wie beispielsweise Diclofenac, Ibuprofen, Novalgin, Paracetamol und Koanalgetika behandelt, erst wenn diese nicht ausreichen, werden sie in Stufe II und III mit leichten bzw. starken Opioiden kombiniert. In den aktuellen Leitlinien von 2018 (102) wurde das Stufenschema zwar weitestgehend verlassen, trotzdem kommen NSAR weiterhin als Kombinationspartner zum Einsatz. Im klinischen Alltag werden aufgrund der gastrointestinalen und nephrotoxischen Nebenwirkungen von Ibuprofen oder Diclofenac oftmals Novalgin und Paracetamol als periphere Analgetika verabreicht. Aufgrund der Wirkung auf Tumorzellen, könnte insbesondere bei Krebspatienten Diclofenac, in Kombination mit Protonenpumpeninhibitoren, wie z.B. Pantoprazol, Esomeprazol oder Omeprazol zur besseren Verträglichkeit, als bevorzugtes Analgetikum eingesetzt werden.

4.2 Die Rolle der Carboxylgruppe des Diclofenacs bei der MCT-Inhibition

Um den Wirkmechanismus des Diclofenacs aufzuklären, wurden in dieser Arbeit die Effekte verschiedener NSAR mit struktureller Ähnlichkeit zum Diclofenac auf die Funktionen von Tumorzellen und humanen T-Zellen hinsichtlich der Fähigkeit Laktatproduktion zu inhibieren untersucht. MCTs transportieren kurzkettige, aliphatische, unverzweigte Monocarboxylate bis zu einer Länge von 5 C Atomen, wie zum Beispiel die Carbonsäuren Laktat und Pyruvat sowie Ketonkörper. Halestrap und Kollegen (8) beschrieben, dass die Familie der Monocarboxylat-Cotransporter (MCT) 14 Mitglieder umfasst. Von ihnen konnte man allerdings nur für die ersten vier (MCT1-MCT4) experimentell nachweisen, dass sie den protonengebundenen Transport von metabolisch wichtigen Monocarboxylaten katalysieren. Diclofenac besitzt eine freie Carboxylgruppe (Abbildung 24), die für die Bindung und die Inhibition von MCT verantwortlich sein könnte.

Im Gegensatz zu den Daten mit Diclofenac, konnte bei Diclofenacamid und ML36, weder in der C7H2 Zelllinie noch in den primären CD4⁺ T-Zellen, ein hemmender Effekt auf die Laktatsekretion beobachtet werden. Da beide Substanzen keine freie Carboxylgruppe aufweisen, lässt diese Beobachtung vermuten, dass die Carboxylgruppe von Diclofenac essenziell für die MCT Inhibition ist.

Sowohl Lumiracoxib als auch Diflunisal besitzen ähnlich dem Diclofenac eine freie Carboxylgruppe (Abbildung 24). Analog zu den Daten für Diclofenac, wurde für Lumiracoxib eine Reduktion der Laktatsekretion und damit einhergehend eine verminderte Proliferation in Melanom-Zellen nachgewiesen (103). Lumiracoxib weist deutlich niedrigere IC_{50} -Werte für die MCTs als Diclofenac auf, war allerdings trotzdem in der Lage die Laktatsekretion in den Tumorzelllinien und auch in den CD4+ T-Zellen zu verringern.

Ein ähnlicher Trend wurde auch für Diflunisal beobachtet. Ursächlich für die deutlich schwächere Laktatinhibition könnte die räumliche Nähe des aromatischen Rings zur COOH-Gruppe sein. Aufgrund dieses strukturellen Unterschieds bindet die Carboxylgruppe von Diflunisal möglicherweise schlechter an das aktive Zentrum der MCTs.

Gegen die Theorie der freien Carboxylgruppe sprechen die mit Ketoprofen erhobenen Daten. Obwohl die freie Carboxylgruppe des Ketoprofens vermuten lässt, dass eine MCT Bindung möglich ist, wurden nur sehr hohe IC_{50} -Werte für die MCT Transporter bestimmt. Ursächlich hierfür könnte ebenfalls die räumliche Nähe des aromatischen Rings zur COOH-Gruppe sein (Abbildung 24). Zudem unterscheiden sich Ketoprofen sowie auch Diflunisal von Diclofenac durch das Fehlen eines C-Atoms, welches im Diclofenac zwischen der Carboxylgruppe und dem aromatischen Ring gelagert ist.

Dem Diclofenac-Effekt in Tumorzellen liegen neben der MCT-Inhibition vermutlich zusätzliche Mechanismen zugrunde. Diclofenac vermindert signifikant die Expression des Transkriptionsfaktors MYC, welcher eine entscheidende Rolle in der Regulation von Zellwachstum, Differenzierung und Apoptose spielt. Eine Inaktivierung von MYC führt in verschiedenen Tumormodellen zur Veränderung des neoplastischen Phänotyps (30,31). Diclofenac vermindert außerdem die Genexpression von GLUT1 und LDHA, was zu einer verminderten Aufnahme und Umsetzung von Glukose führt. Auch die COX Inhibition durch NSAR in Tumorzellen, und die damit einhergehend reduzierte PGE_2 Synthese, führen zu einem vermindertem Tumorwachstum (27). Des Weiteren könnte eine COX Inhibition möglicherweise Immunescape-Strategien von Tumoren unterdrücken. Zelenay und Kollegen (104) zeigten, dass das Wachstum von mutierten BrafV600E-Mausmelanomzellen in einem immunkompetenten Wirt die Produktion von Prostaglandin E2 erfordert, welches wiederum die Immunität unterdrückt und die tumorfördernde Entzündung anregt. Die genetische Entfernung

von COX oder PGE-Synthasen in BrafV600E-Mausmelanomzellen, machte sie hingehen für eine Immunkontrolle empfänglich.

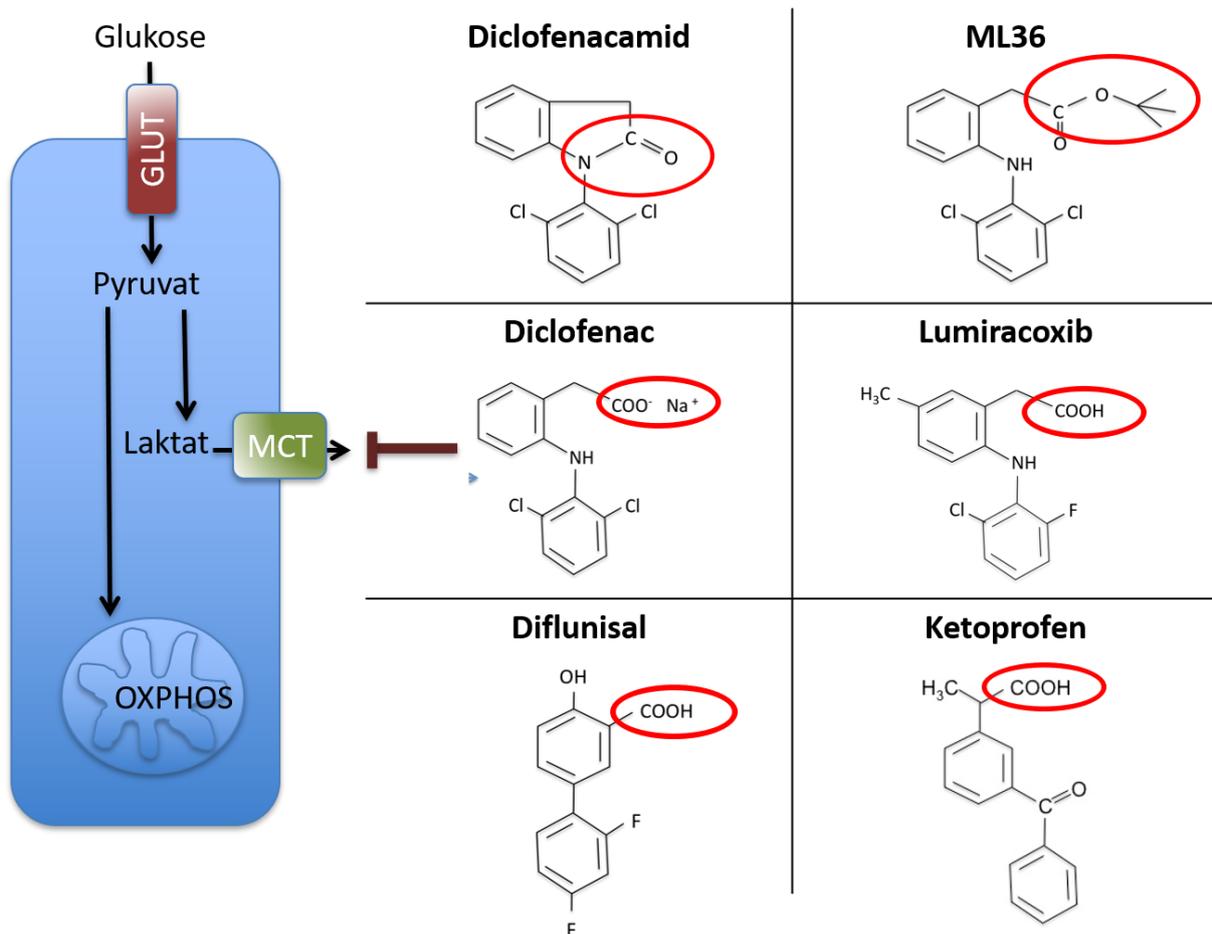


Abbildung 24: Mögliche Beteiligung der Carboxylgruppen an der MCT Inhibition. Die Aufnahme der Glukose in die Zellen (blau dargestellt) erfolgt über die Glukosetransporter (GLUT). Glukose wird im Zellinneren über die Glykolyse zu Pyruvat verstoffwechselt, welches entweder in den Mitochondrien über den Citratzyklus und anschließender oxidativen Phosphorylierung (OXPHOS) oder über die Laktatdehydrogenase zu Laktat weiterverarbeitet wird. Laktat wird im Kotransport mit einem Proton über die MCTs aus der Zelle exportiert. Die Carboxylgruppe könnte zur MCT Inhibition beitragen und ist in den dargestellten Substanzen Diclofenacamid, ML36, Diclofenac, Lumiracoxib, Diflunisal und Ketoprofen rot umkreist. Quelle: Eigene Darstellung.

4.3 Der Effekt verschiedener NSAR auf die T-Zell-Funktionen in humanen T-Zellen

Zusammenhänge zwischen Glukosemetabolismus und der T-Zellfunktion werden in der Literatur kontrovers diskutiert, wobei vor allem Studien im murinen Modell durchgeführt wurden. Im Gegensatz zu den murinen Studien (76,77,105,106), in denen der Glukosestoffwechsel eine entscheidende Rolle zu spielen scheint, weisen

Daten aus dem humanen System darauf hin, dass humane T-Zellen in der Lage sind einen Glukose-Entzug oder eine Blockade des Glukose-Metabolismus zu kompensieren. Für die glykolytische Inhibition via MCT Blockade durch Diclofenac wurde gezeigt, dass die Effektorfunktion von T-Zellen nicht signifikant beeinflusst wird. In CD8⁺ T-Zellen fand eine Verlagerung der metabolischen Aktivität von Glykolyse hin zur Zellatmung statt, was als Ausweichstrategie der Immunzellen interpretiert werden kann.

Um zu evaluieren, ob die Beobachtungen von Renner und Kollegen (32) auch für andere Diclofenac-verwandte Substanzen zutrifft, wurden humane CD4⁺ T-Zellen in der Anwesenheit dieser mit anti-CD3/CD28 Beads oder allogenen mit dendritischen Zellen (in einer MLR) stimuliert und analysiert.

In den Konzentrationen, bei denen bereits Einfluss auf die Proliferation und die Viabilität in Tumorzellen detektiert wurde, hatten die beiden Substanzen Diclofenacamid und ML36 keinen Einfluss auf die Laktatsekretion (Abbildung 10), die Apoptose (Abbildung 12) oder die Zellproliferation (Abbildung 11) in den anti-CD3/CD28 stimulierten CD4⁺ T-Zellen. Außerdem wirkten sich beide Substanzen weder auf die Aktivierung der T-Zellen (Abbildung 14) noch auf die Zytokinproduktion (Abbildung 13) gravierend negativ aus. Im Fall von Diclofenacamid in höheren Konzentrationen war allerdings ein leichter Trend zu einer reduzierten Zytokinsekretion in den anti-CD3/CD28 stimulierten T-Zellen zu beobachten.

In den mit dendritischen Zellen stimulierten T-Zellen wurde zwar keine Apoptose induziert, allerdings wurde die Laktatsekretion und auch die Proliferation in höheren Konzentrationen beider Substanzen eingeschränkt (Abbildung 15). Interessanterweise wurde die IFN γ und TNF Produktion, nicht aber die IL-2 Sekretion unter Diclofenacamid reduziert. Die Daten der mit anti-CD3/CD28 Beads stimulierten T-Zellen deuten darauf hin, dass die beiden Substanzen vor allem die Fähigkeit der dendritischen Zellen, die T-Zellen zu stimulieren, einschränkten. Diese These müsste allerdings in Monokulturen mit dendritischen Zellen evaluiert werden.

Wie in Vorarbeiten gezeigt werden konnte, reduzierte Lumiracoxib die Laktatakkumulation in der C7H2 Zelllinie (Abbildung 16), hatte jedoch in vergleichbaren Konzentrationen keine signifikante Wirkung auf die Laktatproduktion von CD4⁺ T-Zellen. Erst bei höheren Dosierungen zeigte sich in den T-Zellen eine trendmäßige Laktatreduktion (Abbildung 17). Die Proliferation, sowie die

Zytokinproduktion und die Expression von Aktivierungsmarkern der primären CD4⁺ T-Zellen blieb ebenfalls unbeeinflusst (Abbildung 18).

Die Viabilität und Proliferation der anti-CD3/CD28 stimulierten T-Zellen wurde von Diflunisal nicht beeinflusst. Ein trendmäßig reduzierender Effekt auf die Laktatproduktion konnte festgestellt werden. Allerdings war bei einer Konzentration von 0,4 mM Diflunisal, bei der in den C7H2 Zellen Apoptose induziert wurde, auch die T-Zellfunktion eingeschränkt (Abbildung 19). Zwar wurde keine Reduktion der Aktivierungsmarker gemessen, doch die Zytokinproduktion war vermindert (Abbildung 20). Ähnliche Ergebnisse wurden für die mit den dendritischen Zellen stimulierten T-Zellen erhoben, wobei im Gegensatz zu den mit anti-CD3/CD28 stimulierten Zellen die Laktatsekretion und die Proliferation bei einer Konzentration von 0,4 mM Diflunisal reduziert waren (Abbildung 21).

Die T-Zellaktivierung und die Zytokinproduktion von CD4⁺ T-Zellen blieben unter Behandlung mit Ketoprofen unbeeinflusst. Als Negativkontrolle konnte somit gezeigt werden, dass eine alleinige COX Inhibition keinen negativen Einfluss auf den T-Zellmetabolismus hat (Abbildung 22 und 23).

Aus den Beobachtungen dieser Arbeit resultiert die Frage, weshalb einige NSAR und verwandte Substanzen eine deutlich stärkere Wirkung auf Tumorzellen zeigen als auf T-Zellen. Es bleibt zu evaluieren, welche Eigenschaft CD4⁺ T-Zellen von C7H2 unterscheidet, die zu einem Schutz der Immunzellfunktion beiträgt. Für T-Zellen konnte bereits gezeigt werden, dass sie in ihren Stoffwechselwegen flexibler als Tumorzellen sind. Somit können sie sich besser an Veränderungen der Energiebereitstellung anpassen (78).

4.4 Perspektiven: NSAR zur Unterstützung der Immunotherapie?

In der Bekämpfung von maligne entarteten Zellen ist das körpereigene Immunsystem wichtig und die Anzahl der tumorinfiltrierenden T-Zellen ist ein gutes prognostisches Kriterium (107).

Es gibt verschiedene Gründe für eine unzureichende Immunantwort im Tumormilieu und eine Behebung der ungünstigen Bedingungen könnte mit einer Tumorregression einhergehen. Eine Ursache stellt die Konkurrenz um Nährstoffe wie Glukose, Aminosäuren, oder Fettsäuren dar. Diese beruht auf den Gemeinsamkeiten hinsichtlich der ähnlichen Stoffwechselwege in Tumor und Immunzellen (4).

Als weiterer Grund für eine unzureichende Immunantwort im Tumormilieu gelten tumoreigene Escapemechanismen, wie die Suppression der Immunreaktion durch das Exprimieren von PD-L1 (Programmed cell death ligand 1). Gegenstand aktueller Forschung ist der Einsatz von Checkpointinhibitoren (Vertreter dieser Gruppe sind CTLA-4-Inhibitoren, PD-1-Antikörper und PD-L1-Antikörper), welcher zu einer gesteigerten Aktivität von T-Zellen führt und die vom Tumor inhibierte Immunantwort aufrecht erhält (71).

Die Checkpointtherapie könnte allerdings durch hohe Milchsäurelevel im Tumormilieu, welche aufgrund erhöhter glykolytischer Aktivität von Tumorzellen entstehen, negativ beeinflusst werden. Denn durch den niedrigen pH-Wert in der Tumorumgebung werden die Aktivität und das Überleben von T-Zellen stark gesenkt (85). Die Unterdrückung einer effektiven Immunantwort durch hohe Laktatlevel im extrazellulären Raum stellt somit einen weiteren Escape-Mechanismus von Tumoren dar. Brand und Kollegen zeigten unter anderem, dass pathophysiologische Laktatkonzentrationen die Hochregulierung von dem Transkriptionsfaktor NFAT (nuclear factor of activated T cells) verhindern, was eine verminderte IFN γ Produktion zur Folge hat (108). Auch Fischer und Kollegen beschrieben einen Zusammenhang zwischen Laktat und einer Reduktion von Proliferation und Zytokinproduktion in humanen zytotoxischen T-Zellen. Sie zeigten, dass hohe extrazelluläre Laktatlevel zu einem ineffektiven Laktatexport führen und somit den Metabolismus der T-Zellen stören (109). Im Einklang mit diesen Ergebnissen konnte bei einer Therapie mit CTLA-4-Inhibitoren ein erhöhter LDH-Spiegel im Serum retrospektiv als negativer prognostischer Faktor identifiziert werden (110). Auch Renner und Kollegen diskutierten eine Korrelation zwischen erhöhter glykolytischer Aktivität in Melanomen und einem schlechteren Ansprechen der Patienten auf die anti-PD-1 Therapie (32).

Um die negativen Folgen von hohen Laktatleveln auf die Wirksamkeit von Checkpointtherapeutika zu umgehen, ist das Eingreifen in den Glukosemetabolismus der Tumorzellen ein vielversprechender Therapieansatz. Dabei darf allerdings die T-Zellfunktion, nicht beeinträchtigt werden.

Auch für aktivierte T-Zellen ist ein erhöhter Glukose Stoffwechsel charakteristisch, wobei nach Stimulation zunächst oxidative Phosphorylierung und nach ca. 24 Std. eine erhöhte glykolytische Aktivität festgestellt werden konnte (78). Renner und Kollegen beschrieben eine gewisse Flexibilität des Stoffwechsels in T-Zellen. Der Entzug von Glukose oder eine Blockierung der mitochondrialen Atmung mit Oligomycin führten

zwar zu einer reduzierten Proliferation, beeinflussten hingegen die Zytokinsekretion und die Viabilität kaum. Allerdings führte gleichzeitige Blockierung von Glykolyse und mitochondrialer Aktivität durch 2-Deoxy-Glukose zu einer massiven Einschränkung der Effektorfunktion von T-Zellen. Daher ist eine einseitige Blockierung, zum Beispiel durch eine Inhibition der MCT Transporter, eine prinzipiell mögliche Strategie die Checkpoint-Therapie zu verbessern.

Renner und Kollegen zeigten bereits, dass Diclofenac in der Lage war die Checkpointtherapie in zwei murinen Tumormodellen zu unterstützen (32).

Somit könnten sich Vertreter der NSAR, nach langjährigem klinischen Einsatz in der Schmerztherapie, auch als Adjuvantien in der Checkpointtherapie eignen.

5. Zusammenfassung

Das Immunsystem ist ein wichtiger Schutzmechanismus vor entarteten körpereigenen Tumorzellen. Einen großen Durchbruch in der Krebstherapie stellt die Immunotherapie, insbesondere die Checkpointtherapie dar, welche zu einer gesteigerten Aktivität von T-Zellen führt und die vom Tumor inhibierte Immunantwort somit aufrechterhält. Insbesondere in soliden Tumoren wird die Aktivität und das Überleben von T-Zellen aufgrund der Akkumulation von Milchsäure und der damit entstehenden aziden Tumorumgebung verringert. Um die Bedingungen im Tumor zu verbessern, müssen Strategien entwickelt werden, Tumorzellen in ihren Stoffwechselwegen zu inhibieren, bei gleichzeitigem Erhalt der Effektorfunktionen von T-Zellen. Das NSAR Diclofenac könnte eine Substanz darstellen, diese Strategie zu verfolgen. Diclofenac wirkt inhibitorisch auf MCT1 und MCT4 und blockiert somit den Laktat-Transport in glykolytisch-aktiven Zellen, wie beispielsweise Tumorzellen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, ob neben Diclofenac auch andere NSAR in der Lage sind den Laktattransport zu inhibieren. Zudem sollte geklärt werden, welche Rolle die freie Carboxylgruppe des Diclofenacs bei der Blockade der MCT-Transporter spielt. Hierzu wurden Tumorzellen als auch humane CD4⁺ T-Zellen in der Anwesenheit von Diclofenacamid und ML36, Lumiracoxib, Diflunisal und Ketoprofen kultiviert.

Die zwei dem Diclofenac strukturell sehr ähnlichen Substanzen, Diclofenacamid und ML36, hatten keinen hemmenden Effekt auf die Laktatsekretion, weder in Tumorzellen noch in CD4⁺ T-Zellen. Trotzdem induzierten Diclofenacamid und ML36 Apoptose und hemmten die Proliferation der Tumorzellen, wohingegen die T-Zellfunktionen in den CD4⁺ T-Zellen durch die beiden Substanzen kaum eingeschränkt wurde. In der chemischen Struktur unterscheidet sich Diclofenac von den getesteten Diclofenac-Derivaten durch das Vorhandensein der freien Carboxylgruppe. Das Vorhandensein dieser Carboxylgruppe scheint somit ausschlaggebend für die MCT-Blockade zu sein. Das ebenfalls eine Carboxylgruppe aufweisende Lumiracoxib setzte, ähnlich zu Diclofenac, die Laktatsekretion in den untersuchten Zellen herab. Obwohl Lumiracoxib die Laktatsekretion reduzierte, hatte es nur einen geringen Effekt auf die Apoptose und die Zellproliferation in Tumorzellen. Die Effektorfunktionen primärer CD4⁺ T-Zellen blieben bei Behandlung mit Lumiracoxib unbeeinflusst.

Im Gegensatz zu Lumiracoxib reduzierte das NSAR Diflunisal neben der Laktatproduktion, auch die Proliferation und die Viabilität in den untersuchten Tumorzellen. Wohingegen Diflunisal nur einen geringen Effekt auf die Proliferation oder die Viabilität der T-Zellen zeigte. Allerdings war bei höheren Konzentrationen auch die Effektorfunktion von T-Zellen vermindert.

Zusammenfassend scheint die freie Carboxylgruppe in den NSAR für die MCT-Inhibition essenziell zu sein. Allerdings sind einige der getesteten NSAR, unabhängig vom Vorhandensein der Carboxylgruppe ebenfalls in der Lage das Tumorwachstum zu inhibieren. Die humanen CD4⁺ T-Zellen scheinen durch eine pharmakologische Blockade durch die genannten NSAR nur wenig in ihren Funktionen eingeschränkt. Diese Ergebnisse zeigen, dass sich anti-metabolische Substanzen, wie Diclofenac, durchaus zum Einsatz in der Tumortherapie eignen und dass diese eine vielversprechende Ergänzung zu immuntherapeutischen Ansätzen darstellen könnten.

Abstract

The immune system is an important protective mechanism against degenerated endogenous tumour cells. A major breakthrough in cancer therapy is immunotherapy, in particular checkpoint inhibition therapy, which leads to an increased activity of T cells and thus fosters the immune response inhibited by the tumour. However, in solid tumours the activity and survival of T cells is reduced due to the accumulation of lactate and the resulting acidic tumour environment. To improve conditions in the tumour, strategies must be developed to inhibit tumour cells in their metabolic pathways e.g. glycolysis while maintaining effector functions in T cells. The NSAID diclofenac could be a substance to pursue this strategy. Diclofenac has an inhibitory effect on MCT1 and MCT4 and thus blocks lactate transport in glycolytically active cells, such as tumour cells. In the context of this work it was investigated whether other NSAIDs besides diclofenac are able to inhibit lactate transport. In addition, the role of the free carboxyl group of diclofenac in blocking the MCT transporters was to be clarified. For this purpose, tumour cells as well as human CD4⁺ T cells were cultured in the presence of diclofenacamide and ML36, lumiracoxib, diflunisal and ketoprofen.

The two substances that are structurally very similar to diclofenac, diclofenacamide and ML36, had no inhibitory effect on lactate secretion, neither in tumour cells nor in CD4⁺ T cells. Nevertheless, diclofenacamide and ML36 induced apoptosis and inhibited tumour cell proliferation, whereas T-cell function in CD4⁺ T-cells was hardly impaired by both substances. With regard to the chemical structure, diclofenac differs from the tested diclofenac derivatives in the presence of the free carboxyl group. The presence of this carboxyl group thus seems to be decisive for the MCT blockade. Similar to diclofenac, lumiracoxib, which also has a free carboxyl group, reduced lactate secretion in all cell types investigated. Although lumiracoxib reduced lactate secretion, it had only minor effects on apoptosis and cell proliferation in tumour cells. The effector functions of primary CD4⁺ T cells remained unaffected by treatment with lumiracoxib.

In contrast to lumiracoxib, the NSAID diflunisal not only reduced lactate production, but also proliferation and viability in the tumour cells studied. In contrast, diflunisal exerted only a slight effect on proliferation or viability of the T cells. However, at higher concentrations the effector functions of T cells were reduced.

In summary, the free carboxyl group seems to be essential for MCT inhibition by NSAIDs. However, some of the tested NSAIDs are also able to inhibit tumour growth, independent of the presence of the carboxyl group. Human CD4⁺ T cells seem to be only slightly restricted in their functions by a pharmacological blockade by the tested NSAIDs. These results show that anti-metabolic substances, such as diclofenac, are well suited for use in tumour therapy and that they could be a promising complement to immunotherapeutic approaches.

Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden publiziert:

Restricting Glycolysis Preserves T Cell Effector Functions and Augments Checkpoint Therapy; Renner K, Bruss C, Schnell A, Koehl G, Becker H, Fante M, Menevse A, Kauer N, Blazquesz R, Hacker L, Decking S, Bohn T, Faerber S, Evert K, **Aigle L**, et al (2019) Cell Rep 29:135-150.e9. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.08.068>

6. Literaturverzeichnis

1. Warburg O, others. On the origin of cancer cells. *Science*. 1956;123(3191):309–314.
2. ZHENG J. Energy metabolism of cancer: Glycolysis versus oxidative phosphorylation (Review). *Oncol Lett*. 2012 Dec;4(6):1151–7.
3. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*. 2011 Mar 4;144(5):646–74.
4. Renner K, Singer K, Koehl GE, Geissler EK, Peter K, Siska PJ, et al. Metabolic Hallmarks of Tumor and Immune Cells in the Tumor Microenvironment. *Front Immunol*. 2017;8:248.
5. Why do cancers have high aerobic glycolysis? | *Nature Reviews Cancer* [Internet]. [cited 2019 Oct 31]. Available from: <https://www.nature.com/articles/nrc1478?draft=journal>
6. Shim H, Dolde C, Lewis BC, Wu C-S, Dang G, Jungmann RA, et al. c-Myc transactivation of LDH-A: Implications for tumor metabolism and growth. *Proc Natl Acad Sci*. 1997 Jun 24;94(13):6658–63.
7. Macheda ML, Rogers S, Best JD. Molecular and cellular regulation of glucose transporter (GLUT) proteins in cancer. *J Cell Physiol*. 2005 Mar 1;202(3):654–62.
8. Halestrap AP, Meredith D. The SLC16 gene family—from monocarboxylate transporters (MCTs) to aromatic amino acid transporters and beyond. *Pflüg Arch*. 2003 May 9;447(5):619–28.
9. Kunkel M, Reichert TE, Benz P, Lehr H-A, Jeong J-H, Wieand S, et al. Overexpression of Glut-1 and increased glucose metabolism in tumors are associated with a poor prognosis in patients with oral squamous cell carcinoma. *Cancer*. 2003 Feb 15;97(4):1015–24.
10. Walenta S, Wetterling M, Lehrke M, Schwickert G, Sundfør K, Rofstad EK, et al. High Lactate Levels Predict Likelihood of Metastases, Tumor Recurrence, and Restricted Patient Survival in Human Cervical Cancers. *Cancer Res*. 2000 Feb 15;60(4):916–21.
11. Simmons DL, Botting RM, Hla T. Cyclooxygenase Isozymes: The Biology of Prostaglandin Synthesis and Inhibition. *Pharmacol Rev*. 2004 Sep 1;56(3):387–437.
12. Soslow RA, Dannenberg AJ, Rush D, Woerner BM, Khan KN, Masferrer J, et al. COX-2 is expressed in human pulmonary, colonic, and mammary tumors. *Cancer*. 2000 Dec 15;89(12):2637–45.
13. Betz M, Fox BS. Prostaglandin E2 inhibits production of Th1 lymphokines but not of Th2 lymphokines. *J Immunol*. 1991 Jan 1;146(1):108–13.

14. Walker C, Kristensen F, Bettens F, deWeck AL. Lymphokine regulation of activated (G1) lymphocytes. I. Prostaglandin E2-induced inhibition of interleukin 2 production. *J Immunol.* 1983 Apr 1;130(4):1770–3.
15. Levine L. Arachidonic Acid Transformation and Tumor Production. In: Weinhouse GK and S, editor. *Advances in Cancer Research* [Internet]. Academic Press; 1981 [cited 2016 Dec 5]. p. 49–79. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0065230X08609082>
16. Plescia OJ, Smith AH, Grinwich K. Subversion of immune system by tumor cells and role of prostaglandins. *Proc Natl Acad Sci.* 1975 May 1;72(5):1848–51.
17. Gately S, Li WW. Multiple roles of COX-2 in tumor angiogenesis: a target for antiangiogenic therapy. *Semin Oncol.* 2004 Apr 1;31:2–11.
18. Tateson JE, Moncada S, Vane JR. Effects of prostacyclin (PGX) on cyclic AMP concentrations in human platelets. *Prostaglandins.* 1977 Mar 1;13(3):389–97.
19. MI O. Overview of physiological and pathophysiological effects of thromboxane A2. *Fed Proc.* 1987 1987;46(1):133–8.
20. Kneitz C, Tony HP, Krüger K. NSAR und Coxibe: aktueller Stand. *Internist.* 2006 May 1;47(5):533–40.
21. Breast cancer and NSAID use: a meta-analysis | *British Journal of Cancer* [Internet]. [cited 2018 Aug 14]. Available from: <https://www.nature.com/articles/6691709>
22. Muscat JE, Stellman SD, Wynder EL. Nonsteroidal antiinflammatory drugs and colorectal cancer. *Cancer.* 1994 Oct 1;74(7):1847–54.
23. Corley DA, Kerlikowske K, Verma R, Buffler P. Protective association of aspirin/NSAIDs and esophageal cancer: A systematic review and meta-analysis. *Gastroenterology.* 2003 Jan;124(1):47–56.
24. Bosetti C, Rosato V, Gallus S, Cuzick J, La Vecchia C. Aspirin and cancer risk: a quantitative review to 2011. *Ann Oncol.* 2012 Jun 1;23(6):1403–15.
25. Peterson HI. Effects of prostaglandin synthesis inhibitors on tumor growth and vascularization. *Experimental studies in the rat. Invasion Metastasis.* 1983;3(3):151–9.
26. Pantziarka P, Sukhatme V, Bouche G, Meheus L, Sukhatme VP. Repurposing Drugs in Oncology (ReDO)—diclofenac as an anti-cancer agent. *ecancermedicalscience* [Internet]. 2016 Jan 11 [cited 2019 Oct 28];10. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4720497/>
27. Lupulescu A. Prostaglandins, their inhibitors and cancer. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 1996 Feb 1;54(2):83–94.
28. Aspirin and Salicylate Induce Apoptosis and Activation of Caspases in B-Cell Chronic Lymphocytic Leukemia Cells | *Blood Journal* [Internet]. [cited 2018 Aug

- 14]. Available from: <http://www.bloodjournal.org/content/92/4/1406?sso-checked=true>
29. Hsu A-L, Ching T-T, Wang D-S, Song X, Rangnekar VM, Chen C-S. The Cyclooxygenase-2 Inhibitor Celecoxib Induces Apoptosis by Blocking Akt Activation in Human Prostate Cancer Cells Independently of Bcl-2. *J Biol Chem*. 2000 Apr 14;275(15):11397–403.
30. Gottfried E, Lang SA, Renner K, Bosserhoff A, Gronwald W, Rehli M, et al. New Aspects of an Old Drug – Diclofenac Targets MYC and Glucose Metabolism in Tumor Cells. *PLoS ONE* [Internet]. 2013 Jul 9 [cited 2015 Aug 16];8(7). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3706586/>
31. Jain M, Arvanitis C, Chu K, Dewey W, Leonhardt E, Trinh M, et al. Sustained Loss of a Neoplastic Phenotype by Brief Inactivation of MYC. *Science*. 2002 Jul 5;297(5578):102–4.
32. Renner K, Bruss C, Schnell A, Koehl G, Becker HM, Fante M, et al. Restricting Glycolysis Preserves T Cell Effector Functions and Augments Checkpoint Therapy. *Cell Rep*. 2019 Oct;29(1):135-150.e9.
33. Sasaki S, Futagi Y, Ideno M, Kobayashi M, Narumi K, Furugen A, et al. Effect of diclofenac on SLC16A3/MCT4 by the Caco-2 cell line. *Drug Metab Pharmacokinet*. 2016 Jun 1;31(3):218–23.
34. Singer K, Dettmer K, Unger P, Schönhammer G, Renner K, Peter K, et al. Topical Diclofenac Reprograms Metabolism and Immune Cell Infiltration in Actinic Keratosis. *Front Oncol* [Internet]. 2019 [cited 2019 Nov 3];9. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2019.00605/full>
35. Espacenet - Original document [Internet]. [cited 2018 Aug 15]. Available from: https://worldwide.espacenet.com/publicationDetails/originalDocument?CC=EP&NR=0380712A1&KC=A1&FT=D&ND=3&date=19900808&DB=EPODOC&locale=en_EP
36. Chung MC, Dos Santos JL, Oliveira EV, Blau L, Menegon RF, Peccinini RG. Synthesis, ex Vivo and in Vitro Hydrolysis Study of an Indoline Derivative Designed as an Anti-Inflammatory with Reduced Gastric Ulceration Properties. *Molecules*. 2009 Aug 26;14(9):3187–97.
37. Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte. Lumiracoxib (Prexige®): Das BfArM ordnet den Widerruf der Zulassung an [Internet]. 2008. Available from: http://www.bfarm.de/SharedDocs/Risikoinformationen/Pharmakovigilanz/DE/RV_STP/g-l/lumiracoxib-widerruf.html
38. Barden J, Derry S, McQuay HJ, Moore RA. Single dose oral ketoprofen and dexketoprofen for acute postoperative pain in adults. *Cochrane Database Syst Rev*. 2009 Oct 7;(4):CD007355.
39. Brogden RN, Heel RC, Pakes GE, Speight TM, Avery GS. Diflunisal: A Review of its Pharmacological Properties and Therapeutic Use in Pain and

- Musculoskeletal Strains and Sprains and Pain in Osteoarthritis. *Drugs*. 1980 Feb 1;19(2):84–106.
40. Online F. Alkalisierende Krebstherapie | Diflu-Therapie - FOCUS.de [Internet]. Unternehmen - Produkte, Services, Angebote - FOCUS.de. [cited 2018 Aug 15]. Available from: <https://unternehmen.focus.de/alkalisierende-krebstherapie.html>
 41. Diflunisal zur Behandlung von Krebs - Dokument DE10338090A1 [Internet]. [cited 2018 Aug 15]. Available from: <http://www.patent-de.com/20050324/DE10338090A1.html>
 42. Gebhardt U. Onkologie: Mit Bakterien gegen Krebs. *Die Zeit* [Internet]. 2010 Jan 6 [cited 2016 Dec 5]; Available from: <http://www.zeit.de/wissen/2010-01/operation-lockvogel>
 43. Nauts HC, Swift WE, Coley BL. The Treatment of Malignant Tumors by Bacterial Toxins as Developed by the Late William B. Coley, M.D., Reviewed in the Light of Modern Research. *Cancer Res*. 1946 Apr 1;6(4):205–16.
 44. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The Immunobiology of Cancer Immunosurveillance and Immunoediting. *Immunity*. 2004 Aug;21(2):137–48.
 45. Burnet FM. The Concept of Immunological Surveillance [Internet]. Karger Publishers; 1970 [cited 2016 Dec 6]. Available from: <http://www.karger.com/Article/Abstract/386035>
 46. Clemente CG, Mihm MG, Bufalino R, Zurrada S, Collini P, Cascinelli N. Prognostic value of tumor infiltrating lymphocytes in the vertical growth phase of primary cutaneous melanoma. *Cancer*. 1996 Apr 1;77(7):1303–10.
 47. Gooden MJM, de Bock GH, Leffers N, Daemen T, Nijman HW. The prognostic influence of tumour-infiltrating lymphocytes in cancer: a systematic review with meta-analysis. *Br J Cancer*. 2011 Jun 28;105(1):93–103.
 48. Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Lagorce-Pagès C, et al. Type, Density, and Location of Immune Cells Within Human Colorectal Tumors Predict Clinical Outcome. *Science*. 2006 Sep 29;313(5795):1960–4.
 49. Lüllmann-Rauch R. Taschenlehrbuch Histologie. In: 3rd ed. Thieme; p. 292–5.
 50. Rassow, Hauser, Netzker, Deutzmann. *Duale Reihe Biochemie*. 2nd ed.
 51. Taniguchi T, Minami Y. The IL-2/IL-2 receptor system: A current overview. *Cell*. 1993 Apr 9;73(1):5–8.
 52. Samoilova EB, Horton JL, Chen Y. Acceleration of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis in Interleukin-10-Deficient Mice: Roles of Interleukin-10 in Disease Progression and Recovery. *Cell Immunol*. 1998 Sep 15;188(2):118–24.
 53. Ziegler SF, Ramsdell F, Alderson MR. The activation antigen CD69. *Stem Cells Dayt Ohio*. 1994 Sep;12(5):456–65.

54. Carnaud C, Lee D, Donnars O, Park S-H, Beavis A, Koezuka Y, et al. Cutting Edge: Cross-Talk Between Cells of the Innate Immune System: NKT Cells Rapidly Activate NK Cells. *J Immunol.* 1999 Jan 11;163(9):4647–50.
55. Finkelman FD, Katona IM, Mosmann TR, Coffman RL. IFN-gamma regulates the isotypes of Ig secreted during in vivo humoral immune responses. *J Immunol.* 1988 Feb 15;140(4):1022–7.
56. Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA. Interferon- γ : an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol.* 2004 Jan 2;75(2):163–89.
57. U. Boehm, T. Klamp, M. Groot, Howard JC. CELLULAR RESPONSES TO INTERFERON- γ . *Annu Rev Immunol.* 1997;15(1):749–95.
58. Malek TR. The Biology of Interleukin-2. *Annu Rev Immunol.* 2008;26(1):453–79.
59. Fiorentino DF, Zlotnik A, Mosmann TR, Howard M, O'Garra A. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *J Immunol.* 1991 Jan 12;147(11):3815–22.
60. Abul K. Abbas, Andrew H. Lichtman, Shiv Pillai. Cellular and Molecular IMMUNOLOGY. 8th ed. Elsevier Saunders;
61. Baud V, Karin M. Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. *Trends Cell Biol.* 2001 Sep 1;11(9):372–7.
62. Cairns CB, Panacek EA, Harken AH, Banerjee A. Bench to Bedside Tumor Necrosis Factor-alpha: From Inflammation to Resuscitation. *Acad Emerg Med.* 2000 Aug 1;7(8):930–41.
63. Apperley JF, Mauro FR, Goldman JM, Gregory W, Arthur CK, Hows J, et al. Bone marrow transplantation for chronic myeloid leukaemia in first chronic phase: importance of a graft-versus-leukaemia effect. *Br J Haematol.* 1988 Jun;69(2):239–45.
64. Dudley ME, Wunderlich JR, Robbins PF, Yang JC, Hwu P, Schwartzentruber DJ, et al. Cancer Regression and Autoimmunity in Patients After Clonal Repopulation with Antitumor Lymphocytes. *Science.* 2002 Oct 25;298(5594):850–4.
65. Yee C, Thompson JA, Byrd D, Riddell SR, Roche P, Celis E, et al. Adoptive T cell therapy using antigen-specific CD8+ T cell clones for the treatment of patients with metastatic melanoma: In vivo persistence, migration, and antitumor effect of transferred T cells. *Proc Natl Acad Sci.* 2002 Oct 12;99(25):16168–73.
66. Dluczek S, Tretbar S, Fricke S, Köhl U. CAR-T-Zellen: Update 2019. *Transfusionsmedizin - Immunhämatol Hämotherapie Immungenetik Zellther.* 2019 Aug;9(03):187–200.
67. Nastoupil LJ, Jain MD, Spiegel JY, Ghobadi A, Lin Y, Dahiya S, et al. Axicabtagene Ciloleucel (Axi-cel) CD19 Chimeric Antigen Receptor (CAR) T-Cell

- Therapy for Relapsed/Refractory Large B-Cell Lymphoma: Real World Experience. *Blood*. 2018 Nov 29;132(Supplement 1):91–91.
68. Grupp SA, Maude SL, Rives S, Baruchel A, Boyer MW, Bittencourt H, et al. Updated Analysis of the Efficacy and Safety of Tisagenlecleucel in Pediatric and Young Adult Patients with Relapsed/Refractory (r/r) Acute Lymphoblastic Leukemia. *Blood*. 2018 Nov 29;132(Supplement 1):895–895.
69. Shih K, Arkenau H-T, Infante JR. Clinical Impact of Checkpoint Inhibitors as Novel Cancer Therapies. *Drugs*. 2014;74(17):1993–2013.
70. Mu C-Y, Huang J-A, Chen Y, Chen C, Zhang X-G. High expression of PD-L1 in lung cancer may contribute to poor prognosis and tumor cells immune escape through suppressing tumor infiltrating dendritic cells maturation. *Med Oncol*. 2011 Sep;28(3):682–8.
71. Balar AV, Weber JS. PD-1 and PD-L1 antibodies in cancer: current status and future directions. *Cancer Immunol Immunother*. 2017 May 1;66(5):551–64.
72. Fischer K, Hoffmann P, Voelkl S, Meidenbauer N, Ammer J, Edinger M, et al. Inhibitory effect of tumor cell-derived lactic acid on human T cells. *Blood*. 2007;109(9):3812–3819.
73. Choi SYC, Collins CC, Gout PW, Wang Y. Cancer-generated lactic acid: a regulatory, immunosuppressive metabolite? *J Pathol*. 2013 Aug;230(4):350–5.
74. Newsholme P. Why Is L-Glutamine Metabolism Important to Cells of the Immune System in Health, Postinjury, Surgery or Infection? *J Nutr*. 2001 Jan 9;131(9):2515S-2522S.
75. Macintyre AN, Gerriets VA, Nichols AG, Michalek RD, Rudolph MC, Deoliveira D, et al. The Glucose Transporter Glut1 Is Selectively Essential for CD4 T Cell Activation and Effector Function. *Cell Metab*. 2014 Jul 1;20(1):61–72.
76. Peng M, Yin N, Chhangawala S, Xu K, Leslie CS, Li MO. Aerobic glycolysis promotes T helper 1 cell differentiation through an epigenetic mechanism. *Science*. 2016 Oct 28;354(6311):481–4.
77. Chang C-H, Curtis JD, Maggi LB, Faubert B, Villarino AV, O’Sullivan D, et al. Posttranscriptional Control of T Cell Effector Function by Aerobic Glycolysis. *Cell*. 2013 Jun 6;153(6):1239–51.
78. Renner K, Geiselhöringer A-L, Fante M, Bruss C, Färber S, Schönhammer G, et al. Metabolic plasticity of human T cells: Preserved cytokine production under glucose deprivation or mitochondrial restriction, but 2-deoxy-glucose affects effector functions. *Eur J Immunol*. 2015 Sep;45(9):2504–16.
79. Tripmacher R, Gaber T, Dziurla R, Häupl T, Erekul K, Grützkau A, et al. Human CD4+ T cells maintain specific functions even under conditions of extremely restricted ATP production. *Eur J Immunol*. 2008;38(6):1631–42.

80. Morais-Santos F, Granja S, Miranda-Gonçalves V, Moreira AHJ, Queirós S, Vilaça JL, et al. Targeting lactate transport suppresses in vivo breast tumour growth. *Oncotarget*. 2015 Aug 7;6(22):19177–89.
81. Zellzählung | OLS [Internet]. [cited 2018 Aug 15]. Available from: <https://www.ols-bio.de/zellzaehlung/>
82. Durchflusszytometrie. In: Wikipedia [Internet]. 2017. Available from: <https://de.wikipedia.org/w/index.php?title=Durchflusszytometrie&oldid=16155542>
83. Lecoœur H, de Oliveira-Pinto LM, Gougeon M-L. Multiparametric flow cytometric analysis of biochemical and functional events associated with apoptosis and oncosis using the 7-aminoactinomycin D assay. *J Immunol Methods*. 2002 Jul 1;265(1–2):81–96.
84. Schmid I, Krall WJ, Uittenbogaart CH, Braun J, Giorgi JV. Dead cell discrimination with 7-amino-actinomycin D in combination with dual color immunofluorescence in single laser flow cytometry. *Cytometry*. 1992;13(2):204–8.
85. Calcinotto A, Filipazzi P, Grioni M, Iero M, Milito AD, Ricupito A, et al. Modulation of Microenvironment Acidity Reverses Anergy in Human and Murine Tumor-Infiltrating T Lymphocytes. *Cancer Res*. 2012 Jun 1;72(11):2746–56.
86. Mandler AN, Hu B, Prinz PU, Kreutz M, Gottfried E, Noessner E. Tumor lactic acidosis suppresses CTL function by inhibition of p38 and JNK/c-Jun activation. *Int J Cancer*. 2012;131(3):633–40.
87. Husain Z, Huang Y, Seth P, Sukhatme VP. Tumor-Derived Lactate Modifies Antitumor Immune Response: Effect on Myeloid-Derived Suppressor Cells and NK Cells. *J Immunol*. 2013 Aug 1;191(3):1486–95.
88. Dietl K, Renner K, Dettmer K, Timischl B, Eberhart K, Dorn C, et al. Lactic acid and acidification inhibit TNF secretion and glycolysis of human monocytes. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2010 Feb 1;184(3):1200–9.
89. Polański R, Hodgkinson CL, Fusi A, Nonaka D, Priest L, Kelly P, et al. Activity of the Monocarboxylate Transporter 1 Inhibitor AZD3965 in Small Cell Lung Cancer. *Clin Cancer Res*. 2014 Feb 15;20(4):926–37.
90. Pinheiro C, Longatto-Filho A, Scapulatempo C, Ferreira L, Martins S, Pellerin L, et al. Increased expression of monocarboxylate transporters 1, 2, and 4 in colorectal carcinomas. *Virchows Arch*. 2008 Feb 1;452(2):139–46.
91. Miranda-Gonçalves V, Honavar M, Pinheiro C, Martinho O, Pires MM, Pinheiro C, et al. Monocarboxylate transporters (MCTs) in gliomas: expression and exploitation as therapeutic targets. *Neuro-Oncol*. 2013 Feb 1;15(2):172–88.
92. A Phase I Trial of AZD3965 in Patients With Advanced Cancer - Full Text View - ClinicalTrials.gov [Internet]. [cited 2019 Oct 29]. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01791595>

93. Blocking Lactate Export by Inhibiting the Myc Target MCT1 Disables Glycolysis and Glutathione Synthesis | Cancer Research [Internet]. [cited 2019 Oct 29]. Available from: <https://cancerres.aacrjournals.org/content/74/3/908.short>
94. Baek G, Tse YF, Hu Z, Cox D, Buboltz N, McCue P, et al. MCT4 Defines a Glycolytic Subtype of Pancreatic Cancer with Poor Prognosis and Unique Metabolic Dependencies. *Cell Rep.* 2014 Dec 24;9(6):2233–49.
95. Chirasani SR, Leukel P, Gottfried E, Hochrein J, Stadler K, Neumann B, et al. Diclofenac inhibits lactate formation and efficiently counteracts local immune suppression in a murine glioma model. *Int J Cancer.* 2013;132(4):843–53.
96. Schnitzer TJ, Burmester GR, Mysler E, Hochberg MC, Doherty M, Ehram E, et al. Comparison of lumiracoxib with naproxen and ibuprofen in the Therapeutic Arthritis Research and Gastrointestinal Event Trial (TARGET), reduction in ulcer complications: randomised controlled trial. *The Lancet.* 2004 Aug 27;364(9435):665–74.
97. Renner K, Seilbeck A, Kauer N, Ugele I, Siska PJ, Brummer C, et al. Combined Metabolic Targeting With Metformin and the NSAIDs Diflunisal and Diclofenac Induces Apoptosis in Acute Myeloid Leukemia Cells. *Front Pharmacol.* 2018 Nov 2;9:1258.
98. Shirakawa K, Wang L, Man N, Maksimoska J, Sorum AW, Lim HW, et al. Salicylate, diflunisal and their metabolites inhibit CBP/p300 and exhibit anticancer activity. *eLife.* 2016 May 31;5:e11156.
99. Vervoorts J, Lüscher-Firzlaff JM, Rottmann S, Lilischkis R, Walsemann G, Dohmann K, et al. Stimulation of c-MYC transcriptional activity and acetylation by recruitment of the cofactor CBP. *EMBO Rep.* 2003 May 1;4(5):484–90.
100. Chen C, Xu W, Wang C. Combination of celecoxib and doxorubicin increases growth inhibition and apoptosis in acute myeloid leukemia cells. *Leuk Lymphoma.* 2013 Nov 1;54(11):2517–22.
101. WHO. Cancer Pain relieve (second edition). 2nd ed. WHO Library Cataloguing Publication Data; 1996.
102. WHO. WHO guidelines for the pharmacological and radiotherapeutic management of cancer pain in adults and adolescents. Geneva: World Health Organization; 2018.
103. Brummer C. Der Melanomstoffwechsel als vielversprechende therapeutische Zielstruktur unter MAPK-Inhibition. 2019.
104. Zelenay S, van der Veen AG, Böttcher JP, Snelgrove KJ, Rogers N, Acton SE, et al. Cyclooxygenase-Dependent Tumor Growth through Evasion of Immunity. *Cell.* 2015 Sep 10;162(6):1257–70.
105. Cham CM, Gajewski TF. Metabolic mechanisms of tumor resistance to T cell effector function. *Immunol Res.* 2005 Mar 1;31(2):107–18.

106. Siska PJ, Rathmell JC. Metabolic Signaling Drives IFN- γ . *Cell Metab.* 2016 Nov 8;24(5):651–2.
107. Pagès F, Galon J, Dieu-Nosjean M-C, Tartour E, Sautès-Fridman C, Fridman W-H. Immune infiltration in human tumors: a prognostic factor that should not be ignored. *Oncogene.* 2010 Feb;29(8):1093–102.
108. Brand A, Singer K, Koehl GE, Kolitzus M, Schoenhammer G, Thiel A, et al. LDHA-Associated Lactic Acid Production Blunts Tumor Immunosurveillance by T and NK Cells. *Cell Metab.* 2016 Nov 8;24(5):657–71.
109. Fischer K, Hoffmann P, Voelkl S, Meidenbauer N, Ammer J, Edinger M, et al. Inhibitory effect of tumor cell–derived lactic acid on human T cells. *Blood.* 2007 May 1;109(9):3812–9.
110. Kelderman S, Heemskerk B, van Tinteren H, van den Brom RRH, Hospers GAP, van den Eertwegh AJM, et al. Lactate dehydrogenase as a selection criterion for ipilimumab treatment in metastatic melanoma. *Cancer Immunol Immunother.* 2014 May 1;63(5):449–58.

Danksagung

Mein größter Dank gilt meiner Betreuerin, PD Dr. Kathrin Renner-Sattler, für die hervorragende Betreuung und umfassende Unterstützung, sowohl bei der Einarbeitung in die Laborarbeit, Planung der Experimente und Diskussion der Ergebnisse. Ohne sie wäre eine erfolgreiche Durchführung dieser Arbeit nicht möglich gewesen.

Auch möchte ich mich bei Prof. Dr. Marina Kreutz, für die Überlassung des Themas, sowie für die Bereitstellung der Forschungseinrichtung und die herzliche Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe bedanken.

Bei Prof. Dr. Wolfgang Herr bedanke ich mich für die Möglichkeit, meine Arbeit am Lehrstuhl für Hämatologie und internistische Onkologie anzufertigen. Besonders bedanken möchte ich mich bei Prof. Dr. Reinhard Andreesen, durch den ich auf die Möglichkeit einer Promotion am Lehrstuhl für Hämatologie Onkologie aufmerksam gemacht wurde.

Ein großer Dank gilt Christina Bruss, welche mich nicht nur im Labor unterstützte, sondern sich auch die Mühe machte meine Doktorarbeit Korrektur zu lesen und viele konstruktive Vorschläge einbrachte. Auch Stephanie Färber hat durch die gewissenhafte und geduldige Unterstützung meiner Laborarbeit einen großen Beitrag zu dieser Arbeit geleistet.

Ein Dank auch an meine Laborkollegen Christina Brummer, Jakob Bösch, Zügey Elizabeth Cardenas Conejo, Carina Matos, Monika Wehrstein, Gabriele Schönhammer und Anja Wessely welche stets dazu beigetragen haben den Laboralltag zu versüßen.

Tausend Dank an Dirk Turek für die Hilfe bei der Formatierung und die Unterstützung und Beratung bei jeglichen anderen Problemen.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meinen Freunden Judith Kozole, Jonas Holzinger, sowie bei meiner Familie bedanken, zum einen für hilfreiche Korrekturlesungen, zum anderen aber auch für endlose Ermutigungen und Zusprüche während der Arbeit an dieser Dissertation.

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind als solche gekennzeichnet. Weitere Personen waren an der inhaltlich materiellen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich hierfür nicht die entgeltliche Hilfe eines Promotionsberaters oder anderer Personen in Anspruch genommen. Niemand hat von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Diese Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Stuttgart, 08.12.2020

Lisa Aigle