

Aus dem Institut für Neuropathologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Prof. Dr. Guido Reifenberger

Das endogene Cannabinoidsystem in malignen Gliomen
als Angriffspunkt für neue Therapiestrategien

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Anna Henriette Eifer

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. Guido Reifenberger

Zweitgutachter: PD Dr. Philipp Slotty

*Das schönste Glück des denkenden Menschen ist,
das Erforschliche erforscht zu haben
und das Unerforschliche ruhig zu verehren.*

Johann Wolfgang von Goethe

*Für Marion Johanna Jochim-Eifer und Fritz Eifer,
meine Eltern.*

Zusammenfassung

Gliome machen über 80% aller malignen primären Hirntumoren aus. Zirkumskripte Gliome des WHO-Grades I haben eine gute Prognose; Gliome der WHO-Grade II bis IV wachsen diffus infiltrierend und sind prognostisch ungünstig. Deshalb bedarf es neuer Therapieoptionen.

Das endogene Cannabinoidsystem (ECS) ist ein neuromodulatorisches System aus endogenen Cannabinoiden und ihren Rezeptoren, u.a. den Cannabinoidrezeptoren 1 und 2 (CB₁ und CB₂). In diffusen Gliomen wurde eine erhöhte CB₂ Rezeptor-Expression nachgewiesen, was mit einem höheren histologischen Grad korrelierte. Über die CB₁ Expression in Gliomen herrscht Uneinigkeit. *In vitro* und *in vivo* Studien zeigten, dass die Behandlung mit CB₁/ CB₂-Agonisten Proliferationshemmung, Apoptose und Autophagie in diffusen Gliomen induziert.

Die vorliegende Dissertationsarbeit untersucht die Expression von u.a. CB₁ und CB₂ in 61 astrozytären Gliomen der WHO-Grade II bis IV und 14 Proben aus nicht-neoplastischem Gehirngewebe. In Isozitatdehydrogenase (IDH) mutierten Gliomen der WHO-Grade II-IV und in IDH-Wildtyp Glioblastomen zeigte die semiquantitative PCR eine im Vergleich zu gesundem Gehirngewebe signifikant erhöhte mRNA-Expression von CB₂. Diese korrelierte jedoch nicht mit dem Malignitätsgrad. Die CB₁ mRNA-Expression in den untersuchten Tumorproben war signifikant und vom Mutationsstatus der Gene IDH1 und IDH2 unabhängig vermindert.

In Zellkulturexperimenten wurde die zytotoxische Wirkung pharmakologischer ECS-Agonisten, darunter Cannabinol (CN) und Cannabidiol (CBD), sowie von AM404, dem aktiven Metaboliten von Paracetamol, auf humane Glioblastomzellen untersucht. Es wurde jeweils die mittlere inhibitorische Konzentration (IC₅₀) bestimmt. Zusätzlich wurden CN oder CBD mit einer nicht zytotoxischen Dosis von AM404 kombiniert. In zwei von sechs Zelllinien wurde die IC₅₀ von CN durch die Zugabe von AM404 signifikant herabgesetzt. In allen sechs Zelllinien wurde die IC₅₀ von CBD durch die Kombination mit AM404 signifikant herabgesetzt. Das *in vitro* Wachstum von Glioblastomzellen war nach 15 Tagen Kombinationsbehandlung mit ECS-Agonisten und AM404 vermindert. Nach der Behandlung wurden kein signifikanter Anstieg der Expression von Xbp1 *short* mRNA als Hinweis auf Endoplasmatisches-Retikulum-Stress und keine signifikante Apoptoseinduktion festgestellt. Eine Induktion von Autophagie konnte ebenfalls nicht festgestellt werden.

Zusammenfassend bestätigt die vorliegende Arbeit eine erhöhte CB₂ mRNA-Expression und zeigt eine verminderte CB₁ mRNA-Expression in astrozytären Gliomen. Sie deckt auf, dass ein einfacher und günstiger Wirkstoff wie AM404 die Zytotoxizität von Cannabinoiden auf humane Glioblastomzellen *in vitro* verstärken kann. Signifikante Veränderungen von ER-Stress, Apoptose- oder Autophagie als Folge einer Behandlung mit Agonisten des ECS ließen sich nicht nachweisen. Zur Aufklärung der genauen molekularen Mechanismen, die den beobachteten Auswirkungen zugrunde liegen, bedarf es weitergehender Experimente unter Beachtung der Latenzzeit der untersuchten Prozesse.

Summary

Over 80 % of primary malignant brain tumors are gliomas. World Health Organization (WHO) grade I gliomas grow locally circumscribed and have a good prognosis, WHO grade II to IV gliomas show diffuse infiltration and thus associated with less favorable outcome. For the latter group of gliomas further treatment options are needed.

The Endogenous Cannabinoid System (ECS) is a neuromodulatory system consisting of endogenous transmitters called Endocannabinoids and their corresponding receptors such as the Cannabinoid 1 and 2 receptors (CB₁ / CB₂). Previous research has shown that gliomas have a higher CB₂ mRNA expression and that CB₂ expression levels correlate with the WHO grade. Results regarding the CB₁ expression are controversial. *In vitro* as well as *in vivo* experiments have shown that ECS-receptor agonists can induce apoptosis, autophagy and decreased proliferation of human glioma cells.

In this doctoral thesis, the mRNA expression of ECS related receptors was tested in tissue samples of 61 astrocytic gliomas of WHO grades II to IV and 14 samples of non-neoplastic brain tissue. Semi-quantitative PCR analysis showed a significant overexpression of CB₂ in isocitrate dehydrogenase (IDH)-mutant gliomas of WHO grades II-IV and IDH-wildtype glioblastomas but no correlation to WHO grading. CB₁ mRNA expression was significantly lower in all types of glioma regardless of their IDH mutation status.

Cytotoxicity assays of various ECS-receptor agonists, such as Cannabinol (CN) and Cannabidiol (CBD), as well as AM404, the active metabolite of paracetamol, were performed in human glioblastoma cell lines. First, the mean inhibitory concentrations (IC₅₀) of the aforementioned drugs were determined. Then, CN and CBD were combined with low-dose, non-cytotoxic AM404. This combination therapy caused a significant reduction of the IC₅₀ of CN in two out of six glioblastoma cell lines and a significant reduction of the IC₅₀ of CBD in all six glioblastoma cell lines. *In vitro* growth of glioblastoma cell lines was reduced by the combination therapy of CN or CBD with AM404.

Treatment with ECS-receptor agonists did not lead to a significant increase of Xbp1 *short* mRNA expression in human glioblastoma cell lines. This is a surrogate marker for stress of the endoplasmic reticulum which ultimately can induce apoptosis. Flow cytometry of ECS-receptor agonist treated glioblastoma cells showed no significant increase of apoptotic cells. Western blot analysis did not detect evidence for induction of autophagy.

In conclusion, this thesis confirmed increased levels of CB₂ mRNA and showed decreased levels of CB₁ mRNA in astrocytic gliomas. In addition, it is reported that a simple and inexpensive drug as AM404 can enhance the cytotoxic effects of ECS-receptor agonists on human glioblastoma cells. Significant effects of this treatment on ER stress, apoptosis or autophagy could not be demonstrated. To elucidate the exact molecular mechanisms underlying the observed effects, further experiments are required, taking into account the latency of the processes examined.

Abkürzungsverzeichnis

2-AG	2-Arachidonoylglycerol
7-AAD	7-Amino-Actinomycin
AEA	N-Arachidonylethanolamid
AM404	<i>N-arachidinoyl-phenolamin</i>
AMT	<i>anandamide membrane transporter</i>
ATF4	<i>Activating transcription factor 4</i>
ATRX	<i>Alpha Thalassemia/Mental Retardation Syndrome X-Linked</i>
CBD	Cannabidiol
CHOP	<i>C/EBP homologous protein</i>
CN	Cannabinol
COX-2	Cyclooxygenase 2
DBPS	<i>Dulbecco's phosphate-buffered saline</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMF	Dimethylformamid
EANO	<i>European Association of Neuro-Oncology</i>
ECS	Endogenes Cannabinoidsystem
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FAAH	<i>fatty acid amide hydrolase</i>
FCS	<i>Fetal calf serum</i>
GPR55	<i>G protein-coupled receptor 55</i>
IC ₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration
ICAM-1	<i>intercellular adhesion molecule 1</i>
IDH1/2	Isocitratdehydrogenase ½

LC3B-I oder -II	<i>Microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3B-I oder II</i>
MeOH	Methanol
MMP	Matrixmetalloprotease
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromid
NAPQI	N-Acetyl-p-benzochinonimin
NOS	<i>Not otherwise specified</i>
NSAID	<i>Non-steroidal anti-inflammatory drug</i>
p-Akt	<i>phosphorylierte Ak-strain transforming (Proteinkinase B)</i>
p-ERK	<i>phosphorylierte extracellular signal-regulated kinase</i>
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PTEN	<i>phosphatase and tensin homolog</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gelelectrophoresis</i>
THC	Δ^9 -Tetrahydrocannabinol
TRB-3	<i>Tribbles homolog 3</i>
TRPV1	<i>transient receptor potential vanilloid 1</i>
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
VEGF-R	<i>vascular endothelial growth factor receptor</i>
WHO	<i>World Health Organisation</i>

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	1
1.1. Maligne Gliome und Glioblastome	1
1.2. Das endogene Cannabinoidsystem	3
1.3. Bedeutung des endogenen Cannabinoidsystems in der Therapie von malignen Gliomen	6
1.4. Pharmakologische Beeinflussung des endogenen Cannabinoidsystems	11
1.5. Fragestellung und Ziel dieser Arbeit	14
2. MATERIAL UND METHODEN	17
2.1. Materialien	17
2.1.1. Aktenzeichen des Ethikvotums	17
2.1.2. Biologische Materialien	17
2.1.3. Chemikalien, Kits, Verbrauchsmaterialien	19
2.1.4. Geräte	24
2.2. Methoden	25
2.2.1. Zellbiologische Methoden	25
2.2.2. Molekularbiologische Methoden	29
2.2.3. Statistische Auswertung	33
3. ERGEBNISSE	35
3.1. Expression der Rezeptoren CB ₁ , CB ₂ und TRPV ₁ in astrozytären Gliomen und Glioblastomzelllinien	35
3.1.1. CB ₁ mRNA-Expression in gesundem Gehirn und in astrozytären Gliomen	35
3.1.2. CB ₂ mRNA-Expression in gesundem Gehirn und in astrozytären Gliomen	36
3.1.3. TRPV ₁ mRNA-Expression in gesundem Gehirn und in astrozytären Gliomen	37
3.1.4. CB ₁ , CB ₂ , und TRPV ₁ mRNA-Expression in Glioblastomzelllinien	38
3.2. Zytotoxische Wirkung von Substanzen mit Einfluss auf das ECS in Glioblastomzelllinien	40
3.2.1. AM404	40
3.2.2. Cannabidiol	43
3.2.3. Cannabinol	45
3.2.4. Arvanil	46

3.3. Zytotoxische Wirkung von Cannabinoiden in Kombination mit AM404 in Glioblastomzelllinien.....	48
3.3.1. Cannabidiol kombiniert mit AM404	48
3.3.2. Cannabinol kombiniert mit AM404	50
3.4. Auswirkung einer 15-tägigen Cannabinoidbehandlung auf das Wachstum von Glioblastomzellen.....	53
3.5. Nachweis von ER-Stress in behandelten Glioblastomzellen.....	56
3.6. Nachweis einer veränderten Rezeptorexpression in behandelten Glioblastomzellen.....	59
3.7. Nachweis von Apoptose in behandelten Glioblastomzellen	59
3.8. Nachweis von Autophagie in behandelten Glioblastomzellen.....	64
4. DISKUSSION	66
4.1. Ergebnisse dieser Arbeit.....	66
4.1.1. Expression von CB ₁ , CB ₂ und TRPV ₁ mRNA in astrozytären Gliomen	66
4.1.2. Effekt von Cannabidiol, Cannabinol, AM404 und Arvanil auf <i>in vitro</i> kultivierte Glioblastomzellen	67
4.1.3. Synergistische antitumoröse Effekte mit AM404.....	69
4.1.4. Nach einer 15-tägigen Behandlung ist die Kombination mit AM404 der alleinigen Gabe von Cannabinoiden überlegen	70
4.1.5. Die Kombination aus Cannabinoiden und AM404 erhöht zum Teil den ER-Stress in Glioblastomzellen	71
4.1.6. Autophagie und Veränderungen der Rezeptorexpression ließen sich nach Behandlung mit Cannabinoiden und AM404 nicht nachweisen	73
4.1.7. Einfluss die Kombination von Cannabinoiden mit AM404 auf den Anteil apoptotischer Zellen in Glioblastomzelllinien	73
4.2. Limitationen dieser Arbeit.....	74
4.3. Ausblick	75
DANKSAGUNG.....	1
LITERATURVERZEICHNIS	78

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Übersicht Der Substanzen mit Wirkung auf das ECS	15
Tabelle 2 Primer	18
Tabelle 3 Antikörper	19
Tabelle 4 in der Zellkultur verwendeten Produkte.....	20
Tabelle 5 Auflistung der Substanzen mit Wirkung auf das ECS	20
Tabelle 6 verwendeten Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	21
Tabelle 7 selbst hergestellte Puffer.....	23
Tabelle 8 Verwendete Kits	24
Tabelle 9 verwendete instrumente	24
Tabelle 10 In Apoptose Assays angewandte Behandlungsbedingungen.	28
Tabelle 11 Zusammensetzung eines einfachen PCR Ansatzes	30
Tabelle 12 Temperaturen und Dauer der PCR-Schritte.....	31
Tabelle 13 Zusammensetzung eines einfachen real-time PCR-Ansatzes	31
Tabelle 14 Zusammensetzung des Mastermixes für die Proteinextraktion	32
Tabelle 15 IC ₅₀ -Werte für CBD alleine und kombiniert mit AM404	50
Tabelle 16 IC ₅₀ -Werte für CN alleine und kombiniert mit AM404.....	52

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Einteilung der diffusen Gliome	2
Abb. 2: Darstellung des endogenen Cannabinoidsystems	4
Abb. 3: Cannabinoide beeinflussen das Tumorwachstum über multiple Signalwege	9
Abb. 4: Interaktionen des Paracetamol-Metaboliten AM404 mit dem ECS.....	13
Abb. 5: Schematische Darstellung der Kombinationsbehandlung aus Cannabidiol oder Cannabinol mit AM404.....	27
Abb. 6: Normalisierte Expression der CB ₁ mRNA	35
Abb. 7: Normalisierte Expression von CB ₂ mRNA.....	36
Abb. 8: Normalisierte Expression von TRPV ₁ mRNA	37
Abb. 9: Normalisierte Expression von CB ₁ in humanen Glioblastomzelllinien.....	38
Abb. 10: Normalisierte Expression von CB ₂ in humanen Glioblastomzelllinien	39
Abb. 11: Normalisierte Expression von TRPV ₁ in humanen Glioblastomzelllinien	39
Abb. 12: Auswirkung von AM404 auf die Viabilität humaner Glioblastomzellen.	41
Abb. 13: Auswirkung von Cannabidiol auf die Viabilität humaner Glioblastomzellen. ...	43
Abb. 14: Auswirkung von Cannabinol auf die Viabilität humaner Glioblastomzellen. ...	45
Abb. 15: Auswirkung von Arvanil auf die Viabilität humaner Glioblastomzellen.....	47
Abb. 16: Dosis-Wirkungskurven von Cannabidiol mit und ohne AM404	49
Abb. 17: Dosis-Wirkungskurven von Cannabinol mit und ohne AM404	51
Abb. 18: Clonogenic Assays der Zelllinie LN229.	53
Abb. 19: Clonogenic Assays der Zelllinie TP365MG.	55
Abb. 20: Normalisierte Expression von Xbp1 long	57
Abb. 21: Normalisierte Expression von Xbp1 short.....	58
Abb. 22: 7-AAD und Annexin V Färbung in der Zelllinie A172.....	60
Abb. 23: Anteil apoptotischer Zellen in der Zelllinie A172	61
Abb. 24: 7-AAD und Annexin V Färbung in der Zelllinie LN22	62
Abb. 25: Anteil apoptotischer Zellen in der Zelllinie LN229	62
Abb. 26: 7-AAD und Annexin V Färbung in der Zelllinie TP365MG	63
Abb. 27: Anteil apoptotischer Zellen in der Zelllinie TP365MG	64
Abb. 28: Western Blot der LC3B-Unterformen I und II in Glioblastomzellen.....	65

1. Einleitung

1.1. Maligne Gliome und Glioblastome

Gliome gehören zu den neuroepithelialen Tumoren und zeigen histopathologische und immunhistochemische Merkmale von glialen Zellen, den Binde- und Stützgewebszellen des Gehirns (1). Gliome machen einen Anteil von circa 31% an allen intrakraniellen Tumoren und von circa 81% an allen primär malignen Hirntumoren aus. Die altersadjustierte Inzidenz von Gliomen wird in Europa auf circa 5,5 neue Fälle pro 100.000 Einwohner pro Jahr geschätzt, wobei Frauen etwas seltener betroffen sind als Männer (2). Die Häufigkeit von Gliomen hat in vergangenen Jahren aufgrund des demographischen Wandels leicht zugenommen (3).

Anhand ihres Wachstumsmusters unterscheidet man zirkumskript, das heißt lokal begrenzt, wachsende Gliome von diffus infiltrierend wachsenden Gliomen. Zirkumskripte Gliome bestehen mehrheitlich aus langsam wachsenden Tumoren, die wie das pilozytische Astrozytom dem WHO-Grad I gemäß der Klassifikation der Weltgesundheitsorganisation (WHO) entsprechen. Im Gegensatz dazu werden diffus infiltrierende Gliome in die WHO-Grade II bis IV eingeordnet. Von dieser Regel weichen Ependymome und einige seltene andere Gliome wie das pleomorphe Xanthoastrozytom ab, die in den WHO-Grad II oder III eingeordnet werden, obwohl sie eher zirkumskript wachsen. Die höhergradigen Gliome der WHO-Grade III und IV grenzt man von den niedriggradigen Gliomen der WHO-Grade I und II auch als „maligne Gliome“ ab (4).

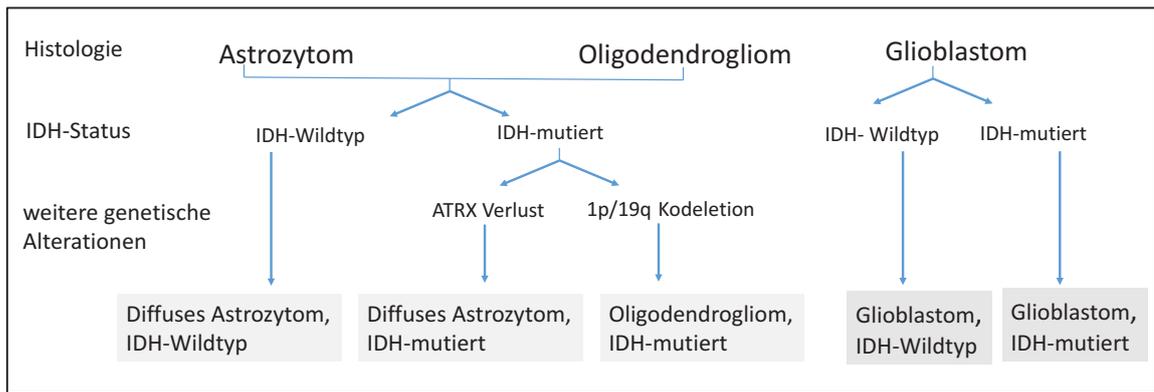


Abb. 1: Vereinfachte schematische Darstellung der Einteilung der diffusen Gliome nach der WHO-Klassifikation von 2016. Diagramm nachempfunden nach (4). In die Diagnose fließen auch genetische Alterationen ein, wie die Mutation des Isocitratdehydrogenase 1 oder 2 Gens (IDH), Verlust des Alpha Thalassemia/Mental Retardation Syndrome X-Linked Gens (ATRX), und die Kodeletion der Chromosomenarme 1p/19q.

Die Klassifikation der diffusen Gliome (Abb. 1) erfolgt nach den Kriterien der WHO-Klassifikation der Tumoren des zentralen Nervensystems. Sie unterteilt diffuse Gliome nach histomorphologischen Aspekten (Astrozytome, Oligodendrogliome, Glioblastome), Grad der Malignität (WHO-Grad II bis IV) und seit der umfassenden Revision von 2016 auch nach molekulargenetischen Markern (4,5).

Diffuse Gliome der WHO-Grade II und III werden abhängig von Mutationen im Isocitratdehydrogenase-1 und -2 Gen (IDH1/2) in die Gruppen IDH-mutiert, IDH-Wildtyp oder NOS (*not otherwise specified*) eingeteilt. Liegt zusätzlich zu der IDH-Mutation auch eine 1p/19q-Kodeletion vor, so handelt es sich um ein IDH-mutiertes und 1p/19q-kodeletiertes Oligodendrogliom; fehlt diese Kodeletion in einem IDH-mutierten Gliom, so handelt es sich um ein Astrozytom mit IDH-mutation (4).

Gliome des WHO-Grades IV entsprechen ganz überwiegend den Glioblastomen (4). Sie zeichnen sich durch ihre außerordentliche Aggressivität und damit verbunden eine sehr geringe Aussicht auf Heilung aus (2). Histologisch sind sie durch eine erhöhte proliferative und mitotische Aktivität, pathologische Gefäßproliferate und Nekrosen gekennzeichnet (4). Auch Glioblastome werden in IDH-mutiert, IDH-Wildtyp und NOS unterteilt. Im Gegensatz zu WHO-Grad II und III Gliomen ist hier jedoch die IDH-Mutation deutlich seltener (< 10%). Eine IDH-Mutation bei einem Glioblastom findet sich häufiger bei jüngeren Patienten oder Patienten mit einer niedriggradigeren astrozytären Vorläuferläsion, also einem diffusen Astrozytom (WHO-Grad II) oder einem anaplastischen Astrozytom (WHO-Grad III). Diese "sekundären Glioblastome"

sind nicht nur seltener, sondern treten bei jüngeren Patienten auf und sind im Vergleich zu den IDH-Wildtyp Glioblastomen mit einer längeren Überlebenszeit assoziiert. Die Mehrzahl der Glioblastome (> 90%) entsteht *de novo* und ist vom IDH-Wildtyp. Das mediane Alter bei Erstdiagnose ist circa 62 Jahre (4). Bei Ausschöpfung aller Therapieoptionen beträgt das mittlere Überleben nach Stellung der Diagnose heutzutage zwischen 14 und 16 Monaten (2).

Für Gliome wurden Risikofaktoren wie ionisierende Strahlung oder prädisponierende Gendefekte identifiziert, erklären aber nur einen Bruchteil der Erkrankungsfälle. Zu den protektiven Faktoren zählen Erkrankungen des atopischen Formenkreises (2).

Die von der *European Association of Neuro-Oncology* (EANO) herausgegebene Leitlinie zur Behandlung von diffusen Gliomen sieht als Therapie für Glioblastome eine möglichst radikale Resektion, gefolgt von einer Radiotherapie und Chemotherapie mit dem DNA-Alkylans Temozolomid vor (6). Trotz moderner Techniken wie Mikrochirurgie und intraoperativem Neuromonitoring ist es aufgrund des infiltrativen Wachstums von diffusen Gliomen meist nicht möglich, sämtliches Tumorgewebe ohne neurologischen Schaden zu entfernen. Einzelne Tumorzellen infiltrieren das umliegende Gehirngewebe so tief, dass sie chirurgisch nicht ohne inakzeptable neurologische Einbußen entfernt werden können. Dadurch ist eine Resektion *in sano* nicht durchführbar und die Gefahr eines Rezidivs außerordentlich hoch (6).

Die nach vielen Jahren der Forschung immer noch limitierten Therapieoptionen sowie die praktisch nicht vorhandene Heilungschance zeigen den Bedarf an neuen Behandlungskonzepten auf. Einen Meilenstein in dieser Entwicklung stellt der Paradigmenwechsel vom morphologischen zum molekularen Verständnis der Tumoren dar. Dieser ebnet den Weg zu präziseren, individualisierten Therapien (7). Im Fokus der Forschung stehen beispielsweise Immuntherapien, *targeted therapies* und neue Applikationsformen von Medikamenten, die die Blut-Hirn-Schranke besser überwinden können.

1.2. Das endogene Cannabinoidsystem

Das endogene Cannabinoidsystem (ECS) ist ein neuromodulatorisches System aus Endocannabinoiden und ihren Rezeptoren, den Cannabinoidrezeptoren 1 und 2 (8). Es ist im peripheren und zentralen Nervensystem lokalisiert (9). Der Name

Cannabinoidsystem ist der Tatsache geschuldet, dass zuerst beobachtet wurde, dass das aus der Hanfpflanze *Cannabis sativa* extrahierte Δ^9 -Tetrahydrocannabinol die Cannabinoidrezeptoren 1 und 2 (CB₁ und CB₂) aktiviert (9). Erst später wurden die körpereigenen, sogenannten Endocannabinoide als physiologische Liganden der beiden Rezeptoren identifiziert. Es handelt sich dabei um Eicosanoide, deren prominenteste Vertreter N-Arachidonylethanolamid (AEA), auch Anandamid genannt, und 2-Arachidonoylglycerol (2-AG) sind (10,11). Ihre Wirkungsweise wird in Abb. 2 schematisch dargestellt. Da es sich hier um Lipide als Transmittermoleküle handelt, werden sie nicht in intrazellulären Vesikeln gespeichert, sondern werden bei Bedarf durch Diacylglycerollipasen aus Vorgängerlipiden in der Zellmembran abgespalten und in den synaptischen Spalt freigesetzt (12).

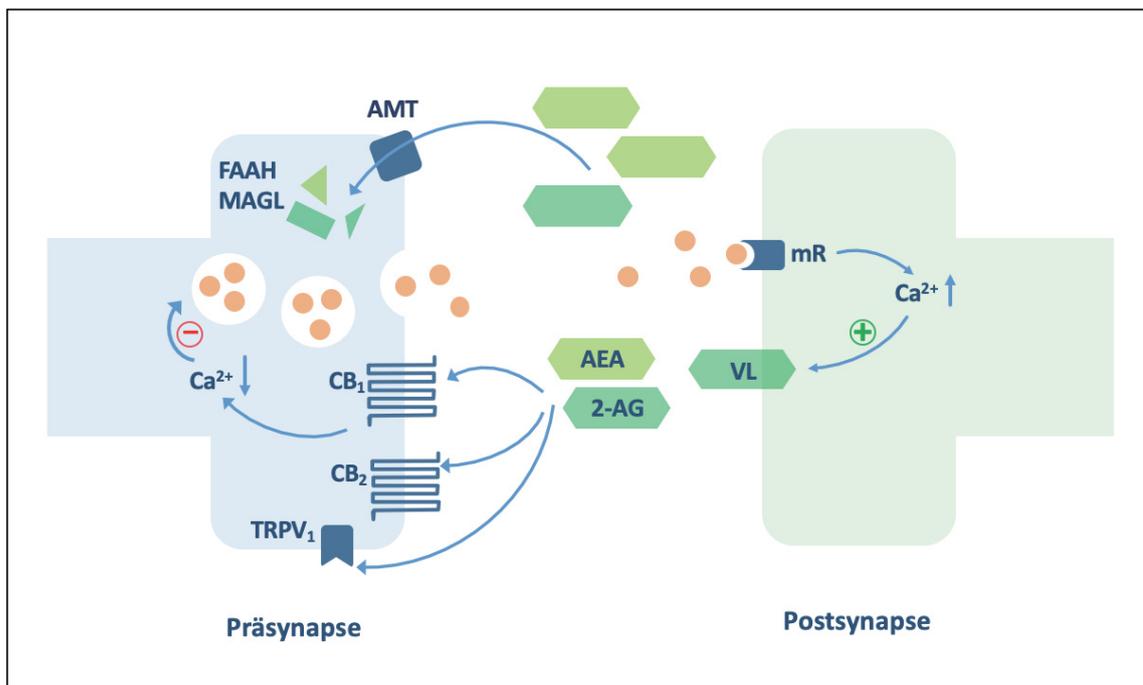


Abb. 2: **Schematische Darstellung des endogenen Cannabinoidsystems (ECS)**, angelehnt an (13). Muskarinerge Rezeptoren (mR) des postsynaptischen Neurons werden von Neurotransmittern stimuliert, woraufhin sich ein Anstieg des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels ausbildet. Hierdurch vermittelt werden aus Vorläuferlipiden (VL) endogene Cannabinoide wie z.B. Anandamid (AEA) und 2-Arachidonoylglycerol (2-AG) in den synaptischen Spalt freigesetzt. Sie wirken als Agonisten an den Cannabinoidrezeptoren 1 und 2 (CB₁, CB₂) und dem Transient Receptor Potential Vanilloid 1 (TRPV₁). Sie werden durch einen selektiven Transporter (anandamide membrane transporter, AMT) nach intrazellulär aufgenommen und dort unter anderem durch die fatty acid amide hydrolase (FAAH) und die monoacylglycerol lipase (MAGL) degradiert.

CB₁ und CB₂ sind G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (9). CB₁ ist vornehmlich präsynaptisch in neuronalen Zellen lokalisiert, wo durch Aktivierung modulierende Effekte auf Ionenströme, Erregbarkeit und Transmitterfreisetzung des präsynaptischen

Neurons ausgeübt werden (14). Der CB₂ Rezeptor kann in geringem Umfang auch im zentralen Nervensystem detektiert werden. Hauptsächlich ist CB₂ auf Immunzellen lokalisiert, wodurch unter anderem die Freisetzung von Zytokinen moduliert und inflammatorische Prozesse wie Leukozytenadhäsion eingedämmt werden (15). Durch eine inhibitorische Signalkaskade wird der Kaliumstrom nach intrazellulär erhöht und der Calciumstrom vermindert, sodass das Membranpotential stabilisiert wird und die Freisetzung von Neurotransmittern aus der präsynaptischen Nervenendigung vermindert wird (9). Nach der Freisetzung in den synaptischen Spalt werden Endocannabinoide recht schnell ($t_{1/2} < 5$ min) wieder daraus entfernt (16). Dies geschieht zum einen durch passive Diffusion, da die lipophilen Eicosanoide die Zellmembran bei bestehendem Konzentrationsgradienten einfach durchdringen können und zum anderen durch selektive Transporter, die *anandamide membrane transporter* (AMT) (16). Intrazellulär werden AEA und 2-AG durch die Enzyme *fatty acid amide hydrolase* (FAAH) und *monoacylglycerol lipase* (MAGL) abgebaut (17,18). Die inaktivierenden Prozesse des ECS können pharmakologisch inhibiert werden. Darauf soll im folgenden Kapitel eingegangen werden.

Allgemein gefasst lässt sich also feststellen, dass die Funktion des ECS die Modulation der Freisetzung von chemischen Botenstoffen ist. Die Orte der höchsten CB₁ Rezeptordichte im Gehirn lassen sich von den psychotropen Auswirkungen des THC-Konsums ableiten und wurden immunhistochemisch und autoradiographisch bestätigt (19). Demnach sind Hirnareale mit der höchsten Rezeptordichte der Hippocampus, die Basalganglien und das Kleinhirn (20). In der Medulla oblongata und dem Atemzentrum werden CB₁ Rezeptoren kaum exprimiert (9). Das ECS spielt in multiplen neuronalen Prozessen eine Rolle, wovon hier nur eine Auswahl aufgeführt werden soll. Es hat einen Einfluss auf Lernprozesse (21), die metabolische Homöostase und Appetitregulation (21,22), die (patho-) psychologische Reaktion auf Stress und Angst (23) und eine sehr komplexe Interaktion mit dem Schmerzempfinden auf spinaler Ebene (24). Dies erklärt die Effekte von Haschischkonsum, der zu einer (psycho)motorischen Sedierung, Appetitsteigerung und Angstlösung führen kann.

In enger Interaktion mit den Cannabinoidrezeptoren wird auch der *transient receptor potential vanilloid 1* (TRPV₁) Rezeptor, der zugleich ein ligandenaktivierter Ionenkanal ist, durch exogene sowie endogene Cannabinoide aktiviert (19). In diesem

Zusammenhang spricht man bei Anandamid und 2-Arachydonoylglycerol nicht nur von Endocannabinoiden, sondern auch von Endovanilloiden (25). TRPV₁ wird in peripheren Neuronen exprimiert, wo es auf Hitze, saure pH-Werte und das in Chili vorkommende Capsaicin reagiert und damit der Geschmacksempfindung und der Nozizeption dient (25–27). Zusätzlich ist TRPV₁ auch im ZNS lokalisiert, in besonderer Dichte in dopaminergen Neuronen der Substantia nigra, im Hypothalamus und im Hippocampus (25). Dort übt TRPV₁ modulatorische Effekte auf die Nozizeption, Thermoregulation und synaptische Plastizität aus (28). Zudem wird dieser Rezeptor auch mit behavioristischen Prozessen wie Angst und Stress in Verbindung gebracht (29). Diese Überschneidungen mit den Funktionen der Cannabinoidrezeptoren machen deutlich, dass auch TRPV₁ als Teil des ECS betrachtet werden muss. Dies wird durch die interessante Tatsache unterstrichen, dass sich das Capsaicin- und Anandamid-Molekül strukturell stark ähneln (30).

Die Erforschung des ECS ist bei Weitem noch nicht abgeschlossen. Als weiterer Akteur des ECS wird der *G protein-coupled receptor 55* (GPR55) angesehen, der eventuell ein dritter Cannabinoidrezeptor ist (31,32). Bislang wurde er als *orphan receptor* betrachtet, das heißt, als Rezeptor, dessen endogener Ligand noch nicht identifiziert wurde (33). Doch mittlerweile ist bekannt, dass er sowohl durch exogene als auch endogene Cannabinoide aktiviert wird, jedoch eine andere Signalkaskade auslöst, als CB₁ und CB₂ (34). Seine umfassende Rolle im ECS muss noch erschlossen werden. Aufgrund ihrer intensiven Erforschung und der in der Fachliteratur beschriebenen Korrelation der Expression von ECS-Rezeptoren CB₁, CB₂ und TRPV₁ mit der Malignität von Gliomen wird sich diese Arbeit hauptsächlich mit diesen drei ECS-Rezeptoren beschäftigen.

1.3. Bedeutung des endogenen Cannabinoidsystems in der Therapie von malignen Gliomen

Viele unterschiedliche Malignome zeigen eine veränderte Expression von Cannabinoidrezeptoren oder anderen Komponenten des endogenen Cannabinoidsystems (ECS). Zudem korreliert bei manchen Entitäten die aberrante Expression mit dem klinischen Verlauf der Erkrankung (35). Als Beispiel zu nennen ist

das Prostatakarzinom, bei dem eine Überexpression von CB₁ mit einem höheren Gleason-Score und verkürztem Überleben einhergeht (36). Ein schlechteres klinisches *Outcome* zeigen auch Patienten mit einem kolorektalen Karzinom, wenn die Expression von CB₁ im Tumor erhöht ist (37). Im Gegensatz hierzu ist der Einfluss der Cannabinoidrezeptoren-Expression beim hepatozellulären Karzinom auf den Krankheitsverlauf ein positiver. Beim hepatozellulären Karzinom können sowohl CB₁ als auch CB₂ überexprimiert sein, wobei das in diesem Fall mit geringeren Zelltypen und einer besseren Prognose korreliert (38). Sowohl in Astrozytomen als auch in Glioblastomen wurden erhöhte Expressionsniveaus des CB₂ Rezeptors nachgewiesen, was mit einer höheren Malignität und höherem histologischem Grad korrelierte (39,40). In Glioblastomen liegt das Expressionsniveau von CB₁ signifikant unter dem von gesundem Gehirngewebe. In anderen Gliomen konnte kein signifikanter Unterschied der CB₁-Expression detektiert werden (41). Eine andere Arbeitsgruppe kommt jedoch zu dem Ergebnis, dass beide Cannabinoidrezeptoren in Gliomen im Vergleich zu gesundem Gehirngewebe überexprimiert werden, während einzelne Enzyme des Endocannabinoid-Stoffwechsels vermindert exprimiert werden (42). Die Datenlage in der Fachliteratur ist demnach widersprüchlich, was in der vorliegenden Arbeit überprüft werden soll.

Sowohl *in vitro* als auch *in vivo* Studien haben gezeigt, dass pflanzliche und synthetische Cannabinoide über multiple Achsen antiproliferative Effekte auf Malignome ausüben (43). Auf der Suche nach neuen Behandlungsansätzen in der Onkologie sind sie schon seit über einem Jahrzehnt Gegenstand der Forschung (44). Die Substanzklasse wird zudem schon seit langer Zeit als supportives Therapeutikum in der Palliativmedizin geschätzt. Die positiven Effekte sind antiemetisch (45), schmerzlindernd (46) und appetitstimulierend (47). Zur Vollständigkeit sei erwähnt, dass Cannabinoide bei einer Vielzahl anderer Krankheiten eingesetzt werden, wie bei pharmakotherapieresistenten Epilepsien, neuropathischen Schmerzen und Muskelspasmen bei Multipler Sklerose und Fibromyalgie (48–50).

Cannabinoide sind die aktiven Wirkstoffe der Hanfpflanzen *Cannabis sativa*, *Cannabis indica* und *Cannabis ruderalis* und deren chemische Derivate (51). Diese Cannabispflanzen produzieren circa 70 Inhaltsstoffe, die sogenannten pflanzlichen Cannabinoide. Dazu zählen das Δ^9 -Tetrahydrocannabinol (THC), Cannabinol (CN), das

nicht psychoaktive Cannabidiol (CBD) und viele weitere (51). Das pflanzliche THC steht aufgrund seiner hohen Konzentration in Marihuana und auch seiner psychoaktiven Wirkung im Fokus der Wissenschaft, aber auch der öffentlichen Debatte um Rauschmittel (52). Zudem vermelden auch diverse Lebensmittelhersteller, darunter Heineken und die CocaCola Company, Interesse an der Kreation von cannabishaltigen Produkten, die mit den Attributen „gesundheitsförderlich“ und „recreational“ beworben werden sollen (53).

Mittlerweile existieren neben aus der Hanfpflanze gewonnenen Cannabinoiden auch synthetische Cannabinoide (54), die vor allem als illegale Betäubungsmittel unter den Namen „Spice“ oder „K2“ bekannt sind. Synthetische sowie pflanzliche Cannabinoide werden in einigen Staaten schon als Medikamente eingesetzt, um radio- und chemotherapie-assoziierte Nebenwirkungen zu mildern. Hierzu zählen Marinol® (THC), Cesamet® (THC-Analogen) und Sativex® (THC und CBD), die in einigen Staaten, unter anderem den Vereinigten Staaten von Amerika schon Medikamentenzulassungen haben (55).

Die Erforschung von Cannabinoiden als potentielle Wirkstoffe im Kampf gegen Krebsleiden begann schon in den Siebzigerjahren des 20. Jahrhunderts. 1975 veröffentlichten Munson et al. eine Arbeit, die zeigte, dass Δ 9-Tetrahydrocannabinol (THC), Cannabinol (CN) und in schwächerem Maße auch Cannabidiol (CBD) das Wachstum von *Lewis lung adenocarcinoma* Zellen inhibierten und bei oraler Gabe die Tumorgroße von in Mäuse implantierten *Lewis lung adenocarcinoma* verringerten und die Überlebensdauer der Tiere verlängerten (56). Mittlerweile wurden viele Signalwege identifiziert, die die genannten Effekte vermitteln.

Die antitumorösen Effekte der Cannabinoide wirken sich aus auf Proliferation, Apoptose, Angiogenese, Autophagie und Metastasierung, wie Abb. 3 illustriert.

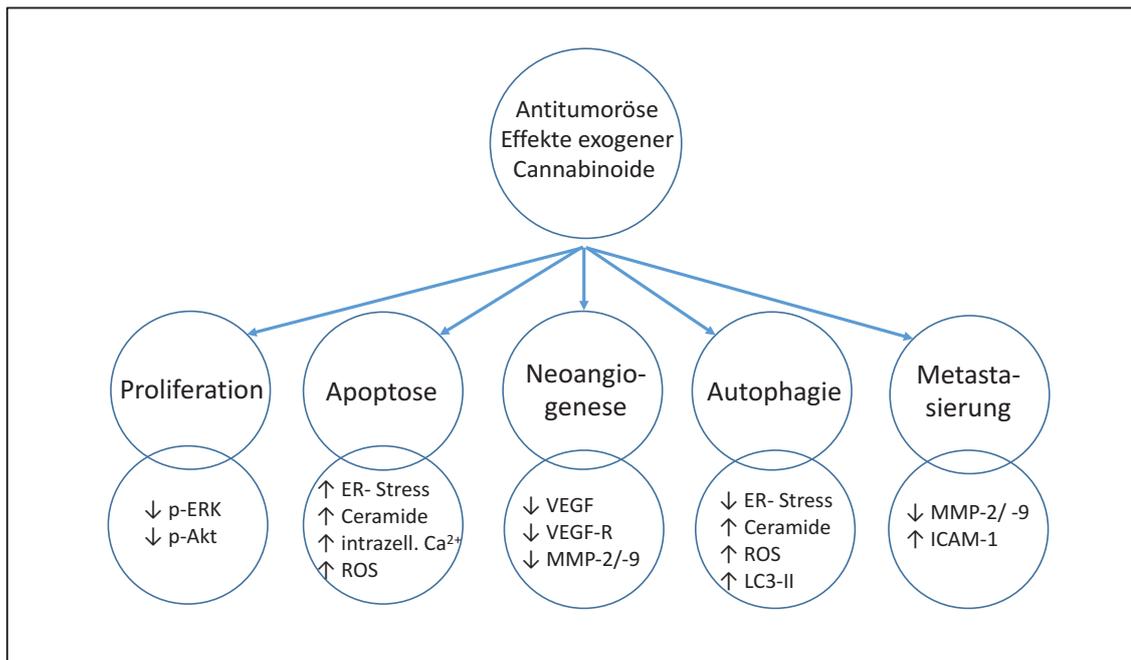


Abb. 3: **Exogene Cannabinoide beeinflussen das Tumorwachstum über multiple Signalwege** (35).
 Abkürzungen: ↑, gesteigert; ↓, vermindert; p-ERK, phosphorylierte extracellular signal-regulated kinase; p-Akt, phosphoryliertes Akt-strain transforming Protein (Proteinkinase B); ER, Endoplasmatisches Retikulum; ROS, reactive oxygen species; VEGF, vascular endothelial growth factor; VEGF-R, vascular endothelial growth factor receptor; MMP, Matrixmetalloprotease; LC3B-II, Microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3B-II; ICAM, intercellular adhesion molecule.

Tumorzellen können in ihrer **Proliferation** durch Cannabinoide gehemmt werden. Dies geschieht durch die Inhibition der durch den *epidermal growth factor* (EGF) aktivierten, proliferationsfördernden, ERK und Akt Signalwege, wie Elbaz et al. in Mammakarzinomzellen zeigten (57). Daraus resultiert eine verminderte Cyclin D und Cyclin E1 Expression und damit ein Zellzyklusarrest in der G0/G1 Phase (58).

Cannabinoide können auf verschiedenen Wegen zur **Apoptose** von Tumorzellen führen. In Gliomzellen führt die Behandlung mit THC zu einem gesteigerten Umsatz von Sphingomyelin, was zu der intrazellulären Akkumulation des proapoptotischen Sphingolipid-Bestandteils Ceramid führt (59). Ceramide inhibieren wiederum den Akt Signalweg, der bei Gliomen häufig durch eine zugrundeliegende Mutation im *PTEN*-Gen daueraktiviert ist (60). Des Weiteren führt die intrazelluläre Ceramid-Akkumulation zur sogenannten *unfolded protein response* (UPR) und zur gesteigerten Expression des mit Zellstress assoziierten Proteins p8. Protein p8 dient als Mediator von Cannabinoid-induziertem ER-Stress, indem es die Expression der Gene *Activating transcription factor 4* (ATF4), *C/EBP homologous protein* (CHOP) und *Tribbles homolog 3* (TRB3) steigert, wie in Pankreaskarzinomzellen, aber auch in Gliomzellen gezeigt

wurde (61–63). In Glioblastomzellen konnte nach CBD-Administration das gesteigerte Vorkommen von *reactive oxygen species* (ROS) detektiert werden, was zu reduzierter Zellviabilität führte (64). Zudem bewirkt die Behandlung mit Cannabinoiden eine erhöhte Konzentration von intrazellulärem Calcium, was mit proapoptotischen Prozessen und ER-Stress verknüpft ist (44).

In engem Zusammenhang mit Apoptose und ER-Stress steht die Induktion von **Autophagie** durch Cannabinoide (35). Autophagie ist ein zellulärer Prozess, der mit der Sequestrierung und dem Abbau von zellulärem Material einhergeht und der sowohl im Überleben als auch im Absterben der Zelle enden kann. Ob Autophagie zum Überleben oder Absterben der Zelle (in Abgrenzung zur Apoptose auch als „programmierter Zelltod Typ II“ bezeichnet) führt, hängt stark von den Begleitumständen und den vorhandenen Signalmolekülen ab (65). Salazar et al. zeigten, dass THC in der Glioblastomzelllinie U87MG ER-Stress und darauffolgend die Inhibition des Akt/mTORC1 Signalweges auslöst. Diese Vorgänge resultieren in Autophagie und der Akkumulation des Autophagosomen-Bestandteils *light chain 3B-II* (LC3B-II) (63). Unter welchen Behandlungsbedingungen exogene Cannabinoide fördernde oder hemmende Auswirkungen auf Autophagie haben, ist bislang noch unerforscht (35).

Die **Neoangiogenese** von Tumoren im Allgemeinen und Glioblastomen im Speziellen wurde schon vor längerer Zeit als Angriffspunkt für die Krebstherapie ins Auge gefasst. Jedoch enttäuschte der Angiogeneseinhibitor Bevacizumab in klinischen Studien im Einsatz gegen Glioblastome (66). Die Hemmung der Neoangiogenese durch Cannabinoide geschieht zum einen durch eine verminderte Produktion und Freisetzung von *vascular endothelial growth factor* (VEGF) und zum anderen durch eine verminderte Aktivierung des VEGF-Rezeptors 2, wie Blázquez et al. in Gliomen und Glioblastomen zeigten (67). Darüber hinaus wird die Expression von mehreren Matrixmetalloproteasen (MMP) inhibiert, die die Extrazellulärmatrix degradieren und damit eine Kapillareinsprossung ermöglichen (68). In Lungenkarzinomzellen wurde nachgewiesen, dass diese nach THC-Behandlung das Protein *tissue inhibitor of matrix metalloproteinases-1* (TIMP-1) freisetzen, Matrixmetalloproteasen inhibieren und somit auch die Neoangiogenese hemmen (69).

Carracedo et al. zeigten, dass nach THC-Injektion in Gliome in Mäusen eine verminderte **Tumorinfiltration** in das umliegende Gewebe stattfindet. Dies wird durch

die verminderte Expression von MMP-2 hervorgerufen, was in *in vitro* Experimenten und bei zwei an einem rekurrenten Glioblastom leidenden Patienten bestätigt wurde. Interessanterweise wurde dieser Effekt sowohl durch die Inhibition der Ceramid-Synthese als auch einen p8 *knockdown* ausgelöscht, was die wichtige Rolle dieser stressinduzierten Signalkaskade unterstreicht (68).

Neben der Reduktion der Tumorinvasion in das umliegende Gewebe wird auch die **Metastasenbildung** durch Cannabinoide vermindert (70). Der zugrundeliegende Mechanismus ist die Induktion des *intercellular adhesion molecule-1* (ICAM-1) durch CBD-Behandlung, welches wiederum die Expression von TIMP-1 steigert. Zudem fördert ICAM-1 die Rekrutierung und Adhäsion von Immunzellen zu den CBD-behandelten Tumorzellen, wie in Lungenkarzinomzellen gezeigt wurde (71).

2009 wurde eine Pilotstudie an neun, an einem rekurrenten Glioblastom leidenden Patienten vorgestellt, die eine Verabreichung von THC intrakraniell in das Tumorbett erhalten hatten. Dabei wurde aufgezeigt, dass die Tumorthherapie mit THC keine Nebenwirkungen hervorrief und nur sehr milde psychotrope Effekte im Sinne von kurz andauernder Euphorie hatte. Radiologisch zeigte sich ein verlangsamtes Tumorwachstum, die histologische Aufarbeitung posttherapeutisch entnommener Tumorproben zeigte eine verminderte Zellproliferation. Das mediane Überleben war 24 Wochen, wobei zwei der neun Patienten fast ein Jahr überlebten (72).

Zusätzlich zu den vielversprechenden *in vitro* und *in vivo* Forschungsergebnissen ist beachtlich, dass sich die antitumorösen Eigenschaften von Cannabinoiden auf die Tumorzellen begrenzt zu sein scheinen. Gliazellen und Neuronen werden von Cannabinoiden nicht negativ affektiert, vielmehr konnte ein protektiver Effekt für Astrozyten (73), Oligodendrozyten (74) und Neuronen (75) nachgewiesen werden.

1.4. Pharmakologische Beeinflussung des endogenen Cannabinoidsystems

Wie schon in Kapitel 1.3. erläutert, existieren diverse Substanzklassen, die das ECS beeinflussen. Es lassen sich Agonisten und Antagonisten an den verschiedenen Rezeptoren unterscheiden, wobei die Agonisten mit dem Überbegriff Cannabinoide versehen sind. Zu den Agonisten gehört die sehr große Gruppe der Cannabispflanzen-Derivate, Phytocannabinoide genannt, von denen über 110 bekannt sind (76). Obwohl

sie strukturell nicht mit den endogenen Cannabinoiden verwandt sind, agieren sie als Agonisten an den CB₁ und CB₂ Rezeptoren. Innerhalb dieser Gruppe kann man anhand der psychoaktiven Wirkung differenzieren. Das bekannteste Phytocannabinoid Δ^9 -**Tetrahydrocannabinol (THC)** verursacht starke psychogene Effekte, unter anderem Euphorie, veränderte Sinneswahrnehmungen, psychomotorische Sedierung und Beeinträchtigung von Erinnerung und Konzentrationsfähigkeit (77). **Cannabidiol (CBD)** sowie **Cannabinol (CN)** besitzen keine Psychoaktivität, jedoch auch eine geringere Affinität zu den Cannabinoidrezeptoren (77). Neben den Phytocannabinoiden, die auch synthetisch hergestellt werden können, wurden synthetische Cannabinoide kreiert, die sehr viel stärkere Rezeptorbindungs-Eigenschaften aufweisen und teilweise psychotrope Effekte aufweisen. Sie werden für Forschungszwecke eingesetzt und darüber hinaus als illegale Betäubungsmittel gehandelt (54). Es existiert eine breite Palette synthetischer Cannabinoidrezeptor-Antagonisten, als Beispiel soll nur eine Substanz erwähnt werden. SR141617 ist ein reiner CB₁ Antagonist, genauer gesagt ein inverser Agonist an diesem Rezeptor. Diese Substanz wurde unter dem Wirkstoffnamen Rimonabant als Medikament im Nikotinentzug und in der Adipositas-Behandlung eingesetzt, verlor jedoch aufgrund schwerwiegender psychischer Nebenwirkungen wieder seine Zulassung (78).

Auch das als Paracetamol bekannte Acetaminophen übt eine Wirkung auf das ECS aus. Paracetamol hat eine analgetische (schmerzlindernde) und antipyretische (fiebersenkende) Wirkung, steht auf der Liste der unentbehrlichen Medikamente der WHO und zählt zu den meistverwendeten Medikamenten weltweit (79).

Paracetamol wurde 1878 entdeckt und zuerst als Entwurmungsmittel erprobt. Es half zwar nicht gegen Würmer, aber es senkte das Fieber der Patienten (80,81). Der Wirkmechanismus des Stoffes ist sehr komplex und noch nicht vollständig aufgeklärt. Nach seiner Deacetylierung in der Leber wird die Substanz durch das Enzym *fatty acid amide hydrolase* (FAAH) mit Arachidonsäure konjugiert. Das Produkt dieser Reaktion wird als N-arachidinoyl-phenolamin, oder kurz AM404, bezeichnet (82). Es ähnelt in seiner chemischen Struktur dem Endocannabinoid Anandamid (83). AM404 entfaltet seine Wirkung im Gehirn, im Rückenmark und in den Spinalganglien. Seine Wirkung auf die Akteure des ECS ist in Abb. 4 illustriert. AM404 wirkt als schwacher Agonist am CB₁ und CB₂ Rezeptor. Außerdem inhibiert es sowohl den *anandamide membrane*

transporter (AMT) als auch die FAAH selbst. Dadurch wird die Konzentration der Endocannabinoide im synaptischen Spalt erhöht und ihre Wirkung verstärkt. Auch am TRPV₁ Rezeptor wirkt AM404 als Agonist (83,84). Diese Fakten könnten erklären, warum einige Patienten nach Paracetamoleinnahme eine euphorisierende, entspannende und beruhigende Wirkung beschreiben (85,86).

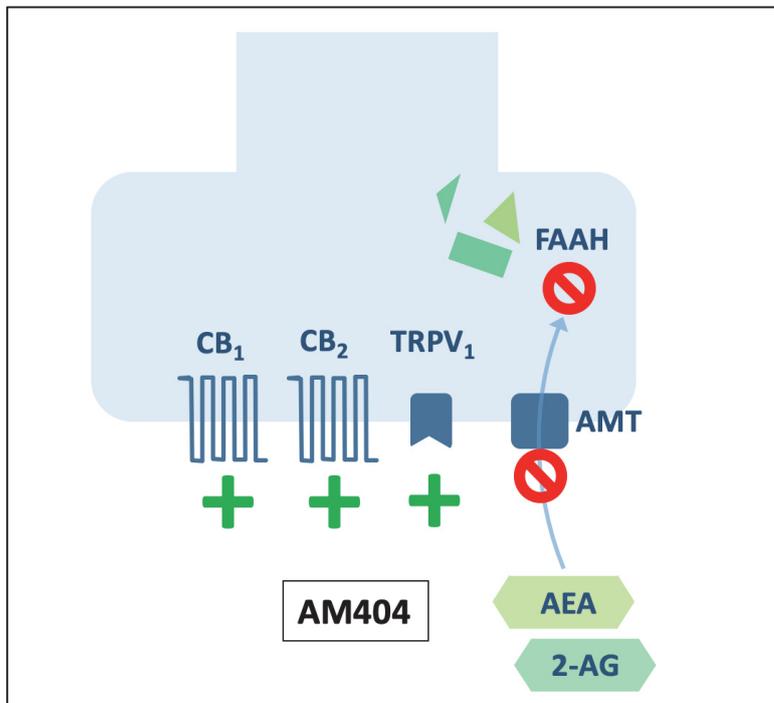


Abb. 4: **Interaktionen des Paracetamol-Metaboliten AM404 mit dem ECS.** Symbole: + Aktivierung; ⊖ Inhibition. Abkürzungen: CB₁, Cannabinoidrezeptor 1; CB₂, Cannabinoidrezeptor 2; TRPV₁, transient receptor potential vanilloid 1; FAAH, fatty acid amide hydrolase; AMT, anandamide membrane transporter, AEA, anandamide, 2-AG, 2-arachidonoylglycerol, AM404, N-arachidinoyl-phenolamin

Zudem hemmt Paracetamol die Cyclooxygenase-2 (COX-2), jedoch nur im ZNS und nicht in der Körperperipherie (87). Des Weiteren übt es einen serotonergen Effekt auf 5-HT₃-Rezeptoren aus (83).

Casper et al. publizierten im Jahr 2000, dass Paracetamol das Wachstum von Gliomzellen hemmt, während gesundes neuronales Gewebe davon unaffektiert bleibt (88). Dies ist möglicherweise auf die Inhibition der COX, die in C6 Gliomzellen überexprimiert wird, zurückzuführen (89). Außerdem vermittelt auch die *Reuptake*-Hemmung von Endocannabinoiden durch AM404 und damit ihre Aufkonzentration an den ECS-Rezeptoren eine zytotoxische Wirkung auf Gliomzellen, und zwar sogar schon in klinisch relevanten Dosen (90). Auf der anderen Seite scheint der Paracetamol-Metabolit AM404 im Rattengehirn in niedrigen Konzentrationen neuroprotektiv zu

sein, weil er die Akkumulation von ROS inhibiert. Dieser Effekt ist jedoch nur bei Dosen von unter 100 mg/kg Körpergewicht feststellbar, in höheren Dosen dreht er sich um (91). Allerdings beträgt die im klinischen Alltag angewandte Dosierung im Menschen sowieso nur 20 mg/kg Körpergewicht (90).

Antitumoröse Effekte wurden auch bei Arvanil festgestellt, ein Stoff, bei dem es sich um ein künstlich geschaffenes Hybrid des TRPV₁-Liganden und exogenen Vanilloids Capsaizin und dem endogenen Cannabinoid Anandamid handelt (92). Arvanil agiert hauptsächlich über die Aktivierung des TRPV₁-Rezeptors und induziert ER-Stress in Glioblastomzellen, welcher in Apoptose mündet (93). Stock et al. zeigten, dass neuronale Stamm- und Vorläuferzellen *in vivo* zu malignen Gliomzellen migrieren können und in diesen durch die Ausschüttung von endogenen Vanilloiden, die strukturell Arvanil ähneln, Apoptose auslösen (93).

1.5. Fragestellung und Ziel dieser Arbeit

Wie schon dargelegt, scheint die Expression der ECS-assoziierten Rezeptoren in Gliomen im Vergleich zu normalen Hirngewebe verändert zu sein und möglicherweise auch mit dem Malignitätsgrad der Tumoren zu korrelieren. Während die Arbeitsgruppen sich darin einig sind, dass die CB₂-Expression in Gliomen hochreguliert ist und positiv mit der Malignität des Tumors korreliert, herrscht Unklarheit, inwiefern die Expression von CB₁ in malignen Gliomen verändert ist. Auch die TRPV₁-Expression scheint bei steigendem WHO-Grad zuzunehmen. In der eigenen Arbeit sollen diese Aussagen an einem Set von 61 astrozytären Gliomen überprüft werden und der Zusammenhang zwischen der Expression von CB₁, CB₂ und TRPV₁ in Gliomen und dem Malignitätsgrad bestimmt werden. Hierzu wurde die aus den Tumorgewebeproben extrahierte RNA in cDNA umgeschrieben und mittels *real time* PCR auf die Expression der infrage stehenden Gene untersucht.

Mehrere Publikationen haben berichtet, dass und wie Cannabinoide auf Tumorzellen – darunter Glioblastomzellen - zytotoxisch wirken. Dafür werden jedoch relativ hohe Konzentrationen benötigt, die eventuell in der klinischen Praxis auf Grund von Nebenwirkungen nicht einsetzbar sind. An dieser Stelle sei an den Paracetamol-Metabolit AM404 erinnert, welcher das ECS direkt an seinen Rezeptoren CB₁, CB₂ und TRPV₁ stimuliert und auch indirekt wirkt, in dem er die Wiederaufnahme und den

Abbau der endogenen Cannabinoide hemmt. In der eigenen Arbeit sollte untersucht werden, ob es bei der gleichzeitigen Behandlung von Glioblastomzellen mit Cannabinoiden und AM404 zu synergistischen Effekten kommt und ob dadurch die zytotoxische Wirkung gesteigert werden kann. Zum Einsatz kamen dabei die Cannabinoide Cannabidiol (CBD) und Cannabinol (CN), die keine psychoaktive Wirkung besitzen und in manchen Ländern schon als Medikamente zugelassen sind. Es sollte untersucht werden, ob durch eine gleichzeitige Behandlung mit AM404 schon bei niedrigeren Cannabinoid-Dosen ein zytotoxischer Effekt auftritt, als bei der Behandlung mit Cannabinoiden allein. Dies sollte anhand von Dosis-Wirkungskurven in sechs unterschiedlichen, etablierten Glioblastomzelllinien (A172, LN18, LN229, T98G, TP365MG, U87MG) überprüft werden.

In einem ersten Schritt wurden dazu Dosis-Wirkungskurven von AM404, CBD, CN und auch dem TRPV₁-Agonisten Arvanil bestimmt. In einem zweiten Schritt wurde eine kombinierte Behandlung mit AM404 und CBD beziehungsweise CN durchgeführt. Um herauszufinden, wie Glioblastomzellen auf eine länger andauernde Behandlung mit Cannabinoiden mit und ohne AM404 reagieren, wurden Klonalitätsanalysen mittels *Clonogenic Assays* durchgeführt, die auf eine 15-tägige Behandlung ausgelegt waren. Tabelle 1 gibt einen Überblick über die pharmakologischen Angriffspunkte der verwendeten Substanzen.

Tabelle 1: Übersicht über die Angriffspunkte der in dieser Arbeit verwendeten pharmakologischen Substanzen

Name	Angriffspunkte	Beschreibung
AM404	CB ₁ Agonismus CB ₂ Agonismus TRPV ₁ Agonismus AMT Inhibition FAAH Inhibition	Ein aktiver Metabolit von Paracetamol
Cannabidiol (CBD)	CB ₁ Agonismus CB ₂ Agonismus	Pflanzliches Cannabinoid, nicht psychoaktiv
Cannabinol (CN)	CB ₁ Agonismus CB ₂ Agonismus	Pflanzliches Cannabinoid, nicht psychoaktiv

Arvanil	TRPV ₁ Agonismus	Synthetisch, Eigenschaften eines endogenen Vanilloids und endogenen Cannabinoids
----------------	-----------------------------	--

Um die Mechanismen, die zu den zytotoxischen Effekten in Glioblastomzellen führen, weiter zu beleuchten, sollten die Zellen nach erfolgter Behandlung auf Zeichen für Apoptose, ER-Stress und Autophagie hin untersucht werden. Apoptose wurde mittels einer Annexin V/7AAD-Färbung durchflusszytometrisch detektiert. ER-Stress wurde mittels *real time* RT-PCR anhand der im Rahmen der *unfolded protein response* alternativ gespleißten mRNA von Xbp1 *short* ermittelt (94). Zum Nachweis von Autophagie wurden Western Blots für den Autophagosomen-Bestandteil LC3B-II durchgeführt. Mit diesen Methoden sollte das Wissen über die Rolle des endogenen Cannabinoidsystems (ECS) in malignen Gliomen vergrößert und möglicherweise neue Anhaltspunkte für klinische Einsatzmöglichkeiten von Cannabinoiden und Paracetamol im Kampf gegen maligne Gliome gefunden werden.

2. Material und Methoden

2.1. Materialien

2.1.1. Aktenzeichen des Ethikvotums

Für das vorliegende Projekt liegt ein Votum der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität vor (Studennummer 5335). Darüber hinaus liegt ein grundsätzliches Votum hinsichtlich der pseudonymisierten Verwendung von Tumorgewebeproben aus der ZNS-Tumorbank am Institut für Neuropathologie für Forschungszwecke vor (Studennummer 3005).

2.1.2. Biologische Materialien

cDNA aus menschlichen malignen Gliomen

Zur Charakterisierung der Expression der ECS-Rezeptoren auf mRNA-Ebene in Gliomen mittels semiquantitativer RT-PCR wurde die aus tiefgefrorenen Tumorgewebeproben extrahierte RNA in cDNA umgeschrieben. Hierfür wurden Proben aus diffusen Astrozytomen der WHO-Grade II und III sowie aus Glioblastomen, WHO-Grad IV untersucht, die gemäß der Kriterien der WHO-Klassifikation 2016 (4) diagnostisch in 10 diffuse Astrozytome, IDH-mutiert (WHO-Grad II), 4 diffuse Astrozytome, IDH-Wildtyp (WHO-Grad II), 9 anaplastische Astrozytome, IDH-mutiert (WHO-Grad III), 8 anaplastische Astrozytome, IDH-Wildtyp (WHO-Grad III), 28 Glioblastome, IDH-Wildtyp (WHO-Grad IV) und 2 Glioblastomen, IDH-mutiert (WHO-Grad IV) eingeteilt wurden. Die Bestimmung des *IDH1* und *IDH2* Mutationsstatus in den Tumoren erfolgte mittels Immunhistochemie für IDH1-R132H bzw. Sequenzierung der Mutations-Hotspots IDH1 Kodon 132 bzw. IDH1 Kodon 172. Die entsprechenden Informationen und die diagnostische Einteilung der Tumoren wurden von Frau Dr. Christiane B. Knobbe-Thomsen für diese Arbeit ermittelt und zur Verfügung gestellt. Zudem wurden in cDNA umgeschriebene RNA-Proben aus nicht-neoplastischen Hirngewebe (*normal brain*) untersucht (n= 14 Proben). Letztere RNA-Proben wurden kommerziell erworben (Agilent, Santa Clara, Kalifornien, USA).

Zelllinien

Es wurden Untersuchungen an insgesamt sechs humanen Glioblastomzelllinien durchgeführt. Dabei handelte es sich um die Zelllinien A172, LN18, LN229, T98G,

TP365MG und U87MG. Die Zelllinien A172, T98G und U87MG wurden von der American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, Vermont) erworben. Die Zelllinien LN18 und LN229 wurden über Herrn Prof. Dr. Michael Weller, Universitätsspital Zürich, von Frau Dr. Monika Hegi, Lausanne, Schweiz zur Verfügung gestellt. Die Zelllinie TP365MG wurde freundlicherweise von Herrn Professor Peter Collins, Cambridge, UK bereitgestellt.

Primer

Die verwendeten Primer wurden kommerziell von den Firmen Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, oder Eurofins, Luxemburg bezogen. Es handelte sich um *custom*-hergestellte Primer, die gegen die Sequenzen der humanen mRNAs der entsprechenden Gene gerichtet sind. Die Primersequenzen für die untersuchten Gene sind in Tabelle 2 aufgelistet.

Tabelle 2: Primer, ihre Nucleotidsequenzen und ihre Bezugsquelle

Ziel-mRNA	Nukleotidsequenz Vorwärts-Primer	Nukleotidsequenz Rückwärts-Primer	Hersteller
Arf1	5'- GACCACGATCCTCT ACAAGC-3'	5'- TCCCACACAGTGAA GCTGATG-3'	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
TRPV ₁	5'- CTGGAGAGCCTGCT GCTCTTC-3'	5'- GTCCGTCGTGCAGG TTGAGCAT-3'	Sigma-Aldrich
TRPV ₂	5'- CAGATAAGAGTCA A CCTCAACTAC-3'	5'- CTCTGGAAGTCCAG CCAGAT-3'	Sigma-Aldrich
CB ₁	5'- GGAACAGGACCAG AGAAGAG-3'	5'- CCATCTAGGATCGA CTTCATAAC-3'	Sigma-Aldrich
CB ₂	5'- GGAGAGGACAGGA A AACAAGT-3'	5'- GAGCCATTGCCTAT CTCTCGA-3'	Sigma-Aldrich
Xbp1 short	5'- TGAGTCCGCAGCA G GTGCAG-3'	5'-GGTCCAAGTTGTC CAGAATGC-3'	Sigma-Aldrich
Xbp1 long	5'- CCGCAGCACTCAGA CTACGT-3'	5'-GGTCCAAGTTGTC CAGAATGC-3'	Sigma-Aldrich und Eurofins, Luxemburg

Antikörper

Da es sich ausschließlich um Proben aus menschlichen Zellen handelte, waren die aufgeführten Primärantikörper auf *homo sapiens* ausgerichtet. Die Sekundärantikörper waren gegen Kaninchen-Antikörper gerichtet. Tabelle 3 listet die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper auf.

Tabelle 3: Antikörper, die in dieser Arbeit verwendet wurden

Name	Verdünnung	Bestellnummer	Hersteller
Anti-TRPV1	1:500	NBP1-97417	Novus Biologicals, Littleton, Colorado, USA
Anti-TRPV2	1:500	SAB1101376	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Anti-CB1R	1:500	PAI-745	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Anti-LC3B-I/II	1:1000	2775	Cell Signaling Techno- logies Inc., Danvers, Massachusetts, USA
Anti-Vinculin	1:2000	ab129002	Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich
Anti- β Actin	1:2000	ab8227	Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich
Anti-Rabbit	1:10.000	926-32211	LI-COR, Lincoln, Nebraska, USA

2.1.3. Chemikalien, Kits, Verbrauchsmaterialien

Materialien für die Zellkultur

Tabelle 4 gibt eine Übersicht über die für Zellkulturarbeiten verwendeten Medien und Chemikalien.

Tabelle 4: Auflistung der in der Zellkultur verwendeten Medien und Chemikalien.

Zellkulturmaterial	Hersteller
DMEM, high glucose, no glutamine	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
DPBS, calcium, magnesium	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
DPBS, no calcium, no magnesium	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
DMSO	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Fetal bovine serum, dialyzed	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Trypsin-EDTA (0,05 %), phenol red	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA

Substanzen mit Wirkung auf das ECS

In Tabelle 5 sind die für die *in vitro* Untersuchungen verwendeten Substanzen mit Angaben zu den verwendeten Lösungsmitteln, Konzentrationen und Bezugsquellen angegeben.

Tabelle 5: Weitergehende Angaben zu den pharmakologischen Substanzen mit Wirkung auf das ECS, die in dieser Arbeit verwendet wurden (vgl. auch Tabelle 1).

Substanz	Lösungsmittel	Konzentration	Bestellnummer	Hersteller
Cannabinol	Methanol	1 mg/ml = 3,225 mM	C-046	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Cannabidiol	Methanol	1 mg/ml = 3,185 mM	C-045	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
AM404	Ethanol	40 mM	ab120095	Abcam, Cambridge, UK

Arvanil	Ethanol	50 mg/ml = 113,7 mM	SML0520	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
---------	---------	------------------------	---------	---

Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Die in dieser Arbeit verwendeten sonstigen Chemikalien und Verbrauchsmaterialien sind in Tabelle 6 zusammengefasst.

Tabelle 6: Auflistung der im Labor verwendeten Chemikalien und Verbrauchsmaterialien und ihrer Bezugsquelle

Produkt	Hersteller
Agar	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Agarose	Bio-Budget GmbH, Krefeld
Benzonase Nuclease - Novagen	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
β-Mercaptoethanol	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Chloroform	Merck KGaA, Darmstadt
Chromatography paper Grade 3mm CHR	Whatman GmbH, Dassel
Complete ULTRA Tablets, Mini, EDTA-free, EASYpac	Roche GmbH, Grenzach-Wyhlen
DNA Marker 100 bp	Bio-Budget GmbH, Krefeld
DNA Marker 1 kilo bp	Bio-Budget GmbH, Krefeld
dNTP (2'-desoxynucleotide-5'-triphosphate) Mix	Bio-Budget GmbH, Krefeld
Essigsäure	Merck KGaA, Darmstadt
Ethanol	Merck KGaA, Darmstadt
Hot Star Taq DNA Polymerase	Qiagen GmbH, Hilden
Isopropanol	Merck KGaA, Darmstadt
Magnesiumchlorid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Methanol	Merck KGaA, Darmstadt
Midori Green Advanced DNA Farbstoff	Nippon Genetics Europe GmbH, Düren

Milchpulver	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Nitrocellulose Blotting Membrane	GE Healthcare Life Science; Buckinghamshire, UK
NuPage Novex 4-12% Bis-Tris Protein Gels, 15-well	Novex life technologies, Waltham, Massachusetts, USA
NuPAGE Novex 4-12% Bis-Tris Protein Gels, 12-well	Novex life technologies, Waltham, Massachusetts, USA
NuPAGE Novex 4-12% Bis-Tris Protein Gels, 10-well	Novex life technologies, Waltham, Massachusetts, USA
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
PCR-Platten	Applied Biosystems, Foster City, Kalifornien, USA
Penicillin (10.000 IU/ ml)-Streptomycin (10 mg /ml)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
PhosSTOP™	Roche GmbH, Grenach-Wyhlen
Prestained Proteinmarker	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
PstI	New England BioLabs, Ipswich, Massachusetts, USA
CutSmart® Buffer	New England BioLabs, Ipswich, Massachusetts, USA
SuperScript® III Reverse Transkriptase	Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA
Taq DNA Polymerase	Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA
Tris-Base (2-Amino-2-hydroxymethylpropane-1,3-diol)	Merck KGaA, Darmstadt
TritonX-100	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
TRIzol®-Reagenz	Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA
Tween-20	Carl Roth GmbH, Karlsruhe

3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromid MTT	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
MicroAmp® Fast Optical 96-Well Reaction Plate	Applied Biosystems, Foster City, Kalifornien, USA
RNase-free-Water	Qiagen GmbH, Hilden

Puffer und Lösungen

Die in dieser Arbeit im Labor selbst hergestellten Puffer und Lösungen sind in Tabelle 7 zusammengefasst.

Tabelle 7: Im Labor selbst hergestellte Puffer und ihre Zusammensetzung

Puffer	Zusammensetzung
Transferpuffer (Western Blot)	25 mM TRIS 0,2 M Glycine 20 % MeOH
Laemmli Puffer (wird in aufzutragender Probe 4-fach verdünnt)	100 mM TRIS 6 % SDS 40 % Glycerol 4 % 2-Mercaptoethanol Bromphenolblau H ₂ O
Laufpuffer für SDS-Page (Western Blot)	192 mM Glycin 25 mM TRIS 0,1 % SDS H ₂ O
MTT-Lösung	5 mg/ml MTT DPBS (pH 7,5)
MTT- Assay Solubilisierungs -Lösung	40 % DMF (in H ₂ O) 4 % AcOH (in H ₂ O) 16 % SDS (in H ₂ O)

RIPA-Puffer	50 mM TRIS-Cl pH 8 150 mM NaCl 1 % Nonoxinol-40 0,5 % Natriumdeoxycholat 0,1 % SDS
TBS-Tween20	10 mM TRIS 150 mM NaCl
Laufpuffer (Agarose-Gelelektrophorese von Nucleinsäuren)	2,0 M TRIS- Acetat 0,05 M EDTA

Kits

Die in dieser Arbeit verwendeten Kits sind in Tabelle 8 aufgelistet.

Tabelle 8: Auflistung der Kits, die in dieser Arbeit verwendet wurden

Name	Hersteller
FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit in Kombination mit 7-Amino-Actinomycin (7AAD)	BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey, USA
Invitrogen™ Platinum™ SYBR™ Green qPCR SuperMix-UDG	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Pierce BCA™ Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA

2.1.4. Geräte

Die in dieser Arbeit verwendeten Geräte werden in Tabelle 9 zusammengefasst.

Tabelle 9: Auflistung der verwendeten Geräte

Instrumente	Hersteller
BD FACS Aria™ II Flow Cytometer	BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey, USA
Gelkammern für Agarosegele	PeqLab GmbH, Erlangen

Gelkammer (Protein), Mini Protean	BioRad GmbH, München
Kühlzentrifuge EBA 12R	Hettich GmbH, Tuttlingen
MilliQ Integral Wasseraufbereiter	Merck KGaA, Darmstadt
Multi-Mode Validation Plate	Molecular Devices, Silicon Valley, Kalifornien, USA
PCR Thermocycler T3	Biometra GmbH, Göttingen
Photometer NanoDrop ND-1000	PeqLab GmbH, Erlangen
PyroMark Q24	Quiagen GmbH, Hilden
QUANTUM ST5	Vilber, Eberhardzelle
Realtime PCR StepOnePlus™	Applied Biosystems, Foster City, Kalifornien, USA
Schüttler 3013	GFL GmbH, Burgwedel
Stromversorgung für Gelkammer PowerPac 3000	BioRad GmbH, München
Thermoblock TD	Falc, Treviglio, Italien
Tischzentrifuge 5417	Eppendorf AG, Hamburg
VI-CELL XR Cell Viability Analyzer	Beckman Coulter, Brea, Kalifornien, USA
Wasserbad	GFL GmbH, Burgwedel
Zellkulturinkubator: CB160	Binder GmbH, Tuttlingen
Zentrifuge 46R	Hettich GmbH, Tuttlingen
Zentrifuge 5424	Eppendorf AG, Hamburg
Multipette E3	Eppendorf AG, Hamburg
Odyssey® CLx Imaging System	Li-Cor Biosciences Inc, Lincoln, Nebraska, USA

2.2. Methoden

2.2.1. Zellbiologische Methoden

Kultivierung von Gliomzelllinien

Die in dieser Arbeit verwendeten Gliomzelllinien wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Als Zellkulturmedium wurde *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) mit 4,5 g/L Glucose verwendet, zu dem 10 % hitzeinaktiviertes fetales Kälberserum

(*heat inactivated fetal calf serum*, HI-FCS) und 1 % Penicillin-Streptomycin (10.000 IU Penicillin/ ml; 10 mg Streptomycin/ ml) hinzugefügt wurde. Bei einer Konfluenz von 70-90 % wurden die Zellen passagiert. Hierfür wurde das Medium abgenommen, die Zellen kurz mit *Phosphate-buffered saline* (PBS) ohne Calcium und Magnesium gespült und dann mit 0,05 % Trypsin bedeckt, um sie von der Zellkulturschale und voneinander zu dissoziieren und eine Einzelzellsuspension zu erhalten. Nach etwa 6-minütiger Inkubation wurden die gelösten Zellen mit frischem Medium abgenommen und neu ausplattiert oder zur weiteren Verarbeitung gezählt.

Um Zellen einzufrieren, wurden trypsinierte Zellen in Medium bei 1000 Umdrehungen pro Minute (rounds per minute – rpm) 5 min abzentrifugiert. Das überstehende Medium wurde abgenommen und das Zellpellet wurde in Einfriermedium bestehend aus 90 % HI-FCS und 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO) resuspendiert und in einem Kryoröhrchen zunächst bei -80 °C und anschließend dauerhaft in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Dosis-Wirkungs-Kurven

Um die dosisabhängige zytotoxische Wirkung der in der vorliegenden Arbeit verwendeten pharmakologischen Substanzen zu bestimmen, wurden Dosis-Wirkungs-Kurven angefertigt. Hierfür wurden je 5000 Zellen in 50 µl Medium auf 96-Well-Platten ausplattiert. In die äußeren Wells der Platte wurden keine Zellen gesät, sondern nur 50 µl Zellkulturmedium gegeben. Nach 24 h wurden die zu untersuchenden Stoffe in Zellkulturmedium verdünnt und jeweils 50 µl der verdünnten Substanz zu den Zellen hinzugefügt, bzw. 50 µl reines Zellkulturmedium als Kontrolle. Erst wurden für die Pharmaka Cannabidiol, Cannabinol, AM404 und Arvanil einzelne Dosis-Wirkungs-Kurven angefertigt. In einem zweiten Schritt wurden Cannabidiol und Cannabinol jeweils in Kombination mit AM404 getestet. Als Kontrolle wurde das Lösungsmittel der betreffenden Substanz äquivalent in Zellkulturmedium verdünnt und auf die Zellen gegeben. Es wurden im Sinne von technischen Replikaten immer drei Wells mit der gleichen Konzentration behandelt. Von jedem Experiment wurden drei biologische Replikate angefertigt. Im Anschluss an eine Inkubationszeit von 72 h wurde ein MTT Assay und eine spektrometrische Auswertung durchgeführt. Die Absorptionswerte der drei technischen Wells wurden gemittelt und auf die unbehandelte Kontrolle normalisiert (siehe unten).

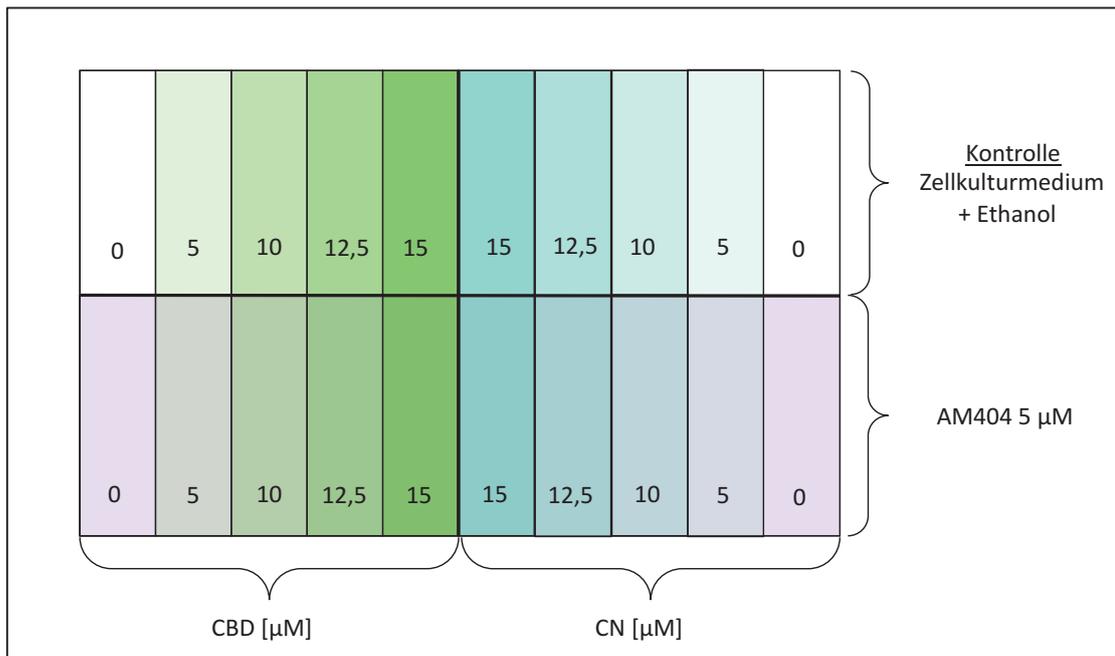


Abb. 5: Schematische Darstellung der Kombination von Cannabidiol (CBD) oder Cannabinol (CN) mit dem Paracetamol-Metaboliten AM404 in den Zellkulturexperimenten.

Abb. 5 zeigt, wie auf 96-Well-Platten die zytotoxische Wirkung von Cannabinoiden allein oder in Kombination mit AM404 getestet wurde. Auf die untere Hälfte der Platte wurde in jedes Well AM404 hinzugegeben, sodass die Konzentration 5 µM betrug. Auf die obere Hälfte der Platte wurde als Kontrolle Ethanol als Lösungsmittel von AM404 in der entsprechenden Konzentration hinzugegeben. Nun wurden zusätzlich vier verschiedene Verdünnungen von CBD und CN aufgetragen. Bei der Beschriftung der Abbildung handelt es sich immer um die finale Konzentration des Stoffes im Well. Nach 72 h Inkubationszeit wurden MTT Assays zur Bestimmung der Viabilität durchgeführt, wie unten beschrieben.

MTT Assay

Mit diesem Assay wurde der Anteil vitaler Zellen in den Dosis-Wirkungs-Kurven bestimmt. 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromid (MTT) wird von vitalen Zellen aufgenommen und zu einem lilafarbenen Formazanprodukt konvertiert. Dieses lässt sich spektrometrisch quantitativ erfassen (95). Zu den in 96-Well-Platten behandelten Zellen wurden 10 µl MTT-Reagenz hinzugefügt, sodass eine MTT-Konzentration von 0,45 mg/ml im Zellkulturmedium erreicht wurde. Nach einer Inkubation von 120 Minuten wurden 100 µl Solubilisierungs-Lösung hinzugegeben. Die Solubilisierungs-Lösung löste die Zellen und die darin befindlichen Formazankristalle auf. Im Anschluss wurde die Absorption bei 570 nm und 690 nm bestimmt und auf die

Negativkontrolle (d.h. unbehandelte, nur mit MTT gefärbte Zellen) normalisiert.

Annexin V Apoptose Assay

Um nachzuweisen, dass Agonisten des ECS Apoptose in Glioblastomzellen auslösen, wurde eine Annexin V Färbung durchgeführt, welche durch Durchflusszytometrie ausgewertet wurde. Hierfür wurde das Annexin V Kit von BD Pharmingen benutzt. Annexin V bindet an Phosphatidylserin, welches nur auf der Oberfläche apoptotischer Zellen zu finden ist. Zusätzlich wurde auch noch eine 7-Amino-Actinomycin (7-AAD) Färbung durchgeführt, welche durch DNA-Interkalation avitale Zellen markiert. Durch diese Doppelfärbung lassen sich vitale, apoptotische und nekrotische Zellen unterscheiden.

Zellen der Zelllinien A172 und LN229 wurden passagiert und zu je 150.000 Zellen pro Well auf 6-Well-Platten gesät. Nach 24 h Inkubationszeit mit normalem Zellkulturmedium wurde dieses abgenommen und durch Kulturmedium, das mit den zu testenden Substanzen versetzt war, ersetzt. Tabelle 10 zeigt die angewandten Behandlungsbedingungen. Pro Well wurden 3 ml Kulturmedium aufgebracht.

Tabelle 10: In Annexin V Apoptose Assays angewandte Behandlungsbedingungen.

1	CBD	10 μ M
2	CN	10 μ M
3	AM404	5 μ M
4	AM404	10 μ M
5	Arvanil	37 μ M
6	CBD + AM404	10 μ M + 5 μ M
7	CN + AM404	10 μ M + 5 μ M
8	Kontrolle	EtOH + MeOH
9	Staurosporin (Positivkontrolle)	4 μ M

Nach 48 h Inkubation unter Behandlungsbedingungen wurde das Kulturmedium erneut abgenommen. Das Apoptose-induzierende Staurosporin (96) wurde erst zwei Stunden vor dem Annexin V Assay auf die für die Positivkontrolle bestimmten Zellen aufgetragen.

Die trypsinisierten Zellen wurden mitsamt dem Behandlungsmedium in Röhren gepoolt, dann wurden die Zellen für 15 Minuten mit Annexin V und 7-AAD in Binding Buffer inkubiert. Nach zweimaligem Waschen der Zellen mit Binding Buffer wurde eine *FACS (fluorescence-activated cell scanning)* Analyse der Zellen durchgeführt.

Clonogenic Assay

Um das Proliferationsverhalten der Zelllinien über einen längeren Zeitraum unter dem Einfluss der oben beschriebenen Substanzen zu untersuchen, wurden Clonogenic Assays durchgeführt. Hierzu wurden jeweils 1800 Zellen der Zelllinien A172, LN229 und TP365MG auf 6 cm Zellkulturschalen ausplattiert. Nach 24 h wurde das Zellkulturmedium abgenommen und 3 ml Zellkulturmedium, versetzt mit der zu untersuchenden Substanz, aufgetragen. Nach 5 Tagen wurde das Medium gegen frisches, wieder mit der zu untersuchenden Substanz versetztes Medium, ausgewechselt. Nach erneut 5 Tagen Inkubation wurden die Zellen mit Kristallviolett angefärbt und nach mehreren Waschgängen wurden die Zellkulturschalen mit dem LiCor Quantum St5 Gerät gescannt.

2.2.2. Molekularbiologische Methoden

RNA-Extraktion und cDNA-Synthese

Um Aufschluss über die mRNA-Expression von Genen in den kultivierten Zelllinien zu erhalten, wurden RNA-Extraktionen und im Anschluss daran cDNA-Synthesen durchgeführt. Es wurden hierfür die Zelllinien A172, LN18, LN229, T98G, TP365MG und U87MG verwendet. Die kultivierten Zellen wurden zu je 150.000 pro Well auf 6-Well Platten ausgesät. Nach 24 Stunden Inkubationszeit wurde das Zellkulturmedium abgenommen und eine RNA-Extraktion mit TRIzol® und mehrere Aufreinigungsschritte mit Isopropanol und Ethanol durchgeführt (97).

Um Anhand der Xbp1 *short* Expression zu prüfen, ob die in dieser Arbeit verwendeten Substanzen ER-Stress induzieren, wurden Glioblastomzellen der Zelllinien A172, LN229 und TP365MG 2 h mit diesen Substanzen inkubiert, bevor eine RNA-Extraktion durchgeführt wurde. Dabei handelte es sich um die folgenden Substanzen und Konzentrationen:

- Cannabinol (CN), 10 µM
- Cannabidiol (CBD), 10 µM
- AM404, 5 µM
- CN10 µM kombiniert mit AM404 5 µM
- CBD 10 µM kombiniert mit AM404 5 µM
- Arvanil, 37 µM

- Methanol, 0,006 %
- Ethanol, 0,0001%
- Methanol 0,006% kombiniert mit Ethanol 0,0001%

Für diesen Versuchsaufbau wurden die Zellen wie oben beschrieben auf 6-Well Platten ausplattiert und 24 h mit normalem Zellkulturmedium inkubiert. Danach wurde das Zellkulturmedium abgenommen und die Zellen wurden für 2 h mit den oben genannten Substanzen, gelöst in Zellkulturmedium, behandelt. Danach erfolgte die RNA-Extraktion nach Protokoll.

Die Konzentration der extrahierten RNA wurde mittels eines NanoDrop Spektrometers ermittelt, um so die für die cDNA Synthese benötigte Menge zu berechnen. Die cDNA Synthese wurde nach Protokoll des Herstellers ausgeführt, wobei 1 µg RNA eingesetzt wurde und Random Hexamer Primer benutzt wurden. Das cDNA-Produkt der Synthese wurde zur Verwendung 1:20 mit ddH₂O verdünnt.

PCR (polymerase chain reaction)

Für die Polymerasekettenreaktion wurden die Primer in einer 10 mM Konzentration verwendet. Tabelle 11 listet die Zusammensetzung eines einfachen PCR-Ansatzes auf. Es wurden jeweils entsprechende Positiv- und Negativkontrollen mitgeführt.

Tabelle 11: Zusammensetzung eines einfachen PCR Ansatzes

10x Buffer	2 µL
dNTPs (10mM)	0,5 µl
Forward Primer (10µM)	0,5 µl
Reverse Primer (10 µM)	0,5 µl
MgCl ²⁻ (50 mM)	0,5 µl
ddH ₂ O	12,9 µl
Taq-Polymerase	0,1 µl
cDNA	3 µl
insgesamt	20 µl

Die Zyklen der PCR wurden folgendermaßen im Thermocycler durchlaufen (Tabelle 12):

Tabelle 12: Temperaturen und Dauer der PCR-Schritte

95 °C	15 min	
95 °C	20 sek	30 oder 40
56 °C	20 sek	Wiederholungen
72 °C	20 sek	
72 °C	10 min	
4 °C	∞	

Für die anschließende Gel-Elektrophorese wurden die PCR-Produkte jeweils mit 5 µl Agarose-Ladepuffer versetzt und sodann auf ein 1,5-2,5 % Midori-Green gefärbtes Agarosegel aufgetragen. Die Laufzeit der Gel-Elektrophorese betrug 20 min bei 180 V. Bei dem in den Agarose-Gelen enthaltenen Midori-Green handelt es sich um einen DNA-Farbstoff, der wie Ethidiumbromid mit Hilfe von UV-Licht visualisiert wird, jedoch nicht toxisch und nicht kanzerogen ist. Die Gele wurden entsprechend in einer GelDoc-Station visualisiert und dokumentiert.

Real time PCR

Die *real time PCR* wurde entsprechend des Protokolls des Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG Herstellers ausgeführt. Wie auch bei der konventionellen PCR wurden die Primer in einer Konzentration von 10 µM verwendet. Die Zusammensetzung der Komponenten für einen einfachen Ansatz war wie folgt (Tabelle 13):

Tabelle 13: Zusammensetzung eines einfachen real-time PCR-Ansatzes

Platinum® SYBR® Green	10 µl
qPCR SuperMix-UDG	
ddH ₂ O	5 µl
Forward Primer (10 µM)	1 µl
Reverse Primer (10 µM)	1 µl
cDNA	3 µl
insgesamt	20 µl

Als Referenz-cDNA wurde umgeschriebene *Human Reference RNA* von Agilent Technologies eingesetzt. Auf diese Referenz wurde die mittels endogener Kontrolle ermittelte relative Expression normalisiert (sog. "Normalisierte Expression"). Als endogene Kontrolle wurde die Expression des das *Housekeeping-Gens ARF1 (ADP-ribosylation factor 1)* benutzt. Alle Proben wurden in Triplets untersucht. Die mathematische Auswertung erfolgte nach der Delta-Delta-CT Methode nach Livak und Schmittgen, die durch die StepOne™ Software Version 2.3 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA) ausgeführt wurde (98).

Protein-Extraktion

Zellen wurden passagiert und zu je 150.000 auf 6-Well-Platten ausgesät. Nach 24 h Inkubation wurde das Zellkulturmedium abgenommen und die Proteinextraktion durchgeführt. Zum Nachweis von Autophagie wurden die Zellen vor der Proteinextraktion mit verschiedenen Substanzen behandelt (s.u.). Die Zellen wurden mit gekühltem PBS im Well gewaschen. Dann wurden pro Well 100 µl Mastermix nach der Zusammensetzung aus Tabelle 14 aufgetragen.

Tabelle 14 Zusammensetzung des Mastermixes für die Proteinextraktion

RIPA- Puffer	10 ml
Benzonase	10 µl
Complete Ultra	1 Tablette

Mit Hilfe eines Plastikspatels wurde der Mastermix samt lysierter Zellen in Eppendorf-Röhrchen transferiert und 30 Minuten auf einem Drehrad bei 4°C inkubiert. Im nächsten Schritt wurde die Zelllösung für 10 Minuten bei 14.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der die Proteine enthaltende Überstand wurde in neue Eppendorf-Röhrchen transferiert.

Protein-Quantifizierung

Um festzustellen, in welcher Konzentration Proteine im Lysat vorhanden sind, wurde das Pierce™ Protein Assay Kit nach den Instruktionen des Herstellers verwendet (99).

Western Blot Analyse

Von den Proben wurden jeweils 20 µg Protein mit 5 µl Laemmli-Puffer versetzt und 2 min bei 80 °C aufgeköcht. Danach wurden die Proteinproben in die Taschen des Bis-

Tris-Gels geladen. Zur Identifikation des Molekulargewichts der Proteinbanden wurde in einer separaten Tasche ein vorgefärbter Page Ruler Marker mit auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese lief für ca. 65 min bei 160 V. Das Bis-Tris-Gel wurde aus der Gelkammer entnommen und auf eine zurechtgeschnittene Nitrocellulosemembran aufgelegt. Das Blotting der aufgetrennten Proteine erfolgte bei 250 mA für 180 min und unter Kühlung durch ein Eisbad.

Um festzustellen, ob die Proteine erfolgreich auf die Nitrocellulosemembran transferiert worden waren, wurde eine Ponceau S-Färbung durchgeführt. Dabei wurde die rote Farblösung kurz auf die Membran gegeben und danach mit TBST wieder abgespült. Hierdurch wurden die Proteinbanden visualisiert. Die Ponceau S-Färbung konnte anschließend wieder restlos von der Membran abgewaschen werden.

Das Blocken der unspezifischen Proteinbindungsstellen auf der Nitrocellulosemembran wurde mit 5 % Milchpulver in TBST durchgeführt. Die Inkubationszeit war 60 min bei Raumtemperatur auf dem Schüttler. Danach wurde die Milchpulverlösung abgenommen und die Nitrocellulosemembran wurde zweimal für 10 min mit TBST gewaschen. Darauf folgte die Inkubation mit dem Primärantikörper. Dieser wurde den Herstellerangaben gemäß in TBST mit 5 % BSA verdünnt und auf die Membran gegeben. Die Inkubation erfolgte bei 4 °C über Nacht. Nachdem der Primärantikörper von der Membran abgenommen worden war, wurde die Membran wieder zweimal für je 10 min mit TBST gewaschen. Dann wurde der nach den Herstellerangaben in TBST mit 5 % Milchpulver 1:10.000 verdünnte fluoreszenzmarkierte Sekundärantikörper auf die Membran gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 60 min bei Raumtemperatur auf dem Schüttler wurde der Sekundärantikörper abgenommen und die Membran wurde erneut zweimal für je 10 min mit TBST gewaschen. Zuletzt wurde der Western Blot auf dem LI-COR Gerät eingelesen.

2.2.3. Statistische Auswertung

Dosis-Wirkungskurven

Zur statistischen Verarbeitung der Daten wurden die Programme Microsoft Excel 2016 (Microsoft® Corporation, Redmont, Washington, USA) und GraphPad PRISM 6 (GraphPad Company, San Diego, Kalifornien, USA) benutzt. Die Absorptionswerte der Versuchsbedingung wurden auf die Kontrollbedingung (d.h. Behandlung nur mit dem Lösungsmittel, in dem die Versuchssubstanz gelöst war) normalisiert und in

Prozentwerte transformiert. Anhand dieser Daten wurden nonlineare Regressionskurven berechnet, die in dieser Arbeit auf einer logarithmischen X-Achse dargestellt werden. Ob der inhibitorische Effekt einzelner Substanzen und einzelner Konzentrationen signifikant war, wurde anhand von ungepaarten, zweiseitigen t-Tests ermittelt. Um die inhibitorische Potenz der Cannabinoide allein mit derjenigen von Cannabinoiden in Kombination mit AM404 zu vergleichen, wurden ungepaarte, zweiseitige t-Tests zwischen den IC₅₀-Werten der Kurven durchgeführt.

Real time PCR

Die Rohdaten wurden aus der StepOne™ Software Version 2.3 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA) in Microsoft Excel exportiert und in GraphPad PRISM 6 weiterverarbeitet. Die Expressionswerte der getesteten Gene wurden auf die Expression des *housekeeping*-Gens *Arf1* in *human reference* cDNA normalisiert. In der aus 75 cDNA-Proben aus gesundem Gehirn (*normal brain*) und diffusen Astrozytomen und Glioblastomen bestehende Serie wurden Ausreißer durch das von GraphPad ROUT-Verfahren mit einer Falscherkennungsrate von 5 % eliminiert. Dann wurden die Expressionsniveaus der getesteten Gene in den Tumorentitäten mittels *one-way* ANOVA mit der Expression in *normal brain* verglichen.

3. Ergebnisse

3.1. Expression der Rezeptoren CB₁, CB₂ und TRPV₁ in astrozytären Gliomen und Glioblastomzelllinien

3.1.1. CB₁ mRNA-Expression in gesundem Gehirn und in astrozytären Gliomen

Eine Serie aus 75 cDNA-Proben bestehend aus 10 diffusen Astrozytomen, IDH-mutiert (WHO-Grad II), 4 diffusen Astrozytomen, IDH-Wildtyp (WHO-Grad II), 9 anaplastischen Astrozytomen, IDH-mutiert (WHO-Grad III), 8 anaplastischen Astrozytomen, IDH-Wildtyp (WHO-Grad III), 28 Glioblastomen, IDH-Wildtyp (WHO-Grad IV), 2 Glioblastomen, IDH-mutiert (WHO-Grad IV) sowie 14 nicht-neoplastischen Hirngewebeproben (als *normal brain* bezeichnet) wurde mit den oben spezifizierten Primern auf die Expression der mRNA des CB₁ Rezeptors hin untersucht (Abb. 6).

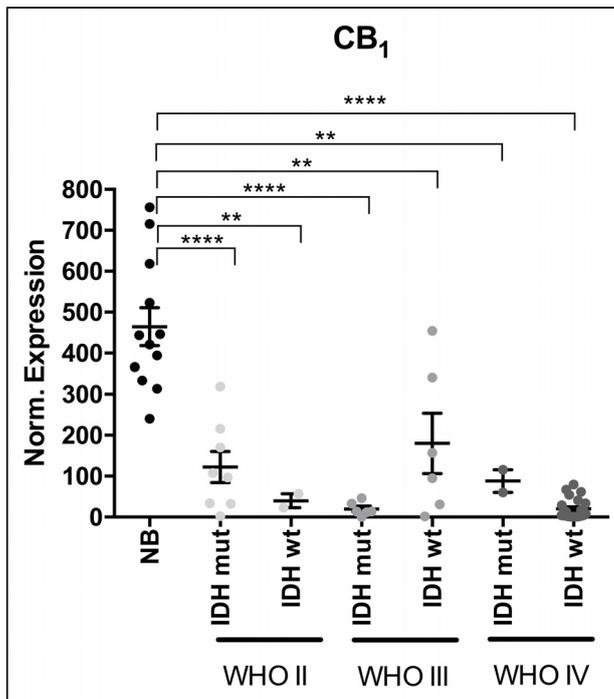


Abb. 6: **Normalisierte Expression der CB₁ mRNA** in gesundem Gehirngewebe (NB, normal brain) und diffusen astrozytären Tumoren der WHO-Grade II bis IV. Die Proben der jeweiligen WHO-Grade wurden zusätzlich in Isoytratdehydrogenase (IDH) mutierte versus IDH-Wildtyp (IDH mut bzw. IDH wt) Tumoren unterteilt (** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, **** $p \leq 0.0001$).

Die durchschnittliche normalisierte CB₁ mRNA-Expression lag in gesundem Hirngewebe bei einem Wert von 464,44. Im Vergleich hierzu war die Expression in allen Tumorengruppen unabhängig vom WHO-Grad signifikant reduziert. In diffusen Astrozytomen (WHO-Grad II) betrug die mittlere Expression 105,76, in anaplastischen

Astrozytomen (WHO-Grad III) 99,9 und in Glioblastomen (WHO-Grad IV) 25,67. In den jeweiligen Untergruppen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen IDH-mutierten und IDH-Wildtyp Tumoren (Abb. 6). Betrachtet man diese Werte und lässt die Aufteilung in IDH-mutiert oder IDH-Wildtyp außen vor, so lässt sich feststellen, dass in der untersuchten Stichprobe die Expression des CB₁-Rezeptors mit steigendem WHO-Grad sinkt. In der getesteten Stichprobe besteht somit eine Tendenz zur niedrigeren CB₁-Expression mit steigenden WHO-Grad, die statistisch signifikant ist.

3.1.2. CB₂ mRNA-Expression in gesundem Gehirn und in astrozytären Gliomen

Die bereits für die Untersuchung des CB₁-Rezeptors beschriebene Serie bestehend aus 75 cDNA-Proben aus diffusen astrozytären Tumoren der WHO-Grade II bis IV sowie aus gesundem Hirngewebe (als *normal brain* bezeichnet) wurde mit den oben spezifizierten Primern auf die Expression der mRNA für den CB₂ Rezeptor hin untersucht (Abb. 7).

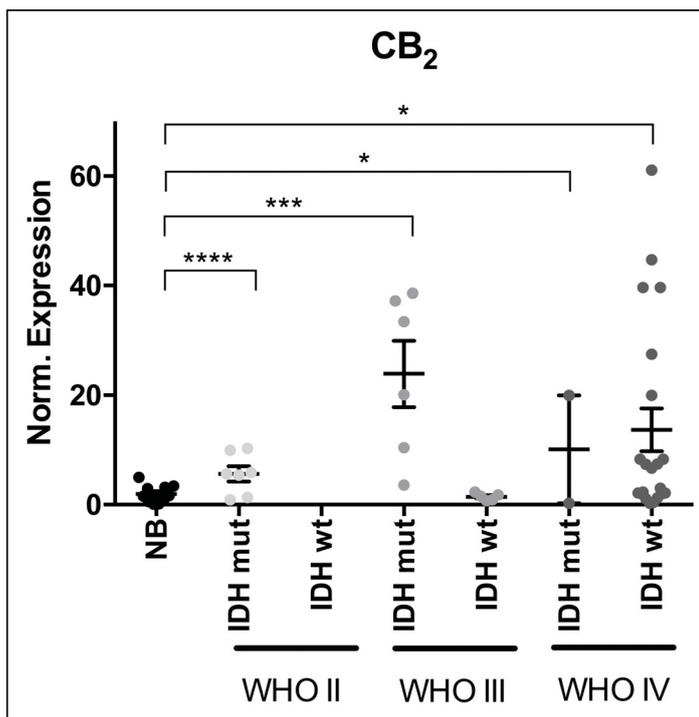


Abb. 7: **Normalisierte Expression von CB₂ mRNA** in gesundem Gehirn (NB, normal brain) und diffusen astrozytären Tumoren der WHO-Grade II bis IV. Die Gliome wurden zusätzlich in IDH-mutierte und IDH-Wildtyp (IDH mut bzw. IDH wt) Tumoren unterteilt (* $p \leq 0.05$, *** $p \leq 0.001$, **** $p \leq 0.0001$).

Abb. 7 zeigt die normalisierten Expression von CB₂ mRNA in den untersuchten Proben. Die Analyse der cDNA-Proben der IDH-Wildtyp Astrozytome des WHO-Grades II mittels *real time* PCR gelang nicht, sodass diese Gruppe nicht ausgewertet werden konnte. Die

normalisierte Expression der CB₂ mRNA beträgt in gesundem Gehirn im Mittelwert 1,95, in diffusen Astrozytomen (WHO-Grad II) 5,62, in anaplastischen Astrozytomen (WHO-Grad III) 13,68 und in Glioblastomen (WHO-Grad IV) 13,46. Somit war die Expression von CB₂ mRNA in allen IDH-mutierten Untergruppen und in den IDH-Wildtyp-Glioblastomen signifikant höher als in gesundem Gehirngewebe.

3.1.3. TRPV₁ mRNA-Expression in gesundem Gehirn und in astrozytären Gliomen

Die 75 cDNA-Proben aus diffusen Astrozytomen der WHO-Grade II bis IV und aus gesundem Hirngewebe wurden mit den oben spezifizierten Primern auf die Expression der mRNA des TRPV₁-Rezeptors hin untersucht (Abb. 8).

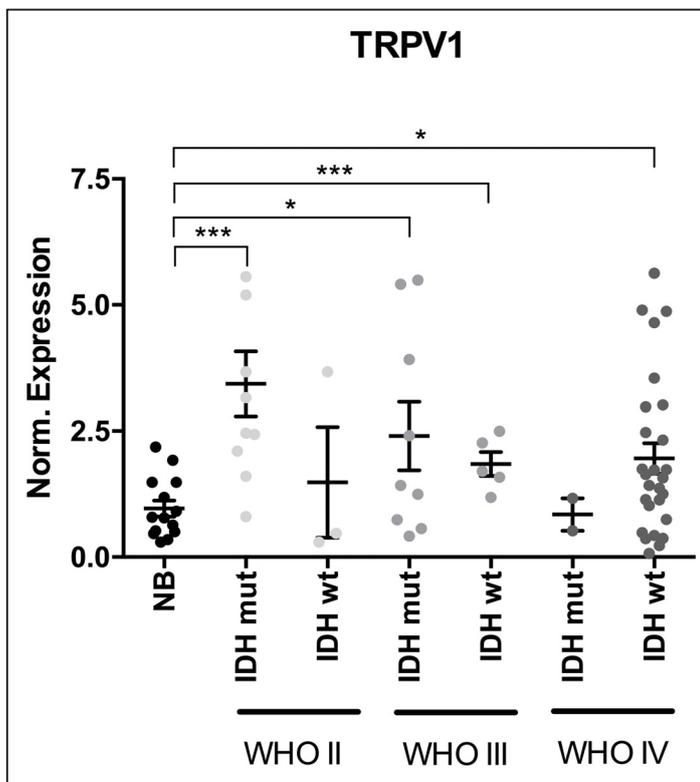


Abb. 8: **Normalisierte Expression von TRPV₁ mRNA** in gesundem Gehirn (NB, normal brain) und diffusen astrozytären Tumoren der WHO-Grade II bis IV. Die Gliome wurden zusätzlich in IDH-mutiert und IDH-Wildtyp (IDH mut bzw. IDH wt) Tumoren unterteilt. (* $p \leq 0.05$, *** $p \leq 0.001$).

Abb. 8 zeigt die normalisierte mRNA Expression von TRPV₁ in Proben aus gesundem Hirngewebe und aus Astrozytomen der WHO-Grade II bis IV, die zusätzlich in IDH-mutierte und IDH-Wildtyp Tumoren aufgeteilt wurden. Das gemittelte Expressionsniveau in den gesunden Gehirngewebeproben beträgt 0,96 und liegt bis auf die IDH-mutierte Gruppe der Glioblastome (Mittelwert 0,84) unterhalb der Expression in den getesteten Astrozytomgruppen. In der Gruppe der IDH-mutierten

diffusen Astrozytome (WHO-Grad II), der IDH-mutierten und IDH-Wildtyp anaplastischen Astrozytome (WHO-Grad III) und der IDH-Wildtyp Glioblastome (WHO-Grad IV) lag die mRNA-Expression von TRPV₁ signifikant höher als in gesundem Gehirngewebe. Betrachtet man die Gruppen unabhängig vom IDH-Mutationsstatus, so erreicht die Überexpression des Rezeptors verglichen zum Normalgewebe in allen Gruppen statistische Signifikanz (nicht abgebildet).

3.1.4. CB₁, CB₂ und TRPV₁ mRNA-Expression in Glioblastomzelllinien

cDNA-Proben aus sechs humanen Glioblastomzelllinien wurden auf die mRNA-Expression der mit dem endogenen Cannabinoidsystem assoziierten Rezeptoren CB₁, CB₂ und TRPV₁ hin untersucht (Abb. 9-11).

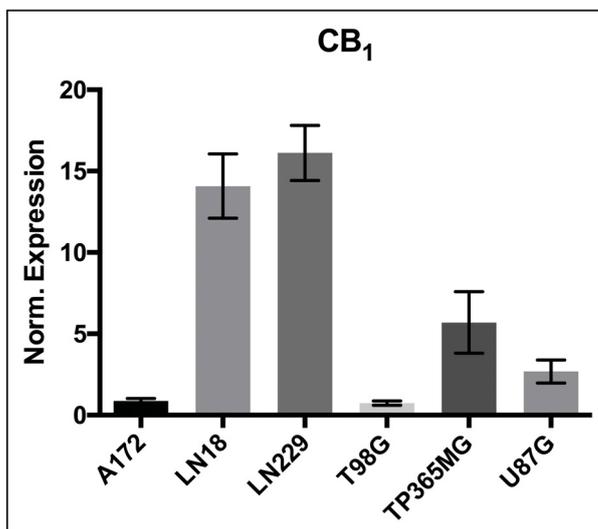


Abb. 9: **Normalisierte Rezeptorexpression von CB₁ in humanen Glioblastomzelllinien.** Die Expressionswerte stammen aus drei unabhängigen Experimenten.

Abb. 9 zeigt die CB₁ mRNA-Expression in sechs verschiedenen humanen Glioblastomzelllinien. Die Zelllinien A172 und T98G wiesen die niedrigste Expression mit Mittelwerten von 0,87 und 0,74 auf. Die höchste Expression war in den Zelllinien LN18 und LN229 mit durchschnittlich 14,01 und 16,12 detektierbar. Damit lag in den untersuchten Glioblastomzelllinien kongruent zu den Glioblastom-Tumorproben (s.o.) die CB₁-Rezeptorexpression deutlich unter jener von gesundem Hirngewebe (vgl. Abb. 6).

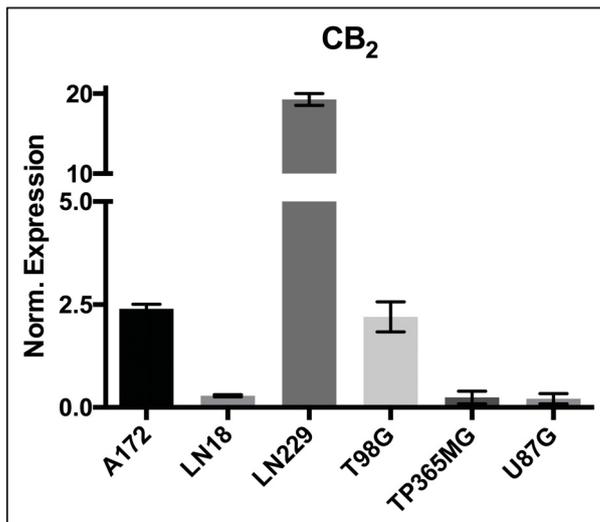


Abb. 10: *Normalisierte Rezeptorexpression von CB₂ in humanen Glioblastomzelllinien. Die Expressionswerte stammen aus drei unabhängigen Experimenten.*

In Abb. 10 ist die in sechs Glioblastomzelllinien ermittelte CB₂ mRNA-Expression abgebildet. Bis auf die Zelllinie LN229 wiesen die Zelllinien eine normalisierte Expression unter 2,50 auf. LN229 lag mit 19,27 deutlich darüber. Damit ähnelte das Expressionsniveau von CB₂ in LN229 den in Gewebeproben ermittelten Werten (vgl. Abb. 7), während die Expressionswerte in den anderen Zelllinien darunterlagen.

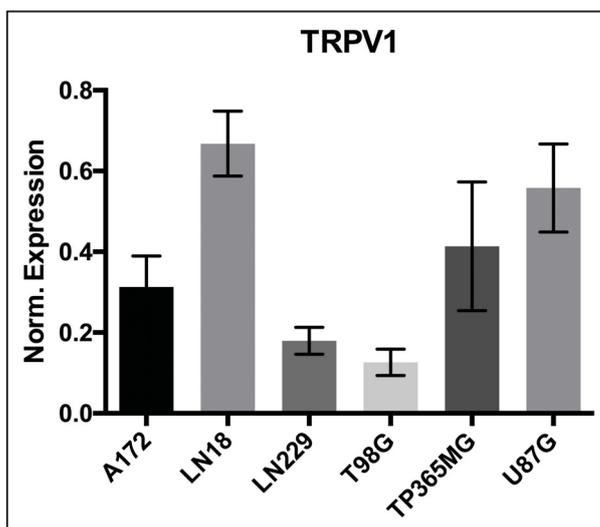


Abb. 11: *Normalisierte Rezeptorexpression von TRPV₁ in humanen Glioblastomzelllinien. Die Expressionswerte stammen aus drei unabhängigen Experimenten.*

Abb. 11 zeigt die mRNA-Expression des Ionenkanals und Rezeptors TRPV₁ in sechs humanen Glioblastomzelllinien. Die normalisierte Expression lag in allen Zelllinien unter 1. In der oben beschriebenen Stichprobe aus gesunden Hirngewebeproben lag die Expression durchschnittlich bei 0,96 und in Glioblastomen durchschnittlich bei 1,96

(vgl. Abb. 8). Die in den folgenden zwei Unterkapiteln präsentierten Dosis-Wirkungskurven wurden an allen sechs der oben aufgeführten Zelllinien durchgeführt. Die Versuche zum Nachweis von ER-Stress, Apoptose, Autophagie und Proliferationshemmung wurden an den Zelllinien A172, LN229 und TP365MG durchgeführt, weil diese drei Zelllinien sich in ihren Rezeptorexpressionsmustern am deutlichsten unterschieden.

3.2. Zytotoxische Wirkung von Substanzen mit Einfluss auf das ECS in Glioblastomzelllinien

3.2.1. AM404

Um zu überprüfen, inwiefern der Paracetamol-Metabolit AM404 die Viabilität von Glioblastomzellen *in vitro* beeinflusst, wurden Dosis-Wirkungskurven angefertigt. Nach einer 72-stündigen Inkubation mit 2,5 μ M, 5 μ M, 10 μ M und 20 μ M AM404 im Zellkulturmedium wurden MTT-Assays durchgeführt. In der Auswertung wurde die Absorption der unbehandelten Kontrolle als 100 % viabel angenommen und die anderen Absorptionswerte wurden auf diese Kontrolle normalisiert (norm. Absorption).

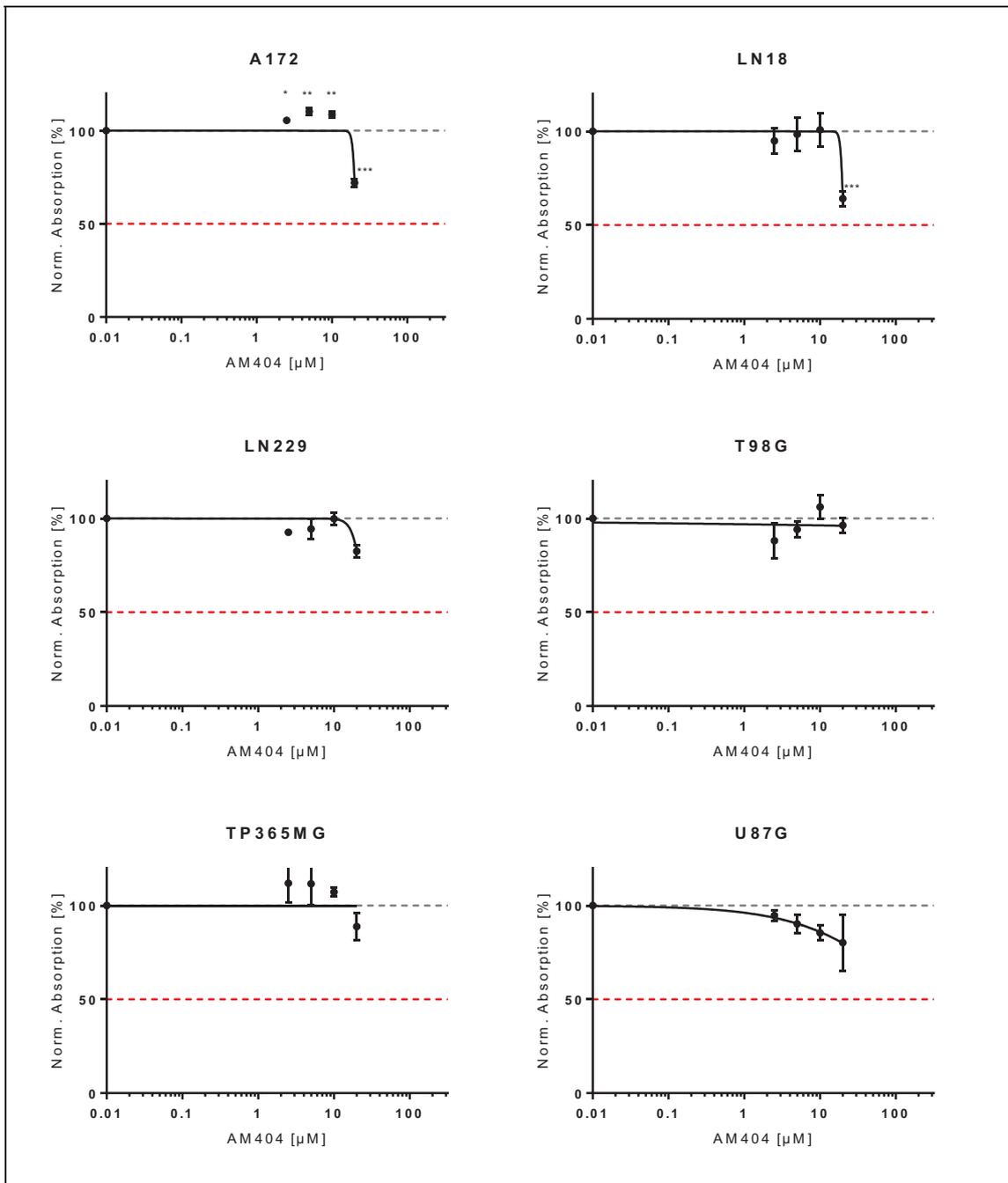


Abb. 12: **Auswirkung verschiedener AM404 Konzentrationen auf die Viabilität humaner Glioblastomzelllinien.** ($n=3$ unabhängige Experimente; $*p \leq 0.05$, $**p \leq 0.01$, $***p \leq 0.001$; graue gestrichelte Linie, 100 % Viabilität; rote gestrichelte Linie, 50 % Viabilität, IC_{50}).

Abb. 12 zeigt die ermittelten Dosis-Wirkungskurven. In allen sechs untersuchten Zelllinien führten die drei niedrigsten Konzentrationen, 2,5 µM, 5 µM und 10 µM, nicht zu einem signifikanten Absinken der Viabilität. In der Zelllinie A172 war sogar ein signifikanter Anstieg der Viabilität festzustellen. Die höchste getestete Konzentration, 20 µM, bewirkte in den Zelllinien A172 und LN18 eine signifikante Reduktion der vitalen Zellen auf 75 % und 60 % verglichen zum Ausgangswert. In den Zelllinien LN229, TP365MG und U87MG war unter Behandlung mit 20 µM eine leichte Reduktion

der vitalen Zellen detektierbar, die jedoch nicht signifikant war. In der Zelllinie T98G war bei 20 μM keine Reduktion der Viabilität nachweisbar. In keiner der getesteten Konzentrationen wurde die mittlere inhibitorische Konzentration (IC_{50} Wert) erreicht.

3.2.2. Cannabidiol

Um die zytotoxischen Effekte des pflanzlichen Cannabinoids Cannabidiol (CBD) in humanen Glioblastomzelllinien zu bestimmen, wurden Dosis-Wirkungskurven nach dem gleichen Versuchsaufbau wie zuvor beschrieben angefertigt.

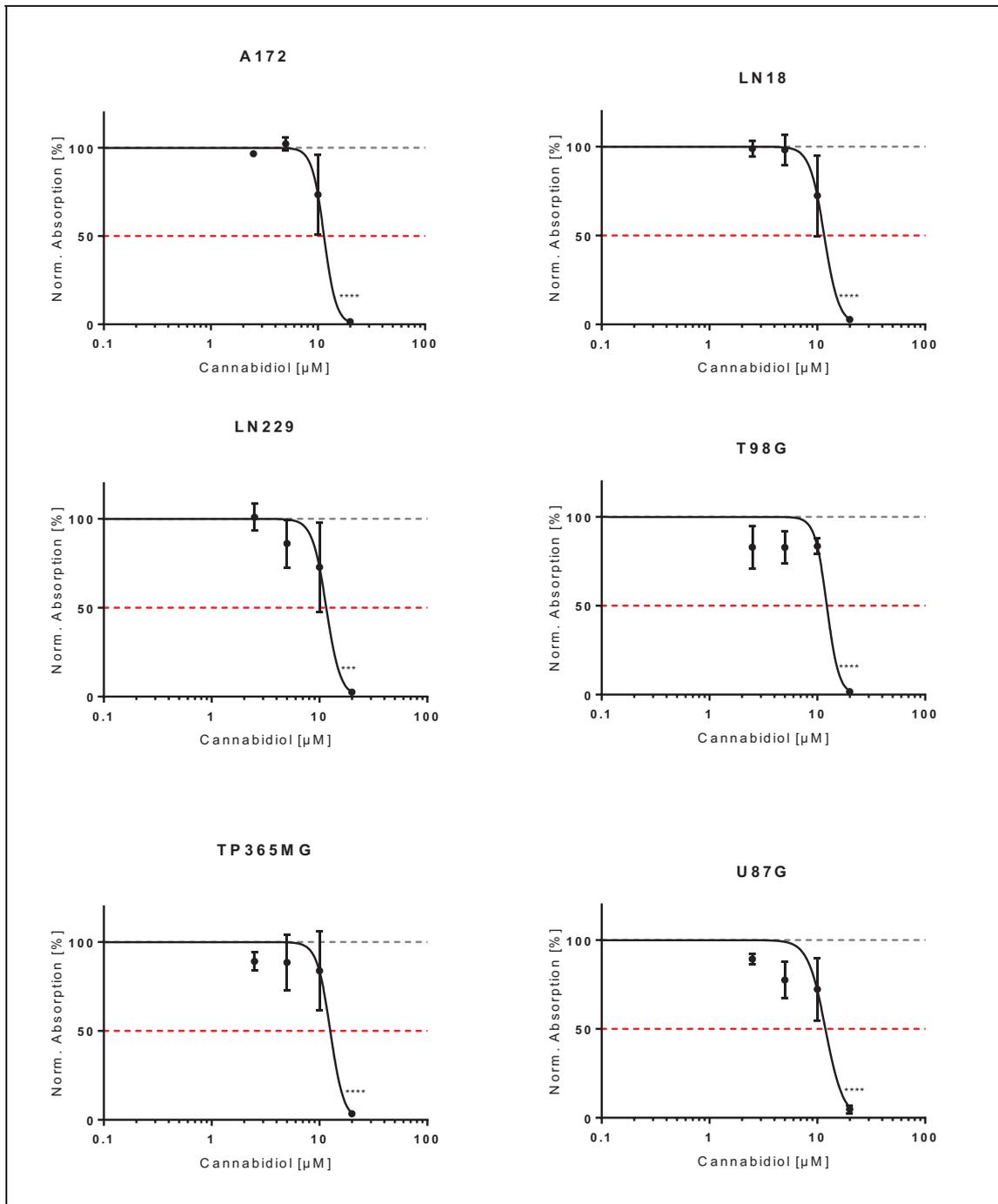


Abb. 13: **Auswirkung verschiedener Cannabidiol-Konzentrationen auf die Viabilität humaner Glioblastomzelllinien.** ($n=3$ unabhängige Experimente, **** $p \leq 0.0001$; graue gestrichelte Linie, 100 % Viabilität; rote gestrichelte Linie, 50 % Viabilität, IC_{50}).

Abb. 13 zeigt die logarithmisch aufgetragenen Dosis-Wirkungskurven. Die drei Konzentrationen 2,5 µM, 5 µM und 10 µM bewirkten keine signifikante Reduktion der

Viabilität in den getesteten Zelllinien. Es lässt sich die Tendenz erkennen, dass die Viabilität bei 10 μM CBD auf etwa 75 % abfällt, jedoch erreichten die Daten keine Signifikanz in der statistischen Auswertung. Die Konzentration von 20 μM CBD führte in allen Zelllinien zur Reduktion des Anteils der vitalen Zellen auf 1-6 % des Ausgangswerts. Aus den Daten lässt sich der IC_{50} -Wert für CBD für die getesteten Zelllinien bei 12 μM verorten.

3.2.3. Cannabinol

Um die zytotoxischen Effekte des pflanzlichen Cannabinoids Cannabinol (CN) in humanen Glioblastomzelllinien zu bestimmen, wurden Dosis-Wirkungskurven nach dem gleichen Versuchsaufbau wie zuvor beschrieben angefertigt.

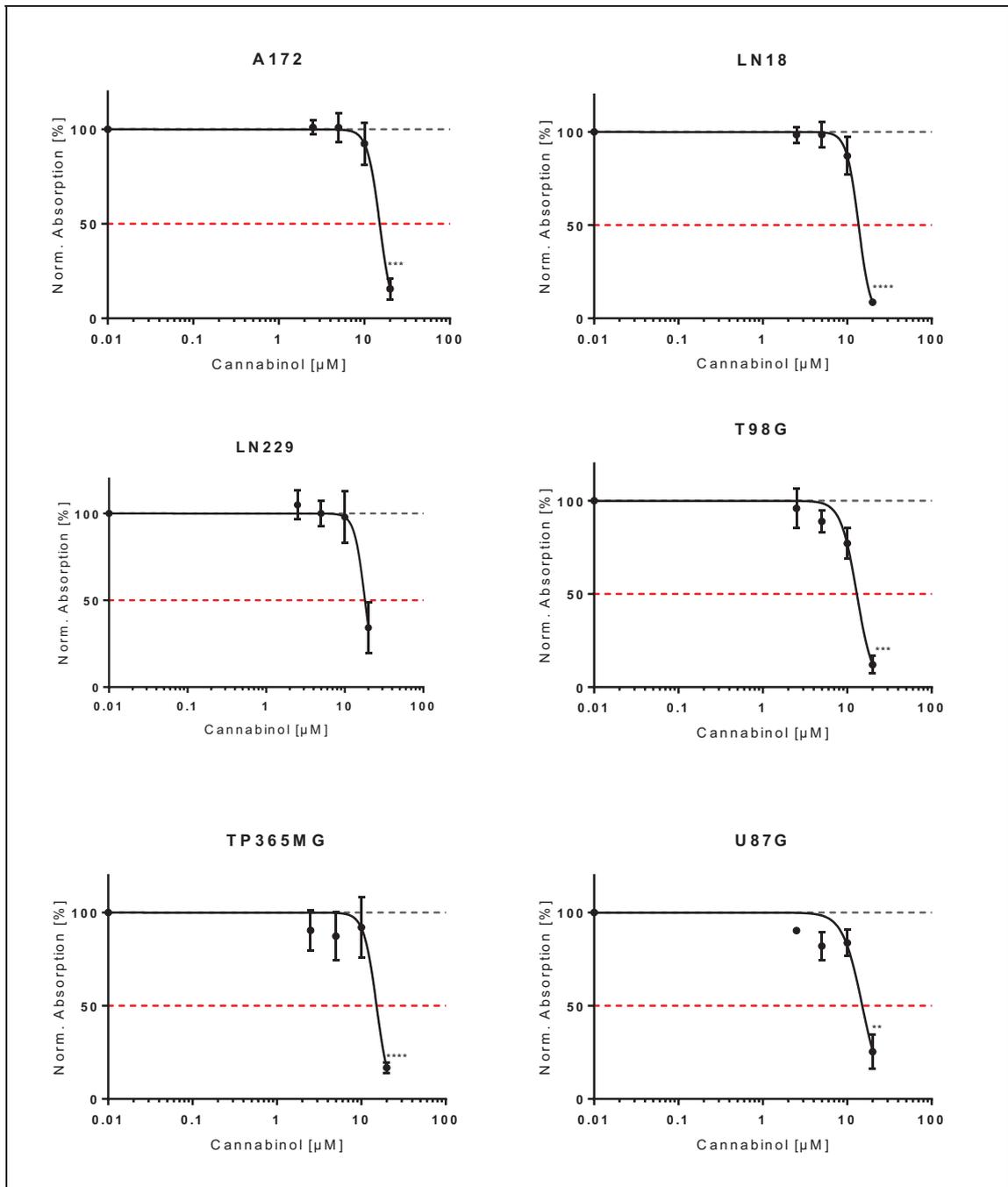


Abb. 14: **Auswirkung verschiedener Cannabinol-Konzentrationen auf die Viabilität humaner Glioblastomzelllinien.** (n=3 unabhängige Experimente. **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001; graue gestrichelte Linie, 100 % Viabilität; rote gestrichelte Linie, 50 % Viabilität, IC₅₀).

In Abb. 14 sind die Ergebnisse der Experimente als logarithmierte Dosis-Wirkungskurven dargestellt. Die drei Konzentrationen 2,5 µM, 5 µM und 10 µM

bewirkten keine signifikante Reduktion der Viabilität in den getesteten Zelllinien. Es lässt sich bei den Zelllinien LN18, T98G und U87MG die Tendenz erkennen, dass die Viabilität bei 10 μM CN um etwa 10–20 % abfällt, jedoch erreichten die Daten keine Signifikanz in der statistischen Auswertung. 20 μM CN führte in allen Zelllinien zu einem deutlichen und signifikanten Abfall der Viabilität auf 10-25 % des Ausgangswerts. Eine Ausnahme bildet die Zelllinie LN229, bei der das Ergebnis von drei biologischen Replikaten aufgrund einer zu hohen Streubreite nicht signifikant war. Aus den Daten lässt sich ein IC_{50} -Wert von 17 μM für CN bestimmen.

3.2.4. Arvanil

Um die zytotoxischen Effekte des Cannabinoid-Vanilloid-Hybrids Arvanil in humanen Glioblastomzelllinien zu bestimmen, wurden Dosis-Wirkungskurven angefertigt. Nach einer 72-stündigen Inkubation mit Arvanil in Konzentrationen von 0,3 bis 76 μM im Zellkulturmedium wurden MTT-Assays durchgeführt.

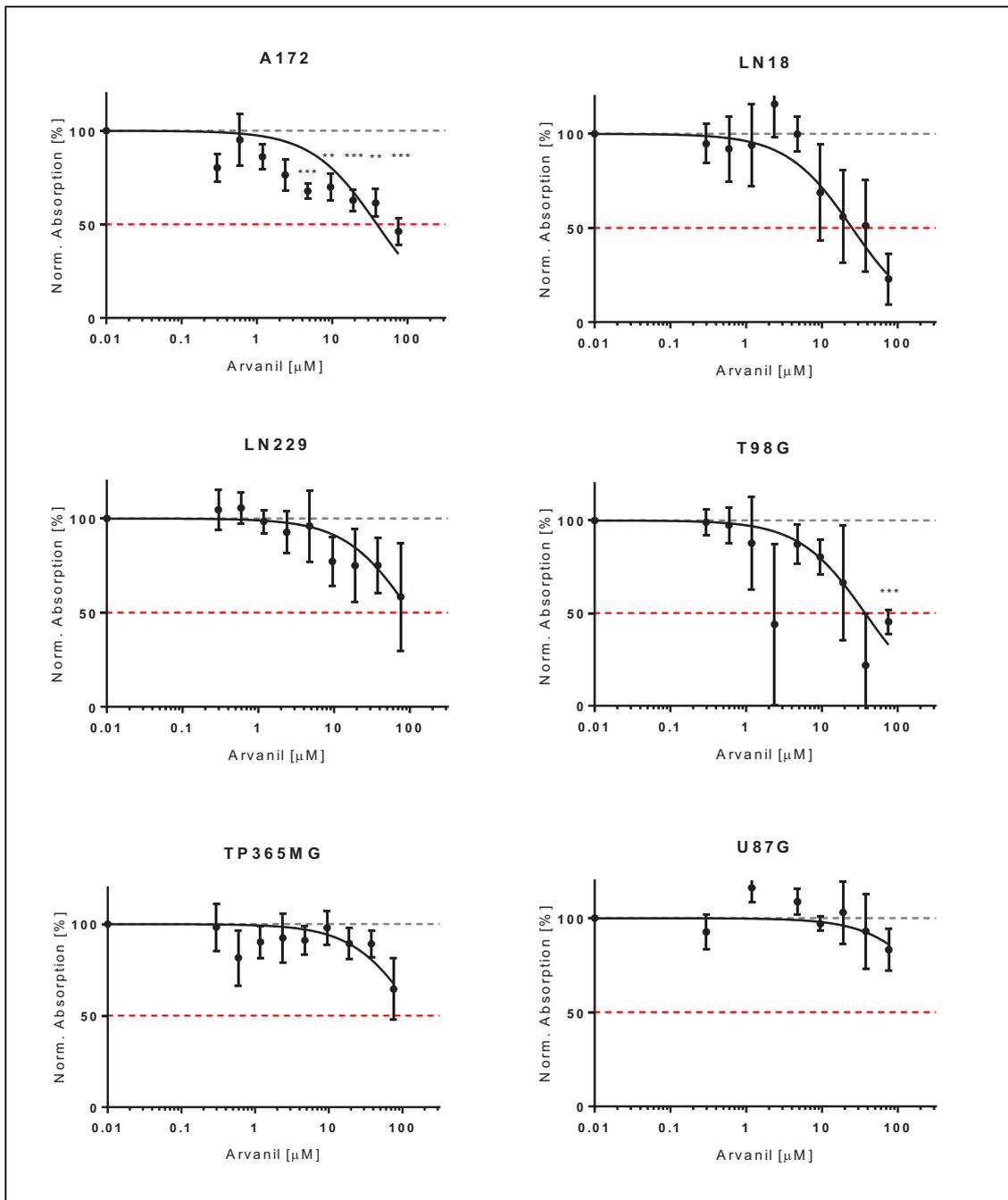


Abb. 15: **Auswirkung ansteigender Arvanil-Konzentrationen auf die Viabilität humaner Glioblastomzelllinien.** ($n=3$ unabhängige Experimente. $**p \leq 0.01$, $***p \leq 0.001$; graue gestrichelte Linie, 100 % Viabilität; rote gestrichelte Linie, 50 % Viabilität, IC_{50}).

Abb. 15 zeigt die für Arvanil ermittelten Dosis-Wirkungskurven. Die Ergebnisse lassen sich in zwei Gruppen einteilen. Die Zelllinien LN229, TP365MG und U87MG zeigen zwar einen Abfall der Viabilität bei steigenden Konzentrationen von Arvanil, jedoch wird selbst in der höchsten Konzentration von 76 μM der IC_{50} -Wert nicht erreicht. Die Zelllinien A172, LN18 und T98G reagieren mit einem deutlicheren Abfall der Viabilität. Der IC_{50} -Wert beträgt in diesen drei Zelllinien 30-40 μM .

3.3. Zytotoxische Wirkung von Cannabinoiden in Kombination mit AM404 in Glioblastomzelllinien

3.3.1. Cannabidiol kombiniert mit AM404

Um die Frage zu beantworten, ob die zytotoxische Wirkung von Cannabidiol (CBD) durch die Zugabe von AM404 gesteigert werden kann, wurden Dosis-Wirkungskurven mit sechs humanen Glioblastomzelllinien angefertigt. Als AM404-Konzentration für die Kombinationsbehandlung wurde 5 μM ausgewählt, weil bei dieser Konzentration kein zytotoxischer Effekt auf die Glioblastomzellen nachgewiesen werden konnte. Somit wäre eine Steigung des zytotoxischen Effekts der Kombinationsbehandlung auf einen Synergismus von AM4040 und Cannabinoid zurückzuführen und nicht auf eine Addition der einzelnen zytotoxischen Effekte. Die Glioblastomzellen wurden 72 h mit 5 μM , 10 μM , 12,5 μM und 15 μM CBD inkubiert. Hierzu wurde in der Versuchskondition 5 μM AM404 (in den Graphen die grüne Kurve) und in der Kontrollgruppe die gleiche Menge des Lösungsmittels von AM404, Ethanol (in den Graphen die schwarze Kurve) hinzugefügt.

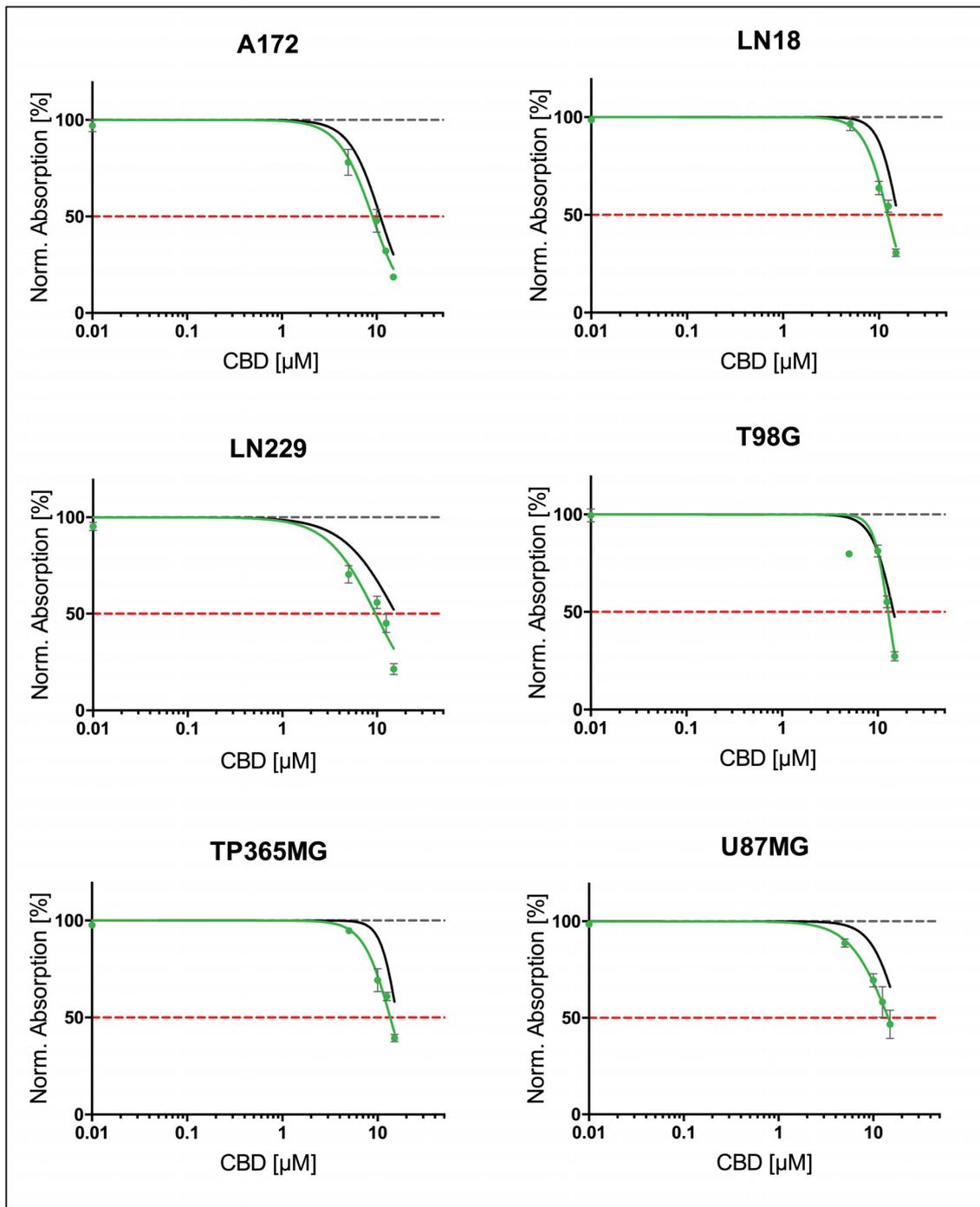


Abb. 16: Dosis-Wirkungskurven von verschiedenen Konzentrationen Cannabidiol (CBD) mit 5 µM AM404 (grüne Kurve) oder ohne AM404 (Kontrolle mit Ethanol, schwarze Kurve) im Zellkulturmedium. (n=3 unabhängige Experimente; graue gestrichelte Linie, 100 % Viabilität; rote gestrichelte Linie, 50 % Viabilität, IC₅₀).

Abb. 16 zeigt in Grün die ermittelten Dosis-Wirkungskurven für verschiedene CBD-Konzentrationen in Kombination mit 5 µM AM404 und in Schwarz die Kontrolle mit Ethanol, dem Lösungsmittel von AM404. Für alle Zelllinien - bis auf die Zelllinie T98G - verläuft die Dosis-Wirkungskurve der Kombinationsbehandlung unterhalb der Kurve der Kontrolle. Mit der höchsten CBD-Konzentration von 15 µM wurde in Kombination

mit AM404 die Viabilität der Zellen um 50 bis 80 % reduziert. In der Kontrolle ohne AM404 wurde in der höchsten CBD-Konzentration die Viabilität der Zellen nur um 40 bis 60 % reduziert. Wie Tabelle 15 zeigt, wurde durch die Kombinationsbehandlung in allen sechs Zelllinien eine Reduktion der Viabilität unter den IC₅₀-Wert erreicht, während in vier Zelllinien (LN18, LN229, TP365MG, U87MG) unter der Kontrollbedingung der IC₅₀ nicht erreicht wurde.

Tabelle 15: Vergleich zwischen den ermittelten IC₅₀-Werten für CBD in Kombination mit AM404 und CBD in Kombination mit Ethanol (EtOH, Kontrolle) und Signifikanz der Differenz (P) (n=3 unabhängige Experimente).

	IC ₅₀ CBD + AM404	IC ₅₀ CBD + EtOH	P
A172	9,02 µM	10,93 µM	0.0079
LN18	12,32 µM	15,70 µM	0.0003
LN229	9,65 µM	15,84 µM	0.0007
T98G	12,83 µM	14,60 µM	0.0095
TP365MG	13,54 µM	16,02 µM	0.0023
U87G	14,42 µM	18,82 µM	0.0099

Der IC₅₀-Wert für CBD in Kombination mit AM404 rangierte zwischen 9,02 µM und 14,42 µM während der IC₅₀-Wert für CBD alleine zwischen 10,93 µM und 18,82 µM lag (Tabelle 15). Vergleicht man die IC₅₀-Werte als Parameter für die Zytotoxizität, so ist in allen Zelllinien die Kombination aus CBD mit AM404 mit hoher Signifikanz potenter als die Kontrolle mit CBD und Ethanol. Die Frage, ob die zytotoxische Wirkung von Cannabidiol (CBD) durch die Zugabe von 5 µM AM404 gesteigert werden kann, ist folglich mit Ja zu beantworten.

3.3.2. Cannabinol kombiniert mit AM404

Um die Frage zu beantworten, ob die zytotoxische Wirkung von Cannabinol (CN) durch die Zugabe von 5 µM AM404 gesteigert werden kann, wurden Dosis-Wirkungskurven mit sechs humanen Glioblastomzelllinien nach dem gleichen Schema wie unter 3.3.1. beschrieben angefertigt.

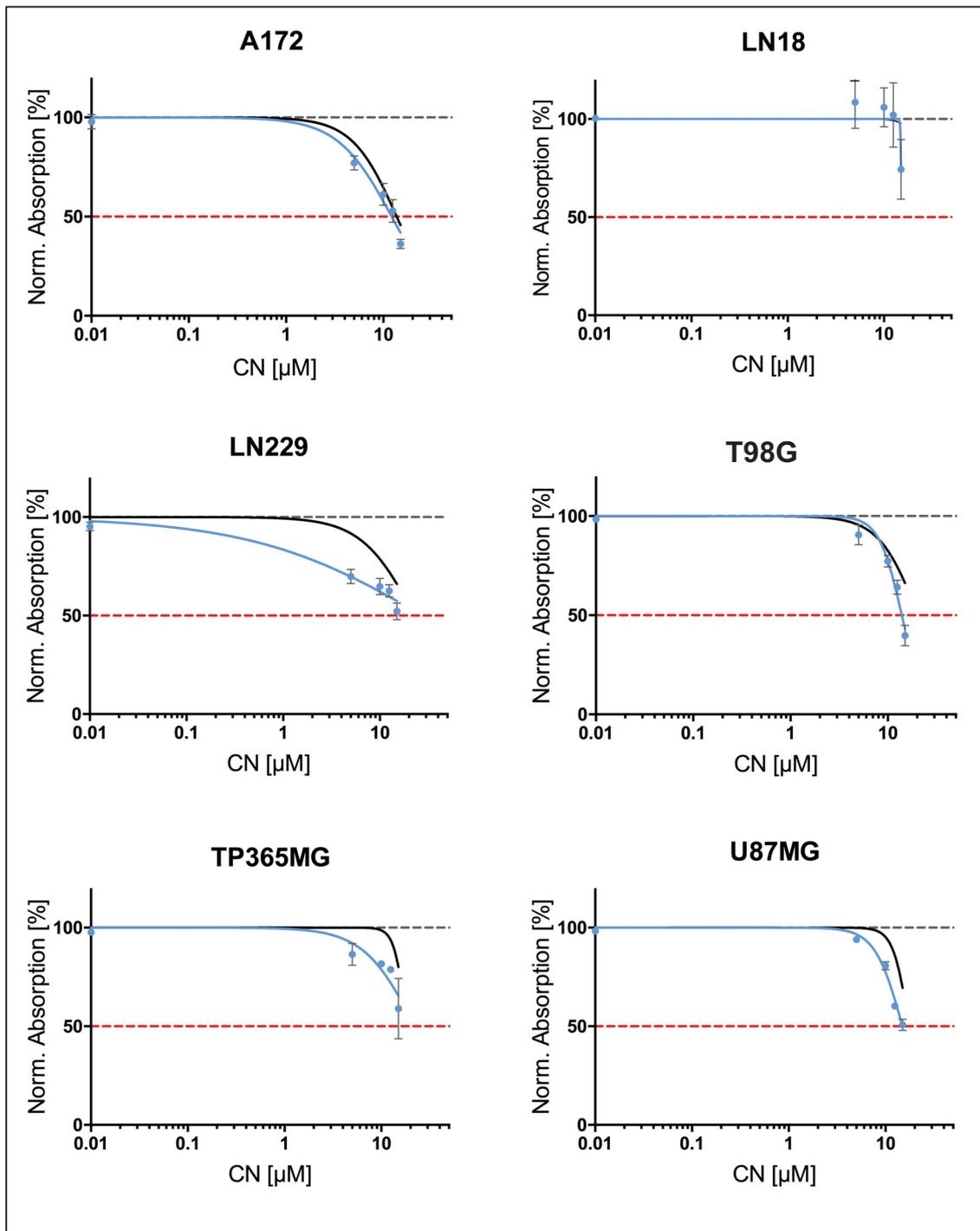


Abb. 17: Dosis-Wirkungskurven von verschiedenen Konzentrationen Cannabinol (CN) mit 5 µM AM404 (blaue Kurve) oder ohne AM404 (Kontrolle mit Ethanol, schwarze Kurve) im Zellkulturmedium. (n=3 unabhängige Experimente; graue gestrichelte Linie, 100 % Viabilität; rote gestrichelte Linie, 50 % Viabilität, IC₅₀).

Abb. 17 zeigt in Blau die ermittelten Dosis-Wirkungskurven für verschiedene CN-Konzentrationen in Kombination mit 5 µM AM404 und in Schwarz die Kontrolle mit Ethanol, dem Lösungsmittel von AM404. Bei 15 µM CN, der höchsten getesteten Konzentration, zeigt sich in der Kombination mit AM404 eine Reduktion der

Zellvitalität um 25 bis 60 % während unter der Kontrollbedingung nur eine Reduktion um 3 bis 30 % erreicht wurde. Einzige Ausnahme bildet die Zelllinie A172, die auch auf die Einzeltherapie mit CN mit einem starken Abfall der Vitalität um 54 % reagierte. Dies ist auch die einzige Zelllinie, in der die Kontrolle mit CN ohne AM404 den IC₅₀-Wert erreichte.

Tabelle 15: Vergleich zwischen den ermittelten IC₅₀-Werten für CN in Kombination mit AM404 und CN in Kombination mit Ethanol (EtOH, Kontrolle) und Signifikanz der Differenz (P) (n=3 unabhängige Experimente).

	IC ₅₀ CN + AM404	IC ₅₀ CN + EtOH	P
A172	12,18 µM	13,71 µM	0.1688
LN18	15,25 µM	~30,00 µM	0.9374
LN229	27,71 µM	22,81 µM	0.5047
T98G	13,93 µM	20,45 µM	0.0001
TP365MG	22,84 µM	18,02 µM	0.4633
U87G	14,95 µM	17,49 µM	0.0074

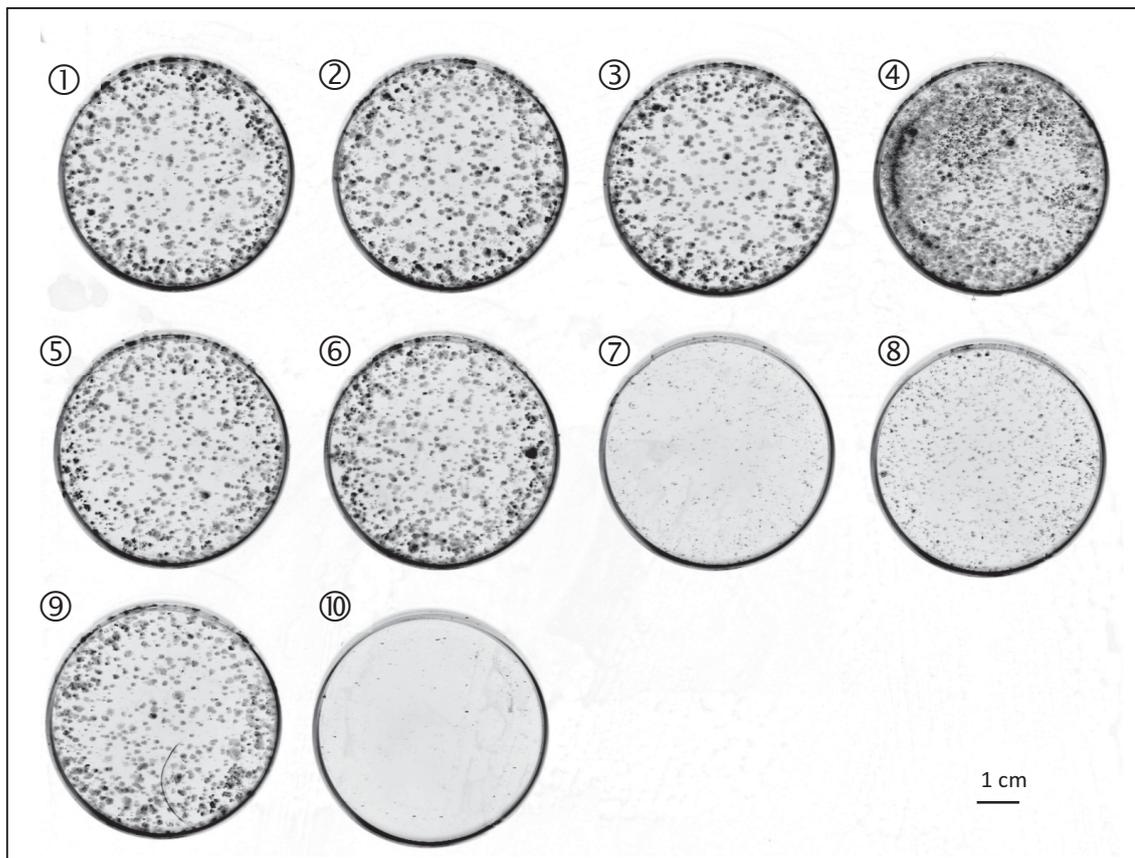
Tabelle 15 listet die aus den Daten errechneten IC₅₀-Werte für die beiden Versuchsbedingungen und die mittels t-Test ermittelte Signifikanz des Unterschieds auf. In der Versuchsbedingung CN + AM404 war der niedrigste IC₅₀-Wert 12,18 µM und der höchste 27,71 µM. In der Kontrollbedingung betragen die IC₅₀-Werte zwischen 13,17 µM und näherungsweise 30 µM. In zwei Zelllinien (LN229 und TP365MG) lag der IC₅₀-Wert der Versuchsbedingung oberhalb des IC₅₀-Werts der Kontrollbedingung. In den restlichen vier Zelllinien lag der IC₅₀-Wert der Versuchsbedingung zwar unterhalb des Werts der Kontrollbedingung, und damit die Toxizität von CN in Kombination mit AM404 über der von CN alleine, allerdings erreichten die Werte nur in zwei Fällen Signifikanz. Dies waren die Zelllinien T98G und U87MG.

Des Weiteren ergab sich für CN + AM404 ein durchschnittlicher IC₅₀-Wert von 17,81 µM und für CN + EtOH ein durchschnittlicher IC₅₀-Wert von 20,41 µM. Im Vergleich dazu konnte für die Kombination CBD + AM404 ein mittlerer IC₅₀-Wert von 11,96 µM und für CBD + EtOH ein um 3,37 µM höherer IC₅₀-Wert von 15,33 µM ermittelt werden. Damit lag die Zytotoxizität von CN deutlich unter jener von CBD, was es mit oder ohne den verstärkenden Effekt von AM404.

Die anfänglich gestellte Frage, ob die zytotoxische Wirkung von Cannabinol (CN) durch die Zugabe von 5 µM AM404 gesteigert werden kann, ist folglich für die Zelllinien T98G und U87G mit Ja und für die anderen Zelllinien mit Nein zu beantworten.

3.4. Auswirkung einer 15-tägigen Cannabinoidbehandlung auf das Wachstum von Glioblastomzellen

Es wurden Clonogenic Assays mit den Zelllinien A172, LN229 und TP365MG durchgeführt, um einen möglichen proliferationshemmenden Effekt von Substanzen mit Einfluss auf das ECS festzustellen. Die Zelllinie A172 verlor durch den Färbeprozess mit Kristallviolett ihre Adhärenz, sodass eine Auswertung des Clonogenic Assays nicht gelang.



① unbehandelte Kontrolle	② Kontrolle mit Ethanol	③ Kontrolle mit Methanol	④ Kontrolle mit Ethanol und Methanol
⑤ CBD 5 μ M	⑥ CN 5 μ M	⑦ CBD 5 μ M kombiniert mit AM404 5 μ M	⑧ CN 5 μ M kombiniert mit AM404 5 μ M
⑨ AM404 5 μ M	⑩ Arvanil. 18,5 μ M		

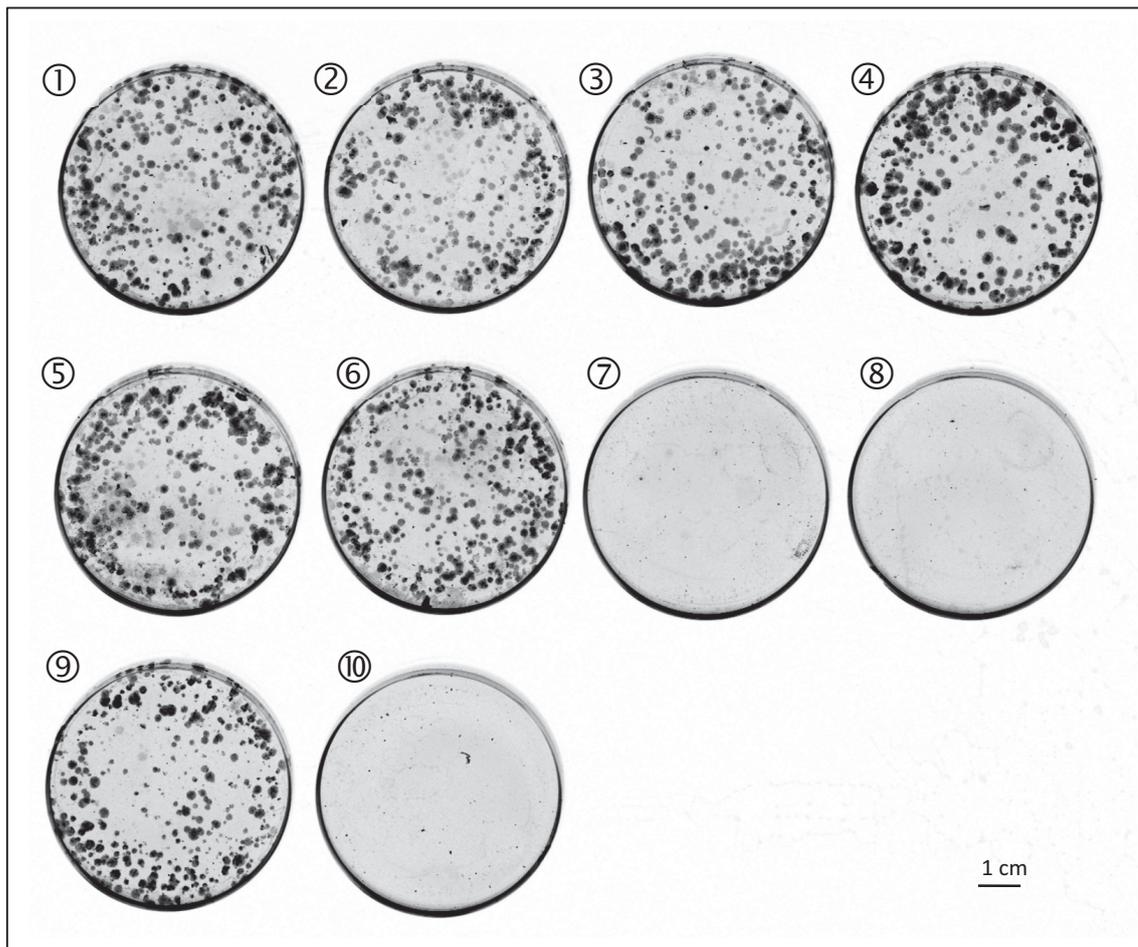
Abb. 18: Clonogenic Assays der Zelllinie LN229.

Abb. 18 zeigt Zellkulturschalen der Zelllinie LN229 nach 15 Tagen Inkubationszeit. Es

handelt sich bei der Abbildung um eines von drei biologischen Replikaten. In der oberen Reihe sind komplett unbehandelte Zellen abgebildet (Negativkontrolle, ①), sowie mit Ethanol (②), Methanol (③) und Ethanol in Kombination mit Methanol (④) behandelte Zellen. Ethanol, welches das Lösungsmittel von Arvanil und AM404 war, beeinflusste die Proliferation und Morphologie der Zellen nicht. Methanol, welches das Lösungsmittel von CBD und CN war, beeinflusste die Proliferation und Morphologie der Zellen ebenfalls nicht. Die Kombination von Ethanol und Methanol beeinflusste die Proliferation nicht, die Morphologie der Kolonien war im Vergleich zur Negativkontrolle jedoch etwas kleiner.

In der zweiten Reihe sind die mit 5 μ M CBD (⑤) und 5 μ M CN (⑥) behandelten Zellen zu sehen. Die Proliferation schien minimal vermindert zu sein, wobei die Morphologie unverändert blieb. Des Weiteren sind die mit einer Kombination aus 5 μ M CBD und 5 μ M AM404 behandelten Zellen zu sehen (⑦). Hier zeigte sich eine extreme Verringerung des Wachstums und es waren sowohl weniger als auch kleinere Kolonien als in der Negativkontrolle festzustellen. Auch die Behandlung mit 5 μ M CN in Kombination mit 5 μ M AM404 (⑧) führte zu einer sichtbaren Reduktion der Proliferation und zu einer Verkleinerung der einzelnen Kolonien, jedoch in einem schwächeren Ausmaß als bei der Kombination von CBD mit AM404.

In der unteren Reihe sind mit 5 μ M AM404 behandelte Zellen (⑨) abgebildet. Es ließ sich keine Veränderung der Proliferation oder Morphologie im Vergleich zur Negativkontrolle feststellen. In der letzten abgebildeten Zellkulturschale (⑩) wurden die Glioblastomzellen mit dem Cannabinoid-Vanilloid-Hybrid Arvanil in 18,5 μ -molarer Konzentration behandelt. Es zeigte sich eine deutliche Verringerung der gewachsenen Kolonien.



① unbehandelte Kontrolle	② Kontrolle mit Ethanol	③ Kontrolle mit Methanol	④ Kontrolle mit Ethanol und Methanol
⑤ CBD 5 μ M	⑥ CN 5 μ M	⑦ CBD 5 μ M kombiniert mit AM404 5 μ M	⑧ CN 5 μ M kombiniert mit AM404 5 μ M
⑨ AM404 5 μ M	⑩ Arvanil. 18,5 μ M		

Abb. 19: Clonogenic Assays der Zelllinie TP365MG.

Abb. 19 zeigt eines von drei gleichwertigen biologischen Replikaten des wie oben beschriebenen Versuchs mit der Glioblastomzelllinie TP365MG. Erneut sind in der oberen Reihe die unbehandelte Negativkontrolle (①) sowie die Kontrollen mit den Lösungsmitteln Ethanol (②), Methanol (③) und Ethanol in Kombination mit Methanol (④) abgebildet. Die Zahl der gebildeten Kolonien war in den Lösungsmittel-Kontrollen im Vergleich zur Negativkontrolle geringfügig vermindert, die Größe der Kolonien war gleich. Die in der mittleren Reihe abgebildeten Versuchskonditionen mit 5 μ M CBD (⑤)

beziehungsweise 5 μM CN (⑥) führte zu keiner sichtbaren Veränderung des Zellwachstums oder der Morphologie der Kolonien. Im Gegensatz hierzu reagierten die Zellen auf eine Kombinationsbehandlung mit 5 μM CBD und 5 μM AM404 (⑦) mit einem deutlichen Rückgang des Wachstums, sodass nur noch wenige vereinzelte und verkleinerte Kolonien sichtbar waren. In dieser Weise reagierten die Zellen auch auf eine Kombinationsbehandlung mit 5 μM CN und 5 μM AM404 (⑧).

In der unteren Reihe sind mit 5 μM AM404 behandelte Zellen (⑨) abgebildet. Es ließ sich eine geringe Verminderung der Größe der Kolonien im Vergleich zur Negativkontrolle feststellen. In der letzten abgebildeten Zellkulturschale (⑩) wurden die Zellen mit Arvanil in 18,5 $\mu\text{-molarer}$ Konzentration behandelt. Es zeigte sich eine deutliche Verringerung und Verkleinerung der gewachsenen Kolonien.

3.5. Nachweis von ER-Stress in behandelten Glioblastomzellen

Um die Frage zu beantworten, ob die verwendeten Substanzen mit Einfluss auf das ECS nach zweistündiger Behandlung ER-Stress in Glioblastomzellen auszulösen vermögen, wurde die Expressionsniveaus des Gens *Xbp1 long* und seiner ER-Stress assoziierten Spleißvariante *XBP1 short* durch *real time* PCR bestimmt.

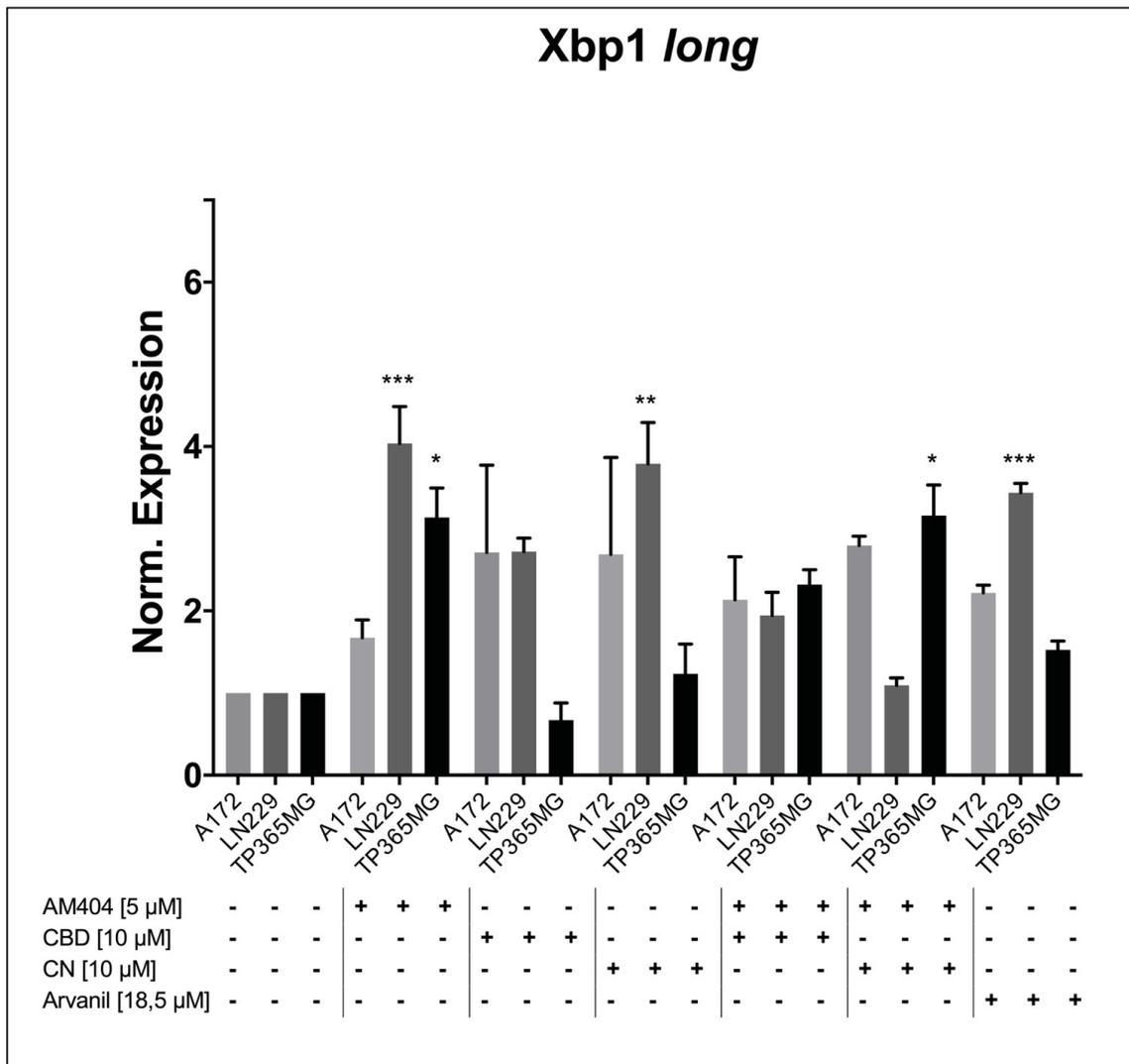


Abb. 20: **Normalisierte Expression von Xbp1 long** in den Zelllinien A172, LN229 und TP365MG nach 2 h Inkubation mit AM404, Cannabidiol (CBD), Cannabinol (CN), AM404 kombiniert mit CBD oder CN, sowie Arvanil (n=3 unabhängige Experimente; *p≤0.05, **p≤0.01, ***p≤0.001).

Abb. 20 zeigt auf die Negativkontrolle normalisierte Veränderungen des mRNA-Expressionsniveaus des Gens Xbp1 long, die nach zweistündiger Inkubation mit verschiedenen Substanzen auftraten. Zudem wurden Lösungsmittelkontrollen mit Ethanol, Methanol und Ethanol mit Methanol kombiniert durchgeführt, die keine signifikante Veränderung des Xbp1 long Expressionniveaus zeigten und nicht abgebildet wurden. Als Negativkontrolle wurden die Zellen mit gewöhnlichem Zellkulturmedium behandelt (erster Block in Abbildung). Die Behandlung mit dem Paracetamol-Metabolit AM404 führte in allen Zelllinien zu einem mitunter signifikanten Anstieg der mRNA-Expression von Xbp1 long. Auch die beiden Cannabinoide CBD und CN führten zu einem Anstieg der Expression in den Zelllinien A172 und LN229, wobei eine hohe Varianz innerhalb der Replikate auftrat. Die Zelllinie

TP365MG zeigte keine deutliche Hochregulation von Xbp1 *long*. Die Kombination aus AM404 und CBD, beziehungsweise CN, bewirkte auch eine gesteigerte Expression von Xbp1 *long*. Jedoch überstieg diese nicht das unter AM404, CBD oder CN alleine gemessene Niveau. Die Substanz Arvanil bewirkte in allen drei Zelllinien einen teilweise signifikanten Anstieg der Expression von Xbp1 *long*.

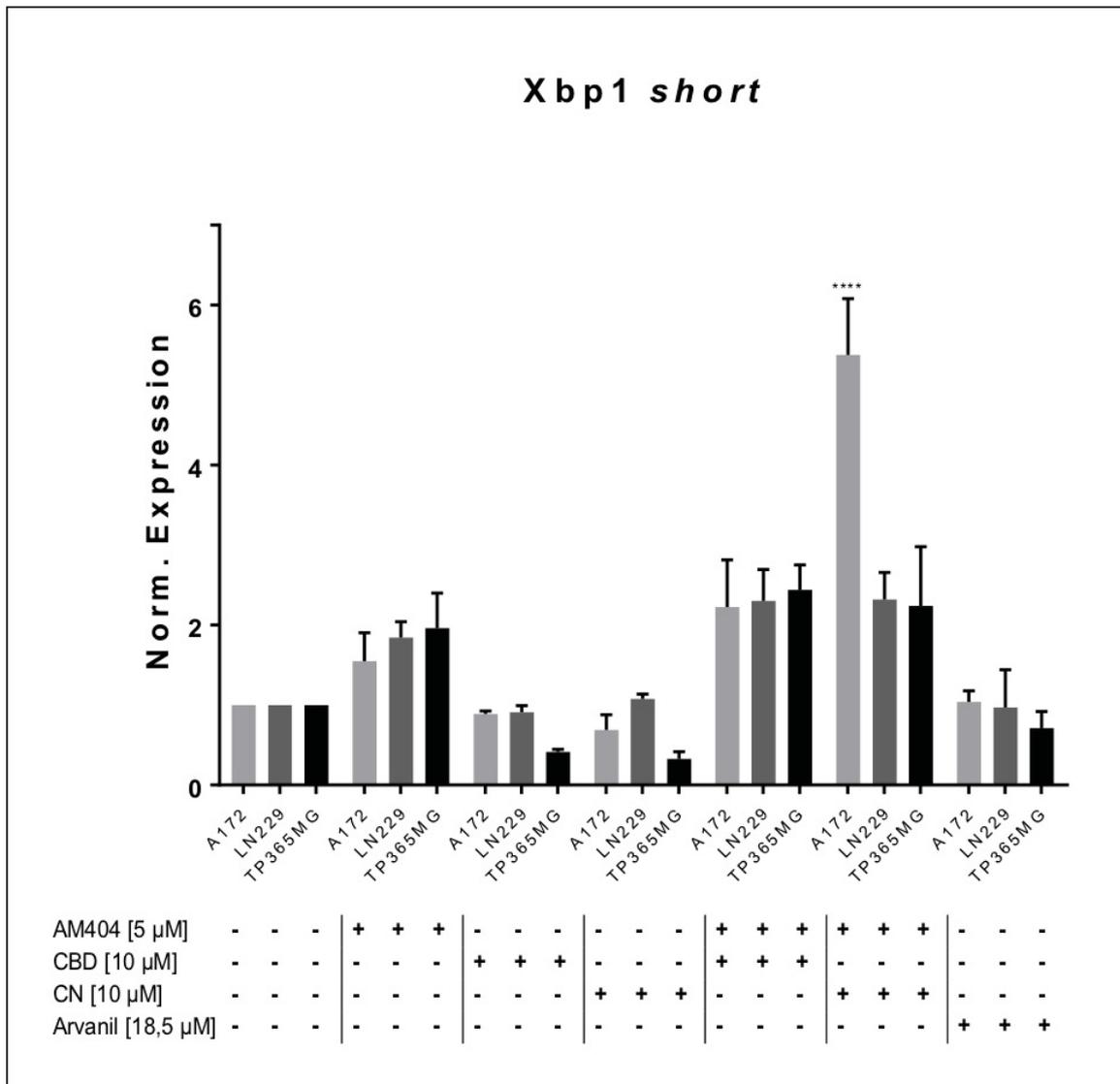


Abb. 21: **Normalisierte Expression von Xbp1 short** in den Zelllinien A172, LN229 und TP365MG nach 2 h Inkubation mit AM404, Cannabidiol (CBD), Cannabinol (CN), AM404 kombiniert mit CBD oder CN, sowie Arvanil (n=3 unabhängige Experimente; ****p<0.0001).

Neben Xbp1 *long* wurde auch die Expression von Xbp1 *short* überprüft (Abb. 21), welches durch alternatives Spleißen aus Xbp1 *long* hervorgeht und einen wichtigen Bestandteil der *unfolded protein response* bildet. Es sind die unbehandelte, nur mit Zellkulturmedium inkubierte Negativkontrolle und die Resultate der

Versuchsbedingungen abgebildet. Die mitgeführten Lösungsmittelkontrollen zeigten keine Veränderungen des Xbp1 *short* Expressionsniveaus und sind nicht in der Abbildung enthalten.

Nach zweistündiger Inkubation mit AM404 zeigte sich ein leichter, aber nicht signifikanter Anstieg der Expression von Xbp1 *short* in allen drei Zelllinien. Im Gegensatz dazu blieb die Expression unter der Behandlung mit CBD und CN unverändert, beziehungsweise fiel im Fall der Zelllinie TP365MG sogar ab. Gleiches ließ sich auch unter Arvanil-Behandlung feststellen. Im Falle der Kombinationsbehandlung aus Cannabidiol oder Cannabinol mit AM404 verdoppelte sich die relative Menge der Xbp1 *short* mRNA im Vergleich zur unbehandelten Negativkontrolle. In der Zelllinie A172 bewirkte die Inkubation mit CN in Kombination mit AM404 sogar eine Verfünffachung der relativen mRNA-Expression.

3.6. Nachweis einer veränderten Rezeptorexpression in behandelten Glioblastomzellen

Um zu überprüfen, ob eine zweistündige Behandlung mit Cannabinoiden alleine und in Kombination mit AM404 zu einer Veränderung der mRNA-Expression von CB₁, CB₂ und TRPV₁ führt, wurde die cDNA behandelter Zellen mittels real time PCR untersucht. Es konnten keine signifikanten Veränderungen der Rezeptorexpression von CB₁, CB₂ und TRPV₁ festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

3.7. Nachweis von Apoptose in behandelten Glioblastomzellen

Um herauszufinden, ob die in den Kapitel 3.2 und 3.3 aufgezeigte Reduktion der Viabilität von Glioblastomzellen auf Apoptose beruht, wurde nach 48-stündiger Inkubation mit den vorbeschriebenen Substanzen eine Färbung mit Annexin V, welches apoptotische Zellen anfärbt, und 7-AAD, welches nekrotische Zellen anfärbt, durchgeführt. Sodann wurden die gefärbten Zellen durchflusszytometrisch erfasst und ausgewertet.

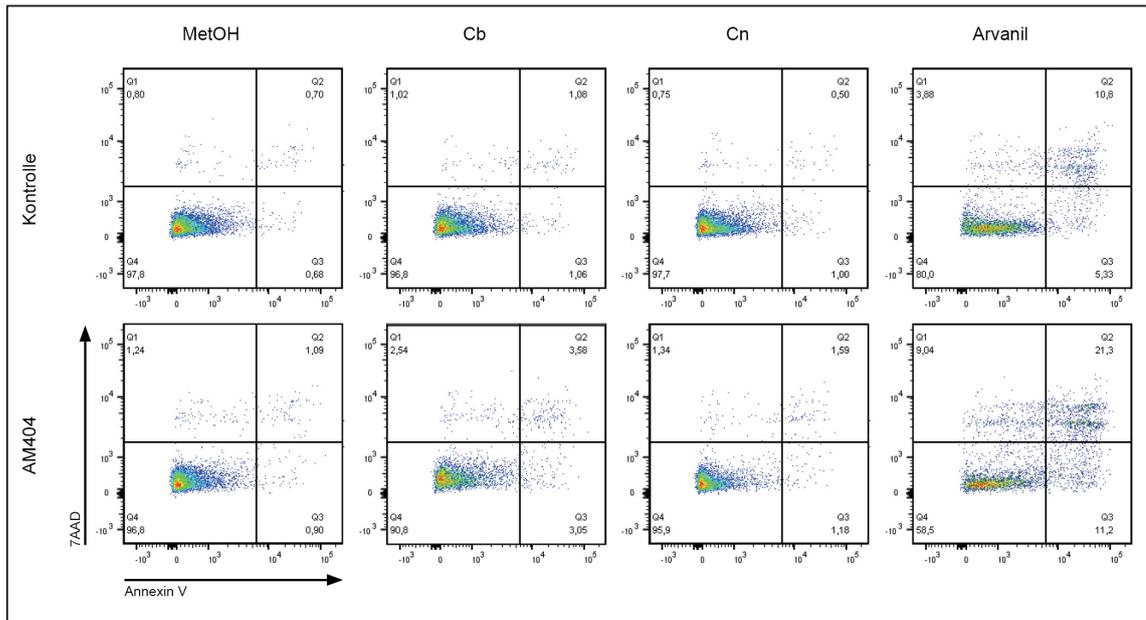


Abb. 22: 7-AAD und Annexin V Färbung in der Zelllinie A172 nach 48 h Inkubation mit Methanol (MetOH, Lösungsmittelkontrolle), AM404, Cannabidiol (CBD), Cannabinol (CN), und Arvanil und AM404 kombiniert mit CBD, CN, sowie Arvanil.

In Abb. 22 wird ein repräsentatives Ergebnis von vier biologischen Replikaten gezeigt. Die durchflusszytometrisch untersuchten Zellen sind anhand ihrer Bindung mit Annexin V und 7-AAD in das Diagramm eingetragen, in welches eine Vierfeldertafel eingefügt wurde. Im unteren linken Quadranten haben die Zellen weder Annexin V noch 7-AAD gebunden, sie sind folglich vital. Im oberen linken Quadranten haben die Zellen nur 7-AAD gebunden, was nekrotischen Zellen entspricht. Im unteren rechten Quadranten haben die Zellen nur Annexin V gebunden, es handelt sich also um Zellen im Prozess der Apoptose. Im oberen rechten Quadranten haben die Zellen sowohl Annexin V als auch 7-AAD gebunden, das heißt, es handelt sich um avitale Zellen, die sowohl apoptotisch als auch nekrotisch sein können.

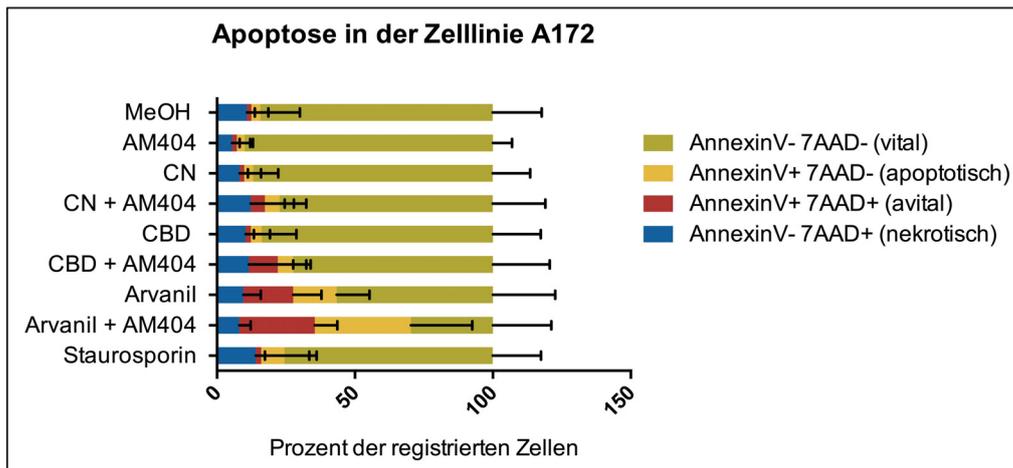


Abb. 23: Anteil apoptotischer Zellen in der Zelllinie A172 nach Inkubation mit Methanol (MeOH, Lösungsmittelkontrolle), AM404, Cannabinol (CN), Cannabidiol (CBD) und Arvanil, sowie Arvanil und AM404 kombiniert mit CBD, CN, sowie Arvanil. Positivkontrolle Staurosporin. (n= 4).

Abb. 23 veranschaulicht die Zusammenfassung von vier biologischen Replikaten. In der Lösungsmittelkontrolle waren 10% der Zellen tot (sowohl apoptotisch als auch avital und nekrotisch), der Anteil der nekrotischen Zellen war darunter am größten. Unter niedrigdosierter, 5µmolarer, AM404 Behandlung waren durchschnittlich 15,73 % der Zellen tot. Nach 48 h Inkubation betrug der Gesamtteil der toten Zellen bei Behandlung mit CN 13,16 % und CBD 16,20 %. Folglich war keine Zunahme der toten Zellen nachweisbar. Im Unterschied hierzu ist in den mit Arvanil (43,41 %) und den mit der Kombinationstherapie behandelten Zellen der Anteil der toten Zellen größer als in der Lösungsmittelkontrolle (CN mit AM404 22,72 %, CBD mit AM404 27,61 %, Arvanil mit AM404 70,05 %). In diesen Behandlungsbedingungen war speziell auch der Anteil apoptotischer Zellen vergrößert. Mit Zugabe von niedrig dosiertem AM404 wurde der Teil apoptotischer Zellen unter CN-Therapie von 3,31 % auf 5,38 % gesteigert und unter CBD-Therapie von 3,86 % auf 5,61 % gesteigert. Unter der Behandlung mit Arvanil und Arvanil mit AM404 war der Anteil apoptotischer Zellen sogar größer als in der Positivkontrolle mit Staurosporin. Zusammengefasst wurde in den mit Arvanil und den Kombinationen mit AM404 behandelten Zellen mehr Apoptose als in der Kontrollgruppe nachgewiesen, aufgrund einer hohen Streubreite der einzelnen Replikate wurde jedoch keine statistische Signifikanz erreicht.

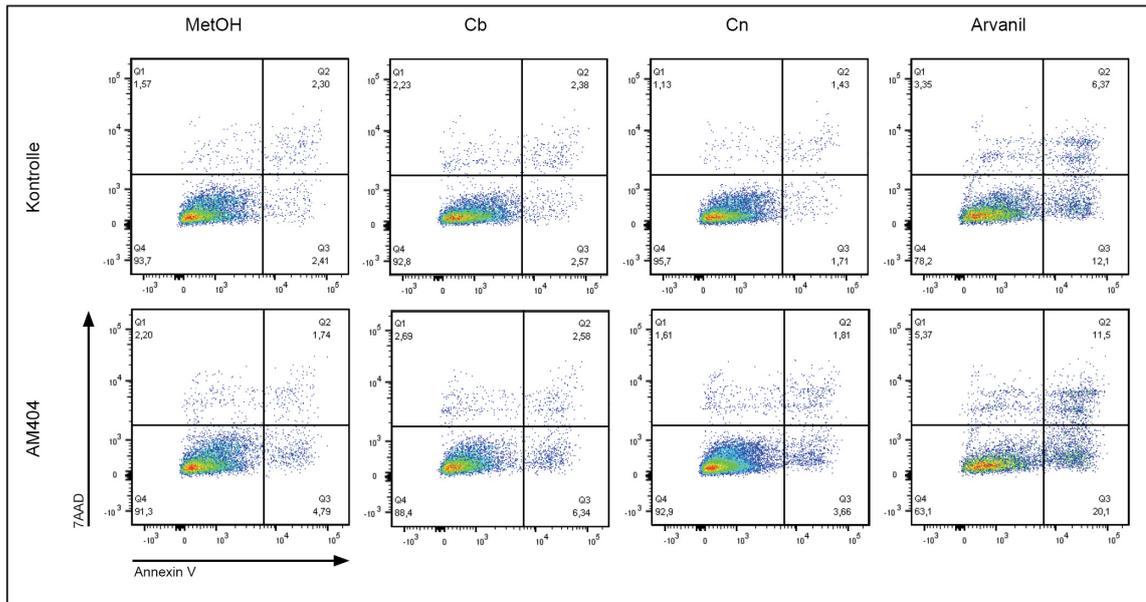


Abb. 24: **7-AAD und Annexin V Färbung in der Zelllinie LN229 nach 48 h Inkubation mit Methanol (MetOH, Lösungsmittelkontrolle), AM404, Cannabidiol (CBD), Cannabinol (CN), und Arvanil und AM404 kombiniert mit CBD, CN, sowie Arvanil.**

Abb. 24 zeigt ein repräsentatives Ergebnis von vier biologischen Replikaten der Zelllinie LN229, die mit verschiedenen Agonisten des ECS behandelt und mit Annexin V und 7-AAD angefärbt wurden.

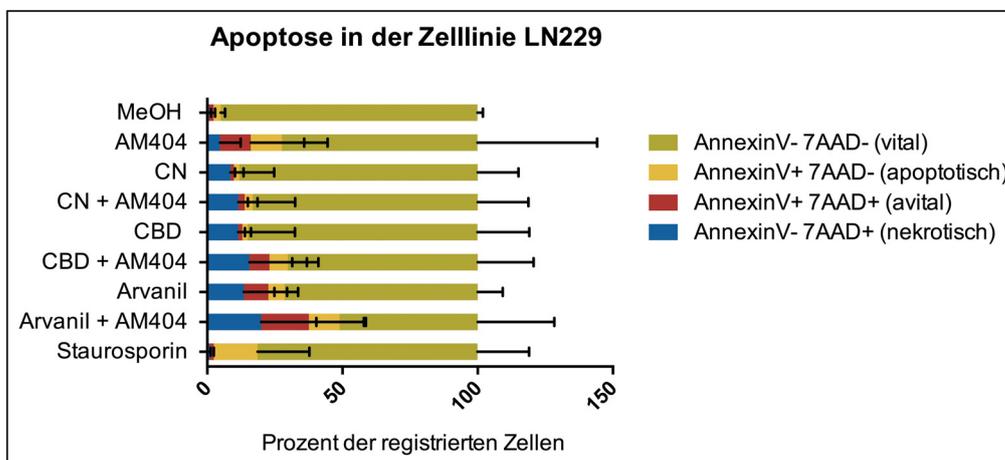


Abb. 25: **Anteil apoptotischer Zellen in der Zelllinie LN229 nach Inkubation mit Methanol (MeOH, Lösungsmittelkontrolle), AM404, Cannabinol (CN), Cannabidiol (CBD) und Arvanil, sowie Arvanil und AM404 kombiniert mit CBD, CN, sowie Arvanil. Positivkontrolle Staurosporin. (n= 4).**

Die Zellen der Zelllinie LN229 wiesen wie in Abb. 25 aufgetragen nach 48 Stunden Behandlung auch in der Lösungsmittelkontrolle mit Methanol eine geringe Menge apoptotischer Zellen auf. In der Zelllinie LN229 führte die Behandlung mit AM404 zu einer Zunahme der apoptotischen Zellen auf durchschnittlich 11,58 %. Die Behandlung mit CN, CN mit AM404, und CBD führte zu keiner erkennbaren Zunahme der

apoptotischen Zellfraktion nach 48 Stunden Inkubationszeit. Wie auch in der Zelllinie A172 zeigten die mit CBD mit AM404, Arvanil und Arvanil mit AM404 inkubierten Zellen einen größeren apoptotischen Anteil als die Lösungsmittelkontrolle. Keine der Behandlungsbedingungen erreichte das Niveau der Positivkontrolle mit Staurosporin. Auffällig ist allerdings, dass bei allen Behandlungsbedingungen die kumulierte Menge der toten Zellen (apoptotisch, nekrotisch und avital) deutlich zunahm. Aufgrund einer hohen Varianz innerhalb der Replikate wurde hierbei keine statistische Signifikanz erreicht.

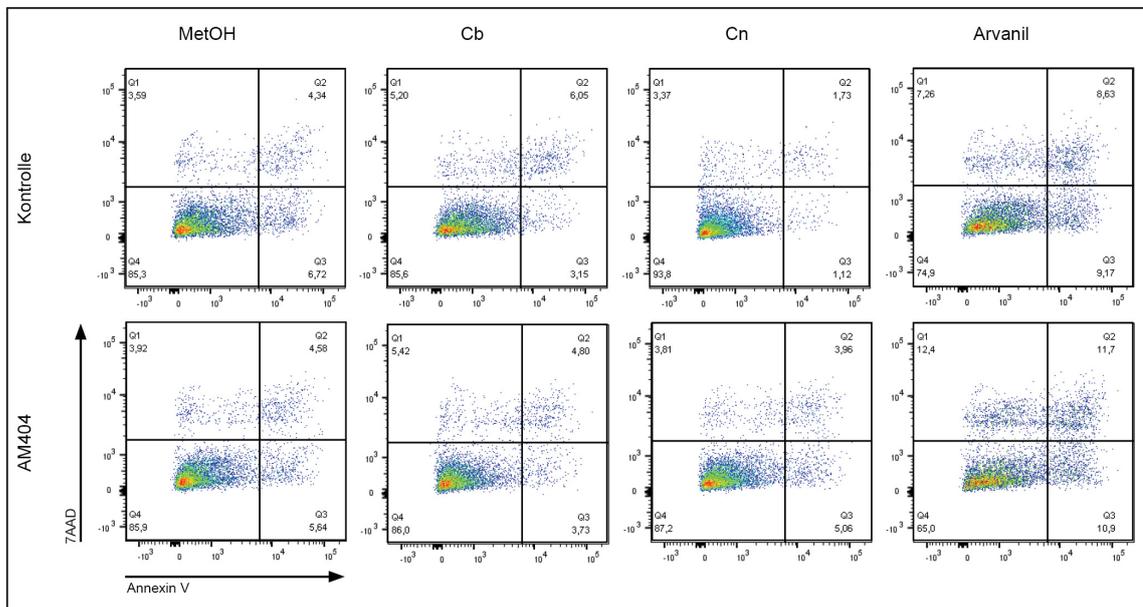


Abb. 26: 7-AAD und Annexin V Färbung in der Zelllinie TP365MG nach 48 h Inkubation mit Methanol (MetOH, Lösungsmittelkontrolle), AM404, Cannabidiol (CBD), Cannabinol (CN), und Arvanil und AM404 kombiniert mit CBD, CN, sowie Arvanil.

Abb.26 zeigt ein repräsentatives Ergebnis von vier biologischen Replikaten der Annexin V und 7-AAD Färbung der Zelllinie TP365MG.

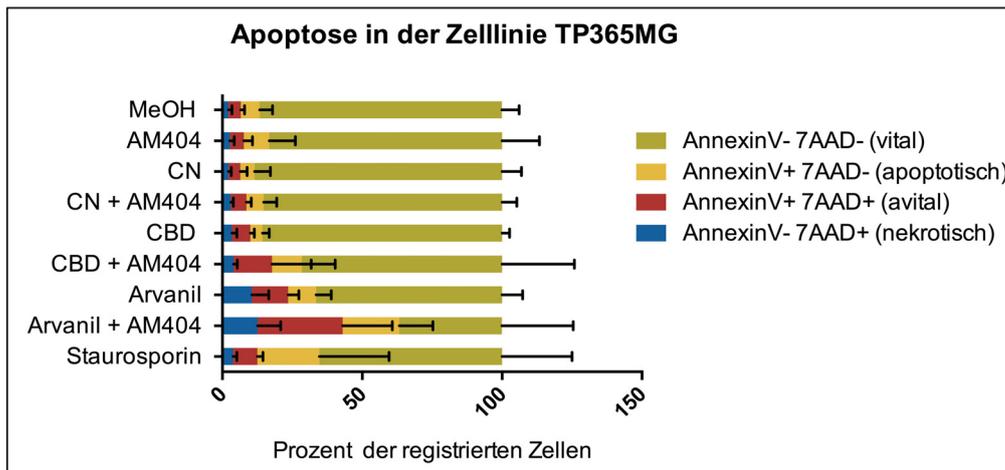


Abb. 27: Anteil apoptotischer Zellen in der Zelllinie TP365MG nach Inkubation mit Methanol (MeOH, Lösungsmittelkontrolle), AM404, Cannabinol (CN), Cannabidiol (CBD) und Arvanil, sowie Arvanil und AM404 kombiniert mit CBD, CN, sowie Arvanil. Positivkontrolle Staurosporin. (n= 4).

In den Zellen der Linie TP365MG betrug der Anteil apoptotischer Zellen in der Lösungsmittelkontrolle 6,76 % und in der Positivkontrolle 22,22 % (siehe Abb. 27). Verglichen damit war nach 48 h Inkubation mit AM404, CN, CN mit AM404 und CBD keine Zunahme der apoptotischen Fraktion nachweisbar. Im Unterschied dazu war unter Behandlung mit CBD mit AM404, Arvanil einzeln und in Kombination mit AM404 eine deutliche Zunahme der toten und apoptotischen Zellen sichtbar. Unter diesen drei Behandlungsbedingungen wurden auch vermehrt avitale Zellen detektiert, die sowohl Annexin V als auch 7-AAD banden und damit nicht eindeutig der nekrotischen oder apoptotischen Gruppe zuteilbar waren. Aufgrund einer hohen Varianz innerhalb der Replikate wurde auch hier keine statistische Signifikanz erreicht.

3.8. Nachweis von Autophagie in behandelten Glioblastomzellen

Um die Frage zu beleuchten, ob eine Kombination aus Cannabinoiden mit AM404 zu einer Intensivierung von autophagischen Prozessen in humanen Glioblastomzellen führt, wurden Zellen der Zelllinien A172, LN229 und TP365MG für 8 Stunden mit Cannabinoiden alleine oder in Kombination mit AM404 inkubiert. Daraufhin wurden Western Blots sowie eine Immundetektion des konstitutionell vorhandenen Proteins LC3B-I und des im Autophagosom enthaltenen Proteins LC3B-II durchgeführt.

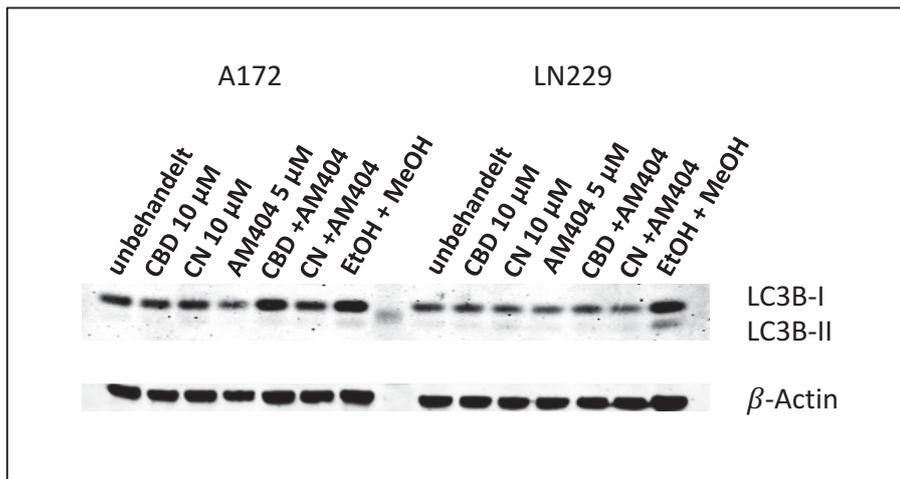


Abb. 28: Western Blot und Immundetektion der LC3B-Unterformen I und II in Glioblastomzelllinien. Abgebildet ist eins von drei gleichwertigen biologischen Replikaten. Als Ladekontrolle diente das Protein β -Actin. Zellen der Zelllinien A172 und LN229 wurden mit Cannabidiol (CBD) oder Cannabinol (CN) in je 10 μ molarer Konzentration behandelt, zudem mit AM404 in 5 μ molarer Konzentration. In der Kombinationsbehandlung wurden die selben Konzentrationen wie einzeln angewandt. Als Kontrolle wurden die Zellen mit Ethanol und Methanol behandelt, welche die Lösungsmittel von AM404 und CBD/CN waren.

Abb. 28 präsentiert eins von drei gleichwertigen biologischen Replikaten. Die Intensität der oberen Bande, die LC3B-I darstellt, wurde durch die unterschiedlichen Behandlungskonditionen nur geringfügig beeinflusst. In Zelllinie A172 nahm die Intensität durch eine Kombinationsbehandlung aus CBD und AM404 sowie durch die Behandlung mit den beiden Lösungsmitteln Ethanol und Methanol leicht zu. In Zelllinie LN229 zeigte sich diese Zunahme der Intensität nur in der Lösungsmittelkontrolle. Auch die untere Bande, die LC3B-II darstellt, zeigte keine Zunahme unter der Behandlung mit Cannabinoiden alleine oder in Kombination mit AM404. Es konnte folglich keine Autophagie nach 8 Stunden Inkubation mit Substanzen mit Einfluss auf das ECS gezeigt werden.

4. Diskussion

4.1. Ergebnisse dieser Arbeit

4.1.1. Expression von CB₁, CB₂ und TRPV₁ mRNA in astrozytären Gliomen

Die in dieser Arbeit analysierte Gruppe von astrozytären Gliomen und normalen Hirngewebsproben zeigte eine aberrante Expression von ECS-assoziierten Rezeptoren.

mRNA-Expression von CB₁ in astrozytären Gliomen

Die mRNA-Expression von CB₁ war in den untersuchten astrozytären Gliomen im Vergleich zu normalem Hirngewebe generell signifikant erniedrigt. Eine unterschiedliche Expression in Abhängigkeit vom WHO-Grad oder dem IDH-Mutationsstatus war dagegen innerhalb der Tumoren nicht nachzuweisen. Die eigenen Befunde bestätigen somit die Ergebnisse einer anderen Arbeitsgruppe, die für Glioblastome durch Western Blot-Analysen eine verminderte CB₁ Proteinexpression im Vergleich zu normalem Hirngewebe zeigten (41). In der eigenen Arbeit fand sich zudem eine verminderte CB₁ mRNA-Expression bereits in astrozytären Gliomen der WHO-Grade II und III.

mRNA-Expression von CB₂ in astrozytären Gliomen

Die von anderen Autoren auf Proteinebene schon beschriebene verstärkte CB₂ Expression in Glioblastomen im Vergleich zu normalem Hirngewebe konnte in der eigenen Arbeit auf mRNA-Expressionsebene bestätigt werden. Die mRNA-Expression von CB₂ stieg sowohl in IDH-mutierten als auch in IDH-Wildtyp Gliomen mit höherem WHO-Grad an, was zu den Befunden anderer Autoren passt (39)(40).

mRNA-Expression von TRPV₁ in astrozytären Gliomen

Auch die in der Fachliteratur schon beschriebene erhöhte Expression von TRPV₁ in Gliomen (z.B. 103) konnte in dieser Arbeit reproduziert werden. Abgesehen von der kleinen Gruppe untersuchter Glioblastome mit IDH-Mutation zeigten alle astrozytären Tumorgruppen eine im Vergleich zu normalem Hirngewebe erhöhte TRPV₁ mRNA-Expression. Die Expressionslevel waren dabei nicht eindeutig abhängig vom WHO-Grad oder vom IDH-Mutationsstatus.

Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse bezüglich der Expression von CB₁, CB₂ und TRPV₁ sind insofern etwas limitiert, als dass nur eine relativ kleine Gruppe

ausschließlich astrozytärer Gliome untersucht wurde. Ob möglicherweise Unterschiede in der Expression von CB₁, CB₂ und TRPV₁ in anderen Gliomtypen, z.B. Oligodendrogliomen oder Ependymomen vorliegen, kann somit auf Basis der eigenen Ergebnisse nicht beantwortet werden.

Glioblastomzelllinien

Neben den Tumorproben wurden auch sechs verschiedene humane Glioblastomzelllinien auf die Expression von CB₁, CB₂ und TRPV₁ mRNA hin überprüft. Dabei war in allen Zelllinien die CB₁-Expression im Vergleich zu gesundem Hirngewebe drastisch erniedrigt, so wie es auch in den Tumorproben der Fall war. Die CB₂-Expression in den Zelllinien wich vom Expressionsmuster der Tumorproben ab, weil nur in der Zelllinie LN229 eine Überexpression im Vergleich zu normalem Hirngewebe festgestellt wurde und die Expression in den anderen Zelllinien im Vergleich nicht erhöht war. Die TRPV₁-Expression der Zelllinien zeigte keine Kongruenz zu den Tumorproben. Hier stellte sich eine durchweg im Vergleich zu normalem Hirngewebe erniedrigte Expression in den Zelllinien dar, wobei diese in den Gewebeproben von Glioblastomen erhöht war.

*4.1.2. Effekt von Cannabidiol, Cannabinol, AM404 und Arvanil auf *in vitro* kultivierte Glioblastomzellen*

In dieser Arbeit wurden vier Substanzen mit Angriffspunkten am endogenen Cannabinoidsystem auf ihre zytotoxische Wirkung auf humane Glioblastomzellen untersucht. Dabei handelte es sich um die pflanzlichen Cannabinoide Cannabidiol (CBD) und Cannabinol (CN), die mittlerweile synthetisch hergestellt werden können. Diese wurden bewusst aus der großen Gruppe der pflanzlichen Cannabinoide ausgewählt, weil sie im Gegensatz zu THC keine psychotropen Effekte auf den Konsumenten haben und sich im Prozess der Legalisierung befinden.

Dass Cannabinoide das Wachstum und die Vitalität von Glioblastomzellen vermindern können, wurde schon in mehreren Publikationen gezeigt (63,72,101). Dabei stellten Scott et al. IC₅₀-Werte von 11 µM (Zelllinie T98G) bis 18 µM (Zelllinie U87MG) für CB fest (102). Diese Größenordnung ließ sich in dieser Arbeit replizieren, wobei für alle sechs Zelllinien der IC₅₀-Wert um 12 µM lag.

Für CN lagen noch keine Daten zur zytotoxischen Wirkung auf Glioblastomzellen vor. In dieser Arbeit wurden IC₅₀-Werte im Bereich von 13,71 µM bis 30 µM (extrapoliert) eruiert. Die geringere zytotoxische Potenz von CN lässt sich möglicherweise dadurch erklären, dass CN ein schwächerer Agonist am CB₁-Rezeptor ist als CBD, aber dafür stärker an den CB₂-Rezeptor bindet (103). Die in den benutzten Glioblastomzelllinien verminderte CB₂-Expression könnte daher eine Ursache für die geringere Wirkung von CN in diesen Zellmodellen sein.

Als weitere Substanz wurde AM404 erprobt. Der aktive Metabolit von Paracetamol zeigte nur bei 20 µM eine Reduktion der Zellvitalität in den untersuchten Glioblastomzelllinien. In den niedrigeren getesteten Konzentrationen von 2,5 µM, 5 µM und 10 µM konnte in vier von sechs Zelllinien sogar eine gesteigerte Proliferation beobachtet werden (s. Seite 40). Casper et al. publizierten 2000, dass Paracetamol auf selektive Weise das Wachstum von Gliomzellen inhibieren kann und die Radiosensitivität ebenjener erhöht (88). Jedoch wurden in dieser Studie Konzentrationen von 1 bis 5 mM Paracetamol verwendet und der Effekt trat erst bei 3 mM ein. Dass solch hohe Konzentrationen *in vivo* im Tumorgewebe erreichbar sind, ist unrealistisch. Nach der Infusion von 20 mg Paracetamol pro Kilogramm Körpergewicht, was der klinischen Standarddosierung entspricht, sind maximale Plasmakonzentrationen von 17,5 mg/l beschrieben worden. Bei der oralen Einnahme einer handelsüblichen Tablette Paracetamol von 1000 mg sogar nur Plasmakonzentrationen von 11 mg/l (104). Da AM404 erst im Gehirngewebe durch die FAAH aus Paracetamol gebildet wird, ist dieses in noch niedrigeren Konzentrationen im Liquor vorzufinden. In der Fachliteratur werden Liquorkonzentrationen von 60 nmol/l genannt (105). Die Konzentration von AM404 im Gehirngewebe selbst ist noch unerforscht. Nach Betrachtung dieser Daten wurde für die folgenden Dosis-Wirkungskurven, in denen die synergistische Zytotoxizität von CBD und CN in Kombination mit AM404 getestet werden sollte, eine Basis-Konzentration von 5 µM für AM404 ausgewählt. Dabei handelte es sich um eine eindeutig nicht toxische Konzentration und zudem um eine Konzentration, die der klinischen Realität deutlich näher liegt, als bei Casper et al. (88).

Bei der vierten in dieser Arbeit getesteten Substanz handelte es sich um Arvanil, ein Hybrid aus endogenem Cannabinoid und Vanilloid, von dem schon antitumoröse

Wirkungen auf Glioblastome bekannt sind. Stock et al. arbeiteten mit einer Konzentration von 50 nM *in vivo* und beobachteten eine deutliche Verkleinerung der Tumorgröße in Mäusen (93). In der vorliegenden Arbeit wurden Konzentrationen im Bereich von 0,3 bis 76 µM *in vitro* erprobt. Von den sechs getesteten Glioblastomzelllinien wiesen drei einen IC₅₀-Wert von 30 bis 40 µM auf, bei den drei anderen lag der IC₅₀-Wert außerhalb der angewandten Konzentrationen. Damit erwies sich die antitumoröse Potenz von Arvanil *in vitro* als schwächer als jene der Phytocannabinoide.

4.1.3. Cannabidiol und AM404 haben synergistische antitumoröse Effekte, während dies für Cannabinol und AM404 nur eingeschränkt gilt

Im zentralen Teil der vorliegenden Arbeit war das Ziel herauszufinden, ob eine Kombinationstherapie von CBD und CN mit AM404 einen stärkeren zytotoxischen Effekt auf humane Glioblastomzelllinien ausübt, als eine alleinige Gabe der Cannabinoiden. Zum einen wurde schon gezeigt, dass AM404 die Suszeptibilität von Gliomen gegenüber Bestrahlung verstärkt (88), zum anderen agiert AM404 (unter anderem) als Agonist des endogenen Cannabinoidsystems, welches nachweislich die antitumoröse Wirkung von Cannabinoiden vermittelt (35). Darüber hinaus entfaltet AM404, wie auch viele *non-steroidal anti-inflammatory drugs* (NSAIDs), eine inhibitorische Wirkung auf die Cyclooxygenase-2 (COX-2)(106). Dieses Enzym, welches Teil der Prostaglandinsynthese ist, ist in Glioblastomen häufig überexprimiert und könnte von großer Bedeutung für den Tumormetabolismus sein (107). Damit bietet sich ein weiterer Angriffspunkt für AM404 und andere NSAIDs, wie es schon in der Fachliteratur diskutiert wurde (89). Der Einsatz von eigentlich nicht-onkologischen Medikamenten im Kampf gegen Krebsleiden bezeichnet man in diesem Kontext auch als *drug repurposing* (108). Möglicherweise ist die große Breite der Angriffspunkte der Grund, warum sich synergistische Effekte zeigen, wenn Cannabinoide mit AM404 kombiniert werden.

Um die verschiedenen Behandlungskonditionen zu vergleichen, wurde der IC₅₀-Wert der Cannabinoide (CBD oder CN) als Parameter herangezogen. In der Kontrollgruppe wurden Glioblastomzelllinien mit CBD in verschiedenen Konzentrationen und 0,0075 % Ethanol, welches das Lösungsmittel von AM404 war, behandelt. Hier wurden IC₅₀-

Werte von 10,93 bis 18,82 μM erreicht. In der Versuchsgruppe waren die Zellen zusätzlich zu CBD noch 5 μM AM404 ausgesetzt. Die IC_{50} -Werte in der Versuchsgruppe lagen allesamt unterhalb der IC_{50} -Werte der Kontrolle und rangierten im Bereich von 9,02 bis 14,42 μM . Damit erwies sich die Kombination von CBD mit AM404 in allen Zelllinien als potenter als CBD alleine. Die statistische Auswertung mittels t-Test ergab zudem, dass die Reduktion des IC_{50} -Werts in allen sechs Zelllinien signifikant war. Die deutlichste Reduktion des IC_{50} -Werts wurde in der Zelllinie LN229 erreicht, wo er durch die Zugabe von AM404 von 15,84 auf 9,65 μM gesenkt werden konnte.

Im Gegensatz hierzu konnte die zytotoxische Potenz von CN durch AM404 nur geringfügig gesteigert werden. In der Kontrollbedingung mit Ethanol ergaben sich IC_{50} -Werte von 13,71 bis 30 μM und in der Versuchsbedingung mit AM404 IC_{50} -Werte von 12,18 bis 27,71 μM . Statistische Signifikanz zwischen Kontroll- und Versuchsgruppe wurde nur in den Zelllinien T98G und U87MG erreicht.

Auffällig ist, dass die IC_{50} -Werte von CBD und CN in Kombination mit Ethanol höher liegen, als ohne Ethanol. Dies ist in den Dosis-Wirkungskurven von CBD und CN alleine in Kapitel 3.2.2 und 3.2.3 zu sehen, wo IC_{50} -Werte von 12 μM für CBD und von 17 μM für CN festgestellt wurden. Eine mögliche Erklärung dafür könnte sein, dass die Dosis-Wirkungskurven von CBD und CN einige Wochen vor dem Kombinations-Experiment angefertigt wurden. Da es sich bei CBD und CN um sehr flüchtige und auch lichtinstabile Verbindungen handelt, könnte es trotz größter Sorgfalt zu einem gewissen Wirkungsverlust über diesen Zeitraum gekommen sein.

Die Frage, ob durch die Hinzugabe von AM404 die zytotoxische Wirkung von Phytocannabinoiden gesteigert werden kann, lässt sich für CBD uneingeschränkt mit Ja beantworten. Im Falle von CN waren die Effekte deutlich geringer ausgeprägt und nur in zwei Zelllinien signifikant. Um diese Unklarheit zu beheben und um die Effekte der Kombination aus Cannabinoiden mit AM404 weiter zu beleuchten, wurden weitere Versuche durchgeführt.

4.1.4. Nach einer 15-tägigen Behandlung ist die Kombination aus Cannabinoiden mit AM404 der alleinigen Gabe von Cannabinoiden überlegen

In Kapitel 3.4 wurde durch *Clonogenic Assays* dargestellt, inwiefern eine Langzeitbehandlung mit Substanzen mit Einfluss auf das ECS das Wachstum von

Glioblastomzellen *in vitro* beeinflusst. In diesem Versuch wurde eine Wirkungsverstärkung von CBD und CN durch AM404 validiert. Das Zellwachstum der Linien LN229 und TP365MG wurde durch die Cannabinoide alleine nur minimal gehemmt, wohingegen die Kombinationsbehandlung zu einer augenfälligen Reduktion der Zellklone führte. Zu beachten ist, dass in diesem Versuchsansatz mit CBD-/ CN-Konzentrationen von 5 μ M und wie gehabt mit 5 μ M AM404 gearbeitet wurde. Dies sollte die Behandlungsdosis in Hinblick auf die Übertragbarkeit *in vivo* realistischer gestalten, da eine Gewebekonzentration von 5 μ M leichter durch *per os* oder intravenöse Gabe zu erreichen ist als 20 μ M. Zudem unterstreicht dieses Ergebnis erneut die synergistische Wirkung von AM404 und CBD/CN, da in den Dosis-Wirkungskurven in Kapitel 3 gezeigt wurde, dass 5 μ M CBD/CN die Zellvitalität nur geringfügig einschränkten. Durch die *Clonogenic Assays* wurde erneut gezeigt, dass AM404 in 5 μ molarer Konzentration keinen eigenen zytotoxischen Effekt auf Glioblastomzellen hatte. Das Cannabinoid-Vanilloid-Hybrid Arvanil entfaltete in der Langzeitbehandlung einen inhibitorischen Effekt auf das Zellwachstum. Es wurde allerdings auch eine Dosis nahe des IC₅₀-Werts angewandt.

4.1.5. Die Kombination aus Cannabinoiden und AM404 erhöht zum Teil den ER-Stress in Glioblastomzellen

Dass Phytocannabinoide ER-Stress in Tumorzellen, auch Gliomzellen im speziellen, hervorrufen, ist schon eine bekannte Tatsache (7). Das Verhalten des ER-Stress-Mediatorproteins Xbp1 war in diesem Zusammenhang bislang unbekannt. Xbp1 ist auch im Zusammenhang mit einer Paracetamol- oder AM404-Therapie noch unerforscht. Es wurde schon publiziert, dass Paracetamol, vornehmlich durch sein toxisches Metabolit N-Acetyl-p-benzochinonimin (NAPQI) vermittelt, in Leber, Niere und Innenohr Zellschäden durch ER-Stress auslösen kann (109–111). Auch die Tatsache, dass Paracetamol und seine Strukturverwandten, wie beispielsweise AM404, zytotoxisch auf Tumorzellen wirken, wurde schon veröffentlicht (112). Was jedoch bislang unklar war, war der Wirkmechanismus. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass Glioblastomzellen nach einer zweistündigen Inkubation mit 5 μ M AM404 erhöhte Xbp1 mRNA-Konzentrationen aufweisen. Dabei bedingte die Behandlung mit AM404 sowohl eine verstärkte Transkription von Xbp1 *long*, als auch einen verstärkten Spleißprozess

in seine aktive Form Xbp1 *short*, was jedoch unterhalb des statistischen Signifikanzniveaus blieb.

Interessanterweise führte die Behandlung der Glioblastomzellen mit CBD und CN einzeln zwar zu einem Anstieg der relativen mRNA-Expression von Xbp1 *long*, aber nicht von Xbp1 *short*. Die Expression von Xbp1 *short* verringerte sich sogar. Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass CBD und CN durch die Aktivierung der Cannabinoidrezeptoren zwar einen Impuls zur Neubildung von Xbp1 *long* geben. Die Konzentration von 10 µM oder die Behandlungszeit von 2 h könnten jedoch zu schwach gewesen sein, um eine relevante Ceramid-Akkumulation und damit eine Unfolded Protein Response auszulösen.

Betrachtet man die Ergebnisse der Versuchsbedingung CBD/CN + AM404, so scheint es, dass das Xbp1 *long*-Expressionsniveau in einem ähnlichen Maß wie in der Einzelbehandlung anstieg. In der Kombination von CBD/CN + AM404 ist die Xbp1 *short* mRNA-Menge im Vergleich zu AM404 einzeln etwas vergrößert. Dies ist bis auf einen Fall (Zelllinie A172, CN+ AM404) jedoch statistisch nicht signifikant und bleibt eine Vermutung. Dass AM404 die ER-Stress-auslösende Potenz von Phytocannabinoiden durch eine Art synergistischen Effekt verstärkt, wurde nicht bestätigt. Die vorliegende Arbeit hat jedoch gezeigt, dass AM404 alleine auch ER-Stress in Glioblastomzellen hervorruft. Eine mögliche Erklärung für diese Tatsache könnte sein, dass AM404 durch die Stimulation des endogenen Cannabinoidsystems ER-Stress auslöst. Damit könnte der Mechanismus dem der pflanzlichen Cannabinoide ähneln und auch durch einen veränderten Sphingolipidstoffwechsel vermittelt sein. Der Zusammenhang zwischen AM404 und ER-Stress ist zudem bemerkenswert, weil durch ER-Stress die zelluläre Expression der COX-2 induziert wird, wie Hung et al. in Leukämie- und Brustkrebszellen zeigten (113). AM404 selbst inhibiert allerdings wiederum die COX-2 (106), sodass sich seine Wirkung auf das ER-Stresslevel dadurch weiter steigern könnte.

Zudem ist in vielen Tumorentitäten, darunter auch in malignen Gliomen, eine Überexpression der COX 2 feststellbar, welche einen integralen Bestandteil der Karzinogenese und Tumorprogression bildet (107,114). Der zugrundeliegende Pathomechanismus ist die Bildung des Prostaglandins E2, welches unter anderem Resistenz gegen Apoptose und eine Attenuierung von regulatorischen T-Zellen bewirkt (115). Das Prostaglandin E2 ist außerdem in der Lage, das proliferationsregulierende

Protein PTEN (*phosphatase and tensin homolog*) zu inhibieren (116). PTEN ist ein Tumorsuppressorprotein, welches in einem Teil der Glioblastome mutiert oder homozygot deletiert ist (117). Dieser Zusammengang unterstreicht, dass es sinnvoll sein könnte, das Potential von COX-hemmenden Medikamenten für die Krebstherapie weiter zu erforschen.

4.1.6. Autophagie und Veränderungen der Rezeptorexpression ließen sich in Glioblastomzellen nach Behandlung mit Cannabinoiden und AM404 nicht nachweisen

Um zu erhellen, durch welche Signalwege die zytotoxische Wirkung von Cannabinoiden in Kombination mit AM404 vermittelt wird, wurden Glioblastomzelllinien mit diesen Substanzen behandelt. Anschließend wurden Western Blots angefertigt und das mit Autophagie assoziierte Protein LC3B-II mittels Immunofluoreszenz detektiert. Es zeigte sich, dass nach 8 h Behandlung keine nennenswerte Veränderung der LC3B-II Menge und somit auch keine gesteigerte Autophagie nachweisbar war. Dies könnte möglicherweise an der gewählten Inkubationszeit liegen, die entweder zu kurz oder zu lang war, um den gesuchten Effekt abzubilden. Nur in der Lösungsmittelkontrolle der Zelllinie LN229 zeigte die LC3B-II Bande eine stärkere Intensität. Da sich dies jedoch in den wiederholten Versuchen nicht reproduzieren ließ, ist die Aussagekraft dieses Resultats gering. Ebenso verhielt es sich mit der Rezeptorexpression von CB₁, CB₂ und TRPV₁. In diesem Experiment wurden die Glioblastomzellen für 2 h mit den diversen Substanzen inkubiert und die mRNA-Expression mittels real time PCR bestimmt. Es waren keine kohärenten Veränderungen der mRNA-Expression von CB₁, CB₂ und TRPV₁ nachzuweisen. Zur Absicherung dieser Ergebnisse sollte dieser Versuch allerdings noch einmal unter optimierten Bedingungen durchgeführt werden sollte.

4.1.7. Einfluss die Kombination von Cannabinoiden mit AM404 auf den Anteil apoptotischer Zellen in Glioblastomzelllinien

Um den Anteil apoptotischer Zellen von nekrotischen Zellen abzugrenzen, wurden Glioblastomzellen mit Cannabinoiden, AM404, Arvanil und der schon bekannten

Kombination aus Cannabinoiden mit AM404 inkubiert und dann mit Annexin V und 7-AAD angefärbt. Durch die durchflusszytometrische Auswertung wurde nachgewiesen, dass der Anteil apoptotischer Zellen durch die Kombinationstherapie in den Zelllinien A172 und TP365MG etwas wuchs, jedoch waren diese Tendenzen nicht statistisch signifikant. Dies galt in diesem Experiment sowohl für die Kombination aus CBD und AM404 als auch für CN und AM404. Viel deutlicher wurde jedoch in allen drei getesteten Zelllinien die Apoptose-induzierende Wirkung des TRPV₂-Agonisten Arvanil, welche durch die Kombination mit AM404 noch weiter gesteigert wurde. Damit konnte die Forschungsfrage, ob die Kombination aus Phytocannabinoiden mit dem Paracetamol-Metabolit eine potentere antitumoröse Therapiestrategie darstellt als nur Phytocannabinoide alleine, nur unter Vorbehalt mit Ja beantwortet werden. Nichtsdestotrotz konnten durch den expliziten Nachweis von Apoptose durch eine Anfärbung mit Annexin V die Ergebnisse der Dosis-Wirkungskurven untermauert und konkretisiert werden. Somit wurde validiert, dass die Kombinationstherapie wirksamer die Vitalität von Glioblastomzellen reduziert, als die alleinige Therapie mit Cannabinoiden. Möglicherweise wurde jedoch die Behandlungszeit von 48 Stunden in diesem Versuch etwas zu lang gewählt, weil der Prozess der Apoptose schon früher eintritt, und nach 48 Stunden nicht mehr spezifisch nachgewiesen werden konnte.

4.2. Limitationen dieser Arbeit

In dieser Arbeit wurde dargestellt, dass der im Gehirngewebe vorkommende Paracetamol-Metabolit AM404 in Glioblastomzellen ER-Stress auslöst und die antiproliferative Wirkung von pflanzlichen Cannabinoiden auf Glioblastomzellen steigert. Der genaue Mechanismus, wodurch AM404 Stress im endoplasmatischen Retikulum provoziert, bleibt allerdings noch unklar. Auch die Erklärung, warum AM404 die antiproliferative Wirkung von CBD und auch von CN in geringerem Maße steigert, wurde in dieser Arbeit nicht gefunden. Wie schon erwähnt wurde, variierte die zytotoxische Potenz der Cannabinoide zwischen den Experimenten. Dies ist eventuell darauf zurückzuführen, dass sich die Konzentration der Wirkstoffe im Lösungsmittel im Laufe der Anwendungsdauer verringerte. Möglicherweise wurden für einige Experimente auch nicht ganz optimale Behandlungszeiten verwendet. Dies wird deutlich in den Versuchen, Apoptose oder Veränderungen in der Rezeptorexpression

nach einer Behandlung mit AM404 und Cannabinoiden aufzuzeigen. Diese Versuche sollten durch weitere Experimente ergänzt werden, in denen verschiedene Behandlungszeiten miteinander verglichen werden, sodass eine zeitliche Abfolge der intrazellulären Prozesse dargestellt werden kann.

In zukünftigen Versuchen sollte ein Augenmerk auf den Signalweg gelegt werden, der die antitumorösen Effekte der Kombination aus AM404 und CBD/CN vermittelt. Der potentielle Zusammenhang zwischen ER-Stress-Antwort und COX2-Inhibition, welcher im vorherigen Abschnitt erläutert wurde, stellt möglicherweise einen geeigneten Ansatzpunkt dar. Da in dieser Arbeit der Fokus auf das Zusammenspiel aus AM404 und Cannabinoiden gelegt wurde, wurde die Kombination aus AM404 und Arvanil weitestgehend außer Acht gelassen. Da es sich bei Arvanil jedoch um eine Substanz handelt, die sowohl endogenen Cannabinoiden als auch endogenen Vanilloiden ähnelt, könnten auch hier durch die Kombinationstherapie synergistische Effekte erzielt werden. Dies deutete sich in der Annexin V Färbung zum Nachweis von Apoptose an und sollte in weiteren Experimenten überprüft werden.

Ob die Kombinationstherapie aus AM404 und Cannabinoiden tatsächlich auch *in vivo* der alleinigen Anwendung von Cannabinoiden überlegen ist, bleibt nachzuweisen. Im Unterschied zu *in vitro*-Experimenten kommen *in vivo* noch viele zusätzliche Faktoren hinzu, welche die Wirksamkeit einer Therapie beeinflussen können. Als einer dieser Faktoren sei insbesondere das *Microenvironment* des Tumors genannt. Durch das überproportionale Tumorwachstum kommt es zu einer unzureichenden Vaskularisierung des Tumors, dies kann zu Hypoxie im Kern des Tumors führen. Es wurde gezeigt, dass die durch CB-Rezeptor-Agonisten vermittelte Apoptoseinduktion in Glioblastomzellen unter hypoxischen Bedingungen reduziert ist (118). Dieses Beispiel illustriert gut, dass es wichtig ist, in präklinischen Experimenten so gut wie möglich die realen Bedingungen im Patienten abzubilden.

4.3. Ausblick

Wie lässt sich Krebs heilen? Diese Frage gehört zu einer der komplexesten Herausforderungen, vor denen die moderne Medizin steht. Um sie zu beantworten, ist unermüdliche Grundlagenforschung notwendig, denn nur mit diesem Wissen lassen sich zielgerichtete Therapien konzipieren. Ein Prinzip der modernen Krebstherapie ist die sogenannte *targeted therapy*, durch welche zielgerichtet veränderte Moleküle

oder Signalwege angesteuert werden, die für entartete Zellen spezifisch sind. Als Beispiel seien hier die in jüngerer Vergangenheit zugelassenen Antikörper wie Vemurafenib oder Trametinib genannt, welche die aberrante Signaltransduktion in Melanomzellen ansteuern und inhibieren und eine Revolution in der Melanomtherapie ausgelöst haben (119,120). Ein weiterer Vorteil der *targeted therapy* ist, dass systemische Nebenwirkungen zwar nicht vermieden, aber im Vergleich zu konventionellen Chemotherapeutika geringer sind. Krebstherapien werden immer besser verträglich und beeinträchtigen damit die Lebensqualität der Patienten weniger. Der in dieser Arbeit präsentierte experimentelle Ansatz der Behandlung von bösartigen Gliomen mit Cannabinoiden und verwandten Substanzen hat ebenfalls die Perspektive einer spezifischen Wirkung auf die Krebszellen bei selbst in hohen Dosierungen nur moderaten Nebeneffekten. Unklar ist allerdings die Frage, ob sich die bisherigen präklinischen Daten zur Wirkung von Cannabinoiden auf Glioblastomzellen *in vitro* oder Glioblastommodelle *in vivo* auf die Situation im Patienten übertragen lassen, d.h. ob Cannabinoide bei Patienten mit einem hochgradig aggressiven Tumor wie dem Glioblastom wirklich einen klinischen Benefit von einer entsprechenden Behandlung haben. Es wurden zwar in Pilotstudien auch mit alleiniger THC-Applikation in das Tumorbett von Glioblastomen begrenzte Erfolge erzielt (72). Realistischer und sinnvoller ist jedoch eine Kombinationstherapie mit dem etablierten Therapiestandard, d.h. Radiatio und Chemotherapie mit Temozolomid, und ggfs. weiteren Pharmaka, um synergistische Effekte auszunutzen (121). Unter diesem Gesichtspunkt wurde in der vorliegenden Arbeit die Kombination aus Cannabinoiden mit dem Paracetamol-Metabolit AM404 in Glioblastomzellen *in vitro* erprobt. Insbesondere die Ergebnisse der Clonogenic Assays waren vielversprechend, da sie bei niedrigen Konzentrationen über einen Zeitraum von 15 Tagen eine signifikante Reduktion der Klonogenität der Glioblastomzellen zeigten. AM404 wirkt wie schon beschrieben einerseits als Agonist des endogenen Cannabinoidsystems und andererseits zusätzlich als COX2-Inhibitor. Sie vereint also zwei antitumoröse Wirkmechanismen in sich. Der Wirkstoffklasse der COX-Inhibitoren, zu denen Aspirin, Ibuprofen, Coxibe und eben auch Paracetamol zählen, werden vielfältige antineoplastische Eigenschaften zugeschrieben (114). Fernerhin ist schon bekannt, dass COX-Inhibitoren die Auftretenswahrscheinlichkeit von Malignomen reduzieren, zum Beispiel von Colonkarzinomen (122).

Eine weitere therapeutische Zielstruktur könnte die Überexpression von CB₂ und TRPV₁ in malignen Gliomen sein, welche in den eigenen Arbeiten bestätigt werden konnte. Zuletzt sei noch die Notwendigkeit der Weiterentwicklung von wirksamen Cannabinoid-Präparaten angesprochen. Es existieren Präparate, durch welche THC und CBD *per os* oder auch *buccal*, also über die Mundschleimhaut, aufgenommen werden können. Die systemische Gabe durch eine intravenöse Injektion oder Infusion ist jedoch aufgrund des lipophilen Charakters der Cannabinoide limitiert. Deshalb wird aktuell die Applikation in das Tumorbett, zum Teil in Form von Mikropartikeln untersucht (123).

Wie lässt sich Krebs heilen? Nach Jahrzehnten intensiver und extensiver Forschung und zahlreichen beachtlichen Erfolgen in der Behandlung verschiedener Krebsarten ist die moderne Medizin noch nicht am Ziel angekommen, diese Frage für bösartige Hirntumoren wie das Glioblastom zu beantworten. Aber sie ist weiter fortgeschritten. Die Überlebenszeit von Patienten mit Glioblastomen hat sich zumindest von wenigen Monaten auf mehr als ein Jahr verlängert. Für weitere Erfolge sind intensive Forschungsanstrengungen notwendig, um die molekularen Mechanismen des Wachstums von bösartigen Gliomen besser zu verstehen und darauf aufbauend gezielte, besser wirksame Therapieansätze zu ermitteln. Einen kleinen Beitrag zu diesen laufenden Anstrengungen konnte die vorliegende Arbeit hoffentlich leisten.

Literaturverzeichnis

1. Weller M, Wick W, Aldape K, Brada M, Berger M, Pfister SM, u. a. Glioma. *Nat Rev Dis Primers*. 16 2015;1:15017.
2. Raizer J, Parsa A. *Current Understanding and Treatment of Gliomas*. Springer; 2014. 186 S.
3. Koch-Institut R. *Krebs in Deutschland | 2013/2014*. :154.
4. Louis DN, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK, u. a. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathologica*. Juni 2016;131(6):803–20.
5. Louis DN, Aldape K, Brat DJ, Capper D, Ellison DW, Hawkins C, u. a. cIMPACT-NOW (the consortium to inform molecular and practical approaches to CNS tumor taxonomy): a new initiative in advancing nervous system tumor classification: cIMPACT-NOW initiative. *Brain Pathology*. November 2017;27(6):851–2.
6. Weller M, van den Bent M, Tonn JC, Stupp R, Preusser M, Cohen-Jonathan-Moyal E, u. a. European Association for Neuro-Oncology (EANO) guideline on the diagnosis and treatment of adult astrocytic and oligodendroglial gliomas. *Lancet Oncol*. 2017;18(6):e315–29.
7. Reifenberger G, Wirsching H-G, Knobbe-Thomsen CB, Weller M. Advances in the molecular genetics of gliomas - implications for classification and therapy. *Nat Rev Clin Oncol*. Juli 2017;14(7):434–52.
8. Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein MJ, Young AC, Bonner TI. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature*. August 1990;346(6284):561–4.
9. Howlett AC, Barth F, Bonner TI, Cabral G, Casellas P, Devane WA, u. a. International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacol Rev*. Juni 2002;54(2):161–202.
10. Felder CC, Briley EM, Axelrod J, Simpson JT, Mackie K, Devane WA. Anandamide, an endogenous cannabimimetic eicosanoid, binds to the cloned human cannabinoid receptor and stimulates receptor-mediated signal transduction. *Proc Natl Acad Sci USA*. 15. August 1993;90(16):7656–60.
11. Devane WA, Hanus L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, Griffin G, u. a. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science*. 18. Dezember 1992;258(5090):1946–9.
12. Jain T, Wager-Miller J, Mackie K, Straiker A. Diacylglycerol Lipase α (DAGL α) and DAGL β Cooperatively Regulate the Production of 2-Arachidonoyl Glycerol in Autaptic Hippocampal Neurons. *Mol Pharmacol*. August 2013;84(2):296–302.
13. Guzmán M. Cannabinoids: potential anticancer agents. *Nat Rev Cancer*. Oktober 2003;3(10):745–55.
14. Pertwee RG. The pharmacology of cannabinoid receptors and their ligands: an overview. *International Journal of Obesity*. 29. März 2006;30(S1):S13–8.

15. Sardinha J, Kelly MEM, Zhou J, Lehmann C. Experimental cannabinoid 2 receptor-mediated immune modulation in sepsis. *Mediators Inflamm.* 2014;2014:978678.
16. Di Marzo V, Fontana A, Cadas H, Schinelli S, Cimino G, Schwartz JC, u. a. Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. *Nature.* 15. Dezember 1994;372(6507):686–91.
17. Cravatt BF, Giang DK, Mayfield SP, Boger DL, Lerner RA, Gilula NB. Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides. *Nature.* 7. November 1996;384(6604):83–7.
18. Karlsson M, Contreras JA, Hellman U, Tornqvist H, Holm C. cDNA cloning, tissue distribution, and identification of the catalytic triad of monoglyceride lipase. Evolutionary relationship to esterases, lysophospholipases, and haloperoxidases. *J Biol Chem.* 24. Oktober 1997;272(43):27218–23.
19. Mackie K. Cannabinoid Receptors: Where They are and What They do. *Journal of Neuroendocrinology.* 20(s1):10–4.
20. Mackie K. Distribution of cannabinoid receptors in the central and peripheral nervous system. *Handb Exp Pharmacol.* 2005;(168):299–325.
21. Hampson RE, Deadwyler SA. Cannabinoids, hippocampal function and memory. *Life Sciences.* 9. Juli 1999;65(6):715–23.
22. Tucci TCK and SA. Endocannabinoids in Appetite Control and the Treatment of Obesity [Internet]. *CNS & Neurological Disorders - Drug Targets.* 2006 [zitiert 22. Oktober 2018]. Verfügbar unter: <http://www.eurekaselect.com/57590/article>
23. Häring M, Kaiser N, Monory K, Lutz B. Circuit Specific Functions of Cannabinoid CB1 Receptor in the Balance of Investigatory Drive and Exploration. *PLoS One* [Internet]. 1. November 2011 [zitiert 22. Oktober 2018];6(11). Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3206034/>
24. Davis MP. Cannabinoids in pain management: CB1, CB2 and non-classic receptor ligands. *Expert Opin Investig Drugs.* August 2014;23(8):1123–40.
25. Bevan S, Quallo T, Andersson DA. TRPV1. *Handb Exp Pharmacol.* 2014;222:207–45.
26. Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature.* 23. Oktober 1997;389(6653):816–24.
27. Frias B, Merighi A. Capsaicin, Nociception and Pain. *Molecules.* 18. Juni 2016;21(6).
28. Palazzo E, de Novellis V, Marabese I, Cuomo D, Rossi F, Berrino L, u. a. Interaction between vanilloid and glutamate receptors in the central modulation of nociception. *Eur J Pharmacol.* 29. März 2002;439(1–3):69–75.
29. Edwards JG. TRPV1 in the central nervous system: synaptic plasticity, function, and pharmacological implications. *Prog Drug Res.* 2014;68:77–104.
30. Starowicz K, Nigam S, Di Marzo V. Biochemistry and pharmacology of endovanilloids. *Pharmacol Ther.* April 2007;114(1):13–33.

31. Ryberg E, Larsson N, Sjögren S, Hjorth S, Hermansson N-O, Leonova J, u. a. The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor. *Br J Pharmacol*. Dezember 2007;152(7):1092–101.
32. Baker D, Pryce G, Davies WL, Hiley CR. In silico patent searching reveals a new cannabinoid receptor. *Trends in Pharmacological Sciences*. 1. Januar 2006;27(1):1–4.
33. Wise A, Jupe SC, Rees S. The Identification of Ligands at Orphan G-Protein Coupled Receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 16. Januar 2004;44(1):43–66.
34. Lauckner JE, Jensen JB, Chen H-Y, Lu H-C, Hille B, Mackie K. GPR55 is a cannabinoid receptor that increases intracellular calcium and inhibits M current. *PNAS*. 19. Februar 2008;105(7):2699–704.
35. Pyszniak M, Tabarkiewicz J, Łuszczki JJ. Endocannabinoid system as a regulator of tumor cell malignancy – biological pathways and clinical significance. *Onco Targets Ther*. 18. Juli 2016;9:4323–36.
36. Chung SC, Hammarsten P, Josefsson A, Stattin P, Granfors T, Egevad L, u. a. A high cannabinoid CB(1) receptor immunoreactivity is associated with disease severity and outcome in prostate cancer. *Eur J Cancer*. Januar 2009;45(1):174–82.
37. Jung CK, Kang WK, Park JM, Ahn HJ, Kim SW, Taek Oh S, u. a. Expression of the cannabinoid type I receptor and prognosis following surgery in colorectal cancer. *Oncol Lett*. März 2013;5(3):870–6.
38. Xu X, Liu Y, Huang S, Liu G, Xie C, Zhou J, u. a. Overexpression of cannabinoid receptors CB1 and CB2 correlates with improved prognosis of patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer Genet Cytogenet*. November 2006;171(1):31–8.
39. Sánchez C, de Ceballos ML, Gomez del Pulgar T, Rueda D, Corbacho C, Velasco G, u. a. Inhibition of glioma growth in vivo by selective activation of the CB(2) cannabinoid receptor. *Cancer Res*. 1. August 2001;61(15):5784–9.
40. Ellert-Miklaszewska A, Grajkowska W, Gabrusiewicz K, Kaminska B, Konarska L. Distinctive pattern of cannabinoid receptor type II (CB2) expression in adult and pediatric brain tumors. *Brain Res*. 16. März 2007;1137(1):161–9.
41. De Jesús ML, Hostalot C, Garibi JM, Sallés J, Meana JJ, Callado LF. Opposite changes in cannabinoid CB1 and CB2 receptor expression in human gliomas. *Neurochem Int*. Juni 2010;56(6–7):829–33.
42. Wu X, Han L, Zhang X, Li L, Jiang C, Qiu Y, u. a. Alteration of endocannabinoid system in human gliomas: Endocannabinoid levels in gliomas. *Journal of Neurochemistry*. März 2012;120(5):842–9.
43. Guindon J, Hohmann AG. The endocannabinoid system and cancer: therapeutic implication. *Br J Pharmacol*. August 2011;163(7):1447–63.
44. Dumitru CA, Sandalcioglu IE, Karsak M. Cannabinoids in Glioblastoma Therapy: New Applications for Old Drugs. *Front Mol Neurosci*. 2018;11:159.
45. Voth EA, Schwartz RH. Medicinal applications of delta-9-tetrahydrocannabinol and marijuana. *Ann Intern Med*. 15. Mai 1997;126(10):791–8.
46. Abrams DI, Guzman M. Cannabis in cancer care. *Clin Pharmacol Ther*. Juni 2015;97(6):575–86.

47. Mattes RD, Engelman K, Shaw LM, Elsohly MA. Cannabinoids and appetite stimulation. *Pharmacol Biochem Behav.* September 1994;49(1):187–95.
48. Benbadis SR, Sanchez-Ramos J, Bozorg A, Giarratano M, Kalidas K, Katzin L, u. a. Medical marijuana in neurology. *Expert Rev Neurother.* Dezember 2014;14(12):1453–65.
49. Turcotte D, Doupe M, Torabi M, Gomori A, Ethans K, Esfahani F, u. a. Nabilone as an adjunctive to gabapentin for multiple sclerosis-induced neuropathic pain: a randomized controlled trial. *Pain Med.* Januar 2015;16(1):149–59.
50. Sumpton JE, Moulin DE. Fibromyalgia. *Handb Clin Neurol.* 2014;119:513–27.
51. ElSohly MA, Slade D. Chemical constituents of marijuana: The complex mixture of natural cannabinoids. *Life Sciences.* Dezember 2005;78(5):539–48.
52. Gaoni Y, Mechoulam R. The isolation and structure of delta-1-tetrahydrocannabinol and other neutral cannabinoids from hashish. *J Am Chem Soc.* 13. Januar 1971;93(1):217–24.
53. Burns J. Coca-Cola Is Considering CBD For Infused Beverage Line [Internet]. *Forbes.* [zitiert 20. September 2018]. Verfügbar unter: <https://www.forbes.com/sites/janetwburns/2018/09/17/coca-cola-is-considering-cbd-for-its-infused-beverages/>
54. Mills B, Yepes A, Nugent K. Synthetic Cannabinoids. *Am J Med Sci.* Juli 2015;350(1):59–62.
55. Federal Drug Admission. Cesamet (nabilone) Capsules For Oral Administration FDA Datasheet.
56. Munson AE, Harris LS, Friedman MA, Dewey WL, Carchman RA. Antineoplastic activity of cannabinoids. *J Natl Cancer Inst.* September 1975;55(3):597–602.
57. Elbaz M, Nasser MW, Ravi J, Wani NA, Ahirwar DK, Zhao H, u. a. Modulation of the tumor microenvironment and inhibition of EGF/EGFR pathway: novel anti-tumor mechanisms of Cannabidiol in breast cancer. *Mol Oncol.* April 2015;9(4):906–19.
58. Park JM, Xian X-S, Choi M-G, Park H, Cho YK, Lee IS, u. a. Antiproliferative mechanism of a cannabinoid agonist by cell cycle arrest in human gastric cancer cells. *J Cell Biochem.* April 2011;112(4):1192–205.
59. Sánchez C, Galve-Roperh I, Canova C, Brachet P, Guzmán M. Delta9-tetrahydrocannabinol induces apoptosis in C6 glioma cells. *FEBS Lett.* 25. September 1998;436(1):6–10.
60. Knobbe CB, Reifenberger G. Genetic alterations and aberrant expression of genes related to the phosphatidylinositol-3'-kinase/protein kinase B (Akt) signal transduction pathway in glioblastomas. *Brain Pathol.* Oktober 2003;13(4):507–18.
61. Carracedo A, Lorente M, Egia A, Blázquez C, García S, Giroux V, u. a. The stress-regulated protein p8 mediates cannabinoid-induced apoptosis of tumor cells. *Cancer Cell.* April 2006;9(4):301–12.
62. Carracedo A, Gironella M, Lorente M, Garcia S, Guzmán M, Velasco G, u. a. Cannabinoids Induce Apoptosis of Pancreatic Tumor Cells via Endoplasmic Reticulum Stress-Related Genes. *Cancer Research.* 1. Juli 2006;66(13):6748–55.

63. Salazar M, Carracedo A, Salanueva ÍJ, Hernández-Tiedra S, Lorente M, Egia A, u. a. Cannabinoid action induces autophagy-mediated cell death through stimulation of ER stress in human glioma cells. *J Clin Invest.* 1. Mai 2009;119(5):1359–72.
64. Singer E, Judkins J, Salomonis N, Matlaf L, Soteropoulos P, McAllister S, u. a. Reactive oxygen species-mediated therapeutic response and resistance in glioblastoma. *Cell Death Dis.* Januar 2015;6(1):e1601.
65. Fonseca BM, Teixeira NA, Correia-da-Silva G. Cannabinoids as Modulators of Cell Death: Clinical Applications and Future Directions. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* 2017;173:63–88.
66. Hundsberger T, Reardon DA, Wen PY. Angiogenesis inhibitors in tackling recurrent glioblastoma. *Expert Rev Anticancer Ther.* Juni 2017;17(6):507–15.
67. Blázquez C, González-Feria L, Alvarez L, Haro A, Casanova ML, Guzmán M. Cannabinoids inhibit the vascular endothelial growth factor pathway in gliomas. *Cancer Res.* 15. August 2004;64(16):5617–23.
68. Blázquez C, Salazar M, Carracedo A, Lorente M, Egia A, González-Feria L, u. a. Cannabinoids inhibit glioma cell invasion by down-regulating matrix metalloproteinase-2 expression. *Cancer Res.* 15. März 2008;68(6):1945–52.
69. Ramer R, Fischer S, Haustein M, Manda K, Hinz B. Cannabinoids inhibit angiogenic capacities of endothelial cells via release of tissue inhibitor of matrix metalloproteinases-1 from lung cancer cells. *Biochemical Pharmacology.* 15. September 2014;91(2):202–16.
70. Ramer R, Bublitz K, Freimuth N, Merkord J, Rohde H, Haustein M, u. a. Cannabidiol inhibits lung cancer cell invasion and metastasis via intercellular adhesion molecule-1. *FASEB J.* April 2012;26(4):1535–48.
71. Haustein M, Ramer R, Linnebacher M, Manda K, Hinz B. Cannabinoids increase lung cancer cell lysis by lymphokine-activated killer cells via upregulation of ICAM-1. *Biochem Pharmacol.* 15. November 2014;92(2):312–25.
72. Guzmán M, Duarte MJ, Blázquez C, Ravina J, Rosa MC, Galve-Roperh I, u. a. A pilot clinical study of Delta9-tetrahydrocannabinol in patients with recurrent glioblastoma multiforme. *Br J Cancer.* 17. Juli 2006;95(2):197–203.
73. Gómez del Pulgar T, de Ceballos ML, Guzmán M, Velasco G. Cannabinoids Protect Astrocytes from Ceramide-induced Apoptosis through the Phosphatidylinositol 3-Kinase/Protein Kinase B Pathway. *Journal of Biological Chemistry.* 27. September 2002;277(39):36527–33.
74. Molina-Holgado E, Vela JM, Arévalo-Martín A, Almazán G, Molina-Holgado F, Borrell J, u. a. Cannabinoids Promote Oligodendrocyte Progenitor Survival: Involvement of Cannabinoid Receptors and Phosphatidylinositol-3 Kinase/Akt Signaling. *J Neurosci.* 15. November 2002;22(22):9742–53.
75. Mechoulam R, Spatz M, Shohami E. Endocannabinoids and Neuroprotection. *Science Signaling.* 23. April 2002;2002(129):re5–re5.
76. Sachs J, McGlade E, Yurgelun-Todd D. Safety and Toxicology of Cannabinoids. *Neurotherapeutics.* Oktober 2015;12(4):735–46.

77. Pertwee RG. Pharmacological and therapeutic targets for Δ^9 tetrahydrocannabinol and cannabidiol. *Euphytica*. 1. Januar 2004;140(1):73–82.
78. Christensen R, Kristensen PK, Bartels EM, Bliddal H, Astrup A. Efficacy and safety of the weight-loss drug rimonabant: a meta-analysis of randomised trials. *Lancet*. 17. November 2007;370(9600):1706–13.
79. WHO Model Prescribing Information: Drugs Used in Anaesthesia: Non-opioid analgesics: Paracetamol [Internet]. [zitiert 6. November 2018]. Verfügbar unter: <http://apps.who.int/medicinedocs/en/d/Jh2929e/6.2.html>
80. von Mering J. Beiträge zur Kenntniss der Antipyretica. *Ther Monatsch*. 1893;7:577–87.
81. Morse HN. Ueber eine neue Darstellungsmethode der Acetylamidophenole. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*. 1. Januar 1878;11(1):232–3.
82. Högestätt ED, Jönsson BAG, Ermund A, Andersson DA, Björk H, Alexander JP, u. a. Conversion of acetaminophen to the bioactive N-acylphenolamine AM404 via fatty acid amide hydrolase-dependent arachidonic acid conjugation in the nervous system. *J Biol Chem*. 9. September 2005;280(36):31405–12.
83. Ghanem CI, Pérez MJ, Manautou JE, Mottino AD. Acetaminophen from liver to brain: New insights into drug pharmacological action and toxicity. *Pharmacol Res*. 2016;109:119–31.
84. Zygmunt PM, Chuang H, Movahed P, Julius D, Högestätt ED. The anandamide transport inhibitor AM404 activates vanilloid receptors. *Eur J Pharmacol*. 12. Mai 2000;396(1):39–42.
85. Mischkowski D, Crocker J, Way BM. From painkiller to empathy killer: acetaminophen (paracetamol) reduces empathy for pain. *Soc Cogn Affect Neurosci*. 2016;11(9):1345–53.
86. Chen Z, Wei H, Pertovaara A, Wang J, Carlson S. Anxiety- and activity-related effects of paracetamol on healthy and neuropathic rats. *Pharmacol Res Perspect*. 2018;6(1).
87. Engström Ruud L, Wilhelms DB, Eskilsson A, Vasilache AM, Elander L, Engblom D, u. a. Acetaminophen reduces lipopolysaccharide-induced fever by inhibiting cyclooxygenase-2. *Neuropharmacology*. August 2013;71:124–9.
88. Casper D, Lekhraj R, Yaparpalvi US, Pidel A, Jaggernauth WA, Werner P, u. a. Acetaminophen selectively reduces glioma cell growth and increases radiosensitivity in culture. *J Neurooncol*. 2000;46(3):215–29.
89. Oksuz E, Atalar F, Tanırverdi G, Bilir A, Shahzadi A, Yazici Z. Therapeutic potential of cyclooxygenase-3 inhibitors in the management of glioblastoma. *J Neurooncol*. Januar 2016;126(2):271–8.
90. Courad JP, Besse D, Delchambre C, Hanoun N, Hamon M, Eschalièr A, u. a. Acetaminophen distribution in the rat central nervous system. *Life Sci*. 10. August 2001;69(12):1455–64.
91. Nazıroğlu M, Cihangir Uğuz A, Koçak A, Bal R. Acetaminophen at Different Doses Protects Brain Microsomal Ca²⁺-ATPase and the Antioxidant Redox System in

- Rats. *Journal of Membrane Biology*. Oktober 2009;231(2–3):57–64.
92. Di Marzo V, Griffin G, De Petrocellis L, Brandi I, Bisogno T, Williams W, u. a. A structure/activity relationship study on arvanil, an endocannabinoid and vanilloid hybrid. *J Pharmacol Exp Ther*. März 2002;300(3):984–91.
93. Stock K, Kumar J, Synowitz M, Petrosino S, Imperatore R, Smith ESJ, u. a. Neural precursor cells induce cell death of high-grade astrocytomas through stimulation of TRPV1. *Nature Medicine*. August 2012;18(8):1232–8.
94. Yoshida H, Matsui T, Yamamoto A, Okada T, Mori K. XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell*. 28. Dezember 2001;107(7):881–91.
95. Riss TL, Moravec RA, Niles AL, Duellman S, Benink HA, Worzella TJ, u. a. Cell Viability Assays. In: Sittampalam GS, Coussens NP, Brimacombe K, Grossman A, Arkin M, Auld D, u. a., Herausgeber. *Assay Guidance Manual* [Internet]. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2004 [zitiert 24. September 2018]. Verfügbar unter: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/>
96. Staurosporine from *Streptomyces* sp. S4400 [Internet]. Sigma-Aldrich. [zitiert 24. September 2018]. Verfügbar unter: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/s4400>
97. Rio DC, Ares M, Hannon GJ, Nilsen TW. Purification of RNA using TRIzol (TRI reagent). *Cold Spring Harb Protoc*. Juni 2010;2010(6):pdb.prot5439.
98. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ Method. *Methods*. Dezember 2001;25(4):402–8.
99. Pierce BCA Protein Assay Kit - Thermo Fisher Scientific [Internet]. [zitiert 24. September 2018]. Verfügbar unter: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/23225>
100. Alptekin M, Eroglu S, Tutar E, Sencan S, Geyik MA, Ulasli M, u. a. Gene expressions of TRP channels in glioblastoma multiforme and relation with survival. *Tumour Biol*. Dezember 2015;36(12):9209–13.
101. Solinas M, Massi P, Cinquina V, Valenti M, Bolognini D, Gariboldi M, u. a. Cannabidiol, a Non-Psychoactive Cannabinoid Compound, Inhibits Proliferation and Invasion in U87-MG and T98G Glioma Cells through a Multitarget Effect. *PLoS One* [Internet]. 21. Oktober 2013 [zitiert 7. Januar 2019];8(10). Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3804588/>
102. Scott KA, Dennis JL, Dalglish AG, Liu WM. Inhibiting Heat Shock Proteins Can Potentiate the Cytotoxic Effect of Cannabidiol in Human Glioma Cells. *Anticancer Res*. November 2015;35(11):5827–37.
103. Petitet F, Jeantaud B, Reibaud M, Imperato A, Dubroeuq M-C. Complex pharmacology of natural cannabinoids: Evidence for partial agonist activity of Δ^9 -tetrahydrocannabinol and antagonist activity of cannabidiol on rat brain cannabinoid receptors. *Life Sciences*. 29. Mai 1998;63(1):PL1–6.

104. Jiang X-L, Zhao P, Barrett JS, Lesko LJ, Schmidt S. Application of Physiologically Based Pharmacokinetic Modeling to Predict Acetaminophen Metabolism and Pharmacokinetics in Children. *CPT: Pharmacometrics & Systems Pharmacology*. 16. Oktober 2013;2(10):e80.
105. Sharma CV, Long JH, Shah S, Rahman J, Perrett D, Ayoub SS, u. a. First evidence of the conversion of paracetamol to AM404 in human cerebrospinal fluid. *J Pain Res*. 28. November 2017;10:2703–9.
106. Saliba SW, Marcotegui AR, Fortwängler E, Ditrich J, Perazzo JC, Muñoz E, u. a. AM404, paracetamol metabolite, prevents prostaglandin synthesis in activated microglia by inhibiting COX activity. *J Neuroinflammation*. 13. Dezember 2017;14(1):246.
107. Qiu J, Shi Z, Jiang J. Cyclooxygenase-2 in glioblastoma multiforme. *Drug Discov Today*. Januar 2017;22(1):148–56.
108. Sleire L, Førde HE, Netland IA, Leiss L, Skeie BS, Enger PØ. Drug repurposing in cancer. *Pharmacol Res*. Oktober 2017;124:74–91.
109. Hur KY, So J-S, Ruda V, Frank-Kamenetsky M, Fitzgerald K, Koteliensky V, u. a. IRE1 α activation protects mice against acetaminophen-induced hepatotoxicity. *J Exp Med*. 13. Februar 2012;209(2):307–18.
110. Lorz C, Justo P, Sanz A, Subirá D, Egido J, Ortiz A. Paracetamol-induced renal tubular injury: a role for ER stress. *J Am Soc Nephrol*. Februar 2004;15(2):380–9.
111. Foufelle F, Fromenty B. Role of endoplasmic reticulum stress in drug-induced toxicity. *Pharmacol Res Perspect* [Internet]. 4. Februar 2016 [zitiert 9. Januar 2019];4(1). Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4777263/>
112. De Lago E, Gustafsson SB, Fernández-Ruiz J, Nilsson J, Jacobsson SOP, Fowler CJ. Acyl-based anandamide uptake inhibitors cause rapid toxicity to C6 glioma cells at pharmacologically relevant concentrations. *J Neurochem*. Oktober 2006;99(2):677–88.
113. Hung J-H, Su I-J, Lei H-Y, Wang H-C, Lin W-C, Chang W-T, u. a. Endoplasmic reticulum stress stimulates the expression of cyclooxygenase-2 through activation of NF-kappaB and pp38 mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem*. 5. November 2004;279(45):46384–92.
114. Goradel NH, Najafi M, Salehi E, Farhood B, Mortezaee K. Cyclooxygenase-2 in cancer: A review. *Journal of Cellular Physiology* [Internet]. [zitiert 21. Januar 2019];0(0). Verfügbar unter: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jcp.27411>
115. Liu B, Qu L, Yan S. Cyclooxygenase-2 promotes tumor growth and suppresses tumor immunity. *Cancer Cell Int*. 2015;15:106.
116. Chang J, Tang N, Fang Q, Zhu K, Liu L, Xiong X, u. a.: Inhibition of COX-2 and 5-LOX regulates the progression of colorectal cancer by promoting PTEN and suppressing PI3K/AKT pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [Internet]. 13. Januar 2018 [zitiert 21. Januar 2019]; unter: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006291X18300676>

117. Knobbe CB, Merlo A, Reifenberger G. Pten signaling in gliomas. *Neuro Oncol.* 1. Juli 2002;4(3):196–211.
118. Sugimoto N, Ishibashi H, Nakamura H, Yachie A, Ohno-Shosaku T. Hypoxia-induced inhibition of the endocannabinoid system in glioblastoma cells. *Oncol Rep.* Dezember 2017;38(6):3702–8.
119. Chapman PB, Robert C, Larkin J, Haanen JB, Ribas A, Hogg D, u. a. Vemurafenib in patients with BRAFV600 mutation-positive metastatic melanoma: final overall survival results of the randomized BRIM-3 study. *Ann Oncol.* 1. Oktober 2017;28(10):2581–7.
120. Long GV, Weber JS, Infante JR, Kim KB, Daud A, Gonzalez R, u. a. Overall Survival and Durable Responses in Patients With BRAF V600-Mutant Metastatic Melanoma Receiving Dabrafenib Combined With Trametinib. *J Clin Oncol.* 10. März 2016;34(8):871–8.
121. Ivanov VN, Wu J, Hei TK. Regulation of human glioblastoma cell death by combined treatment of cannabidiol, γ -radiation and small molecule inhibitors of cell signaling pathways. *Oncotarget.* 26. September 2017;8(43):74068–95.
122. Thun MJ, Namboodiri MM, Heath CW. Aspirin Use and Reduced Risk of Fatal Colon Cancer. *New England Journal of Medicine.* 5. Dezember 1991;325(23):1593–6.
123. Hernán Pérez de la Ossa D, Lorente M, Gil-Alegre ME, Torres S, García-Taboada E, Aberturas M del R, u. a. Local Delivery of Cannabinoid-Loaded Microparticles Inhibits Tumor Growth in a Murine Xenograft Model of Glioblastoma Multiforme. *PLoS One* [Internet]. 22. Januar 2013 [zitiert 18. Dezember 2018];8(1). Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3551920/>

Danksagung

Mein großer Dank gilt Prof. Dr. Guido Reifenberger, meinem Doktorvater, und Dr. Christiane Knobbe-Thomsen, der Betreuerin dieser Arbeit, die es mir ermöglicht haben, am Institut für Neuropathologie der Heinrich-Hein-Universität Düsseldorf zu forschen. Ich wurde herzlich in ihr Team integriert, durfte von ihrer Erfahrung und Expertise profitieren und meine eigenen Forschungsideen frei verfolgen. Allen Mitarbeiter*innen im Institut, vor allem Christianes Arbeitsgruppe, sei herzlich für die Unterstützung (egal ob in Form von fachlichem Rat oder Schokolade) gedankt. Namentlich hervorheben möchte ich Dr. Sascha Steltgens, der mir bei der Durchführung von Western Blots beratend zur Seite stand und Marc Weber, dessen Ergebnisse zum IDH1/2 Mutationsstatus der Tumorproben ich nutzen darf.

Ich danke der Studienstiftung des deutschen Volkes für die finanzielle Förderung meines Studiums und meines Freisemesters.

Ich danke meinen Freunden. Ihr habt euch meinen Kummer angehört, wenn mal etwas nicht lief und habt mich motiviert. Ihr habt die Zeit in Düsseldorf unvergesslich gemacht.

Von den beiden Personen, denen der meiste Dank gebührt, meinen Eltern, erlebst nur noch du, Mama, die Fertigstellung dieser Arbeit mit. Wie sehr wir Papa vermissen, davon fange ich hier nicht an. Ihr beide habt mich unermüdlich unterstützt. Ohne euch hätte ich es schlichtweg nicht geschafft, diese Arbeit zu schreiben.