

Aus der neurochirurgischen Klinik und Poliklinik der
Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Jörg-Christian Tonn

Abteilung für neurochirurgische Forschung

Leiter: Prof. Dr. rer. nat. Rainer Glaß

**Cannabinoide als mögliche Therapeutika
für Glioblastome –
TRPV-vermittelte Pharmakologie
körpereigener Tumorabwehr**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Bernhard Jonathan Nagl

aus

Rosenheim

2022

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. R. Glaß

Mitberichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Kirsten Lauber
PD Dr. med. Rupert Egensperger
Prof. Dr. med. Jochem Herm

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter:

Dekan Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 07.07.2022

Meinen Eltern!

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|----------|
| Zusammenfassung | 1 |
| 1 Theoretische Grundlagen der Arbeit | 2 |
| 1.1 Gliome und Glioblastome – Allgemeine Übersicht und Einführung . | 2 |
| 1.1.1 Einordnung in die Tumore des zentralen Nervensystems und WHO-Klassifikation | 3 |
| 1.1.2 Entstehung und histopathologische Einteilung von Glioblastomen | 4 |
| 1.1.3 Neue molekularpathologische Einteilung in IDH ^{wt} - und IDH ^{mut} - Glioblastome | 5 |
| 1.1.4 Weitere genetische Mutationen | 6 |
| 1.1.5 Epigenetische Mechanismen – MGMT und G-CIMP | 7 |
| 1.1.6 Molekularbiologische Einteilung in Subtypen | 8 |
| 1.1.7 Epidemiologische Betrachtung des Glioblastoms | 9 |
| 1.1.8 Aktuelle Therapiestandards und -erfolge | 10 |
| 1.2 Endogene Tumorsuppression durch neuronale Vorläuferzellen | 12 |
| 1.2.1 Neuronale Vorläuferzellen im gesunden, adulten Gehirn | 12 |
| 1.2.2 Migration neuronaler Vorläuferzellen zu Gliomen | 13 |
| 1.2.3 Molekulare Mechanismen der endogenen Tumorsuppression | 13 |
| 1.2.3.1 Durch bone morphogenetic protein-7 – BMP-7 | 14 |
| 1.2.3.2 Durch Endovanilloide via TRPV-1-Rezeptoraktivierung | 15 |
| 1.2.3.3 Gemeinsame Endstrecke – ER-Stress und ATF-3 | 16 |
| 1.3 Vanilloide und Cannabinoide – bekannte TRPV-Agonisten | 18 |
| 1.3.1 TRPV-Rezeptoren | 18 |
| 1.3.2 Vanilloide | 21 |
| 1.3.3 Cannabinoide | 22 |
| 1.3.4 Etablierter klinischer Einsatz pflanzlicher Cannabinoide | 25 |
| 1.4 Flavonoide als Aktivatoren des BMP-7-Signalweges | 25 |
| 1.5 Tumornekrosefaktor- α – TNF- α | 26 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 2 | Verwendete Materialien und Methoden | 28 |
| 2.1 | Zellkultur | 28 |
| 2.1.1 | Zelllinien | 28 |
| 2.1.2 | Primärkulturen | 30 |
| 2.1.3 | Versuchsaufbau im Multi-Well-Format | 31 |
| 2.2 | Verwendete Wirksubstanzen und Konzentrationen | 32 |
| 2.2.1 | Vanilloide und Cannabinoide | 32 |
| 2.2.2 | TRPV-Antagonisten | 32 |
| 2.2.3 | Rekombinantes BMP-7 und Isoliquiritigenin | 33 |
| 2.2.4 | Rekombinanter Tumornekrosefaktor- α | 34 |
| 2.3 | Messung der relativen Zytotoxizität mittels des CytoTox-Fluor TM Cytotoxicity Assays | 35 |
| 2.4 | Fluoreszenzbasierte Messung der relativen Zellzahl – HOECHST 33342 | 36 |
| 3 | Ergebnisse der Arbeit | 38 |
| 3.1 | Screening zehn verschiedener Cannabinoide | 38 |
| 3.2 | Testung an Primärkulturen | 41 |
| 3.3 | Ergebnisse mit TRPV-Antagonisten | 43 |
| 3.4 | Kombination der zytotoxischen Wirkung von CBD mit einer Aktivie- rung des BMP-7-Signalweges | 49 |
| 3.5 | Kombination von Cannabinoiden mit TNF- α | 52 |
| 4 | Diskussion der Ergebnisse | 56 |
| 4.1 | Interpretation der Ergebnisse des Cannabinoid-Screenings | 56 |
| 4.2 | Rezeptoren der tumorsuppressiven Wirkung von CBD | 57 |
| 4.3 | Cannabinoide und Flavonoide – eine vielversprechende Kombination? | 58 |
| 4.4 | Mögliche Folgerungen aus der Wechselwirkung von Cannabinoiden und TNF- α | 59 |
| 4.5 | Ausblicke und Perspektiven | 59 |
| 4.5.1 | Weitere Schritte zur pharmakologischen Evaluierung von Can- nabidiol als Therapeutikum für Glioblastome | 60 |
| 4.5.2 | Cannabinoide als Therapeutika für Low-Grade-Gliome? | 60 |
| | Anhang A: Weiterentwicklung der Messmethode für Zytotoxizität | 62 |
| | Literatur | 64 |
| | Danksagung | 76 |

Eidesstattliche Versicherung

77

Abbildungsverzeichnis

| | | |
|------|---|----|
| 1.1 | Neue Einteilung der Glioblastome anhand Molekularbiologie und Epigenetik | 8 |
| 1.2 | Die molekularbiologischen Subtypen des Glioblastoms | 9 |
| 1.3 | Die Aktivierung des klassischen BMP-Signalweges | 15 |
| 1.4 | Überblick über die Funktionen von ATF-3 | 17 |
| 1.5 | Schematische Darstellung der Induktion von Zytotoxizität durch NPCs via Endovanilloide | 19 |
| 1.6 | Strukturformeln ausgewählter Vanilloide und Cannabinoide | 24 |
| 3.1 | Screening verschiedener Cannabinoide | 39 |
| 3.2 | Erweitertes Screening der Cannabinoide – Dosis-Wirkungskurven . . | 40 |
| 3.3 | Zytotoxizität von CBD im Zeitverlauf | 42 |
| 3.4 | CBD in Primärkulturen – Dosis-Wirkungskurven | 44 |
| 3.5 | Reduktion der Zytotoxizität von NADA durch TRPV-Antagonisten | 46 |
| 3.6 | Abschwächung der Zytotoxizität von CBD durch TRPV-2-Antagonisten | 47 |
| 3.7 | Verminderung der relativen Zytotoxizität von CBD durch Ruthenium Red in Primärkulturen | 48 |
| 3.8 | Reduktion der Zytotoxizität von CBD durch Kombination von TRPV-1- und TRPV-2-Antagonisten | 50 |
| 3.9 | Kombination von CBD mit BMP-7 | 51 |
| 3.10 | Kombination von CBD mit BMP-7 in Primärkulturen | 53 |
| 3.11 | Verstärkung der Zytotoxizität von CBD durch Kombination mit Isoliquiritigenin | 54 |
| 3.12 | Steigerung und Beschleunigung der zytotoxischen Effekte von CBD durch TNF- α | 55 |

Tabellenverzeichnis

| | | |
|-----|--|----|
| 1.1 | Aktuelle WHO-Klassifikation der Hirntumore | 4 |
| 2.1 | Übersicht über die verwendeten Primärkulturen | 30 |
| 2.2 | Übersicht über die verwendeten Cannabinoide | 33 |
| 2.3 | Übersicht über die verwendeten TRPV-Antagonisten | 34 |

Zusammenfassung

Das Glioblastom ist der häufigste und aggressivste Hirntumor. Trotz intensiver wissenschaftlicher und klinischer Bemühungen liegt die mittlere Überlebenszeit nach Diagnosestellung bei ca. 15 Monaten. Eine definitive Heilung ist nicht möglich.

Endogene Tumorsuppressionsmechanismen vermittelt durch neuronale Vorläuferzellen verhindern insbesondere im jungen Gehirn die Formierung von Gliomen. Durch Ausschüttung von Endovanilloiden und bone morphogenetic protein-7 (=BMP-7) induzieren sie TRPV-1-vermittelten ER-Stress und folgend Zelltod in den Tumorzellen und insbesondere Tumorstammzellen.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte *IN VITRO* gezeigt werden, dass pflanzliche Cannabinoide TRPV-vermittelt Zytotoxizität in malignen Gliomzellen erzeugen können. Cannabinoide sind pharmakologisch bereits etabliert und gelten allgemein als gut verträglich. Von den zehn getesteten pflanzlichen Cannabinoiden zeigte Cannabidiol (=CBD) die stärksten zytotoxischen Effekte, die sich zumindestens teilweise auf eine Aktivierung von TRPV-Rezeptoren zurückführen ließen.

Vor allem die Kombination von Cannabinoiden mit einer pharmakologisch bereits etablierten Aktivierung des BMP-Signalweges durch sog. Flavonoide zeigt einen besonders hoffnungsvollen Ansatz zur Entwicklung neuer therapeutischer Optionen für Patienten mit Glioblastomen und evtl. auch mit niedrig-malignen Gliomen.

Kapitel 1

Theoretische Grundlagen der Arbeit

Im ersten Teil der Arbeit sollen die theoretischen Grundlagen für eine mögliche pharmakotherapeutische Anwendung von Cannabinoiden für die Therapie maligner Gliome erörtert werden.

Beginnend mit einer allgemeinen Einführung zu Gliomen und Glioblastomen liegt im weiteren ein Schwerpunkt auf der Rolle neuronaler Stamm- und Vorläuferzellen. Diese sind sowohl für die Tumorgenese von Gliomen als auch für endogene Tumorsuppressionsmechanismen, die den molekularbiologischen Ansatzpunkt dieser Arbeit bilden, von entscheidender Bedeutung.

Abschließend werden dann noch ausführlich die verschiedenen Substanzen und Stoffklassen vorgestellt, die zur Nachahmung der endogenen Tumorsuppressionsmechanismen und damit für eine mögliche Pharmakotherapie von Glioblastomen eingesetzt werden sollen.

1.1 Gliome und Glioblastome – Allgemeine Übersicht und Einführung

Gliome – ausgehend von den verschiedenen Typen an Gliazellen – sind die häufigsten hirneigenen Tumore. (Westphal u. a. 2011) Im Gegensatz zu soliden Tumoren anderer Gewebe (z. B. sog. *Karzinome* bei epitheliale Ursprung oder *Sarkome* bei mesenchymalem Ursprung) stellen die Gliome eine grundsätzlich andersartige Gruppe onkologischer Erkrankungen da. (Böcker u. a. 2008)

Glioblastome gehören zu der aggressivsten und am schwierigsten zu therapierenden Untergruppe der Gliome und machen zudem auch den größten Anteil der neudiagnostizierten Gliome aus. Trotz intensiver wissenschaftlicher und klinischer Bemühungen ist die Diagnose Glioblastom immer noch mit einer sehr schlechten bzw. infausten Prognose verbunden. Die Möglichkeit einer definitiven Heilung besteht nicht, mit

einer Kombination aus Resektion und aggressiver Radiochemotherapie kann aktuell nur ein medianes Überleben von ungefähr 15 Monaten nach Diagnosestellung erreicht werden. (Aldape u. a. 2015; Stupp u. a. 2009; Westphal u. a. 2011) 5 Jahre nach der Diagnose Glioblastom sind nur noch ca 3% der Patienten am Leben. (Ohgaki u. a. 2005)

1.1.1 Einordnung in die Tumore des zentralen Nervensystems und WHO-Klassifikation

Intracranielle Raumforderungen bzw. Tumore können zunächst grundsätzlich nach ihrem histologischen Ursprungsgewebe eingeteilt werden. Neben Metastasen extracranieller Tumore (im Erwachsenenalter die häufigste Ursache einer cerebralen Raumforderung) sind auch intracranielle Manifestationen hämato-onkologischer Erkrankungen (z. B. cerebrales Lymphom und meningeosis leucaemica) von den eigentlichen Hirntumoren abzugrenzen. (Böcker u. a. 2008; Louis u. a. 2016b) Diese können dann u. a. unterschieden werden in Meningeome (ausgehend von den Hirnhäuten), embryonale Tumore (z. B. Medulloblastom) und – wie bereits erwähnt – die große Gruppe der Gliome (ausgehend von den Gliazellen; Böcker u. a. 2008; Louis u. a. 2016b).

Gliome können histopathologisch durch Morphologie und immunhistochemische Methoden entsprechend den vermuteten Ursprungszellen u. a. in Astrozytome, Oligodendrogliome oder Ependymome unterschieden werden. (Böcker u. a. 2008; Westphal u. a. 2011) Klinisch-pathologisch ist dabei – im Gegensatz zum sog. *Staging* bei anderen soliden Tumoren – für die hirneigenen Tumore – insbesondere die Gliome – hauptsächlich das sog. *Grading* anhand von Zellteilungsrate und Invasivität entscheidend für die weitere Prognose und Therapieplanung. (Böcker u. a. 2008; Westphal u. a. 2011) Diese Einteilung nach der sog. WHO-Klassifikation erfolgt von °I – gutartig mit möglicher Heilung – bis °IV – bösartig mit deutlicher Einschränkung der Lebenserwartung. (Louis u. a. 2016b; Westphal u. a. 2011)

Tabelle 1.1 auf der nächsten Seite zeigt einen orientierenden Überblick über die aktuelle Version der WHO-Klassifikation von 2016. (Böcker u. a. 2008; Louis u. a. 2016b) Im klinischen und wissenschaftlichen Sprachgebrauch hat sich davon ausgehend eine Einteilung in low-grade (meist °I–°II) und high-grade Gliome (meist °III–°IV, teilweise auch nur °IV) etabliert. (Louis u. a. 2016b; Westphal u. a. 2011) Ebenfalls gebräuchlich ist eine Abgrenzung von sog. *diffusen Gliomen* (meist °II–°IV), die sich durch eine Infiltration des umgebenden Hirngewebes auszeichnen und deshalb nach chirurgischer Entfernung eine nahezu 100%ige Rezidivrate aufweisen. (Aldape u. a. 2015; Sahm u. a. 2012)

Wie bereits erwähnt, ist das Glioblastom der häufigste – ca. 50 % aller diagnostizierten Gliome sind Glioblastome (Ostrom u. a. 2015; Thakkar u. a. 2014) – und aggressivste Subtyp und wird entsprechend als WHO °IV klassifiziert. (Louis u. a. 2016b; Westphal u. a. 2011) Das Glioblastom wird alternativ auch als Glioblastoma multiforme (alte histopathologische Bezeichnung) oder als sog. high-grade Gliom bezeichnet, wobei bei letzterem dann die korrekte Abgrenzung zu anaplastischen Gliomen bzw. Astrozytomen (WHO °III/IV) zu beachten ist. (Aldape u. a. 2015; Louis u. a. 2016b; Westphal u. a. 2011)

Histopathologisch stellt sich das Glioblastom als nahezu komplett entdifferenzierter Tumor dar, die Diagnose erfordert außerdem den Nachweis von Nekrosen oder atypischer mikrovaskulärer Proliferation. (Aldape u. a. 2015; Louis u. a. 2016b) Im Gegensatz zu den weniger malignen Gliomen (bis einschließlich WHO °III, s. o.) kann das Tumorausprungsgewebe histologisch nicht mehr zugeordnet werden. (Böcker u. a. 2008; Louis u. a. 2016b; Westphal u. a. 2011)

Tabelle 1.1: **WHO-Klassifikation der Hirntumore** – orientierender Überblick über die WHO-Klassifikation der Tumore des zentralen Nervensystems anhand der aktualisierten Version von 2016 (Louis u. a. 2016a,b)

| WHO-Klassifikation | typische Vertreter | Charakterisierung |
|--------------------|--|---|
| °I | Meningeome pilozystische Astrozytome | gutartig, evtl. Heilung durch Resektion |
| °II | Astrozytome Oligodendrogliome Ependymome | gutartig, (bösartige) Rezidive möglich |
| °III | anaplastische Astrozytome anaplastische Oligodendrogliome anaplastische Ependymome | bösartig, Reduzierung der Lebenserwartung |
| °IV | prim. und sek. Glioblastome Medulloblastome cerebrale Lymphome | bösartig, deutliche Lebenseinschränkung |

1.1.2 Entstehung und histopathologische Einteilung von Glioblastomen

Nachdem lange Zeit Unklarheit über die Ursprungszellen für die Gliomagenese bestand, kann mittlerweile davon ausgegangen werden, dass Glioblastome aus entarteten neuronalen Vorläuferzellen entstehen. (Barami 2007; Sanai u. a. 2005) Sowohl klinisch als auch molekularbiologisch lassen sich dabei allerdings zwei verschiedene

Wege unterscheiden, die beide zur Entwicklung eines Glioblastoms führen. (Ohgaki u. a. 2007, 2013) Die früher allgemein gültige und in der klinischen Praxis teilweise weiterhin gebrauchte Einteilung unterscheidet auf der einen Seite die sog. *primären Glioblastome*, die DE NOVO bei zuvor vollkommen gesunden Patienten auftreten, und auf der anderen Seite die sog. *sekundären Glioblastome*, die durch fortschreitende Malignisierung aus oft langjährig bekannten niedriggradigeren Gliomen (typischerweise WHO °II–°III Astrozytome) entstehen. (Ohgaki u. a. 2007, 2013) Histopathologisch und klinisch lassen sich diese beiden Formen nicht sicher unterscheiden. Erst durch immunhistochemische bzw. molekularbiologische Methoden gelang die sichere Differentialdiagnose, da auch ein DE NOVO diagnostiziertes Glioblastom sekundär aus einem zuvor nicht bekannten niedriggradigen Gliom entstanden sein kann. (Ohgaki u. a. 2007, 2013)

1.1.3 Neue molekularpathologische Einteilung in IDH^{wt}- und IDH^{mut}-Glioblastome

In der aktualisierten Fassung der „*World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System*“ (Louis u. a. 2016a) hat sich die Einteilung der Glioblastome von einer histopathologischen zu einer molekularbiologisch-basierten gewandelt. (Komori 2017; Louis u. a. 2016b) Als grundlegend setzte sich dabei die Einteilung nach dem molekulargenetischen Mutationsstatus des *Isocitrat-Dehydrogenase-1 (=IDH-1)*-Gens als sinnvoller und prognostisch relevanter durch. (Louis u. a. 2016b; Nobusawa u. a. 2009; Ohgaki u. a. 2004, 2013) Es werden dabei Glioblastome mit Nachweis der nicht-mutierten *Wildtyp-IDH (=IDH^{wt})*, von solchen mit Nachweis einer *mutierten IDH (=IDH^{mut})* unterschieden. (Louis u. a. 2016b; Nobusawa u. a. 2009; Ohgaki u. a. 2004, 2013) Vereinfacht entsprechen dabei die meisten IDH^{wt}-Glioblastome den früheren primären Glioblastomen und IDH^{mut}-Glioblastome den früheren sekundären Glioblastomen. (Louis u. a. 2016b; Nobusawa u. a. 2009)

Circa 90 % der neu diagnostizierten Glioblastome entfallen auf IDH^{wt} bzw. primäre Glioblastome, allerdings ist der Anteil an IDH^{mut}-Glioblastomen etwas höher als klinisch erwartet. (Nobusawa u. a. 2009; Ohgaki u. a. 2004, 2013; Watanabe u. a. 2009) Dies wird auf rasche Progredienz von klinisch bis dahin noch nicht auffällig gewordenen niedriggradigen Gliomen zurückgeführt. (Nobusawa u. a. 2009; Ohgaki u. a. 2004, 2013) Die moderne Einteilung ist von besonderer Relevanz, da die zusätzlich meist jüngeren Patienten mit IDH^{mut}-Glioblastomen u. a. wegen der andersartigen genetischen Mutationen und dem im weiteren Verlauf der Arbeit geschilderten verbesserten Ansprechen auf übliche Therapien eine signifikant verbesserte Prognose haben, welche

bereits zuvor bei den sekundären Glioblastomen beschrieben wurde. (Louis u. a. 2016b; Nobusawa u. a. 2009; Ohgaki u. a. 2007, 2013) Zudem kann angenommen werden, dass die Ausbildung einer IDH^{mut}-Vorläuferzelle den ersten Schritt von einer glialen Vorläuferzelle zu einer malignen Gliomzelle im Rahmen der immer noch so bezeichneten sekundären Glioblastomgenese darstellt. Dies unterstreicht die zentrale Rolle dieser Mutation und rechtfertigt die zentrale Stellung in der Einteilung. (Ohgaki u. a. 2013; Parsons u. a. 2008; Watanabe u. a. 2009)

Die bei ca. 12 % aller Glioblastome auftretende Mutation betrifft fast ausschließlich die Isocitrat-Dehydrogenase-1 (=IDH-1) an der 395. Basenstelle und entsprechend der 132. Aminosäure. (Parsons u. a. 2008; Watanabe u. a. 2009) Zu ca. 90 % liegt dabei eine DNA-Mutation von Guanin zu Adenin (G395A) und ein Ersatz der Aminosäure Arginin durch Histidin (R132H) vor. (Parsons u. a. 2008; Watanabe u. a. 2009) Die genannte Mutation betrifft dabei die relevante Substratbindungsstelle des Enzyms. (Nekrutenko u. a. 1998; Parsons u. a. 2008; Xu u. a. 2004) Interessanterweise kann die genetische Mutation der IDH durch die charakteristische Proteinmodifikation in der Gliomzelle durch einen spezifischen Antikörper auch immunhistochemisch nachgewiesen werden. (Capper u. a. 2009)

Insgesamt sind im humanen Genom fünf Subtypen der IDH kodiert, wovon drei im Mitochondrium lokalisiert sind. (Geisbrecht u. a. 1999; Kim u. a. 2007; Lee u. a. 2002) Die IDH-1 ist dagegen im Zytoplasma und in Peroxisomen anzutreffen und reguliert, u. a. über den Citratzyklus und die Produktion von Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (=NADPH), oxidativen Zellstress. (Geisbrecht u. a. 1999; Kim u. a. 2007; Lee u. a. 2002)

1.1.4 Weitere genetische Mutationen

In Glioblastomen können viele verschiedene genetische Mutationen nachgewiesen werden, die für die Entartung neuronaler Vorläuferzellen förderlich bzw. notwendig sind. Neben der gerade ausführlich diskutierten Einteilung anhand des Mutationsstatus der IDH ist mittlerweile auch der sog. *1p/19q-Status* Bestandteil der modernen Einteilung. (Ceccarelli u. a. 2016; Louis u. a. 2016b) Der gleichzeitige Verlust aller Allele auf dem kurzen Arm des Chromosoms 1 (1p) und des langen Armes des Chromosoms 19 (19q), welcher zunächst bei Oligodendrogliomen WHO °III als positiver, prognostischer Marker identifiziert wurde und als *Loss of heterozygosity (=LOH)* bzw. *1p/19q-Codeletion* bezeichnet wird, ist auch in Glioblastomen mit einer deutlich verbesserten Prognose assoziiert. (Bent u. a. 2003; Brat u. a. 2015; Eckel-Passow u. a. 2015; Parsons u. a. 2008)

Typisch ist zudem der Nachweis klassischer Tumorsuppressor- bzw. Protoonkogene wie z. B. *p53*, *RAS* oder *BRAF*. (Aldape u. a. 2015; Barami 2007; Sanai u. a. 2005) Die Mutationen unterliegen dabei einer für spezifische maligne Erkrankungen auffallenden Heterogenität, so kann z. B. die als typisch betrachtete Amplifikation des *Epidermal growth factor receptor (=EGFR)* nur in ca. 30–40 % aller (v. a. IDH^{wt}) Glioblastome nachgewiesen werden. (Aldape u. a. 2015; Hurtt u. a. 1992; Ohgaki u. a. 2013) Auch weitere nachweisbare Mutationen, wie u. a. in den Genen *PTEN*, *ATRX*, *NF1* und *PDGFRA*, treten nur inkonstant auf. (Aldape u. a. 2015; Ohgaki u. a. 2013)

1.1.5 Epigenetische Mechanismen – MGMT und G-CIMP

Epigenetische Mechanismen (v. a. DNA-Methylierung) scheinen ebenfalls eine wichtige Rolle in der Entstehung und der Prognose von Glioblastomen zu spielen und sind mittlerweile an der Einschätzung der Prognose und Steuerung der Therapie entscheidend mitbeteiligt. (Aldape u. a. 2015; LeBlanc u. a. 2016; Ohgaki u. a. 2013) Der klinisch wichtigste epigenetische Marker ist der *Methylierungsgrad des MGMT-Promotors*. (Aldape u. a. 2015; Ohgaki u. a. 2013) Eine Hypermethylierung des MGMT-Promotors führt zur verminderten Genexpression eines DNA-Reperaturenzym und damit zu einer erhöhten Empfindlichkeit gegenüber alkylierenden Substanzen wie z. B. Temozolomid. Hierauf wird in Abschnitt 1.1.8 auf Seite 10 im weiteren noch ausführlich eingegangen. (Aldape u. a. 2015; Hegi u. a. 2005; Wick u. a. 2012) Ungefähr 40 % aller primären Glioblastome sind MGMT-methyliert. (Aldape u. a. 2015; Hegi u. a. 2005; Wick u. a. 2012)

Von hoher prognostischer Relevanz ist zudem der Nachweis des *Glioma-CpG Island Methylator Phenotype (G-CIMP)*. (Malta u. a. 2018; Noushmehr u. a. 2010) Die Ausbildung eines G-CIMP wird durch die Mutation der IDH bedingt, nahezu alle IDH^{mut}-Glioblastome sind auch G-CIMP+. (Turcan u. a. 2012) Dies zeigt einen ersten von vielen vermuteten Zusammenhängen zwischen genetischen und epigenetischen Mechanismen in der Tumorgenese. (Malta u. a. 2018; Turcan u. a. 2012) Bezüglich der Prognose ist allerdings innerhalb der IDH^{mut}/G-CIMP+-Glioblastome erneut eine ausgeprägte Heterogenität auffällig. (Ceccarelli u. a. 2016) Anhand des Ausmaßes der namensgebenden DNA-Methylierung der CpG-Inseln lassen sich zwei Gruppen unterscheiden, wobei die als *G-CIMP-high* bezeichneten Glioblastome mit höherem Grad an DNA-Methylierung eine verbesserte Prognose und die als *G-CIMP-low* mit einem niedrigeren Grad an DNA-Methylierung und einer schlechteren Prognose einhergehen. (Ceccarelli u. a. 2016; Malta u. a. 2018; Noushmehr u. a. 2010; Turcan u. a. 2012)

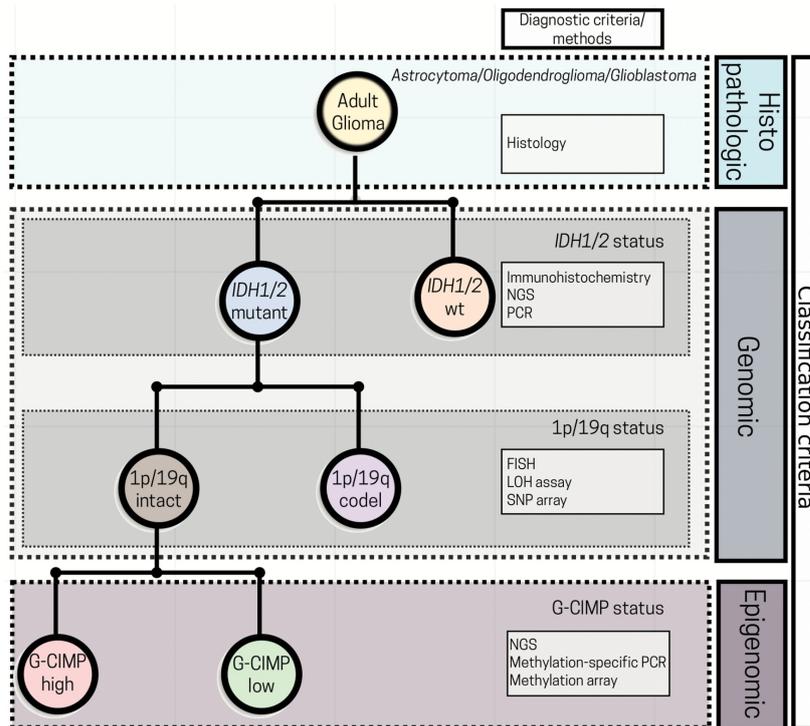


Abbildung 1.1: **Neue Einteilung der Glioblastome anhand Molekularbiologie und Epigenetik** (Louis u. a. 2016a,b; Malta u. a. 2018) entnommen aus Malta u. a. (2018, Fig. 5) mit freundlicher Genehmigung von *Neuro-Oncology*

In Abb. 1.1 werden schematisch die wichtigsten prognostischen Mutationen und Mechanismen aufgeführt, welche heutzutage zur Klassifikation von Glioblastomen verwendet werden können. (Malta u. a. 2018)

1.1.6 Molekularbiologische Einteilung in Subtypen

Unabhängig von der in den vorherigen Kapiteln geschilderten, molekularbiologischen Einteilung der Glioblastome vorrangig anhand prognostischer Kriterien konnten auch mittels zunehmender sequentieller Genanalyse, z. B. im Rahmen des „*The Cancer Genome Atlas (TCGA) Research Network*“-Projekts, zunehmend homogene Subgruppen identifiziert werden, welche die Grundlage für eine Einteilung in drei bzw. vier Subtypen bilden. (Freije u. a. 2004; McLendon u. a. 2008; Phillips u. a. 2006; Verhaak u. a. 2010) Unterschieden werden zumeist der *proneurale*, der *proliferative* und der *mesenchymale* Subtyp. (Phillips u. a. 2006) Der proliferative Subtyp wird

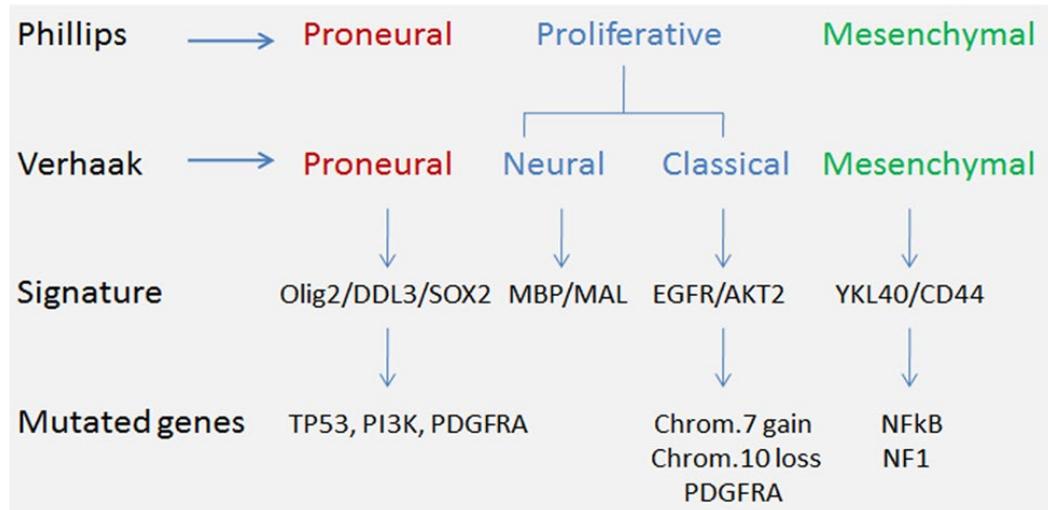


Abbildung 1.2: **Die molekularen Subtypen des Glioblastoms** mit den jeweiligen charakterisierenden genetischen Mutationen, entnommen aus Aldape u. a. (2015, Fig. 2) mit freundlicher Genehmigung von *Acta Neuropathologica* und Springer®

teilweise weiterhin in einen *neuralem* und einen sog. *klassischen* Subtyp unterteilt, wobei unklar ist, ob nicht Kontamination mit Zellen des den ursprünglichen Tumor umgebenden Parenchyms für das beschriebene Genexpressionsmuster verantwortlich ist. (Verhaak u. a. 2010) Auffällig war bei dieser Form der Einteilung zunächst, dass der proneurale Subtyp mit einer deutlich verbesserten Prognose verbunden ist. (Aldape u. a. 2015; Phillips u. a. 2006; Verhaak u. a. 2010) Im Verlauf konnte allerdings gezeigt werden, dass IDH^{mut}-Glioblastome, und damit alle sekundären Glioblastome, ausschließlich den proneuralen Subtyp ausbilden und sich daher – u. a. mithilfe geeigneter Subgruppenanalyse – die verbesserten Überlebensstatistiken erklären lassen. (Aldape u. a. 2015; Brennan u. a. 2013)

Abb. 1.2 zeigt nochmals zusammenfassend einen Überblick über die Einteilung des Glioblastoms in molekulare Subtypen und die entsprechenden charakteristischen Mutationen. (Aldape u. a. 2015; Phillips u. a. 2006; Verhaak u. a. 2010)

1.1.7 Epidemiologische Betrachtung des Glioblastoms

Die Inzidenz für Glioblastome lag in den Jahren 2008–2012 beispielsweise in den USA bei ca. 3,20 pro 100 000 Einwohner, für alle Gliome bei ca. 6,62 pro 100 000 Einwohner und für alle Hirntumore (inklusive z. B. Meningeome und Adenome der Hypophyse)

bei ca. 21,97 pro 100 000 Einwohner. (Ostrom u. a. 2015) Die Inzidenzen für die beiden in Industriestaaten häufigsten Tumorentitäten lagen im gleichen Zeitraum bei 192,83 pro 100 000 Einwohner (nur Männer über 20 Jahre) für Prostatakarzinome und 172,01 pro 100 000 Einwohner (nur Frauen über 20 Jahre) für Mammakarzinome im Vergleich zu bereinigten 28,57 pro 100 000 Einwohner über 20 Jahre für Hirntumore. (Ostrom u. a. 2015) Die Mehrheit – in der obigen US-amerikanischen Studie von ungefähr 56 % bzw. 57 % – aller Patienten mit Gliomen bzw. Glioblastomen sind Männer, während Frauen allgemein unter Patienten mit Hirntumoren die Mehrheit darstellen, entsprechend v. a. bei den nicht-malignen Meningeomen und Adenomen. (Ohgaki u. a. 2004; Ostrom u. a. 2015; Thakkar u. a. 2014)

Typischerweise treten Glioblastome im fortgeschrittenen Erwachsenenalter auf, das mediane Alter bei Diagnose liegt je nach Studie zwischen 61 und 64 Jahren. (Ohgaki u. a. 2004; Ostrom u. a. 2015; Thakkar u. a. 2014) Trotz der deutlichen Häufigkeitszunahme im höheren Lebensalter sind Hirntumore auch im Kindes- und Jugendalter relevant. (Ohgaki u. a. 2005; Ostrom u. a. 2015; Thakkar u. a. 2014) Sie stellen in dieser Altersgruppe die am häufigsten auftretenden Tumore dar und nahezu gleichauf mit Leukämien auch die zweithäufigste malignitäts-assoziierte Todesursache, klassische Glioblastome sind bei Kindern und Jugendlichen aber eine absolute Seltenheit. (Ostrom u. a. 2015)

1.1.8 Aktuelle Therapiestandards und -erfolge

Die aktuell etablierte Therapie umfasst eine *neurochirurgische Resektion* – wegen des bereits erwähnten diffus-infiltrativen Wachstums ist eine komplette sog. R0-Resektion bei Glioblastomen nicht möglich – und anschließender Kombination aus *Radiotherapie mit 60 Gy* und einer *Chemotherapie mit Temozolomid*. (Stupp u. a. 2009, 2005; Weller 2015) Die Kombination der Strahlentherapie mit gleichzeitiger und folgender adjuvanter Chemotherapie mit Temozolomid führt zu einer Verlängerung des durchschnittlichen Überlebens um ca. 3 Monate, zudem erhöht sich bei vertretbaren Nebenwirkungen die 2-Jahres-Überlebensrate deutlich. (Stupp u. a. 2009, 2005) Bei älteren bzw. stärker eingeschränkten Patienten – ohne vorhergehende Resektion – zeigte sich eine isolierte Therapie mit Temozolomid der Alternative einer alleinigen Strahlentherapie ebenfalls als ebenbürtig. (Wick u. a. 2012) Diese Überlebensvorteile fallen besonders deutlich bei *methyliertem MGMT-Promoterstatus* aus, (Hegi u. a. 2005; Stupp u. a. 2009; Wick u. a. 2012) wobei sich auch hier wieder sehr deutlich der bereits erwähnte positive Prognosefaktor der IDH^{mut} bestätigt. (Wick u. a. 2013)

Temozolomid (=TMZ, Handelsname Temodal®) ist ein oral verabreichbares, alkylie-

rendes Chemotherapeutikum. (Barciszewska u. a. 2015; Fisher u. a. 2007) Alkylierende Substanzen, wie z. B. Platin-haltige, gehören zu den ältesten, aber immer noch für eine Vielzahl maligner Erkrankungen sehr gebräuchlichen Zytostatika. (Barciszewska u. a. 2015; Fisher u. a. 2007) Die Alkylantien zerstören die DNA, v. a. von sich schnell teilenden Zellen, indem sie kleine organische Reste an die DNA-Basen binden und durch die entstehenden Komplexe die DNA schädigen. (Barciszewska u. a. 2015; Fisher u. a. 2007) Temozolomid ist ein *Prodrug* und gehört als Imidazol-Derivat zur zweiten Generation alkylierender Zytostatika. Es ist lipophil und kann deshalb die Blut-Hirn-Schranke passieren. (Barciszewska u. a. 2015; Fisher u. a. 2007) Der aktive Metabolit überträgt Methyl-Gruppen auf die verschiedenen DNA-Basen, insbesondere auf Guanosin. (Barciszewska u. a. 2015; Fisher u. a. 2007) Das Protein *MGMT* entfernt die Methylgruppen umgehend wieder (v. a. an der O-6-Position von Guanosin), macht damit die DNA-Modifikationen rückgängig und reduziert somit drastisch die zytotoxischen Effekte von Temozolomid. (Happold u. a. 2012; Hegi u. a. 2005; Weller u. a. 2010) Bei methyliertem *MGMT*-Promotorstatus und folgender verminderter Genexpression von *MGMT* entfällt daher dieser Effekt und die zytotoxische Wirkung von Temozolomid kann sich voll entfalten. (Happold u. a. 2012; Hegi u. a. 2005; Weller u. a. 2010)

Leider sprechen aber viele Patienten nicht oder nur sehr schlecht auf das gerade beschriebene Therapieprotokoll an oder sind der intensiven Therapie nicht zugänglich, eine langfristige Kontrolle des Tumors gelingt nur äußerst selten. (Aldape u. a. 2015; Masui u. a. 2012; Stupp u. a. 2009; Westphal u. a. 2011) Auch die Ausbildung verschiedener Resistenzmechanismen gegen Temozolomid kann beobachtet werden. (Happold u. a. 2012) Zudem sind, wie bereits erwähnt, andere konventionelle Zytostatika für die Therapie hirneigener Tumore meist nahezu komplett ungeeignet (Aldape u. a. 2015; Masui u. a. 2012; Westphal u. a. 2011) und auch Studien mit monoklonalen Antikörpern brachten nicht den erhofften Erfolg, wie z. B. das Anti-VEGF (=Vascular Endothelial Growth Factor) gerichtete *Bevacizumab* (Handelsname *Avastin*®). (Chinot u. a. 2014; Gilbert u. a. 2014) Deshalb und wegen einer immer noch komplett fehlenden kurativen Perspektive ist die Entwicklung neuer Therapieansätze für Patienten mit malignen Glioblastomen entscheidend.

1.2 Endogene Tumorsuppression durch neuronale Vorläuferzellen

Wie bereits in Abschnitt 1.1.2 auf Seite 4 diskutiert kann angenommen werden, dass neuronale Stamm- bzw. Vorläuferzellen das Ausgangsgewebe für die Entstehung maligner Gliome darstellen. (Sanai u. a. 2005) Die Anzahl und die Aktivität neuronaler Vorläuferzellen im Gehirn erreicht allerdings das Maximum bereits im Säuglingsalter und reduziert sich danach beim Menschen – im Gegensatz zur Maus – schnell und deutlich. (Knoth u. a. 2010; Leuner u. a. 2007) Im Gegensatz dazu werden die meisten Glioblastome allerdings erst wesentlich später – im fortgeschrittenen Erwachsenenalter und damit zu einem Zeitpunkt mit nur noch vereinzelter Auftreten neuronaler Vorläuferzellen – diagnostiziert. (Ohgaki u. a. 2005; Stock u. a. 2012)

Im jetzt folgenden Kapitel soll der *Mechanismus der endogenen Tumorsuppression durch neuronale Vorläuferzellen* ausführlich dargestellt werden, der diesen inversen Zusammenhang erklärt und als Ansatzpunkt für eine mögliche Pharmakotherapie maligner Gliome mit Cannabinoiden dient.

1.2.1 Neuronale Vorläuferzellen im gesunden, adulten Gehirn

Der *Hippocampus*, hier insbesondere der *Gyrus dentatus*, und die *Subventrikuläre Zone (=SVZ)* sind die einzigen im Gehirn erwachsener Menschen bekannten Lokalisationen von neuronalen Stamm- und Vorläuferzellen und damit auch die einzigen Orte einer funktionierenden Neurogenese. (Conover u. a. 2011; Deng u. a. 2009) Physiologischerweise wandern die neuronalen Vorläuferzellen aus der *SVZ* zum *Bulbus olfactorius* und dienen dort der Regeneration der Riechsinneszellen. (Conover u. a. 2011; Walzlein u. a. 2008) Vergleichbar zu Nagetieren kann auch für den Menschen von einer funktionierenden Neurogenese im *Gyrus dentatus* eines adulten Gehirns ausgegangen werden. (Deng u. a. 2009; Knoth u. a. 2010) Dies scheint eine wichtige Rolle bei der cerebralen Manifestation von Gedächtnisprozessen im *Hippocampus* zu spielen. (Conover u. a. 2011; Deng u. a. 2009; Knoth u. a. 2010)

Die Quantität der neuronalen Vorläuferzellen fällt allerdings auch im *Gyrus dentatus* und in der *SVZ* mit ansteigendem Alter deutlich ab. (Conover u. a. 2011; Knoth u. a. 2010; Walzlein u. a. 2008)

1.2.2 Migration neuronaler Vorläuferzellen zu Gliomen

Neuronale Vorläuferzellen aus der SVZ wandern allerdings nicht nur unter physiologischen Bedingungen zum Bulbus olfactorius, sondern auch zu sich neu formierenden Gliomen. (Glass u. a. 2005) Dort bewirken sie eine deutliche Reduktion der Tumorgroße und führen in geeigneten *IN VIVO* Experimenten zu einem signifikant verlängerten Überleben der Versuchstiere. (Glass u. a. 2005; Suzuki u. a. 2005) Dieser tumorsuppressive Effekt zeigt eine deutliche Abhängigkeit vom Alter der Versuchstiere: je älter, desto weniger neuronale Vorläuferzellen konnten um die induzierten Tumore nachgewiesen werden und desto geringer war der tumorsuppressive Effekt. (Glass u. a. 2005; Walzlein u. a. 2008) Es konnte allerdings gezeigt werden, dass dafür nicht das fortgeschrittene Alter der Versuchstiere selbst verantwortlich ist, sondern ausschließlich die deutlich verminderte Anzahl der neuronalen Vorläuferzellen in der SVZ im fortgeschrittenen Alter. (Walzlein u. a. 2008) Auch ein altersabhängiger Funktionsverlust der neuronalen Stamm- oder Vorläuferzellen, z. B. durch genetischen Verlust oder Mutation von D-Type Cyclin, scheint an der zunehmenden Ineffektivität der endogenen Tumorsuppression beteiligt zu sein (Walzlein u. a. 2008) Die Glioblastomtumorzellen dagegen sind auch bei fortgeschrittenem Alter weiterhin für die tumorsuppressiven Effekte von neuronalen Vorläuferzellen empfindlich. (Chirasani u. a. 2010; Glass u. a. 2005; Stock u. a. 2012; Walzlein u. a. 2008) So kann z. B. *IN VITRO* durch Zugabe von funktionsfähigen neuronalen Vorläuferzellen Zelltod in Glioblastomzellen induziert werden. (Glass u. a. 2005)

Es kann also angenommen werden, dass nach erfolgter maligner Entartung einer neuronalen Stammzelle (Sanai u. a. 2005) die Bildung eines Glioblastoms nur erfolgen kann, wenn u. a. aufgrund von fortgeschrittenem Alter und verminderter Anzahl und Funktion neuronaler Vorläuferzellen in der SVZ eine endogene Tumorsuppression durch neuronale Vorläuferzellen nicht mehr möglich ist. (Glass u. a. 2005; Walzlein u. a. 2008)

1.2.3 Molekulare Mechanismen der endogenen Tumorsuppression

Der therapeutische Einsatz von neuronalen Stammzellen wird wohl erst in weiter Zukunft möglich sein. Deshalb kommt den molekularen Mechanismen der endogenen Tumorsuppression eine besondere Bedeutung zu. Die im folgenden beschriebenen Mechanismen stellen den theoretischen Kern dieser Arbeit dar und sind der entscheidende Angriffspunkt für eine pharmakologische Nachahmung und damit für eine TRPV-vermittelte Pharmakotherapie maligner Gliome.

1.2.3.1 Durch bone morphogenetic protein-7 – BMP-7

Die Malignität von Gliomen, insbesondere von Glioblastomen, hängt entscheidend mit der Aktivität der sog. Tumorstammzellen zusammen. (Jordan 2009; Jordan u. a. 2006) Diese werden im weiteren als *Glioblastoma-Stem-Cells (=GSCs)* bezeichnet. (Jordan 2009; Jordan u. a. 2006) Gleichzeitig migrieren, wie gerade beschrieben, neuronale Vorläuferzellen (NPCs) zu entstehenden Gliomen und führen zu einer deutlichen Suppression des Tumorwachstums. (Glass u. a. 2005; Walzlein u. a. 2008) Dies geschieht u. a. durch Ausschüttung von bone morphogenetic protein-7 (=BMP-7). (Chirasani u. a. 2010) Durch BMP-7 wird allgemein eine Differenzierung neuronaler Stamm- und Vorläuferzellen – meist in Richtung Astrozyten – bewirkt. (Chirasani u. a. 2010; Gargiulo u. a. 2013; Lim u. a. 2000) Mittlerweile konnte aber auch gezeigt werden, dass BMP-7 eine Differenzierung der GSCs bewirkt und damit deren Fähigkeit zur Aufrechterhaltung des Wachstumsprozesses von Gliomen eingeschränkt. (Chirasani u. a. 2010; Gargiulo u. a. 2013; Lim u. a. 2000)

Die Gruppe der bone morphogenetic proteins (=BMPs) bildet eine Untergruppe der Transforming Growth Factors (=TGFs). Sie scheinen allgemein eine wichtige Rolle in der Regulierung der Neurogenese zu spielen, verschiedene Vertreter (neben dem bereits erwähnte BMP-7 u. a. auch BMP-2 und BMP-4) konnten bereits in neuronalen Vorläuferzellen aus der SVZ nachgewiesen werden. (Colak u. a. 2008; Lim u. a. 2000; Watabe u. a. 2009) Auch für die embryonale Neurogenese ist eine relevante Beeinflussung der neuronalen Differenzierung durch BMPs als erwiesen anzusehen. (Hochstim u. a. 2008; Kriegstein u. a. 2009) Insbesondere BMP-2 und BMP-4 wurden auch schon – letztendlich vergeblich – als mögliche klinische Therapieoptionen für Patienten mit Glioblastom diskutiert, da für sie ebenfalls gegen GSCs gerichtete Effekte aufgezeigt werden konnten. (Lee u. a. 2008; Piccirillo u. a. 2006)

Für tumorsupprimierende neuronale Vorläuferzellen konnte *IN VITRO* und *IN VIVO* eine deutlich erhöhte Expression und Sekretion von *BMP-7* gezeigt werden, was wiederum zu der bereits erwähnten Differenzierung und Suppression der GSCs führte. (Chirasani u. a. 2010) Durch Suppression der GSCs kann nicht nur von einer allgemeinen Tumorsuppression ausgegangen werden, sondern auch von einer deutlichen Reduktion der für Glioblastome typischen Neigung zu Rezidiven, die vermutlich meist von überlebenden GSCs ausgehen. (Chirasani u. a. 2010)

Die Aktivierung des BMP-Signalweges durch BMP-7 führt in GSCs zu einer Phosphorylierung der Signalproteine Smad1/5/8. Daraufhin kommt es zu einer nukleären Translokation von Smad4 mit folgender Beeinflussung der Genexpression, die letztendlich zu einer Erzeugung von sog. *ER-Stress* führt. (Chirasani u. a. 2010;

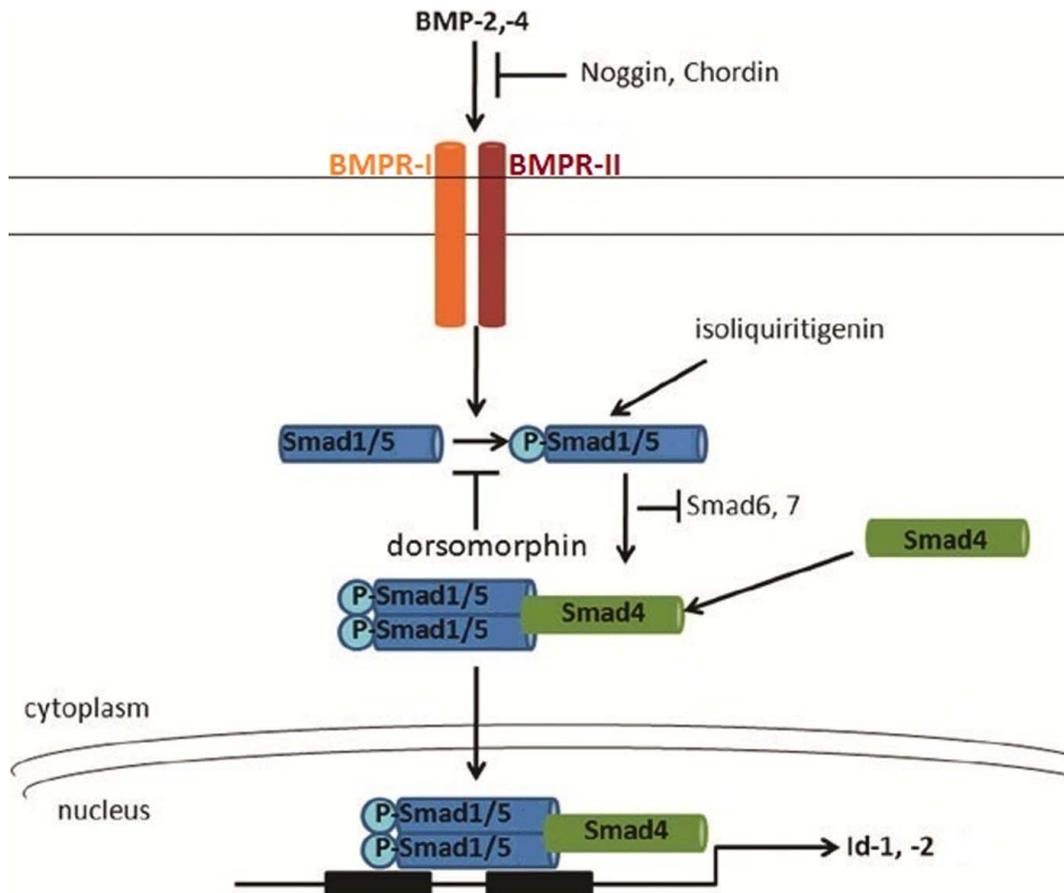


Abbildung 1.3: **Die Aktivierung des klassischen BMP-Signalweges** mit Darstellung der folgenden zytoplasmatischen und nukleären Prozesse, entnommen aus Vrijens u. a. (2013, Fig. 1) mit freundlicher Genehmigung von *PLoS ONE* gemäß Creative Commons Attribution License®

(Gargiulo u. a. 2013) Die nukleäre Translokation von Smad4 kann aber auch durch Transforming Growth Factor- β (=TGF- β) und eine folgende Phosphorylierung von Smad2 bewirkt werden. (Gargiulo u. a. 2013; Watabe u. a. 2009)

Abb. 1.3 gibt einen zusammenfassenden Überblick über die molekularbiologischen Prozesse nach einer Aktivierung des BMP-Signalweges. (Vrijens u. a. 2013)

1.2.3.2 Durch Endovanilloide via TRPV-1-Rezeptoraktivierung

Die bereits beschriebenen tumorsuppressiven und zytotoxischen Effekte von neuronalen Vorläuferzellen auf Glioblastomzellen können durch Einsatz von TRPV-1-Antagonisten (hier: Capsazepine) signifikant reduziert werden. (Stock u. a. 2012) Au-

ßerdem ist die Expression des TRPV-1-Rezeptors in Glioblastomzellen im Gegensatz zu gesundem Hirngewebe sehr hoch und im Kulturmedium neuronaler Vorläuferzellen können sog. Endovanilloide (hier z. B. Arachidonoyl ethanolamide (=AEA), Oleoyl ethanolamide (=OEA) und Palmitoyl ethanolamide (=PEA)) nachgewiesen werden, die bereits als TRPV-1-Agonisten bekannt sind. (Starowicz u. a. 2007; Stock u. a. 2012; Szallasi u. a. 2007) Diese drei Endovanilloide können in entsprechender Konzentration auch alleine IN VITRO deutlich messbare zytotoxische Effekte auf Glioblastomzellen bewirken, die wiederum durch TRPV-1-Antagonisten signifikant vermindert werden können. (Stock u. a. 2012) Auch durch das *synthetische Vanilloid Avranil*, einen bekannten starken TRPV-1-Aktivator, kann ein vergleichbarer zytotoxischer Effekt nachgewiesen werden. (Stock u. a. 2012)

Es kann also angenommen werden, dass die endogene Tumorsuppression durch neuronale Vorläuferzellen neben BMP-7 v. a. durch sog. Endovanilloide mittels TRPV-1-Rezeptoraktivierung vermittelt wird. (Chirasani u. a. 2010; Stock u. a. 2012)

1.2.3.3 Gemeinsame Endstrecke – ER-Stress und ATF-3

Das *Endoplasmatische Retikulum (=ER)* hat vielfältige Aufgaben, die der Aufrechterhaltung der Zellhomöostase dienen, so u. a. der Ca^{2+} -Speicherung, Lipidsynthese und posttranslationalen Modifikation (v. a. Faltung und Glykosilierungen) neu synthetisierter Proteine. Kommt es zu einer Anhäufung falsch- oder ungefalteter Proteine, so werden intracelluläre Signaltransduktionswege in Gang gesetzt, die entweder zu einer Verminderung der Proteinbiosynthese oder zur Induktion verschiedener Zelltodmechanismen führen. Dies wird als sog. *ER-Stress* bezeichnet. (Han u. a. 2013; Hetz 2012; Walter u. a. 2011)

Es konnten mittlerweile eine Vielzahl an Proteinen identifiziert werden, die ER-Stress abhängige Signaltransduktionswege beeinflussen. Als Beispiele für ER-Stress- und Zelltod-regulierende Proteine sind in diesem Zusammenhang u. a. die Transkriptionsfaktoren CHOP, CREB, CREM und Activating Transcription Factor-1 (=ATF-1) bis ATF-7 (teilweise auch unter alternative Bezeichnungen bekannt) zu nennen. (Han u. a. 2013; Thompson u. a. 2009)

Von besonderem Interesse ist dabei v. a. Activating Transcription Factor-3 (=ATF-3), wofür sowohl protoonkogene als auch tumorsuppressive Wirkungen beschrieben werden. (Thompson u. a. 2009) Einen Überblick über die intrazellulären Wirkungen von ATF-3 bietet Abb. 1.4 auf der nächsten Seite. (Thompson u. a. 2009)

In Folge einer Einwirkung von Endovanilloiden kommt es in malignen Gliomzellen zu einer relevanten Entwicklung von sog. ER-Stress. (Stock u. a. 2012) Dies zeigt sich

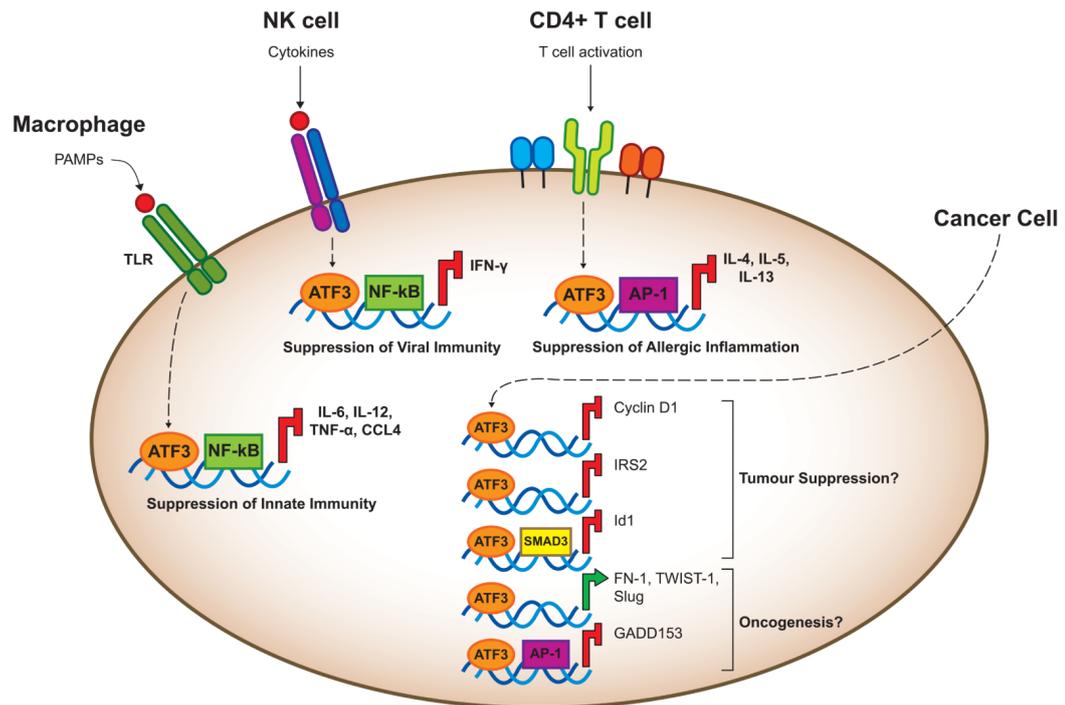


Abbildung 1.4: **Überblick über die Funktionen von ATF-3** aus Thompson u. a. (2009, Fig. 1) mit freundlicher Genehmigung des *Journal of Molecular Medicine* und von Springer®

durch eine deutliche Größenzunahme des endoplasmatischen Reticulums (=ER) und der verstärkten Expression von bekannten Proteinen, die mit ER-Stress assoziiert sind, wie v. a. ATF-3. (Stock u. a. 2012) Diese Effekte können ebenfalls durch TRPV-1-Antagonisten signifikant reduziert werden. (Stock u. a. 2012) Zu vermuten ist, dass die o. g. Endovanilloide aufgrund ihrer Lipophilie die Zellmembran ungehindert passieren können und durch Bindung an TRPV-1-Rezeptoren in der Membran des ERs die folgenden Signalkaskaden unter Beteiligung von ATF-3 und ATF-4 aktivieren (vgl. schematische Darstellung in Abb. 1.5 auf der nächsten Seite). (Stock u. a. 2012)

Somit kann angenommen werden, dass ein relevanter Anteil der endogenen Tumorsuppression via BMP-7- und TRPV-1-Aktivierung mit Induktion von ER-Stress und den gerade beschriebenen Signalkaskaden vermittelt wird. (Chirasani u. a. 2010; Stock u. a. 2012)

1.3 Vanilloide und Cannabinoide – bekannte TRPV-Agonisten

Um den gerade beschriebenen Mechanismus einer TRPV-1-Rezeptoraktivierung mit folgender Erzeugung von ER-Stress pharmakologisch nachzuvollziehen, sollen in dieser Arbeit pflanzliche Cannabinoide zum Einsatz kommen. Als besondere Vorteile dieser Stoffklasse können eine sehr gute Verträglichkeit und ein bereits laufender erfolgreicher klinischer Einsatz genannt werden. Dies steht im Gegensatz zu endogenen und synthetischen TRPV-1-Agonisten, die bei systemischer Therapie durch Rezeptorsensitivierung im Rückenmark Schmerzen neu erzeugen oder verstärken können. (Chu u. a. 2003)

1.3.1 TRPV-Rezeptoren

Ausgeschrieben als *transient receptor potential vanilloid (subfamily member) 1* bezeichnet ist der TRPV-1-Rezeptor der erste beschriebene Vertreter der Vanilloid-Untergruppe der großen Gruppe der TRP-Rezeptoren bei Säugetieren und Menschen. (Montell 2005; Venkatachalam u. a. 2007) Die TRP-Rezeptoren sind allesamt als transmembranöse Kationenkanäle beschrieben, die nach Aktivierung und Öffnung durch Einstrom von Na⁺- und Ca²⁺-Ionen zu einer Depolarisierung der Zelle führen, deshalb ist auch die Bezeichnung als TRP-Kanal oder -Ionenkanal teilweise in Verwendung. (Montell 2005; Venkatachalam u. a. 2007) Insgesamt sind zur Zeit sieben Untergruppen der TRP-Rezeptoren bekannt, die Vanilloid-Untergruppe hat

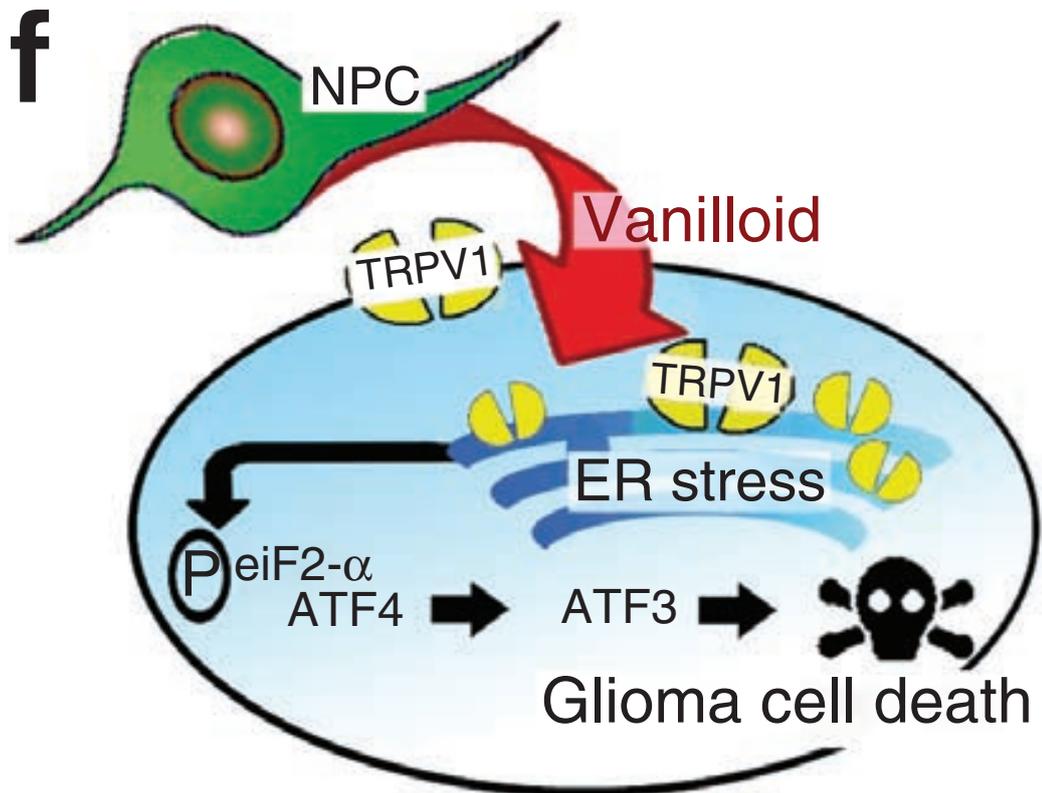


Abbildung 1.5: Schematische Darstellung der Induktion von TRPV-1-vermittelte Cytotoxizität durch NPCs mittels Sekretion von Endovanilloiden entnommen aus Stock u. a. (2012, Fig. 4f) mit freundlicher Genehmigung von *Nature Medicine* und der Nature Publishing Group®

aktuell sechs bekannte Mitglieder, TRPV-1 bis TRPV-6, wobei einerseits TRPV-1–4 und andererseits TRPV-5 und TRPV-6 jeweils eine funktionelle Untergruppe bilden. (Montell u. a. 2002; Venkatachalam u. a. 2007)

Ursprünglich wurde der TRPV-1-Rezeptor in der Mundschleimhaut (zur Wahrnehmung von Schärfe) und an den Axonen gering myelinisierter afferenter Nervenfasern nachgewiesen. (Caterina u. a. 2000, 1999, 1997; Tominaga u. a. 1998) Die Besonderheit des TRPV-1-Rezeptors liegt – wie bei allen TRPV-Rezeptoren – im Mechanismus seiner Aktivierung. So kann er nicht nur klassischerweise von Capsaicin (vgl. Strukturformel in Abb. 1.6a auf Seite 24, deshalb teilweise auch als Capsaicin-Rezeptor bezeichnet) aktiviert und geöffnet werden, sondern wird z. B. auch durch Einwirkung von Hitze (ab ca. 43 °C) oder H⁺-Ionen aktiviert. (Ferrer-Montiel u. a. 2012; Szallasi u. a. 2007; Venkatachalam u. a. 2007) Somit kann durch den TRPV-1-Rezeptor eine Vielzahl von potentiell gewebschädigenden Reizen wahrgenommen und in Schmerzreize umgewandelt werden, ein genetischer *knock-out* dieses Rezeptors führt zu einer stark gestörten Schmerz- und Hitzewahrnehmung. (Caterina u. a. 2000; Szallasi u. a. 2007)

Der TRPV-1-Rezeptor findet sich aber nicht nur im peripheren afferenten Nervensystem, sondern auch in vielen verschiedenen Bereichen des zentralen Nervensystems. (Starowicz u. a. 2007; Szallasi u. a. 2007) Mittlerweile konnte der TRPV-1-Rezeptor auch in verschiedenen anderen Geweben und Zellen nachgewiesen werden, z. B. in Lymphozyten. (Saunders u. a. 2007) Wie bereits erwähnt kann aber auch in den Tumorzellen von Glioblastomen eine deutlich erhöhte Expression von TRPV-1 gemessen werden. (Stock u. a. 2012)

Auch der TRPV-2-Rezeptor wurde zuerst als Hitze-Rezeptor beschrieben (Kanalöffnung für Kationen hier bei ungefähr 52 °C), scheint aber sowohl in der endogenen Thermoregulation als auch der Thermorezeption keine Rolle zu spielen. (Caterina u. a. 1999; Park u. a. 2011; Peralvarez-Marin u. a. 2013) Ebenso wie der TRPV-1-Rezeptor ist auch der TRPV-2-Rezeptor im zentralen Nervensystem exprimiert, er scheint hier insbesondere in der embryonalen Ausbildung der Axone eine Rolle zu spielen. (Peralvarez-Marin u. a. 2013; Shibasaki u. a. 2010) Auch im adulten Gehirn ist der TRPV-2-Rezeptor an vielen verschiedenen Stellen exprimiert und scheint ebenso wie der TRPV-1-Rezeptor eine große Rolle in autonomen Regulationsprozessen zu spielen, u. a. in der Aufrechterhaltung der osmotischen Stabilität sowie der Hunger- und Durstregulation. (Muraki u. a. 2003; Nedungadi u. a. 2012) Eine wichtige Rolle nimmt der TRPV-2-Rezeptor außerdem im Zusammenspiel mit dem Glucagon-like Peptide 1 (=GLP-1) in den β -Zellen des Pankreas in den Steuerungs- und Rückkopplungs-

mechanismen der Insulinausschüttung ein. (Aoyagi u. a. 2010; Hisanaga u. a. 2009; Kanzaki u. a. 1999) Eine Beteiligung an kardiovaskulären Regulationsfunktionen wird ebenfalls diskutiert, (Peralvarez-Marín u. a. 2013) eine Expression von TRPV-2 in der glatten Muskulatur von arteriellen und venösen Gefäßen ließ sich beweisen. (Park u. a. 2003; Peng u. a. 2010) Auch in vielen lymphatischen Geweben, wie z. B. der Milz, und in vielen verschiedenen Zellen des Immunsystems, wie z. B. Kupffer-Zellen, Langerhans-Zellen, Alveolarmakrophagen und Lymphozyten ist TRPV-2 dauerhaft exprimiert. (Caterina u. a. 1999; Link u. a. 2010; Saunders u. a. 2007)

Auch für viele verschiedene Tumorentitäten, ausgehend z. B. von embryonalem, hepatischem oder urogenitalem Gewebe, konnte mittlerweile eine molekulare Überexpression des TRPV-2-Rezeptors nachgewiesen werden. (Caprodossi u. a. 2008; Liu u. a. 2010; Peralvarez-Marín u. a. 2013) Insbesondere für Blasenkarzinome konnte auch ein tumorsuppressiver Effekt durch die Aktivierung des TRPV-2-Rezeptors gezeigt werden. (Yamada u. a. 2010) Im Gegensatz dazu konnte für Prostatakarzinomzellen bei TRPV-2-Nachweis eine verstärkte Metastasierungsrate und Migrationsbereitschaft beobachtet werden. (Monet u. a. 2009, 2010)

Von besonderem Interesse ist für diese Arbeit die Tatsache, dass auch für den TRPV-2-Rezeptor – wie auch für den TRPV-1-Rezeptor (Stock u. a. 2012) – eine Assoziation zu tumorsuppressiven Mechanismen auf Glioblastomzellen gezeigt werden konnte. (Morelli u. a. 2012; Nabissi u. a. 2010, 2013) Die *IN VITRO* Zellproliferation und Widerstandsfähigkeit gegen zytotoxische Einflüsse von malignen Gliomzellen nahm mit steigendem Level an TRPV-2-Expression deutlich ab. (Nabissi u. a. 2010) Zudem führt eine TRPV-2-Aktivierung durch geeignete Rezeptoragonisten zu einer Verringerung der Aktivität und Proliferation der spezifischen Tumorstammzellen (hier GSCs) durch Differenzierung und damit zu einer wirkungsvollen Tumorsuppression, die vom Mechanismus mit einer Aktivierung des BMP-7-Signalweges vergleichbar ist. (Morelli u. a. 2012) Die TRPV-2-Aktivierung bewirkt außerdem eine erhöhte Sensibilität gegen klassische zytotoxische Chemotherapeutika, wie z. B. die Standardtherapie mit Temozolomid. (Nabissi u. a. 2013)

1.3.2 Vanilloide

Vanilloide sind definiert als Verbindungen, die sich in ihrer chemischen Struktur vom *Vanillin* (vgl. Abb. 1.6b auf Seite 24) ableiten lassen und als Agonisten am TRPV-1-Rezeptor – hier dann auch als Vanilloid-Rezeptor oder VR-1-Rezeptor bezeichnet – wirken. (Römpp Enzyklopädie 2016, s. v. Vanillin, Vanilloid-Rezeptor; Szallasi u. a. 2007) Als Endovanilloide werden entsprechend die hauptsächlich zen-

tral wirkenden endogenen Agonisten am TRPV-1-Rezeptor bezeichnet. (Römpp Enzyklopädie 2016, s. v. Endovanilloide; Starowicz u. a. 2007) Als erstes Endovanilloid konnte Arachidonoyl ethanolamid (=AEA, meist als *Anandamid* bezeichnet, vgl. Abb. 1.6c auf Seite 24) identifiziert werden, welches bereits zuvor als Agonist an zentralen Cannabinoid-Rezeptoren beschrieben worden war. (Howard u. a. 2013; Mechoulam u. a. 1998; Römpp Enzyklopädie 2016, s. v. Endovanilloide; Starowicz u. a. 2007) Mittlerweile konnte eine Vielzahl an Endovanilloiden beschrieben werden, wie z. B. N-Arachidonoyldopamin (=NADA, vgl. Abb. 1.6d auf Seite 24) oder N-Oleoyldopamin (=ODA), die u. a. für komplexe zentrale Prozesse wie die endogene Thermoregulation von Bedeutung sind. (Römpp Enzyklopädie 2016, s. v. Endovanilloide; Starowicz u. a. 2007)

Neben der bereits erwähnten Vanillyl-Gruppe bzw. einer stereochemisch ähnlichen Gruppe bestehen Endovanilloide häufig noch aus einem mehrfach ungesättigten Fettsäurerest, wie z. B. einem Derivat der Arachidonsäure, und zeigen damit mögliche Verbindungen zu einem weiteren komplexen Zellkommunikationssystem der Prostaglandine und Leukotriene auf. (Howard u. a. 2013; Mechoulam u. a. 1998)

1.3.3 Cannabinoide

Cannabinoide sind eine Gruppe an Substanzen, die ursprünglich aus den weiblichen Blütenspitzen (Marihuana) und dem aus diesen gewonnenen Harz (Haschisch) der indischen Hanfpflanze *Cannabis sativa* isoliert werden konnten. (Elsohly u. a. 2005; Römpp Enzyklopädie 2016, s. v. Cannabinoide) Diese natürlich gewonnene Mischung zeigen ausgeprägte psychotrope Auswirkungen auf den menschlichen Organismus, die v. a. mit dem Gehalt an δ -9-Tetrahydrocannabinol (=THC, vgl. Abb. 1.6e auf Seite 24) in Korrelation stehen. (Elsohly u. a. 2005; Römpp Enzyklopädie 2016, s. v. Cannabinoide) Weitere nachweisbare Inhaltsstoffe sind u. a. Cannabidiol (=CBD, vgl. Abb. 1.6f auf Seite 24) und Cannabinol. (Elsohly u. a. 2005; Römpp Enzyklopädie 2016, s. v. Cannabinoide) Während die berauschende Wirkung von THC hauptsächlich auf einen direkten Agonismus an den zentralen Cannabinoid-Rezeptoren CB₁ und CB₂ zurückgeführt werden kann, (Howlett u. a. 2002; Pertwee 2006) sind für andere Cannabis-Bestandteile, wie insbesondere für CBD, nur sehr geringe, zum Teil auch antagonistische Wirkungen an diesen Rezeptoren bekannt. (Mechoulam u. a. 2007; Scuderi u. a. 2009) Da deshalb die typischen berauschenden oder sedierenden Nebenwirkungen fehlen, ist CBD pharmakologisch besonders interessant. (Mechoulam u. a. 2007; Scuderi u. a. 2009) Für CBD werden u. a. Interaktionen am Serotonin-Rezeptor 5-HT_{1a} und an verschiedenen TRPV-Rezeptoren, allosterische

Modulationen an Opiod-Rezeptoren, Beeinflussung diverser Zytokin-Systeme (wie z. B. TNF- α und IFN- γ) und anti-oxidative Effekte diskutiert. (Mechoulam u. a. 2007; Scuderi u. a. 2009) Aktuell sind deshalb u. a. antiepileptische, antiemetische, analgetische, hypnotische und weitere v. a. zentrale und neuroprotektive Wirkungen Gegenstand intensiver pharmakologischer Forschung. (Elsohly u. a. 2005; Mechoulam u. a. 2007; Scuderi u. a. 2009)

Mittlerweile konnte ähnlich dem Endovanilloid-System auch ein cerebrales Endocannabinoid-System nachgewiesen werden, als zentrale Rezeptoren dienen hier v. a. die Cannabinoid-Rezeptoren CB₁ und CB₂. (Mechoulam u. a. 1998; Römpp Enzyklopädie 2016, s. v. Cannabinoid-Rezeptor) Zusätzlich wird auch eine Beteiligung verschiedener weiterer Rezeptoren, wie z. B. des N-Arachidonoylglycin-Rezeptors GPR18, des Orphan-Rezeptors GPR55 oder des GPR119-Rezeptors diskutiert. (Mechoulam u. a. 1998; Pertwee u. a. 2010) Im Gegensatz zu den TRPV-Rezeptoren handelt es sich bei den endogenen Cannabinoid-Rezeptoren CB₁ und CB₂ nicht um Ionenkanäle, sondern sie beeinflussen als G-Protein gekoppelte Rezeptoren Phosphorylierungsprozesse in verschiedenen Zelltransduktionswegen – z. B. durch Beeinflussung der Adenylat-Cyclase und damit der intrazellulären Konzentration an cyclischem AMP (=cAMP) – und die Öffnungswahrscheinlichkeiten verschiedener K⁺- und Ca²⁺-Ionenkanäle mit meist inhibitorischen Effekten. (Howlett u. a. 2002; Pertwee 2006; Römpp Enzyklopädie 2016, s. v. Cannabinoid-Rezeptor) Die CB₁-Rezeptoren kommen hauptsächlich im zentralen und peripheren Nervensystem vor, die CB₂-Rezeptoren dagegen sind vorwiegend in den verschiedenen Zellen des Immunsystems lokalisiert, kommen aber teilweise ebenfalls im zentralen Nervensystem vor. (Howlett u. a. 2002; Pertwee 2006; Römpp Enzyklopädie 2016, s. v. Cannabinoid-Rezeptor)

Als wichtige Endocannabinoide können das bereits bei den Endovanilloiden erwähnte Anandamid und 2-Arachidonoylglycerin (=2-AG) genannt werden. (Mechoulam u. a. 1998) Wie am Beispiel von Anandamid zu sehen, bestehen zwischen dem Endovanilloid-System und dem Endocannabinoid-System weitreichende Überschneidungen. So interagieren viele Endovannilloide agonistisch oder antagonistisch mit CB-Rezeptoren. Umgekehrt konnte auch für Cannabinoide bereits eine Interaktion mit TRPV-Rezeptoren gezeigt werden. (Peralvarez-Marín u. a. 2013; Pertwee u. a. 2010; Starowicz u. a. 2007)

Insbesondere für den TRPV-2-Rezeptor ist eine mögliche Aktivierung durch pflanzliche Cannabinoide bereits bekannt und gut etabliert, die notwendigen Konzentrationen bewegen sich je nach Substanz im Bereich ab 1,25 μ M für CBD. (De Petrocellis u. a. 2011; Peralvarez-Marín u. a. 2013; Qin u. a. 2008) Die im letzten Absatz von Ab-

Kapitel 1 Theoretische Grundlagen der Arbeit

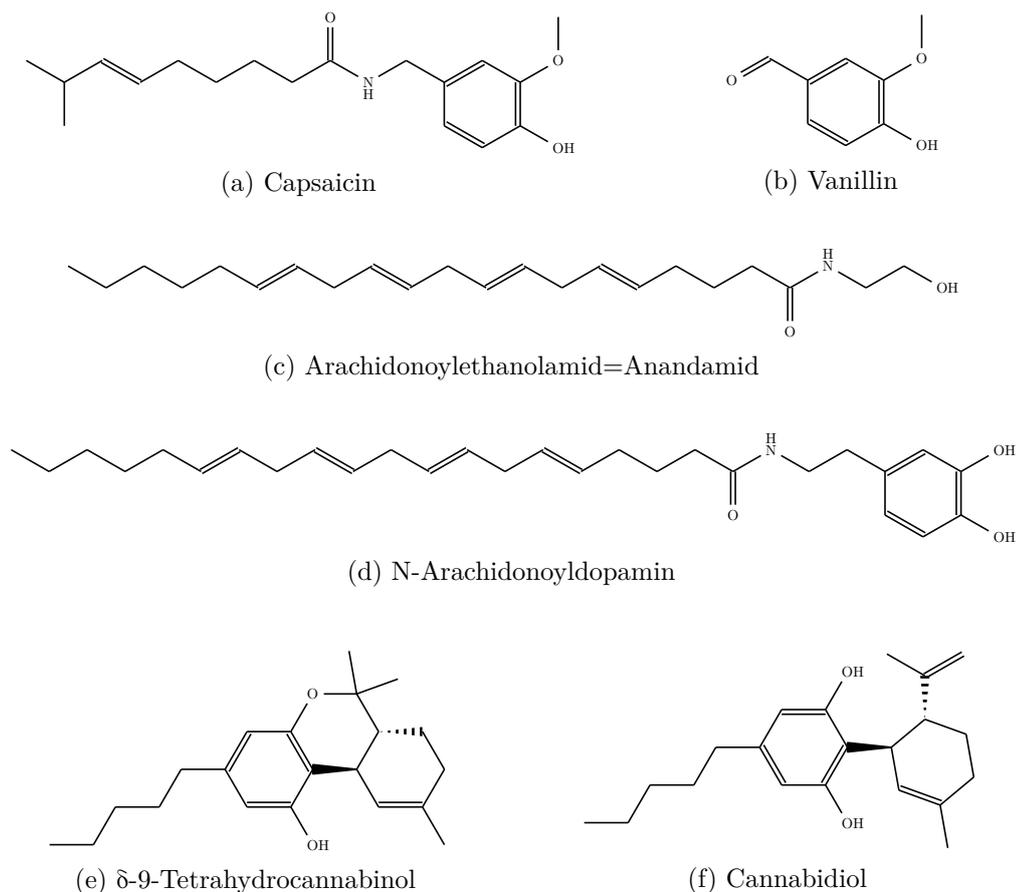


Abbildung 1.6: **Strukturformeln ausgewählter Vanilloide und Cannabinoide**
Strukturformeln erstellt mit *mol2chemfig* (mol2chemfig 2016) nach
Abgleich mit *PubChem* (PubChem 2016)

schnitt 1.3.1 auf Seite 18 erwähnten tumorsuppressiven Effekte auf Glioblastomzellen durch TRPV-2-Agonisten konnten durch Einsatz pflanzlicher Cannabinoide – hier insbesondere von Cannabidiol (=CBD) – erreicht werden. (Morelli u. a. 2012; Nabissi u. a. 2013; Solinas u. a. 2013) Neben dieser TRPV-2 vermittelten Tumorsuppression von Glioblastomen konnten auch für eine Vielzahl anderer maligner Erkrankungen, wie z. B. für Prostata-, Brust-, Lunge-, Haut- und Pankreaskarzinome sowie für maligne Lymphome, tumorsuppressive Effekte durch Cannabinoide gezeigt werden. (Sarfaraz u. a. 2008) Teilweise konnten dabei Zellsignalkaskaden identifiziert werden, die über die aktivierten Cannabinoid-Rezeptoren durch Phosphorylierungsprozesse Apoptose induzieren. Zudem ist aber auch die bereits erwähnte TRPV-2 vermittelte Tumorsuppression zu diskutieren. (Sarfaraz u. a. 2008; Yamada u. a. 2010)

1.3.4 Etablierter klinischer Einsatz pflanzlicher Cannabinoide

Neben den im vorherigen Abschnitt bereits diskutierten möglichen pharmakologischen Einsatzgebiete für pflanzliche Cannabinoide gibt es einige Indikationen und Substanzen, für die bereits eine komplette Zulassung inkl. kompletter Phase-I- bis Phase-III-Studien erfolgt ist. So werden Cannabinoide, hier eine je 50 %ige Mischung aus δ -9-Tetrahydrocannabinol (=THC) und Cannabidiol (=CBD), unter dem Handelsnamen Nabiximols® bereits erfolgreich zur Behandlung von Spastik und Schmerzen bei Multipler Sklerose eingesetzt. (Howard u. a. 2013; Notcutt 2015; Zettl u. a. 2016) Zudem können Cannabinoide auch erfolgreich bei Chemotherapie-induzierter Übelkeit und Erbrechen (v. a. THC), bei AIDS-abhängiger Anorexie (hier z. B. das synthetische Cannabinoid Nabilone) und auch bei nicht anders kontrollierbaren chronischen Schmerzen – auch ohne Tumorassoziation – zum Einsatz kommen. (Howard u. a. 2013; Lynch u. a. 2015) Mittlerweile wird auch intensiv ein Einsatz bei therapierefraktärer kindlicher Epilepsie evaluiert, insbesondere beim *Lennox-Gastaut-Syndrom* oder auch beim *Dravet-Syndrom*. (Campbell u. a. 2017; Szaflarski u. a. 2019; Wheless u. a. 2019)

1.4 Flavonoide als Aktivatoren des BMP-7-Signalweges

Neben der TRPV-1-Rezeptoraktivierung durch Endovanilloide, die in dieser Arbeit pharmakologisch mit Cannabinoiden erfolgen soll, ist wie bereits beschrieben auch eine Aktivierung des BMP-7-Signalweges an der endogenen Tumorsuppression beteiligt. (Chirasani u. a. 2010; Stock u. a. 2012) Es kann vermutet werden, dass mit zunehmendem Alter und Verminderung neuronaler Vorläuferzellen das durch BMP-7-Aktivierung vermittelte Gleichgewicht zwischen Tumorsuppression und Gliomagenese in den neuronalen Vorläuferzellen verschoben wird. (Chirasani u. a. 2010) Die Flavonoide sind eine pharmakologisch bereits erprobte und gut untersuchte Substanzgruppe, die IN VITRO und IN VIVO eine Aktivierung des BMP-7-Signalweges bewirken kann. (Gargiulo u. a. 2013; Vrijens u. a. 2013) Dadurch könnte ein therapeutischer Ersatz für die endogene Aktivierung des BMP-7-Signalweges möglich sein. (Chirasani u. a. 2010)

In einem sog. *High Throughput Screening* konnten vier verschiedene Flavonoide – je zwei Chalone (Isoliquiritigenin und 4'-Hydroxychalon) und Flavone (Diosmetin und Apigenin) – identifiziert werden, die eine Aktivierung des BMP-Signalweges bewirken. (Vrijens u. a. 2013) Nur für die beiden Chalone – insbesondere das im weiteren Verlauf dieser Arbeit verwendete *Isoliquiritigenin* – konnte auch phosphoryliertes Smad1/5 (pSmad1/5, ab einer Konzentration von 5–10 μ M Isoliquiritigenin) und

Id1, sowie Id2 (ab einer Konzentration von 14–28 μM Isoliquiritigenin) nachgewiesen werden. (Vrijens u. a. 2013) Zusätzlich wurde für Isoliquiritigenin auch bereits IN VIVO ein Agonismus an intracerebralen GABA_A-Rezeptoren gezeigt, somit kann eine verlässliche Überwindung der Blut-Hirn-Schranke angenommen werden. (Cho u. a. 2011)

Damit bietet sich *Isoliquiritigenin* zur pharmakologischen Aktivierung des BMP-7-Signalweges an, IN VITRO in dieser Arbeit und möglicherweise auch zur pharmakologischen Nachahmung der endogenen Tumorsuppression IN VIVO.

1.5 Tumornekrosefaktor- α – TNF- α

Tumornekrosefaktor- α (=TNF- α , teilweise auch als Cachectin oder Lymphotoxin bezeichnet) wurde ursprünglich als von Makrophagen und Lymphozythen sezerniertes Protein beschrieben, welches zur Lyse von Zellen, insbesondere von Tumorzellen, führt. (Carswell u. a. 1975; Granger u. a. 1969; Locksley u. a. 2001) Weiterhin konnte gezeigt werden, dass TNF- α eine wichtige Rolle in der Entstehung von Fieber spielt und noch viele weitere, vorwiegend immun- und entzündungsmodulatorische Funktionen hat. (Beutler u. a. 1986; Locksley u. a. 2001)

Von besonderer Bedeutung für diese Arbeit ist die Tatsache, dass TNF- α die Empfindlichkeit präsynaptischer TRPV-1-Rezeptoren im Rückenmark für die Einwirkung von endogenen Agonisten ähnlich den o. g. Endovanilloiden (z. B. N-Oleoyldopamin) deutlich erhöht. (Spicarova u. a. 2010) Dabei wird durch TNF- α zunächst u. a. die Aktivität der *Cyclin-dependent kinase 5* (=Cdk5) gesteigert, die anschließend durch eine Phosphorylierung am TRPV-1-Rezeptor den Einstrom von Ca²⁺-Ionen in die Zelle und damit (vgl. Abschnitt 1.3.1 auf Seite 18) die bereits beschriebene Aktivierung des Rezeptors begünstigt. (Caterina u. a. 1997; Pareek u. a. 2007; Rozas u. a. 2016) Ursprünglich zur Schmerzreaktion auf Entzündungsreize dienend, könnte dieser Effekt für eine TRPV-vermittelte Pharmakologie maligner Gliome nützlich sein.

TNF- α scheint – neben u. a. Interleukin (=IL)-6, IL-8, IL-10 und TGF- β – auch im *cerebralen Tumor-Microenvironment* von Glioblastomen eine wichtige Rolle zu spielen. (Aggarwal u. a. 1996; Bhat u. a. 2013; Charles u. a. 2012) So konnte z. B. gezeigt werden, dass eine molekulargenetische Blockade von TNF- α IN VIVO tumorsuppressiv auf Glioblastome wirkt. (Aggarwal u. a. 1996) Weiterhin scheint TNF- α auch einen Einfluss auf die Ausprägung des molekularbiologischen Subtyps zumindest IN VITRO zu haben. (Bhat u. a. 2013) Durch Einwirkung von TNF- α kommt es in GSCs vom

Kapitel 1 Theoretische Grundlagen der Arbeit

proneuralen Subtyp zur Aktivierung der NF- κ B-Kaskade und zur Expression von u. a. CD44 und damit zur Ausprägung des mesenchymalen Subtyps und einer verminderten Strahlensensitivität *IN VITRO*. (Bhat u. a. 2013)

Eine wichtige Rolle nimmt TNF- α auch in der Immunreaktion als Stimulator von Makrophagen ein. Diese Stimulation ist insbesondere in der Reaktion auf *Mycobacterium tuberculosis*, den Erreger der Tuberkulose entscheidend. Während einer Behandlung mit Anti-TNF- α -Antikörpern besteht hier eine große Gefahr der Reaktivierung einer latenten Infektion. (Keane u. a. 2001) Die Anti-TNF- α -Antikörper, z. B. *Infliximab* (Remicade®) oder *Adalimumab* (Humira®) sind heutzutage wichtige Bestandteile der Therapie verschiedener Autoimmunerkrankungen, wie z. B. den chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen Morbus Crohn und Colitis ulcerosa oder der rheumatoiden Arthritis, so dass davon ausgegangen werden kann, dass TNF- α auch in der Pathogenese dieser Krankheiten zentral beteiligt ist. (Hehlgans u. a. 2005)

Kapitel 2

Verwendete Materialien und Methoden

Im Verlauf des folgenden Kapitels werden die verwendeten Materialien, insbesondere die zu untersuchenden Cannabinoide, aufgeführt und ihre Verwendungs- und Lagerungsbedingungen dokumentiert. Weiterhin werden auch die angewandten Mess- und Analysemethoden vorgestellt, mit besonderem Fokus auf Durchführung und Weiterentwicklung der Methode der fluoreszenzbasierten Messung der relativen Zytotoxizität (CytoTox-FluorTM Cytotoxicity Assay, Promega # G 9262). Zudem wird die Technik der IN-VITRO-Zellkultivierung beschrieben, wie sie im Tumorbiologischen Labor der Abteilung für neurochirurgische Forschung etabliert ist.

2.1 Zellkultur

Es wurden zwei verschiedene Formen der IN-VITRO-Zellkultur verwendet. Grundsätzlich zu unterscheiden sind dabei die lang etablierten sog. *Zelllinien*, die in serumhaltiger Kultur eine unbegrenzte Wachstums- und Teilungspotenz haben, von den sog. *Primärkulturen*, die direkt aus Operationspräparaten gewonnen in serumfreiem Medium kultiviert werden. Letztere zeichnen sich zwar durch eine größere zellbiologische Ähnlichkeit zu IN-VIVO-Tumorgewebe aus, haben aber eine deutlich eingeschränkte Teilungsgeschwindigkeit und -potenz sowie wesentlich anspruchsvollere Kulturbedingungen.

2.1.1 Zelllinien

Für die Kultivierung der eingesetzten Zelllinien wurde als Standardkulturmedium DMEM (=Dulbecco's Modified Eagle Medium, Biochrom # FG 0415) eingesetzt mit den empfohlenen Zusätzen von 10 % FCS (=Fetal-Calf-Serum, Biochrom # SO 115), 1 % MEM NEAA (=Non-Essential-Amino-Acids, Gibco # 11140-035) und 1 % Penicillin/Streptomycin/Glutamin (Gibco # 10378-016). Letzteres konnte im Verlauf der

Kapitel 2 Verwendete Materialien und Methoden

Arbeit auf 1 % Penicillin/Streptomycin (Gibco # 15140-122) umgestellt werden, da bereits im Ausgangsmedium standardmäßig ausreichend L-Glutamin enthalten ist. Zur Ablösung der meist adhärensten Zellen vom Boden des Kulturgefäßes – sog. *Splitten* – wurde 0,5 %iges Trypsin mit Zusatz von 0,2 % EDTA (Biochrom # L 2153) verwendet, wie allgemein üblich diente als Waschpuffer isotonisches PBS (=Phosphate-Buffered-Saline, Bezug über Klinikapotheke).

Die verwendeten Zelllinien, hauptsächlich die etablierte humane Glioblastom-Zelllinie U87, wurden in Zellkulturflaschen verschiedener Größen (25 cm² TPP # 90026, 75 cm² TPP # 90760 und 150 cm² TPP # 90151) bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit in einem handelsüblichen Brutschrank kultiviert. Bei regelmäßiger mikroskopischer Kontrolle des Zellwachstums erfolgte mindestens zweimal pro Woche ein Wechsel des o. g. Kulturmediums, bei ausreichender Dichte des Zellrasens (ca. 70–90 % Konfluenz) wurden die Zellen gesplittet. Dazu wurde das Medium entfernt, der Zellrasen mindestens einmal mit PBS gewaschen und der Boden der Zellkulturflasche mit Trypsin/EDTA bedeckt. Nach kurzer Inkubation bei Raumtemperatur, falls erforderlich auch bei 37 °C im Brutschrank, und einer anschließenden kurzen mikroskopischen Kontrolle auf die komplette Ablösung aller Zellen vom Boden, wurde das Trypsin/EDTA mit mindestens dem doppelten Volumen an Kulturmedium – durch die antiproteolytischen Bestandteile des zugesetzten FCS – inaktiviert. Die erhaltene Zellsuspension wurde dann für fünf Minuten bei 2 000 rpm zentrifugiert und das entstandene Zellpellet in einer definierten Menge Medium (z. B. 1 ml) resuspendiert, sodass eine Zellzahl bzw. -konzentration mithilfe der Neubauer-Zählkammer (Roth # T 728.1) bestimmt werden konnte. Zur weiteren Kultivierung wurden meist ungefähr 10 % der abgelösten Zellen gemeinsam mit frischem Medium zurück in die Zellkulturflasche gegeben, alternativ nach Zählung ca. 100 000 Zellen mit 4 ml Medium in eine kleine Zellkulturflasche (25 cm²), ca. 300 000 Zellen mit 10 ml Medium in eine mittlere Zellkulturflasche (75 cm²) oder ca. 600 000 Zellen mit 20 ml Medium in eine große Zellkulturflasche (150 cm²). Die übrigen Zellen konnten dann für die im weiteren beschriebenen zellbiologischen Experimente verwendet werden.

Nach jedem Splitten wurde gemäß der Konvention die Passagezahl um 1 erhöht. Im Laufe der Arbeit wurden ausschließlich Zellen mit laborinternen Passagezahlen zwischen 5 und 40 verwendet. Um dies zu ermöglichen, wurden zu Beginn der Arbeit Zellen mit niedrigen Passagezahlen in speziellem Einfriermedium unter Zusatz von DMSO (=Dimethylsulfoxid) bei -80 °C im Tiefkühlschrank bzw. bei -196 °C in flüssigem Stickstoff kryokonserviert.

2.1.2 Primärkulturen

Im Gegensatz zu den Zelllinien wurde für die Primärkulturen *serumfreies Medium* verwendet. Zu Beginn der Arbeit wurde dafür Neurobasal MEDIUM A (Gibco # 12349-015) eingesetzt, allerdings ohne Zusatz von Phenolrot, um Interaktionen mit den anschließenden fluoreszenzbasierten Messmethoden zu vermeiden. Entsprechend den Empfehlungen wurde 1 % Penicillin/Streptomycin/Glutamin (Gibco # 10378-016), 1 % B27-Supplement (Gibco # 17504-044), 0,5 % N2-Supplement (Gibco # 17502-048) und je 20 ng/ml hEGF (R & D # 236-EG), bFGF (PeproTech # 100-18B) und Heparin (Sigma # H 3149-10KU) zugesetzt. Nachdem Vergleichsexperimente ein gleiches Wachstumsverhalten gezeigt hatten, wurde das serumfreie Medium auf DMEM/F-12 (Gibco # 21041-033) umgestellt, ebenfalls ohne Phenolrot und mit Zusatz von 1 % Penicillin/Streptomycin (Gibco # 15140-122), 2 % B27-Supplement (Gibco # 17504-044) und je 20 ng/ml hEGF (R & D # 236-EG) und bFGF (PeproTech # 100-18B). L-Glutamin war hier ebenfalls schon standardmäßig enthalten.

Bei regelmäßiger mikroskopischer Kontrolle des Zellwachstums erfolgte hier mindestens dreimal pro Woche ein Wechsel des Kulturmediums. Aufgrund des teilweisen oder vollständigen sphäroiden Wachstums der verwendeten Primärkulturen wurde dabei zunächst immer das alte Medium für fünf Minuten bei 1 500 rpm zentrifugiert und dann das entstandene Zellpellet resuspendiert bzw. gesplittet. Zum *Splitten* wurde anstelle von Trypsin/EDTA hier Accutase (Sigma # A6964) verwendet, die allerdings nicht durch im Medium enthaltene Proteine inaktiviert wurde, sondern ausschließlich durch Verdünnung und anschließendes Abzentrifugieren entfernt werden konnte. Das weitere Vorgehen ist vergleichbar zum Protokoll bei *Zelllinien*.

Tabelle 2.1 zeigt eine Auflistung der vier verwendeten humanen *Primärkulturen* – etabliert im Tumorbiologischen Labor der Abteilung für neurochirurgische Forschung – und führt jeweils rein *subjektiv* Wachstumsgeschwindigkeit und dominierende Wachstumsform auf.

Tabelle 2.1: **Übersicht über die verwendeten Primärkulturen**

| Name | Wachstumsgeschwindigkeit | dominierende Wachstumsform |
|-------|--------------------------|--------------------------------|
| GBM10 | mittel | gemischt adhärent und sphäroid |
| GBM13 | langsam | rein sphäroid |
| GBM20 | schnell | mehr adhärent als sphäroid |
| GBM29 | mittel | gemischt adhärent und sphäroid |

2.1.3 Versuchsaufbau im Multi-Well-Format

Für die zellbiologischen Versuche wurde ein Multi-Well-Format mit 24- und 96-Well-Testplatten verwendet (TPP # 92424 und TPP # 92096). Zur Vermeidung von unerwünschten Störeffekten wurden in jeder 96-Well-Platte der äußere Rand der Platte nicht genutzt und zum Ausgleich mit je 200 µl PBS gefüllt, bei den 24-Well-Platten wurde darauf verzichtet. Im weiteren werden Vorgehen und Mengen für 96-Well-Platten mit *Zelllinien* beschrieben, für die 24-Well-Platten sind die Zahlen und Volumina analog zu den Größenverhältnissen, insbesondere der Bodenfläche pro Well, jeweils um den Faktor 5 zu erhöhen. Die Besonderheiten für die *Primärkulturen* werden jeweils extra aufgeführt.

Am ersten Versuchstag wurden die gesplitteten Zellen in Aliquots von 200 µl Kulturmedium mit je 3 000 Zellen bzw. zu Beginn der Arbeit je 10 000 Zellen pro Well auf die Platten verteilt. Mindestens fünf Wells wurden als Leerkontrolle entsprechend mit Medium ohne Zellen befüllt.

Am folgenden Tag wurde das Medium vorsichtig abgesaugt und jeweils 90 µl serumfreies Primärkulturmedium zugegeben. Bei Primärkulturzellen begann der Versuch erst zu diesem Zeitpunkt, es wurden direkt je 3 000 Zellen in 90 µl Primärkulturmedium pro Well aliquotiert. War eine Vorbehandlung der Zellen geplant (z. B. mit TRPV-Antagonisten oder TNF- α) wurden die entsprechenden Substanzen in der geplanten Wirkkonzentration direkt dem Medium hinzugefügt.

Nach einer erneuten Inkubationszeit von 24 Stunden wurden pro Well jeweils 10 µl Primärkulturmedium mit der gleichen Konzentration an eventueller Vorbehandlungssubstanz und der zehnfachen gewünschten Konzentration der Wirksubstanzen (z. B. Cannabinoide oder Flavonoide) zugegeben. Dies führte zu einer weiterhin konstanten Konzentration der Vorbehandlungssubstanz und durch die Verdünnung zu der gewünschten Konzentration der zu untersuchenden Substanz. Zusätzlich zu den oben beschriebenen Leerkontrollen wurden auf jeder Platte jeweils mindestens fünf Kontrollwells mit unbehandelten Zellen eingerichtet. Je getesteter Konzentration, Kombination oder korrespondierender Kontrolle (z. B. nur mit Vorbehandlung) wurden ebenfalls immer mindestens fünf Wells verwendet. Die Konzentration an verwendeten organischen Lösungsmitteln (v. a. DMSO) wurde über alle Wells inklusive aller Kontrollen exakt gleich gehalten.

In der Folge wurde – nach gewünschter Inkubationszeit – entweder die gesamte Platte einer kombinierten Messung von Zytotoxizität und Zellzahl zugeführt, wie in Abschnitt 2.4 auf Seite 36 und Abschnitt 2.3 auf Seite 35 beschrieben, oder es wurden unter sterilen Bedingungen 20 µl Aliquots entnommen und mit der im

letzten Absatz von Abschnitt 2.3 beschriebenen weiterentwickelten Messmethode für relative Zytotoxizität analysiert, um Zeitverläufe zu erstellen oder den optimalen Messzeitpunkt zu ermitteln.

2.2 Verwendete Wirksubstanzen und Konzentrationen

Im folgenden Abschnitt werden jetzt die einzelnen Substanzen aufgeführt, die im gerade beschriebenen Versuchsaufbau mit Glioblastomzellen auf IN VITRO zytotoxische Effekte, sowie auf die Verstärkung oder Inhibition dieser Effekte untersucht werden sollten.

2.2.1 Vanilloide und Cannabinoide

In Tabelle 2.2 auf der nächsten Seite sind insgesamt zehn *Cannabinoide* aufgeführt, die auf ihre zytotoxischen Effekte untersucht werden sollten. Diese wurden mit beiliegendem Certificate of Analysis freundlicherweise von GW Pharmaceuticals® zur Verfügung gestellt. Ergänzt wurden die Testsubstanzen von den bekannten endogenen TRPV-1-Aktivatoren Capsaicin (Sigma # M 2028) und N-Arachidonoyldopamin (=NADA, Sigma # A 8848). Alle Substanzen außer NADA wurden in DMSO mit einer Konzentration von 100 mM gelöst. NADA wurde bereits gelöst in Ethanol geliefert (50mg/ml entsprechend 113,73 mM) und mit reinem Ethanol ebenfalls auf eine Konzentration von 100 mM verdünnt. Bei einer maximalen Wirkkonzentration von 10 μ M in den Experimenten entspricht dies einer Verdünnung im Verhältnis von 1:10 000 und damit ebenfalls einer Lösungsmittelkonzentration von 1:10 000. Diese ist somit wesentlich geringer als die – insbesondere für DMSO – allgemein übliche kritische Grenze von 1:2 000 bis maximal 1:1 000. Im Rahmen dieser Arbeit wurde allerdings ein Grenzwert von maximal 1:4 000 nach Möglichkeit nicht überschritten, da einzelne, nicht-signifikante Versuchsreihen tatsächlich bereits bei derartigen Konzentrationen zytotoxische Effekte zeigten. Die Lagerung der gelösten Substanzen erfolgte bei -20 °C, die der ungelösten Produkte entsprechend den Empfehlungen der Hersteller im Zweifel immer bei -80 °C.

2.2.2 TRPV-Antagonisten

Tabelle 2.3 auf Seite 34 zeigt eine Auflistung der TRPV-Antagonisten, die verwendet wurden, um die zytotoxischen Effekte der Cannabinoide auf ihre Abhängigkeit von TRPV-Rezeptoraktivierung zu untersuchen. Es wurden die spezifischen

Tabelle 2.2: Übersicht über die verwendeten Cannabinoide

| Name | Abkürzung | Lösungsmittel |
|-------------------------------|-----------|---------------|
| Cannabidiol | CBD | DMSO |
| Cannabigerol | CBG | DMSO |
| Cannabidivarin | CBDV | DMSO |
| Tetrahydrocannabivarinic Acid | THCVA | DMSO |
| Cannabidiolic Acid | CBDA | DMSO |
| Cannabigerolic Acid | CBGA | DMSO |
| Cannabigevarin | CBGV | DMSO |
| Tetrahydrocannabivarin | THCV | DMSO |
| Cannabidivarinic Acid | CBDVA | DMSO |
| Cannabichromene | CBC | DMSO |
| Capsaicin | CAP | DMSO |
| N-Arachidonyl-Dopamine | NADA | Ethanol |

TRPV-1-Antagonisten 5-IRTX (=5-Iodoresiniferatoxin, Tocris # 1362-10) in einer Konzentration von 10 nM (vergleichbar den relevanten Vorexperimenten; Marinelli u. a. 2002; Stock u. a. 2012; Szallasi u. a. 2007; Wahl u. a. 2001) und SB366791 (Sigma # S 0441) in einer Konzentration von 1 μ M (Szallasi u. a. 2007; Varga u. a. 2005), der unspezifische TRPV-1-Antagonist Capsazepine (Sigma # C 191) in einer Konzentration von 1 μ M (Marinelli u. a. 2002; Stock u. a. 2012; Szallasi u. a. 2007), der spezifische TRPV-2-Antagonist Tranilast (Sigma # T 0318) in einer Konzentration von 100 μ M (Peralvarez-Marin u. a. 2013) und der unspezifische TRPV- und Ca^{2+} -Kanal-Antagonist Ruthenium Red (Sigma # R 2751) in einer Konzentration von 1 μ M (Caterina u. a. 1999; Peralvarez-Marin u. a. 2013) verwendet. Diese wurden in der 10 000-fachen in der Tabelle aufgeführten Wirkkonzentration in DMSO gelöst, sodass erneut eine Lösungsmittelkonzentration von 1:10 000 im Experiment möglich war und bei Kombination mit einem Cannabinoid eine Konzentration von 1:5 000 nicht überschritten wurde. Die Lagerung der Lösungen erfolgte ebenfalls bei -20 °C.

2.2.3 Rekombinantes BMP-7 und Isoliquiritigenin

Um die in Abschnitt 1.2.3.1 auf Seite 14 und Abschnitt 1.4 auf Seite 25 beschriebenen Effekte auch IN VITRO in Kombination mit Cannabinoiden zu testen, wurden rekombinantes BMP-7 und das Flavonoid *Isoliquiritigenin* verwendet. Isoliquiritigenin (Sigma # I 3766) wurde mit einer laut Herstellerangabe maximal möglichen Konzentration von 50 mM in DMSO gelöst und rhBMP-7 (=recombinant human bone

Tabelle 2.3: **Übersicht über die verwendeten TRPV-Antagonisten**
 (Caterina u. a. 1999; Marinelli u. a. 2002; Peralvarez-Marin u. a. 2013;
 Stock u. a. 2012; Szallasi u. a. 2007; Varga u. a. 2005; Wahl u. a. 2001)

| Name | Abkürzung | Lösungsmittel | Rezeptor | Konz. |
|-----------------------|-----------|---------------|--------------|-------------|
| 5-Iodoresiniferatoxin | 5-IRTX | DMSO | spez. TRPV-1 | 10 nM |
| SB366791 | | DMSO | spez. TRPV-1 | 1 μ M |
| Capsazepine | CZP | DMSO | TRPV-1 | 1 μ M |
| Tranilast | | DMSO | spez. TRPV-2 | 100 μ M |
| Ruthenium Red | Ruth.Red | DMSO | unspez. TRPV | 1 μ M |

morphogenetic protein-7, PeproTech # 120-03) mit einer Konzentration von 10 μ g/ml in PBS mit Zusatz von 0,1 % BSA (=Bovine-Serum-Albumin, Sigma # A 9418). Da dieses Lösungsmittel im Zellkulturmedium als interaktionsfrei zu werten ist, war eine 1:1 000 Verdünnung für die erforderliche Endkonzentration von 10 ng/ml rhBMP-7 im Testwell möglich. Vorversuche zeigten für Isoliquiritigenin in Kombination mit Cannabinoiden bereits ab einer Konzentration von 5 μ M eine deutliche Steigerung der zytotoxischen Effekte, sodass auch hier mit einer Verdünnung von 1:10 000 gearbeitet werden konnte und in Kombination mit einem Cannabinoid ebenfalls eine Konzentration an DMSO von maximal 1:5 000 nicht überschritten wurde. Die Lagerung beider Substanzen erfolgte wie üblich auch bei -20 °C.

2.2.4 Rekombinanter Tumornekrosefaktor- α

Für eine experimentelle Kombination der tumorsuppressiven Effekte von Cannabinoiden und TNF- α wurde rekombinanter Tumornekrosefaktor- α (=rhTNF- α , PeproTech # 300-01A) verwendet. Das rhTNF- α wurde genau wie rhBMP-7 mit einer Konzentration von 10 μ g/ml in PBS mit Zusatz von 0,1 % BSA (=Bovine-Serum-Albumin, Sigma # A 9418) gelöst. Somit konnte nach einer Verdünnung von 1:1 000 ebenfalls eine Wirkkonzentration von 10 ng/ml im Well erreicht werden, entsprechend den in Abschnitt 1.5 auf Seite 26 verwendeten Konzentrationen. (Bhat u. a. 2013) Die Lagerung erfolgte ebenfalls bei -20 °C.

2.3 Messung der relativen Zytotoxizität mittels des CytoTox-Fluor™ Cytotoxicity Assays

Zur Messung der zytotoxischen Effekte der im bisherigen Verlauf des Kapitels beschriebenen Substanzen auf Glioblastomzellen wurde der CytoTox-Fluor™ Cytotoxicity Assay (Promega # G 9262) verwendet. Dieser, eigens für den Einsatz im Multi-Well-Format entwickelte Assay, bildet die relative Zytotoxizität durch Messung sog. *dead-cell-protease activity* ab. (Niles u. a. 2007) Diese Proteasen werden ausschließlich von sterbenden Zellen, deren Membranintegrität beschädigt ist, aus dem Zellplasma freigesetzt, gleichzeitig kann das Assaysubstrat bis-AAF-R110 (=bis-Alanyl-Alanyl-Phenylalanyl-Rhodamine 110) eine intakte Zellmembran nicht durchdringen. (Niles u. a. 2007) Das bis-AAF-R110 Substrat wird von den dann im Kulturmedium gelösten Proteasen in *direkter Proportionalität* in das fluoreszierende *Rhodamine 110* ($485\text{ nm}_{Ex}/520\text{ nm}_{Em}$) überführt. (Niles u. a. 2007) Dieses kann dann von einem sog. *Plate Reader* mit geeignetem Fluoreszenzfilter ausgelesen werden. Hier wurde der Infinte® F200 PRO von Tecan® mit einem Filter für $485\text{ nm}_{Ex}/535\text{ nm}_{Em}$ verwendet. Somit können Unterschiede in der zytotoxischen Aktivität zwischen den einzelnen Wells und damit auch zwischen den verschiedenen Wirksubstanzen *relativ* messbar gemacht werden. (Niles u. a. 2007)

Zur Auswertung wurde von allen Messwerten zunächst die durchschnittliche Fluoreszenzaktivität der Leerkontrollen und danach auch der Kontrollwells mit unbehandelten Zellen abgezogen. Die erhaltenen Werte wurden dann jeweils durch den durchschnittlichen Wert der Kontrollwells mit unbehandelten Zellen geteilt, damit wurde für jedes Well ein relativer Zytotoxizitätswert berechnet und der Durchschnittswert für die unbehandelten Zellen rechnerisch gleich 0 gesetzt. Unter der Annahme, dass die Messwerte für die einzelnen Wells innerhalb eines Versuchsansatzes normalverteilt sind, wurden danach mittels des *Nalimov-Tests* eventuelle statistisch signifikante Ausreißer-Wells identifiziert innerhalb der einzelnen Gruppen identifiziert und aussortiert. Abschließend wurde von den übriggebliebenen Werten der Durchschnitt bestimmt und als einzelner Ergebniswert vermerkt, der dann mit den Ergebnissen der Wiederholungsexperimente zum endgültigen Ergebnis gemittelt wurde. Zur korrekten Berechnung der Standardabweichung in diesem Setting wurden neben der Standardabweichung der Mittelwerte auch die Standardabweichungen der einzelnen Versuche berücksichtigt. Bei weiterführenden Versuchen, die eine Abschwächung oder Steigerung der relativen Zytotoxizität der untersuchten Cannabinoide (z. B. nach Zugabe von TRPV-Antagonisten oder BMP-7-Aktivatoren) untersuchen sollten,

wurde vor dem Mitteln noch eine zweite Normalisierung der einzelnen Messwerte auf die alleinige relative Zytotoxizität der Cannabinoide vorgenommen, die damit auf 1 (entsprechend 100 %) gesetzt wurde. Die statistische Auswertung erfolgte unter Nutzung von Prism® von GraphPad® mittels ANOVA. Als Post-hoc-Test wurde entweder der Tukey-Test, bei Vergleich zwischen allen Gruppen, oder der Dunnett-Test durchgeführt, falls nur ein statistischer Vergleich zu einer Kontrollgruppe sinnvoll war.

Zu Beginn der Arbeit wurde der Assay gemäß dem empfohlenen Protokoll von Promega® eingesetzt. Die beiden Komponenten, der Assay Buffer und das Substrat bis-AAF-R110, wurden im Verhältnis 1:1 000 gemischt und zu jedem Well das bereits darin enthaltene Volumen (meist 100 µl in einer 96-Well-Platte) zugegeben. Für eine Positivkontrolle wurde zuvor in einige Wells je 10 µl einer Lösung von 300 µg/ml Digitonin (Serva # 19551.01) in destilliertem Wasser zugegeben, um eine absolute Zelllyse und damit maximale Zytotoxizitätswerte zu erreichen. Nach einer Inkubationszeit von 1–3 Stunden bei 37 °C wurde die Messung vorgenommen.

Aufgrund von Problemen mit dieser empfohlenen Anwendung der Messmethode, die zusammen mit der in der Folge durchgeführten Weiterentwicklung in Anhang A auf Seite 62 beschrieben sind, wurde im weiteren Verlauf der Arbeit ausschließlich die folgende verbesserte Version verwendet. Zum Zeitpunkt der geplanten Messung wurde aus allen Wells je 20 µl in ein Well einer schwarzen 384-Well-Platte (Corning # 3573) überführt und danach je 20 µl des fertig gemischten Assays dazu gegeben. Die Messung erfolgte weiterhin nach einer Inkubationszeit von 1–3 Stunden.

2.4 Fluoreszenzbasierte Messung der relativen Zellzahl – HOECHST 33342

Um die im vorherigen Kapitel erwähnten und ausführlich in Anhang A auf Seite 62 dargestellten Probleme der Vergleichbarkeit und Messbarkeit zu deutlicher zytotoxischer Effekte zu lösen, wurde zu Beginn der Arbeit eine Normalisierung der relativen Zytotoxizität auf die ebenfalls relativ gemessene Zellzahl vorgenommen. Dafür wurde die HOECHST-Messmethode verwendet, die von Gilbert u. a. (2011) in *PLoS ONE* in »A novel multiplex cell viability assay for high-throughput RNAi screening« vorgestellt und mit anderen etablierten sog. *Cell Viability Assays* verglichen wurde. Angestrebt wurde eine Konzentration von 10 µM HOECHST 33342 im Well und eine Inkubationszeit von 1–3 Stunden. (Gilbert u. a. 2011)

Dazu wurde in einer 96-Well-Platte entsprechend das enthaltene Volumen mit der

doppelten Konzentration (d. h. 20 μM) an HOECHST 33342 in serumfreiem Medium ohne Phenolrot zugegeben und für 1–3 Stunden bei 37 °C inkubiert. Zur Kombination der beiden Messmethoden wurde die entsprechende Menge HOECHST 33342 direkt in den fertigen CytoTox-FluorTM Cytotoxicity Assay gegeben und dann wie im dritten Absatz von Abschnitt 2.3 auf Seite 35 beschrieben fortgesetzt. Nach Ende der Inkubationszeit und ggfs. nach Abschluss der fluoreszenzbasierten Messung der relativen Zytotoxizität wurde das in den Wells enthaltene Medium abgesaugt und pro Well jeweils 100 μl serumfreies Medium wiederum ohne Phenolrot zugegeben. Danach wurde unmittelbar die fluoreszenzbasierte Messung bei $360\text{ nm}_{Ex}/465\text{ nm}_{Em}$ mit dem Infinte®F200 PRO von Tecan® durchgeführt.

Die Auswertung erfolgte vergleichbar zur Auswertung der Messungen der relativen Zytotoxizität. Zunächst wurde von allen Werten der durchschnittliche Wert der Leerkontrollen abgezogen. Die erhaltenen Werte wurden dann jeweils durch den Durchschnittswert der Kontrollwells mit unbehandelten Zellen geteilt, um für jedes Well einen relativen Zellzahl-Wert zu erhalten. Der Durchschnittswert der Kontrollwells mit unbehandelten Zellen wurde damit hier dann sinnvollerweise auf 1 (=100%) gesetzt. Bei einer Kombination mit der fluoreszenzbasierten Messung der relativen Zytotoxizität wurde danach für jedes Well jeweils der relative Zytotoxizitätswert durch den relativen Wert für die Zellzahl geteilt und damit auf die Zellzahl normalisiert. Abschließend wurden ebenfalls mittels des *Nalimov-Tests* statistisch signifikante Ausreißer identifiziert und aussortiert, und dann von den übriggebliebenen Werten die Durchschnittswerte gebildet.

Kapitel 3

Ergebnisse der Arbeit

Im folgenden werden jetzt die Ergebnisse der Arbeit vorgestellt, die mit den gerade beschriebenen Substanzen und Methoden erzielt wurden. Dabei wurde – falls nicht anders angegeben – die weiterentwickelte Version der Messmethoden verwendet, wie im letzten Absatz von Abschnitt 2.3 auf Seite 35 dargestellt.

3.1 Screening zehn verschiedener Cannabinoide

In Abb. 3.1 auf der nächsten Seite werden die relativen Zytotoxizitätswerte normalisiert auf die relativen Zellzahlwerte für alle in Tabelle 2.2 auf Seite 33 aufgeführten Cannabinoide bei einer Konzentration von jeweils 10 μM verglichen. Es zeigte sich für alle getesteten Substanzen eine erhöhte Zytotoxizität gegenüber der Kontrolle mit unbehandelten Zellen (hier gleich 1 gesetzt), welche bei niedriger Wiederholungszahl und der beschriebenen Messproblematik zu Beginn der Versuchsdurchführung (vgl. Abschnitt 2.3 auf Seite 35 und Anhang A auf Seite 62) mit Ausnahme des hauptsächlich zur Kontrolle eingesetzten *N-Arachidonoyldopamin* (=NADA) kein Signifikanzlevel erreichten. Aufgrund der Charakteristik dieses Experiments als primäres Screening für die eigentlichen, weiterführenden Untersuchungen wurde auf weitere Wiederholungen verzichtet und direkt mit den drei Substanzen, die orientierend die höchsten Zytotoxizitätswerte zeigten, – *Cannabidiol* (=CBD), *Cannabigerolic Acid* (=CBGA) und *Tetrahydrocannabivarin* (=THCV) – fortgesetzt.

In der folgenden Abb. 3.2 auf Seite 40 sind dann entsprechend vollständige Dosis-Wirkungskurven für diese vier Substanzen aufgeführt. Hierbei lässt sich für CBD in Abb. 3.2a eine deutliche Zunahme der auf die Zellzahl normalisierten Zytotoxizität ab einer Konzentration von 5 μM nachweisen, ab 7 μM sind die Werte gegenüber der unbehandelten Kontrolle signifikant erhöht. Auch für NADA in Abb. 3.2b zeigt sich eine steigende relative Zytotoxizität, allerdings ohne Nachweis einer statistischen Signifikanz. Die zytotoxischen Effekte von Endocannabinoiden und die TRPV-1-Affinität

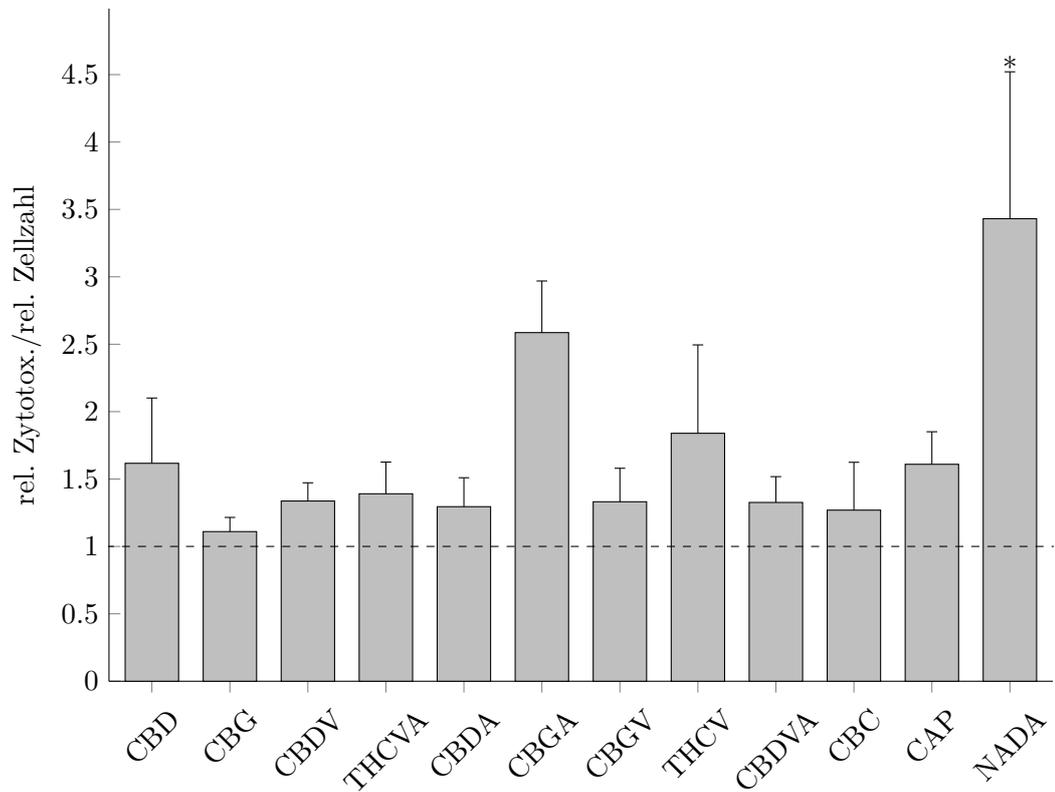


Abbildung 3.1: **Screening zehn verschiedener Cannabinoide** und zweier Vergleichssubstanzen (Capsaicin und NADA) auf maximale zytotoxische Effekte mit 10 000 Zellen U87 pro Well und 72 h Inkubationszeit, normalisiert auf die Zellzahl und die unbehandelte Kontrolle (hier gleich 1 gesetzt und durch gestrichelte Linie gekennzeichnet)

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ mit ANOVA und Post-hoc-Test (hier Dunnett, verglichen mit der unbehandelten Kontrolle), Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler des Mittelwertes, $n=2$

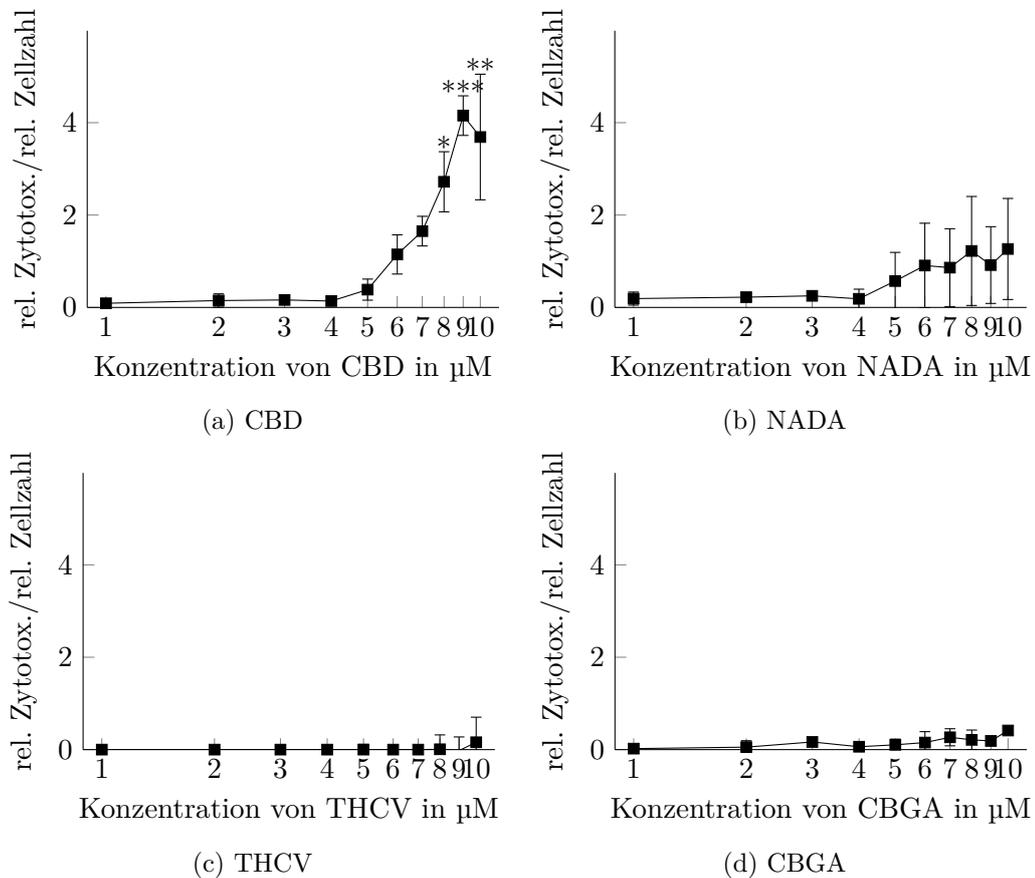


Abbildung 3.2: **Erweitertes Screening der Cannabinoide – Dosis-Wirkungskurven**

Semilogarithmische Darstellung der zytotoxischen Effekte von CBD, NADA, THCV und CBGA, signifikanter Anstieg der relativen Zytotoxizität (normalisiert auf die unbehandelte Kontrolle) kann nur für CBD nach 72 h Inkubationszeit mit 10 000 Zellen U87 pro Well nachgewiesen werden.

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ mit ANOVA und Post-hoc-Test (hier Dunnett, verglichen mit der unbehandelten Kontrolle), Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler des Mittelwertes, $n=2$

von NADA ist bereits ausführlich beschrieben worden. (Starowicz u. a. 2007; Stock u. a. 2012) Da NADA hier zudem nur zur Kontrolle dient, wurde auf ausführliche Wiederholungen und Optimierung verzichtet. Wie in Abb. 3.2c und 3.2d gezeigt, konnten die zytotoxischen Effekte von *THCV* und *CBGA* aus dem ersten Screening hier nicht bzw. nur vergleichsweise schwach reproduziert werden und bleiben weit hinter den deutlichen Effekten für *CBD* zurück.

Dieses und das vorhergehende erste Diagramm wurden noch nach der ursprünglichen, weniger sensitiven Messmethode für die relative Zytotoxizität und entsprechend mit Normalisierung auf die relative Zellzahl erstellt. Wegen der deutlich überlegenen zytotoxischen Effekte von *CBD* im Vergleich zu den anderen getesteten Substanzen wurden diese Screening-Experimente mit der weiterentwickelten Methode aber nicht wiederholt und *CBD* (= *Cannabidiol*) direkt als zu untersuchendes Cannabinoid für die weiterführenden Experimente zur Evaluation einer möglichen Pharmakotherapie mit Cannabinoiden für Glioblastome ausgewählt.

In Abb. 3.3 auf der nächsten Seite wird dann die relative Zytotoxizität von $10\ \mu\text{M}$ *CBD* im Zeitverlauf aus einem 24-Well-Versuch gezeigt. Einschließlich diesem Versuch wurden alle weiteren Experimente mit der modifizierten Messtechnik durchgeführt. Es zeigte sich ab dem zweiten Tag ein deutlicher Anstieg der relativen Zytotoxizität auf ungefähr das drei- bis vierfache Niveau der Kontrolle mit unbehandelten Zellen, also um ca. 300–400 %. Dieser Effekt blieb dann bis zum sechsten Beobachtungstag annähernd konstant hoch messbar und ist an Tag 4 und 5 gegenüber der unbehandelten Kontrolle statistisch signifikant. Ab dem siebten Tag Inkubation mit *CBD* war dann aufgrund des zunehmend geschlossenen Zellrasens in den Kontrollwells und des gleichzeitig schon weit fortgeschrittenen Zelltods in den Testwells wiederum keine sinnvolle Messung mehr möglich.

3.2 Testung an Primärkulturen

In Abb. 3.4 auf Seite 44 wird die Dosis-abhängige Zytotoxizität von *CBD* auf verschiedene *Primärkulturen* dargestellt. Es konnte für die laborintern GBM10 (Abb. 3.4a), GBM20 (Abb. 3.4c) und GBM29 (Abb. 3.4d) genannten Primärkulturen jeweils ab einer Konzentration von 3 bzw. $4\ \mu\text{M}$ *CBD* eine erhöhte Zytotoxizität gegenüber der Kontrolle mit unbehandelten Zellen gezeigt werden, für die höheren Konzentrationen ließ sich jeweils statistische Signifikanz gegenüber der unbehandelten Kontrolle nachweisen. Für GBM20 erreicht die relative Zytotoxizität bei einer Konzentration von $10\ \mu\text{M}$ *CBD* den 6,7-fachen Wert der unbehandelten Kontrolle entsprechend

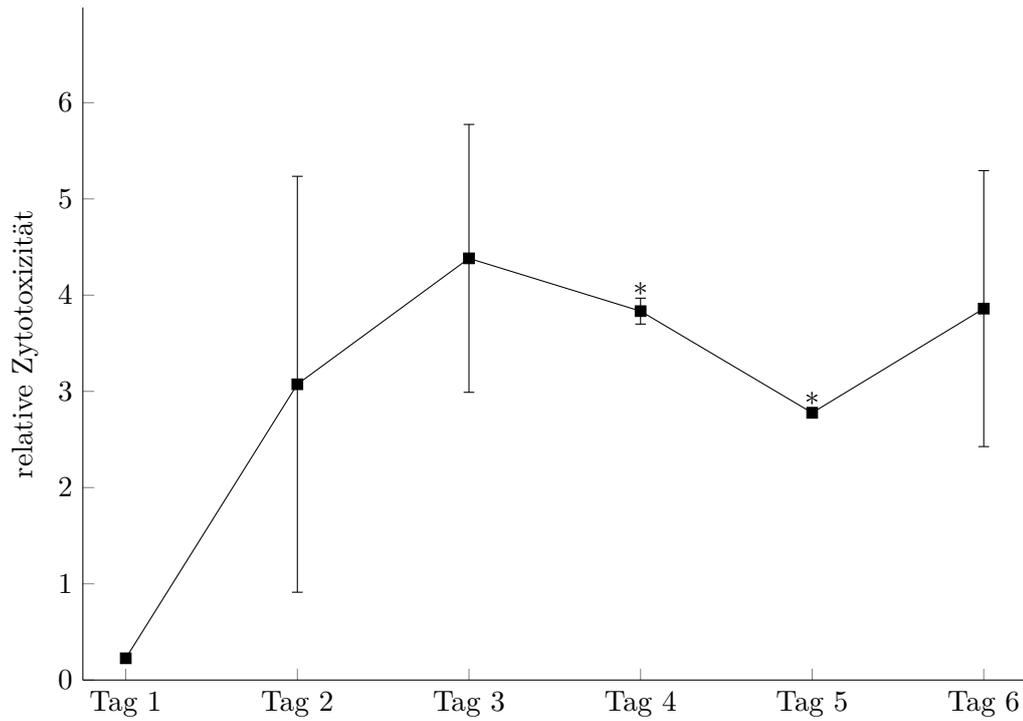


Abbildung 3.3: **Zytotoxizität von CBD im Zeitverlauf**

Darstellung des Anstieges der relativen Zytotoxizität von 10 μ M CBD im Zeitverlauf aus einem 24-Well-Versuch mit 15 000 Zellen U87 pro Well

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ mit ANOVA und Post-hoc-Test (hier Dunnett, gepaarte Analyse verglichen mit dem Nullwert), Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler des Mittelwertes, $n=3$

einer Zunahme um 670 % und damit den absoluten Maximalwert in diesem Vergleich. Für GBM10 und GBM29 konnte immer noch je ungefähr der 4-fache Wert der Kontrolle und damit eine Steigerung der Zytotoxizität um 400 % gemessen werden. Ausschließlich bei GBM13 (Abb. 3.4b) zeigten sich dagegen nur sehr gering erhöhte relative Zytotoxizitätswerte ohne jede statistische Signifikanz. Der Höchstwert einer 0,4-fachen Erhöhung über den Basalwert wurde bei der maximal verwendeten Konzentration von 10 μ M CBD erreicht. GBM13 war allerdings auch die einzige komplett nicht-adhärenzte der hier verwendeten Primärkulturen und zeigte im Vergleich zu den anderen auch ein wesentlich langsames Wachstums- und Reaktionsverhalten.

Zu beachten ist außerdem, dass die Ergebnisse mit Primärkulturen alle mit einer Inkubationszeit von maximal 24 h erzielt wurden. In Vorversuchen und Weiterführungen der Experimente über mehrere Tage hatte sich ein komplett eingetretener Zelltod bereits ab dem zweiten Tag Inkubation gezeigt. Somit waren dann keine Unterschiede in der Zytotoxizität mehr messbar, da wiederum das bereits diskutierte und in Anhang A auf Seite 62 dargestellte Problem der Messbarkeit von zytotoxischen Proteasen bei komplett toten Zellen auftrat.

3.3 Ergebnisse mit TRPV-Antagonisten

Zur genaueren Evaluation der Mechanismen der gerade gezeigten zytotoxischen Effekte von Cannabinoiden auf Glioblastomzellen wurden CBD und NADA in Kombination mit den verschiedenen TRPV-1- und TRPV-2-Antagonisten getestet, wie sie in Tabelle 2.3 auf Seite 34 aufgeführt sind. Neben dem Nachweis einer Abhängigkeit dieser Effekte von einer TRPV-Aktivierung – insbesondere des TRPV-1-Rezeptors – und damit der Möglichkeit einer potentiellen Imitation der endogenen Tumorsuppression durch Cannabinoide sollte auch eine Abgrenzung von rein lytischen Effekten auf die Zellmembran erfolgen.

In Abb. 3.5 auf Seite 46 ist die deutliche *Reduktion der relativen Zytotoxizität von 10 μ M NADA*, hier auf 1 – entsprechend 100 % – normalisiert, nach Zugabe verschiedener Antagonisten zu sehen. Deutliche Effekte zeigten sich bei Zugabe des *spezifischen TRPV-2-Antagonisten Tranilast*, mit Abschwächung auf ungefähr ein Viertel des Ausgangswertes, und ebenfalls bei Zugabe des *unspezifischen Rezeptorantagonisten Ruthenium Red*, mit Verminderung auf ca. 36 %. Eine Abschwächung der relativen Zytotoxizität von NADA auf je ca. 60 % war auch nach Zugabe des eher *unspezifischen TRPV-1-Antagonisten Capsazepine (=CPZ)* und des *hochspezifischen TRPV-1-Antagonisten SB366791* messbar. Nach Zugabe des ebenfalls *hochspezifischen*

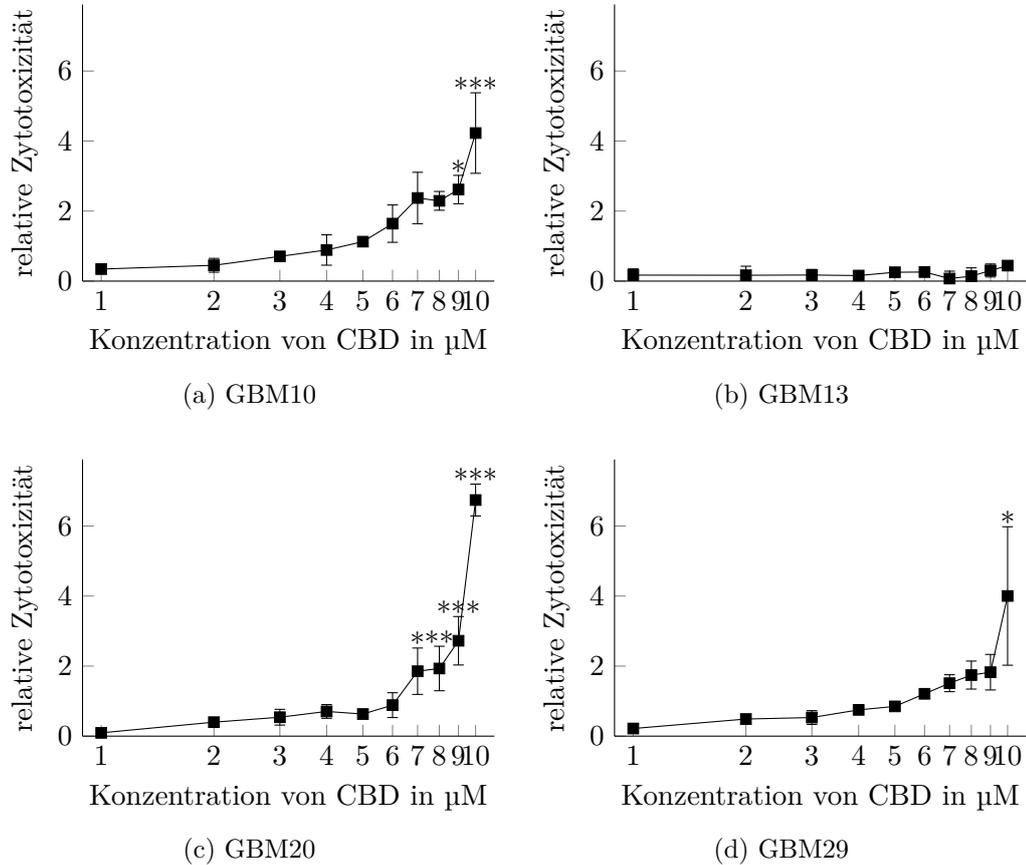


Abbildung 3.4: **CBD in Primärkulturen – Dosis-Wirkungskurven**

Semilogarithmische Darstellung der zytotoxischen Effekte von CBD in den vier verwendeten Primärkulturen nach 24 h Inkubationszeit bei je 3 000 Zellen pro Well (96-Well-Platte) mit signifikantem Anstieg bei GBM10, GBM20 und GBM 29 und fehlendem Effekt bei GBM13 * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ mit ANOVA und Post-hoc-Test (hier Dunnett, bezogen jeweils auf die unbehandelte Kontrolle), Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler des Mittelwertes, $n=2$ für (a), (b) und (d), $n=4$ für (c)

TRPV-1-Antagonisten 5-Iodoresiniferatoxin (=5-IRTX) zeigte sich kein relevanter Effekt. Statistische Signifikanz konnte allerdings nicht nachgewiesen werden. Da die Auswirkungen von NADA bereits ausführlich beschrieben und nicht explizit Inhalt dieser Arbeit sind, wurde hier auf weitere Wiederholungen verzichtet. Insgesamt kann mit den vorliegenden Ergebnissen trotzdem ein funktionierendes Messsystem zur entsprechenden Testung weiterer Cannabinoide angenommen werden.

In Abb. 3.6 auf Seite 47 ist eine deutliche, aber nicht-signifikante *Abschwächung der relativen Zytotoxizität von 10 μ M CBD* auf ca. 36 % des Vergleichswerts durch Zugabe des *spezifischen TRPV-2-Antagonisten Tranilast* in einer Konzentration von 100 μ M zu sehen. Für alle anderen in dieser Arbeit verwendeten Antagonisten konnte in diesem Modell keine Verminderung der relativen Zytotoxizität von CBD erreicht werden. Exemplarisch ist hier der nahezu *gleichbleibende Wert* nach Zugabe von 1 μ M des *hochspezifischen TRPV-1-Antagonisten SB366791* gezeigt.

Bei Testung in Primärkulturen (Abb. 3.7 auf Seite 48), hier mit den bereits als besonders empfindlich identifizierten GBM20-Zellen, konnte eine *hochsignifikante Verminderung der relativen Zytotoxizität von CBD* auf ein Niveau von ungefähr 40 % des Ausgangswerts durch Einsatz des *unspezifischen Rezeptorantagonisten Ruthenium Red* erreicht werden. Durch einen spezifischen TRPV-2-Antagonismus (Tranilast) ließ sich in Primärkulturen im Gegensatz zum vorherigen Versuch mit der U87-Zelllinie keine nennenswerte Abschwächung der relativen Zytotoxizität erreicht werden. Die getesteten TRPV-1-Antagonisten erbrachten in Primärkulturen ebenfalls keine Verminderung der relativen Zytotoxizität, exemplarisch ist erneut der nahezu gleichbleibende Wert nach Zugabe von SB366791 gezeigt.

Für die Einordnung der hier auftretenden Unterschiede zwischen Zelllinien und Primärkulturen sind erneut die stark abweichenden Inkubationszeiten von 24 bzw. 96 h zu beachten, die zu diesen Ergebnissen führten. Wie bereits in Abschnitt 3.2 auf Seite 41 diskutiert, sind maximale Zytotoxizitätswerte für CBD in Primärkulturen nach spätestens 24 h Inkubation messbar, im U87-Zelllinien-Modell dagegen beginnen die zytotoxischen Effekte erst am zweiten Tag nach Zugabe und erreichen ihr Maximum nach 72–96 h Inkubation (vgl. Abb. 3.3 auf Seite 42).

Um diese zeitlichen Unterschiede genauer erfassen und die mögliche Beteiligung mehrerer Rezeptoren untersuchen zu können, wurde im Zeitverlauf in einem 24-Well-Versuch im U87-Modell eine Kombination von TRPV-1- und TRPV-2-Antagonisten durchgeführt. In Abb. 3.8 auf Seite 50 ist die bereits bekannte fehlende Abschwächung der relativen Zytotoxizität von CBD durch SB366791 im gesamten Versuchszeitraum zu sehen. Ebenfalls konnte die bereits bekannte Verminderung der Zytotoxizität von

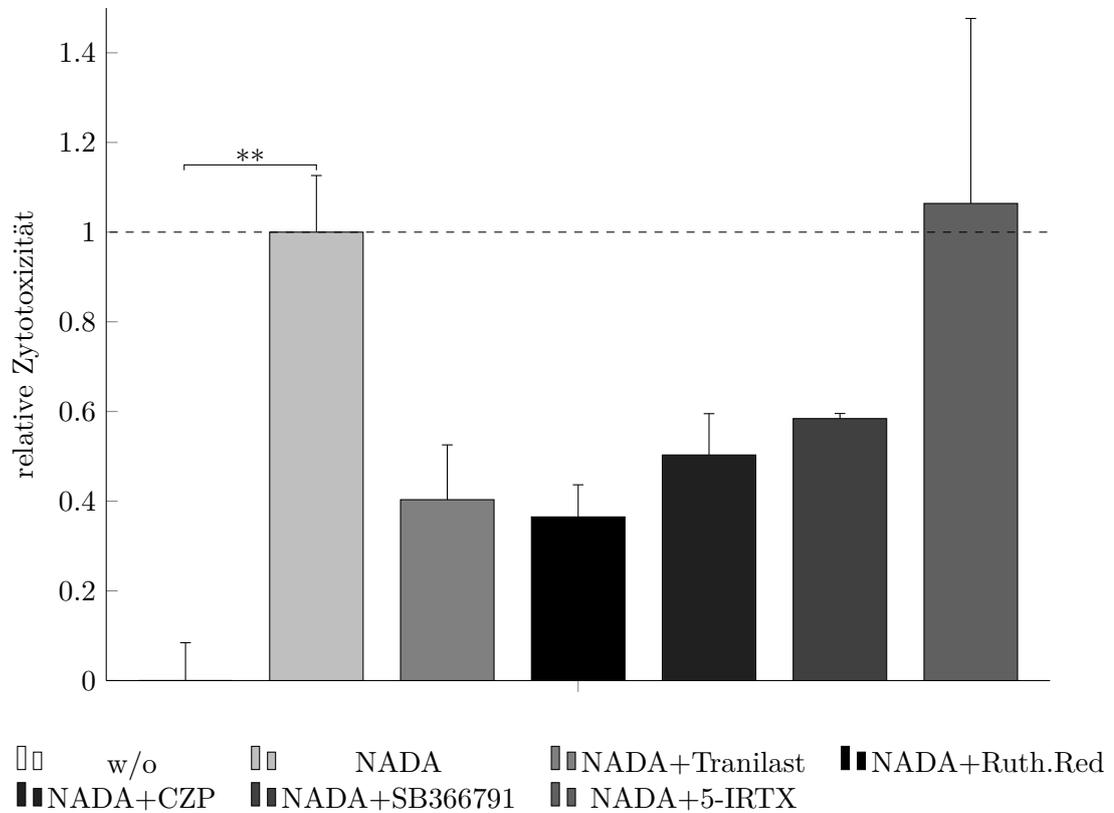


Abbildung 3.5: **Reduktion der relativen Zytotoxizität von NADA durch TRPV-Antagonisten**

Nach 48 h Inkubationszeit mit 10 μ M NADA und 24 h Vorbehandlung mit 100 μ M Tranilast, 1 μ M Ruthenium Red, 1 μ M CZP, 1 μ M SB366791 oder 10 nM 5-IRTX in einer 96-Well-Platte mit 3 000 Zellen U87 pro Well zeigt sich – mit Ausnahme von 5-IRTX – durchgehend ein Abfall der gegenüber der unbehandelten Kontrolle hochsignifikant erhöhten Zytotoxizität von NADA

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ mit ANOVA und Post-hoc-Test (hier Dunnett), Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler des Mittelwertes, $n=3$

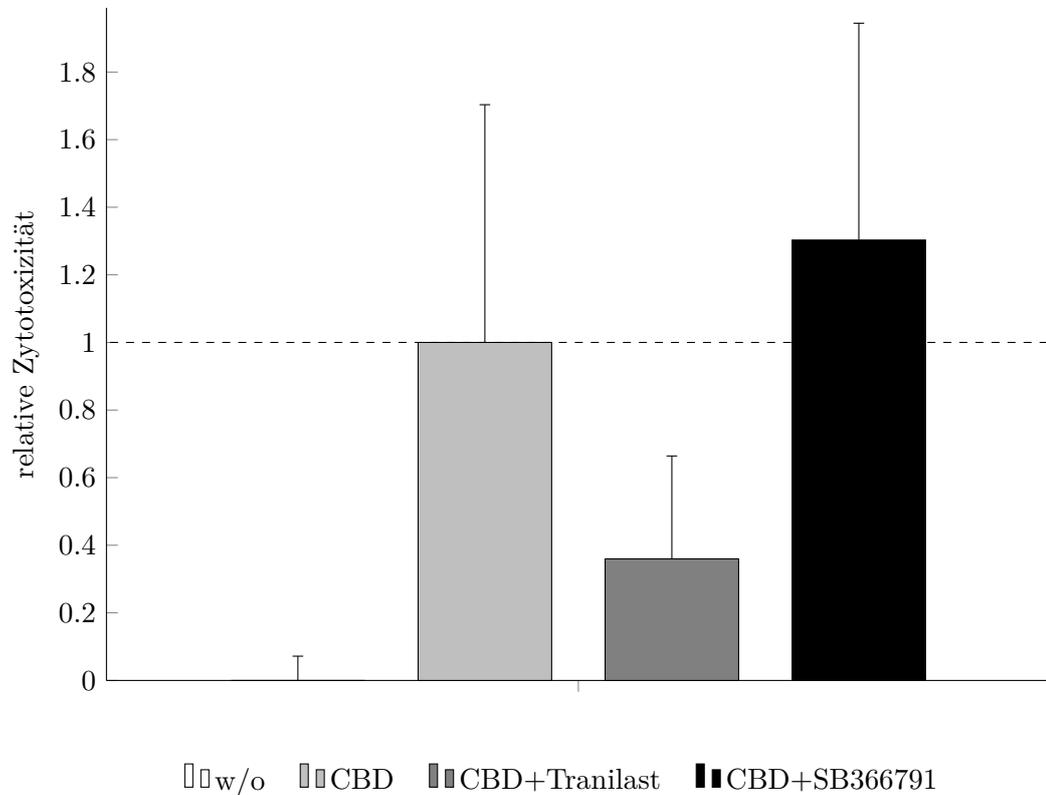


Abbildung 3.6: **Abschwächung der relativen Zytotoxizität von CBD durch TRPV-2-Antagonisten**

Abfall der CBD-vermittelten Zytotoxizität durch TRPV-2-Antagonisten und kein Effekt durch den TRPV-1-Antagonisten nach 96 h Inkubationszeit mit 10 μM CBD und 24 h Vorbehandlung mit 100 μM Tranilast, bzw. 1 μM SB366791 in einer 96-Well-Platte mit 3000 Zellen U87 pro Well

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ mit ANOVA und Post-hoc-Test (hier Dunnett), Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler des Mittelwertes, $n=3$

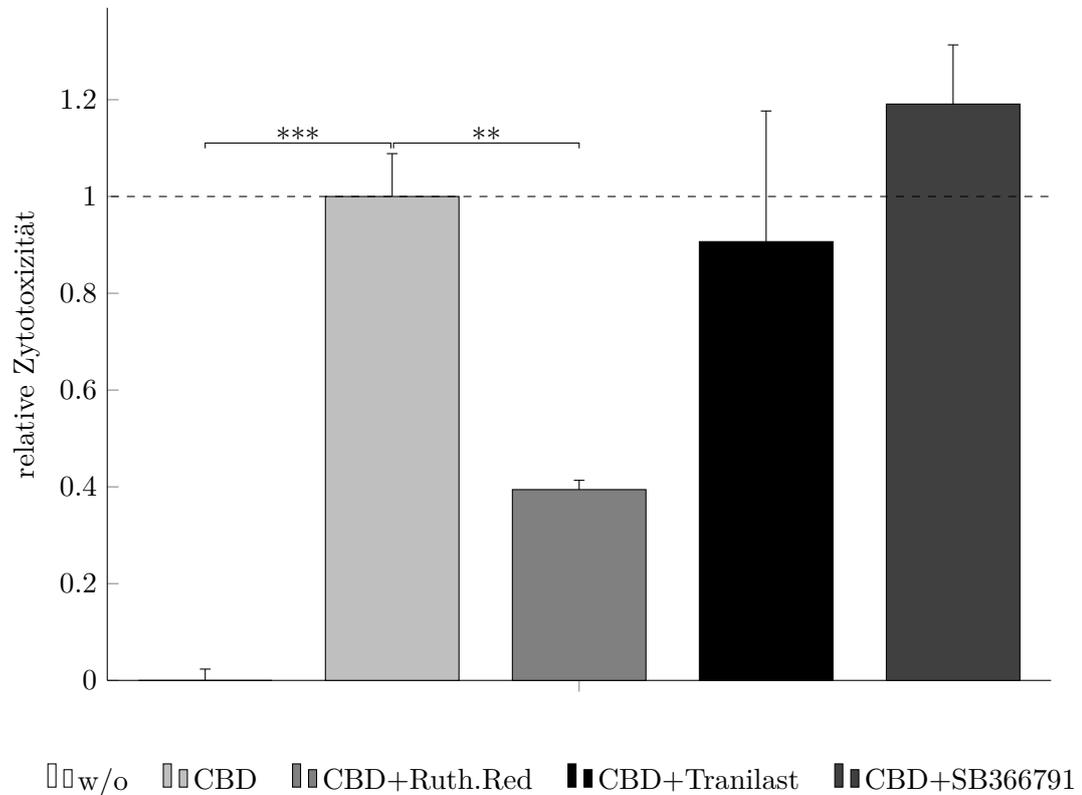


Abbildung 3.7: **Verminderung der relativen Zytotoxizität von CBD durch Ruthenium Red in Primärkulturen**

Nach 24 h Inkubationszeit mit 10 μM CBD und 24 h Vorbehandlung mit 1 μM Ruthenium Red, 100 μM Tranilast oder 1 μM SB366791 in einer 96-Well-Platte mit 3000 Zellen GBM20 pro Well lässt sich durch Ruthenium Red ein hochsignifikanter Abfall der gegenüber der unbehandelten Kontrolle ebenfalls hochsignifikant erhöhten Zytotoxizität von CBD erreichen, für die spezifischen TRPV-1- und TRPV-2-Antagonisten lässt sich kein Effekt nachweisen

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ mit ANOVA und Post-hoc-Test (hier Dunnett), Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler des Mittelwertes, $n=5$

CBD unter Einwirkung von Tranilast auf Werte zwischen 25 % und 50 % über alle drei Zeitpunkte reproduziert werden. Es zeigt sich allerdings über den gesamten Untersuchungszeitraum zusätzlich bei Kombination der beiden spezifischen Antagonisten eine nochmalige deutliche Reduzierung der gemessenen relativen Zytotoxizität von CBD. Am deutlichsten tritt dieser Effekt an Tag 5 des Beobachtungszeitraums auf. Hier vermindert sich die relative Zytotoxizität von CBD von ca. 0,34 mit Tranilast alleine – entsprechend ungefähr 34 % – auf nur noch ca. 0,16 – entsprechend 16 % – durch die *Kombination von Tranilast und SB366791* und wird damit *nochmals um 50 % reduziert*. Statistisch signifikant waren allerdings nur die Unterschiede zwischen der Kombination aus CBD, Tranilast und SB366791 im Vergleich zu CBD und SB366791 bzw. CBD alleine. Somit ist Tranilast ein Antagonist der zytotoxischen Wirkung von CBD, eine TRPV-2 vermittelte (Teil-)Komponente somit gesichert. Eine Beteiligung des TRPV-1-Rezeptors kann stark vermutet, aber nicht als bewiesen angenommen werden.

3.4 Kombination der zytotoxischen Wirkung von CBD mit einer Aktivierung des BMP-7-Signalweges

Wie in Abschnitt 1.2.3 auf Seite 13 beschrieben, sind an der endogenen Glioblastom-Tumorsuppression durch neuronale Vorläuferzellen neben Vanilloiden noch weitere Substanzen, wie z. B. *bone morphogenetic protein-7 (=BMP-7)*, beteiligt. Es werden jetzt Ergebnisse einer *IN-VITRO-Kombination von CBD und rekombinantem BMP-7* vorgestellt. Im weiteren Verlauf der Experimente erfolgte die Aktivierung des BMP-7-Signalweges dann mit dem *Flavonoid Isoliquiritigenin*, einem pharmakologisch einsetzbaren Aktivator des BMP-Signalweges (s. Abschnitt 1.4 auf Seite 25).

In Abb. 3.9 auf Seite 51 wird im Zeitverlauf aus einem 24-Well-Versuch mit der Zelllinie U87 eine deutliche Zunahme der relativen Zytotoxizität bei einer *Kombination von CBD mit rhBMP-7* gezeigt, im Vergleich zu den auf 1 normalisierten Werten für CBD alleine. Unter zusätzlicher Einwirkung von BMP-7, das *alleine keinen messbaren zytotoxischen Effekt* hat, steigt die relative Zytotoxizität von CBD über den gesamten Messverlauf auf jeweils mindestens das 1,5-fache und damit um 50 % an.

In Abb. 3.10 auf Seite 53 zeigt sich im Primärkulturmodell GBM20 ebenfalls eine deutliche Steigerung auf *mehr als das Doppelte* der relativen Zytotoxizität von CBD bei einer *Kombination mit BMP-7*. BMP-7 induziert hier selbst eine geringe, aber nicht signifikante Zytotoxizität, die bei einem Wert von ca. 11 % der relativen Zytotoxizität von CBD allerdings wesentlich kleiner ist als die absolute Steigerung

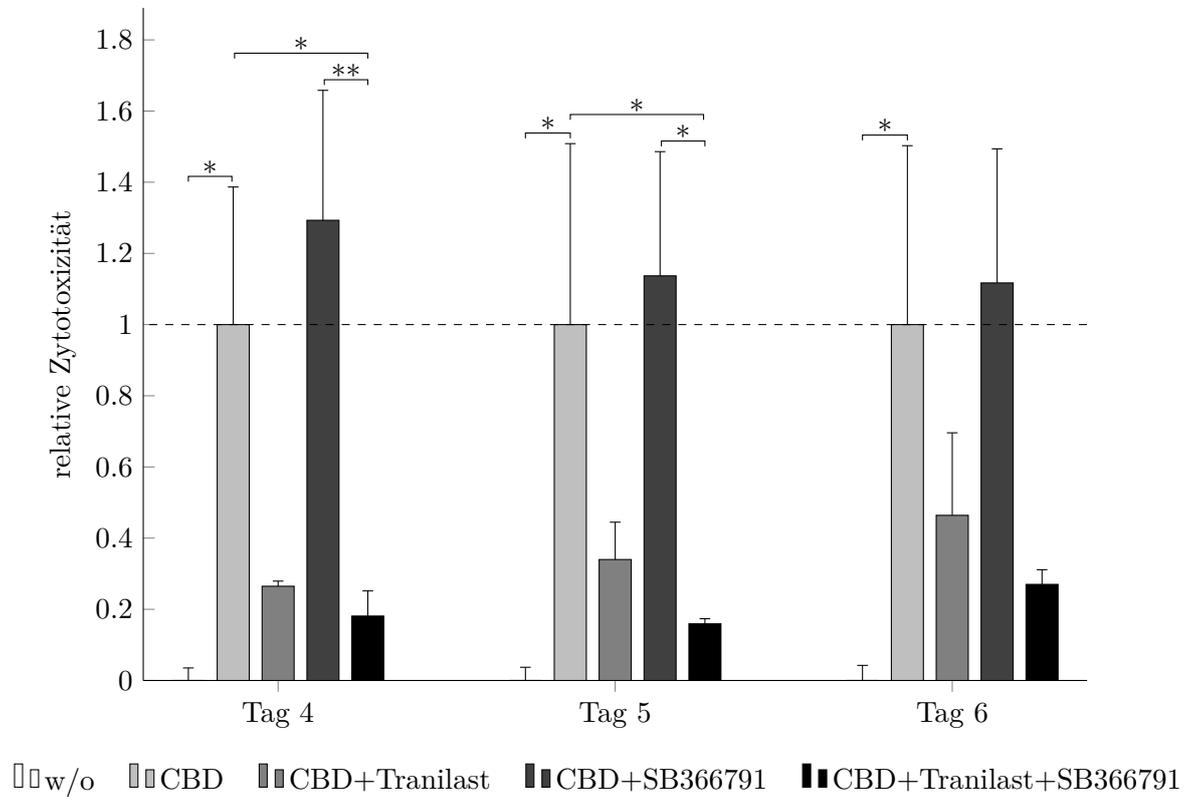


Abbildung 3.8: **Reduktion der Zytotoxizität von CBD durch Kombination von TRPV-1- und TRPV-2-Antagonisten im Zeitverlauf**

Die im Zeitverlauf (24-Well-Format mit 15 000 Zellen U87 pro Well) durchgehend signifikant-erhöhte Zytotoxizität von 10 μ M CBD wird durch eine Kombination aus 100 μ M Tranilast und 1 μ M SB366791 (24 h Vorbehandlung) signifikant erniedrigt.

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ mit ANOVA und Post-hoc-Test (hier Tukey), Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler des Mittelwertes, $n=3$

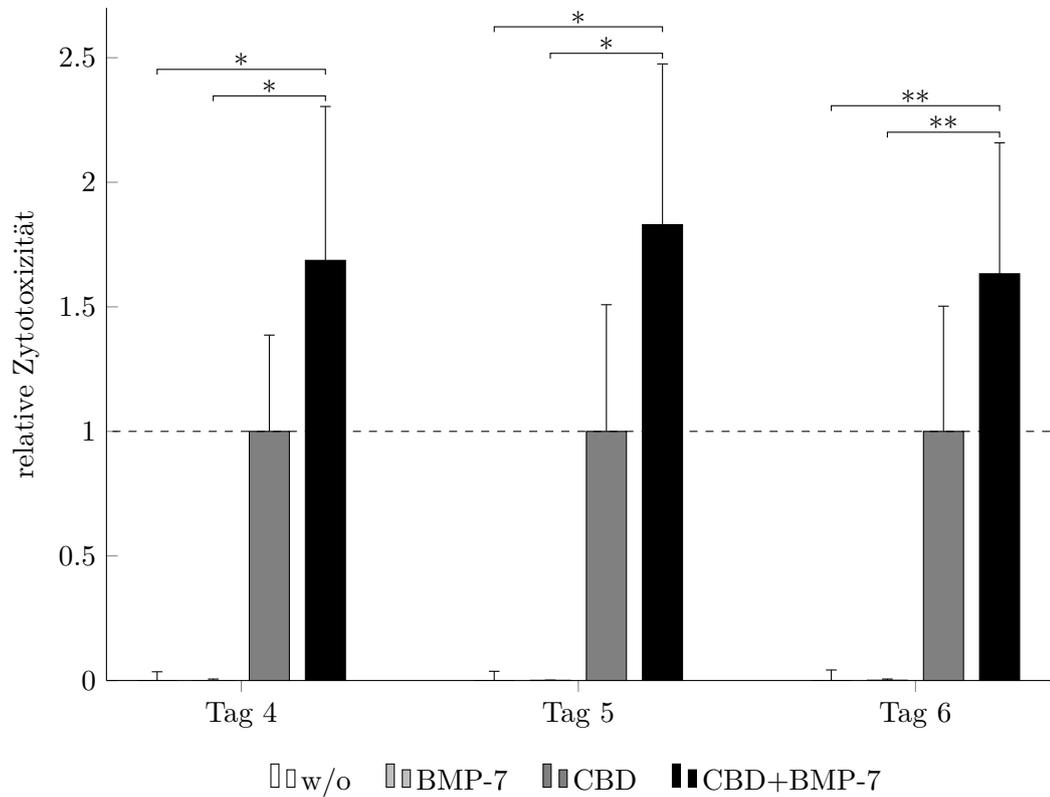


Abbildung 3.9: **Kombination von CBD mit BMP-7**

Eine Kombination von 10 μ M CBD mit 10 ng/ml BMP-7 führt im Zeitverlauf (24-Well-Format mit 15 000 Zellen U87 pro Well) konstant zu einer Erhöhung der Zytotoxizität.

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ mit ANOVA und Post-hoc-Test (hier Tukey), Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler des Mittelwertes, $n=3$

der Zytotoxizität von CBD durch die Kombination mit BMP-7. Abweichend von allen anderen Versuchen wurde CBD hier in einer Konzentration von 5 μM verwendet, welche im GBM20-Modell in der Dosis-Wirkungskurve (Abb. 3.4c auf Seite 44) bereits ein deutliches Ansprechen gezeigt hatte, aber noch weit von dem Maximalwert für 10 μM CBD entfernt war. Dadurch bleibt hier der notwendige Raum nach oben für den Nachweis einer Steigerung der relativen Zytotoxizität durch die Kombination.

In Abb. 3.11 auf Seite 54 werden wieder im Zeitverlauf aus einem 24-Well-Versuch die Ergebnisse einer *Kombination von 10 μM CBD mit 5 μM Isoliquiritigenin* gezeigt. Auch hier wird durch die Aktivierung des BMP-7-Signalweges eine deutliche Steigerung der von CBD induzierten Zytotoxizität erreicht. An Tag 4 und 5 des Beobachtungszeitraumes ist der Anstieg der relativen Zytotoxizität durch die Kombination um ca. den Faktor 2,5 statistisch hochsignifikant im Vergleich zu CBD bzw. Isoliquiritigenin alleine. Auch an Tag 5 und 6 fällt der Zuwachs mit einem Faktor von 2,4 bzw. 3,0 jeweils sehr deutlich aus und ist außerdem wesentlich höher als die nur geringfügig messbare Zytotoxizität von 5 μM Isoliquiritigenin alleine. Wie im theoretischen Teil der Arbeit bereits ausgeführt, liegt die Konzentration an *Isoliquiritigenin in Monotherapie* bei Werten *größer als 25 μM* zum Erreichen messbarer zytoreduktiver Effekte. Dies konnte in einfachen Kontrollen jeweils erreicht und bestätigt werden, für wegweisende Kombinationseffekte genügte hier allerdings wie schon erwähnt eine deutlich geringere Konzentration von 5 μM .

3.5 Kombination von Cannabinoiden mit TNF- α

In Abb. 3.12 auf Seite 55 ist ein deutlicher Anstieg der relativen Zytotoxizität von CBD nach einer 24-stündigen *Vorbehandlung mit 10 ng/ml TNF- α* zu sehen. Erwähnenswert ist, dass der Anstieg bereits im Zeitraum zwischen Tag 1 und 3 zu messen ist und damit wesentlich früher, als dies bei alleinigem Einsatz von CBD oder in Kombination mit Aktivatoren des BMP-7-Signalweges der Fall ist. So ist die relative Zytotoxizität der Kombination von CBD und TNF- α am ersten Tag statistisch signifikant um ca. das 5,4-fache erhöht gegenüber dem Effekt von CBD allein. Zu diesem Zeitpunkt kann für CBD alleine noch kaum ein relevanter zytotoxischer Effekt gegenüber der Kontrolle mit unbehandelten Zellen gemessen werden (vgl. Abb. 3.3 auf Seite 42). Auch an Tag 2 bzw. 3 des Messzeitraums ist die relative Zytotoxizität weiterhin deutlich gesteigert, um den Faktor 3,3 bzw. 4,1.

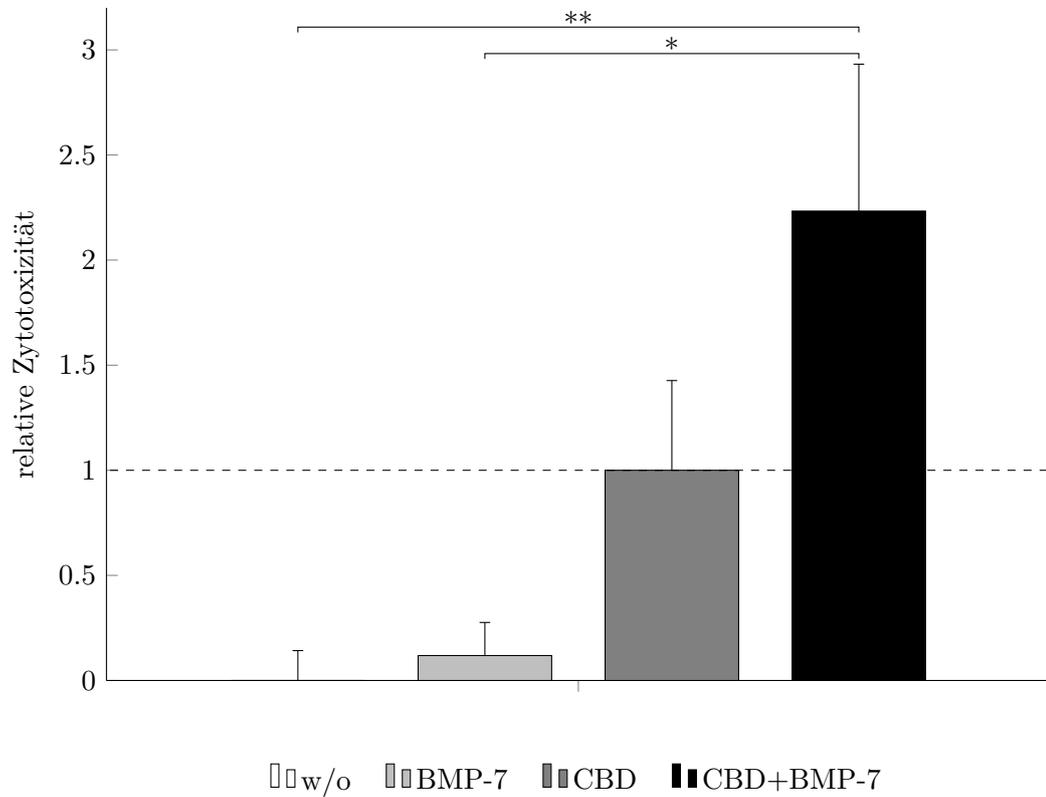


Abbildung 3.10: **Kombination von CBD mit BMP-7 in Primärkulturen**
 Nach 24 h Inkubationszeit in einer 96-Well-Platte mit 3 000 Zellen GBM20 pro Well erhöht sich die relative Zytotoxizität von 5 μ M CBD auch in Primärkulturen durch Kombination mit 10 ng/ml BMP-7 nach 24 h Inkubationszeit in einer 96-Well-Platte mit 3 000 Zellen GBM20 pro Well
 * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ mit ANOVA und Post-hoc-Test (hier Tukey), Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler des Mittelwertes, $n=3$

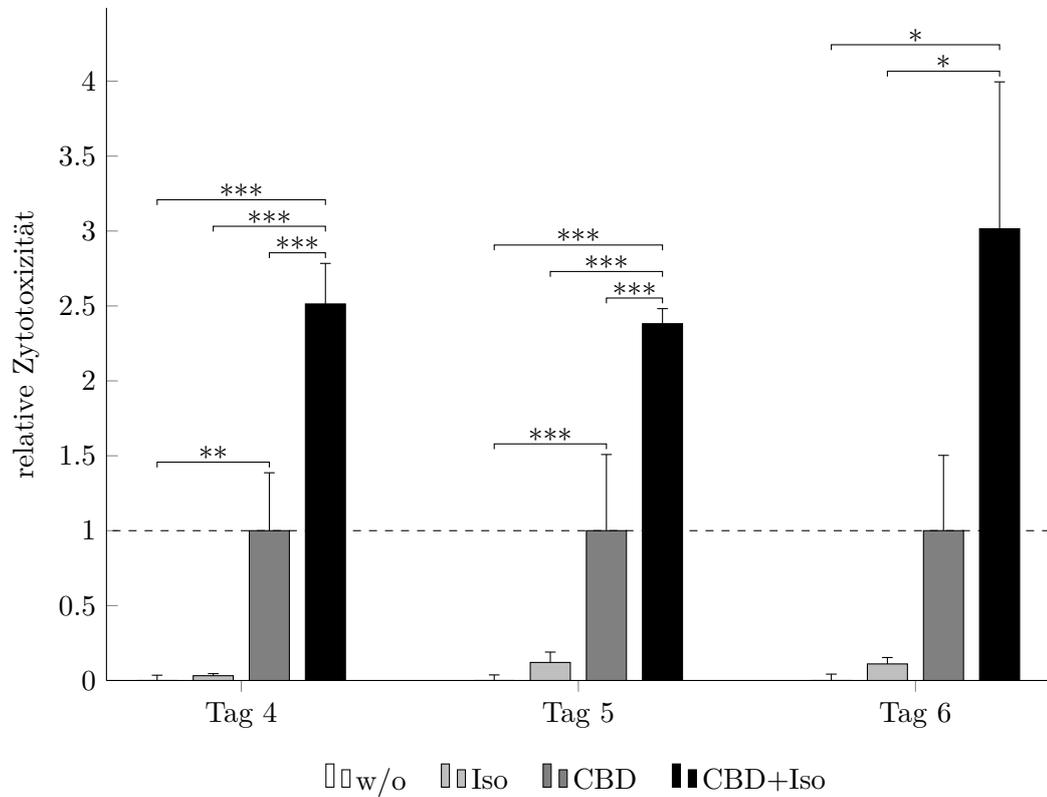


Abbildung 3.11: **Verstärkung der Zytotoxizität von CBD durch Kombination mit Isoliquiritigenin**

Die Zytotoxizität von 10 μM CBD wird durch Kombination mit 5 μM Isoliquiritigenin (Iso) hochsignifikant gegenüber allen Kontrollen nach 4 bzw. 5 Tagen im Zeitverlauf (24-Well-Format mit 15 000 Zellen U87 pro Well) erhöht.

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ mit ANOVA und Post-hoc-Test (hier Tukey), Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler des Mittelwertes, $n=3$

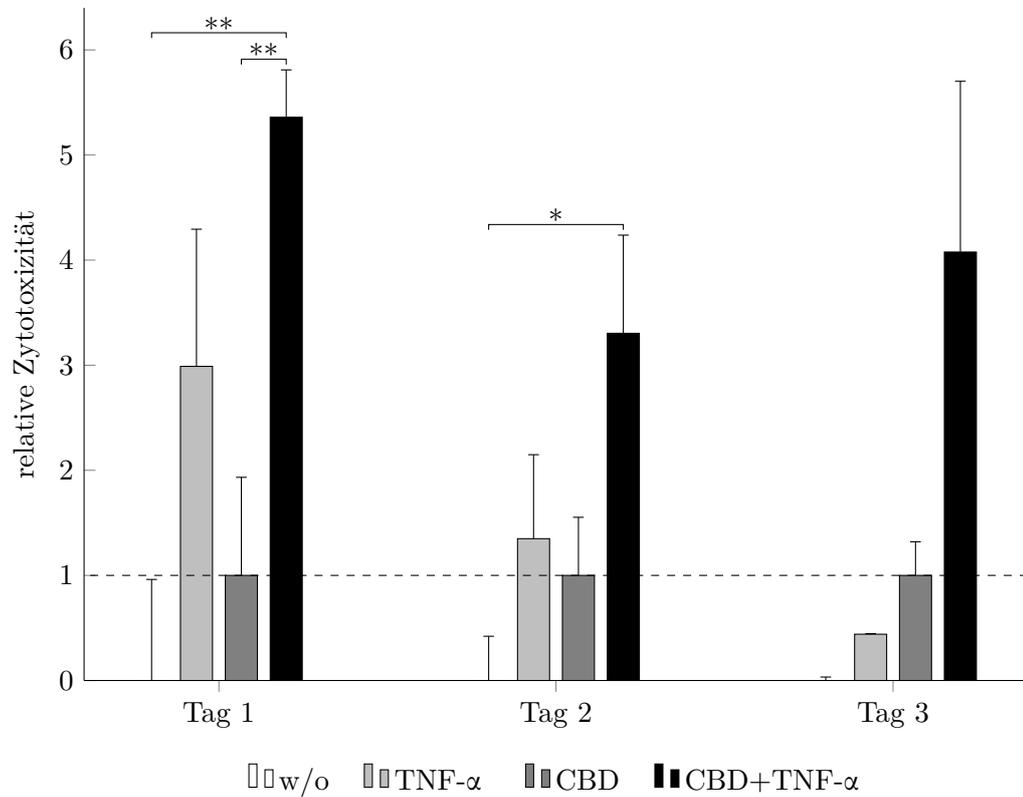


Abbildung 3.12: **Steigerung und Beschleunigung der zytotoxischen Effekte von CBD durch TNF-α**

Durch 10 ng/ml TNF-α werden die zytotoxischen Effekte von 10 μM CBD signifikant gesteigert und treten bereits ab Tag 1 (Zeitverlauf im 24-Well-Format mit 15 000 Zellen U87 pro Well) auf.

*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 mit ANOVA und Post-hoc-Test (hier Tukey), Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler des Mittelwertes, n=3

Kapitel 4

Diskussion der Ergebnisse

In diesem Abschnitt der Arbeit sollen jetzt die gerade vorgestellten Ergebnisse in den theoretischen Kontext eingeordnet werden, sowie weiterhin Perspektiven und noch notwendige Schritte erörtert werden, um eine Pharmakotherapie maligner Gliome mit Cannabinoiden zu etablieren.

4.1 Interpretation der Ergebnisse des Cannabinoid-Screenings

Wie bereits im entsprechenden Abschnitt des Ergebnisteils diskutiert, wurde nach Abschluss des ersten Screenings und Erstellung von Dosis-Wirkungskurven für die vier wirksamsten Cannabinoide *Cannabidiol* (=CBD) aus den zehn getesteten Cannabinoiden für weitere Experimente und Untersuchungen ausgewählt. Dies erfolgte hauptsächlich aufgrund der stärksten zytotoxischen und Zellzahl reduzierenden Effekte, die zudem bereits bei den im Vergleich niedrigsten Konzentrationen auftraten. Außerdem zeigte sich der zytotoxische Effekt von CBD im entsprechenden Versuchsaufbau stets stabil – was für die weiterführenden Experimente von großer Bedeutung war – und konnte auch in den meisten Primärkulturen reproduziert werden. Es trat hier zudem der positive Effekt auf, dass in den meisten getesteten Primärkulturen im Vergleich zu Zelllinien eine um ungefähr 50 % geringere Konzentration für nennenswerte zytotoxische Effekte ausreichend war. Aufgrund der größeren zellbiologischen Ähnlichkeit von Primärkulturen zu IN VIVO Tumorgewebe kann deshalb auch auf positive Testergebnisse in einem noch durchzuführenden Tierexperiment gehofft werden.

CBD ist außerdem bereits pharmakologisch etabliert und im klinischen Einsatz. Somit ist eine sichere Verträglichkeit und das weitgehende Fehlen gravierender Nebenwirkungen im Menschen bereits garantiert, was als weiteres Argument für eine

intensivere Untersuchung gelten kann. Zudem ist für CBD auch eine fehlende Wirkung an den Cannabinoid-Rezeptoren beschrieben, so dass eine psychotrope Wirkung ausgeschlossen werden kann. (Scuderi u. a. 2009) Es konnten auch bereits weitere tumorsuppressive Effekte auf Glioblastomzellen *IN VITRO* nachgewiesen werden, u. a. eine dosisabhängige deutliche Verminderung der Expression verschiedener Proteine, die das Tumorwachstum begünstigen. (Solinas u. a. 2013) Außerdem wurde ein positiver Effekt einer Kombinationstherapie von Temozolomid mit Cannabinoiden – hier THC und auch CBD – gezeigt, im speziellen auch auf Temozolomid-resistente Zellen. (Torres u. a. 2011)

Zusammenfassend kann somit festgestellt werden, dass Cannabinoide und speziell Cannabidiol (=CBD) einen hoffnungsvollen neuen therapeutischen Ansatz für Patienten mit Glioblastom darstellen. Allerdings sind die *IN VITRO* benötigten Konzentrationen für messbare Effekte noch um ca. den Faktor 10 höher als die pharmakotherapeutisch *IN VIVO* erreichbaren Konzentrationen. Berichtet wurden bisher z. B. trotz konstanter, maximal verträglicher Zufuhr interindividuell stark schwankende Konzentrationen meist zwischen 100 ng/ml (=0,32µM) und 500 ng/ml (=1,59µM), in Ausnahme- bzw. Einzelfällen bis zu 1200 ng/ml (3,82µM), evaluiert beim Einsatz als Antiepileptikum. (Szaflarski u. a. 2019; Wheless u. a. 2019) Hier werden weitere Experimente Aufschluss geben müssen, ob ausreichende Wirkkonzentrationen *IN VIVO* erreichbar sind. Hoffnung macht dafür die oben bereits erwähnte größere Empfindlichkeit von Primärkulturen im Vergleich zu Zelllinien.

4.2 Rezeptoren der tumorsuppressiven Wirkung von CBD

Die deutliche Reduzierung der relativen Zytotoxizität nach Zugabe des hochspezifischen TRPV-2-Antagonisten Trnilast zeigt, dass TRPV-2 an der Induktion von Zytotoxizität in Glioblastomzellen durch CBD beteiligt ist. Auch der vergleichbare Effekt in Primärkulturen nach Zugabe des unspezifischen Rezeptorantagonisten Ruthenium Red – für den ebenfalls ein relevanter TRPV-2-Antagonismus bekannt ist – verdeutlicht dies in Übereinstimmung mit den im theoretischen Teil der Arbeit aufgeführten, bereits publizierten Ergebnissen zusätzlich. (Nabissi u. a. 2013)

Ebenfalls kann aus den Ergebnissen für Ruthenium Red, welche eine höchstsignifikante Verminderung der zytotoxischen Effekte von CBD durch diesen unspezifischen Rezeptor-Antagonisten (u. a. TRPV-Rezeptor) zeigen, auf eine *Beteiligung mehrerer verschiedener Rezeptoren* geschlossen werden. Eine besondere Relevanz ergibt sich, da diese Ergebnisse mit Primärkulturen erzielt wurden und damit eine wesentlich

größere Nähe zur IN VIVO Tumorbiologie angenommen werden kann. Bestätigt wurde die Vermutung einer Beteiligung mehrerer Rezeptoren durch die Ergebnisse der Kombination hochspezifischer TRPV-1- und TRPV-2-Antagonisten, die eine nochmalige Reduktion der zytotoxischen Effekte von CBD bewirkte. Somit kann angenommen werden, dass in der verwendeten U87-Zelllinie neben einer dominierenden TRPV-2 vermittelten Zytotoxizität vermutlich auch TRPV-1 vermittelte Effekte eine Rolle spielen.

Die signifikante Verstärkung der relativen Zytotoxizität von CBD bei zusätzlicher Aktivierung des BMP-7-Signalweges gibt Anlass zur Annahme, dass hier eine kombinierte Rezeptoraktivierung ähnlich zur endogenen Tumorsuppression durch neuronale Vorläuferzellen als Grundlage der gemessenen zytotoxischen Effekte vorliegt. Somit kann auch aus diesen Experimenten eine Beteiligung des TRPV-1-Rezeptors an den gemessenen zytotoxischen Effekten stark vermutet werden. Ebenso kann der deutliche Anstieg der Zytotoxizität nach Zugabe von $\text{TNF-}\alpha$, wofür bereits im theoretischen Teil u. a. eine Sensitivierung von TRPV-1-Rezeptoren diskutiert wurde, als Indiz für eine TRPV-1-vermittelte Komponente aufgefasst werden.

Mittlerweile konnte von der Arbeitsgruppe der Abteilung für neurochirurgische Forschung mit einem auf diese Arbeit aufbauenden TRPV-1-knockout-Versuch IN VITRO der Zusammenhang einer TRPV-1-Aktivierung mit der CBD-vermittelten Zytotoxizität auf Glioblastomzellen deutlich bestätigt und bewiesen werden. (Dasari u. a. 2015)

Abschließend kann somit festgestellt werden, dass die IN VITRO zytotoxischen Effekte von CBD wohl am ehesten durch eine *Beteiligung von TRPV-1- und TRPV-2-Rezeptor-Aktivierung* bewirkt werden. Zudem ist noch eine Beteiligung weiterer Rezeptoren zu diskutieren, für eine entsprechende Aufklärung sind noch weitere umfangreiche Arbeiten erforderlich.

4.3 Cannabinoide und Flavonoide – eine vielversprechende Kombination?

Wie im Ergebnisteil auf- und ausgeführt, kann durch eine Kombination von Cannabinoiden (hier CBD) mit einer Aktivierung des BMP-7-Signalweges eine deutliche Steigerung des zytotoxischen Effekts erzielt werden. Im Interesse dieser Arbeit lag es, den Mechanismus der endogenen Tumorsuppression durch neuronale Vorläuferzellen IN VITRO mit Cannabinoiden statt Endovanilloiden nachzuvollziehen. Nachdem der gewünschte Effekt durch Einsatz von *rhBMP-7* erreicht werden konnte, zeigte sich

ein sogar noch etwas stärkerer Effekt auch für die pharmakologische Aktivierung des BMP-7-Signalwegs durch Flavonoide (hier Isoliquiritigenin) in vergleichsweise geringer Konzentration. Wie bereits erwähnt zeigen andere Arbeiten auch vielversprechende tumorsuppressive Effekte für Flavonoide alleine, allerdings in höherer Konzentration. (Gargiulo u. a. 2013)

Somit könnte eine Kombination von Cannabinoiden und Flavonoiden in der Zukunft eine höchst effektive Therapieoption für Patienten mit Glioblastomen darstellen, da einerseits die gegenseitige Wirkverstärkung und Nachahmung eines erfolgreichen endogenen Mechanismus, andererseits aber auch die synergistischen Effekte einer bloßen Kombination zweier zytoreduktiver Substanzen genutzt werden könnten.

4.4 Mögliche Folgerungen aus der Wechselwirkung von Cannabinoiden und TNF- α

Die deutlich erhöhte relative Zytotoxizität von CBD bei Kombination mit TNF- α kann wohl am ehesten auf die in Abschnitt 1.5 auf Seite 26 beschriebene Phosphorylierung und damit Aktivierung des TRPV-1-Rezeptors durch TNF- α zurückgeführt werden. (Pareek u. a. 2007; Rozas u. a. 2016; Spicarova u. a. 2010) Einen deutlichen Hinweis auf eine vorliegende erhöhte Empfindlichkeit des TRPV-1-Rezeptors nach Einwirkung von TNF- α gibt ein einmalig orientierendes Experiment mit zusätzlich einem TRPV-1-Antagonisten, hier konnte eine teilweise Abschwächung der erhöhten relativen Zytotoxizität durch SB366791 gemessen werden. Dies kann als weiteres Indiz für eine TRPV-1-abhängige Komponente in der Vermittlung von Zytotoxizität durch CBD bzw. Cannabinoide im allgemeinen gewertet werden.

Welche Rolle z. B. der molekularbiologische Subtyp, der zumindest *IN VITRO* ebenfalls durch TNF- α beeinflusst wird (Bhat u. a. 2013), in der Empfindlichkeit gegenüber Cannabinoiden spielt, kann wohl nur in einem ausführlichen *IN VIVO* Tierversuch evaluiert werden, da er wie bereits erwähnt sich *IN VITRO* angleicht.

4.5 Ausblicke und Perspektiven

Im folgenden letzten Abschnitt der Arbeit sollen basierend auf den vorgestellten Ergebnissen abschließende Ausblicke und Perspektiven zum pharmakotherapeutischen Einsatz von Cannabinoiden aufgezeigt werden.

4.5.1 Weitere Schritte zur pharmakologischen Evaluierung von Cannabidiol als Therapeutikum für Glioblastome

In Zusammenschau mit den bereits erwähnten Ergebnissen für TRPV-1-knockout-Zellen (Dasari u. a. 2015) kann die *IN VITRO* TRPV-1-vermittelte tumorsuppressive Wirkung von CBD auf Glioblastomzellen endgültig bestätigt werden. In einem nächsten Schritt wäre die Durchführung eines Tierexperimentes zur erstmaligen *IN VIVO* Evaluierung notwendig. Auch hier würde sich eine Ergänzung um ein TRPV-1-knockout-Modell anbieten. Bei ebenfalls positiven Ergebnissen könnten anschließend die üblichen pharmakologischen Zulassungsstudien durchgeführt werden, wobei hier wiederum die bereits erfolgte pharmakologische Etablierung von Vorteil wäre. Von Anfang an wäre dabei eine Kombination mit Flavonoiden zu diskutieren, um die mutmaßlichen Synergieeffekte von Anfang an auszunutzen bzw. besser beschreiben zu können.

4.5.2 Cannabinoide als Therapeutika für Low-Grade-Gliome?

In Abschnitt 1.1 auf Seite 2 wurden bereits ausführlich die verschiedenen Arten von hirneigenen Tumoren und der Prozess einer sekundären Genese eines Glioblastoms aus einem niedriggradigen Gliom erläutert. Für diese sog. *Low-Grade-Gliome* existieren nur sehr eingeschränkte Therapieoptionen, insbesondere um bei den meist noch verhältnismäßig jungen Patienten eine sekundäre Malignisierung zu verhindern. Aufgrund der geringen Zellteilungsrate ist zudem die Empfindlichkeit gegen konventionelle Chemotherapeutika sehr eingeschränkt und eine Resektion in kurativer Absicht ebenfalls nicht immer möglich.

Um diesen Patienten langfristige Überlebensperspektiven zu geben, könnte eine Pharmakotherapie mit Cannabinoiden – eventuell in Kombination mit Flavonoiden – erfolgversprechend sein. Basierend auf der Hypothese eines Versagens der endogenen Tumorsuppression durch eine verminderte Anzahl neuronaler Vorläuferzellen bei zunehmendem Alter könnte eine pharmakologische Imitation hier neue Chancen bieten. Die bereits erwähnte gute Verträglichkeit und das weitgehende Fehlen relevanter Nebenwirkungen würde auch eine möglicherweise lebenslang erforderliche Langzeittherapie über viele Jahre bzw. Jahrzehnte erlauben.

Problematisch für eine entsprechende weitergehende Evaluierung ist, dass für Low-Grade-Gliome aufgrund ihrer geringen Zellproliferationsrate eine *IN VITRO* Zellkultur nicht oder nur sehr schwer (z. B. für IDH^{III} -Astrozytome) möglich ist. Die charakteristische Ausprägung einer *mutierten IDH* ($=\text{IDH}^{\text{mut}}$) geht zudem *IN VITRO* meist

Kapitel 4 Diskussion der Ergebnisse

verloren, so dass auch ein Vergleich des Ansprechens von primären und sekundären Glioblastomen sehr schwierig ist. (Piaskowski u. a. 2011) Ebenfalls würden aufgrund der langsamen Progredienz und der geringen Fallzahlen entsprechende klinische Studien sehr lange Beobachtungszeiten von wahrscheinlich mehreren Jahrzehnten voraussetzen.

Der hoffnungsvollste Weg zu einer zukünftigen derartigen Pharmakotherapie führt wahrscheinlich über eine erfolgreiche Evaluierung für Glioblastome (entsprechend WHO °IV) und anschließende *Erweiterung auf die Low-Grade-Gliome* (entsprechend WHO °II–III), wie es in der Vergangenheit z. B. bereits mit der heutigen Standardtherapie Temozolomid erfolgt ist.

Anhang A

Weiterentwicklung der Messmethode für Zytotoxizität

Wie in Abschnitt 2.3 auf Seite 35 beschrieben wurde der CytoTox-FluorTM Cytotoxicity Assay zu Beginn der Arbeit gemäß den Empfehlungen von Promega® verwendet. Dazu wurde zu den in den Wells befindlichen 100 µl Kulturmedium – ggfs. mit Zusätzen – je 100 µl fertiger Assay gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 1–3 Stunden wurde die fluoreszenzbasierte Messung durchgeführt und wie bereits beschrieben ausgewertet.

Häufig zeigten sich dabei Messergebnisse, die mit den optisch gesehenen und photographisch dokumentierten Eindrücken nicht übereinstimmten. Als besonders problematisch erwiesen sich dabei hohe gemessene Werte für die Kontrollwells mit unbehandelten Zellen, die als Referenzwerte für die relativen Zytotoxizitätswerte dienen sollten. Teilweise zeigten sich dann in der Auswertung nur sehr gering erhöhte relative Zytotoxizitätswerte für maximale Cannabinoid-Konzentrationen mit mikroskopisch deutlicher Zellschädigung, was bedeutet, dass die gemessene sog. *dead-cell-protease activity* in den behandelten Wells niedriger war, als in den unbehandelten. Zusammenfassen war festzustellen, dass die über die gesamte Kultur gemittelten Werte deutlich niedriger als erwartet waren, vermutlich da in CBD-behandelten Wells mittlerweile deutlich weniger Zellen vorhanden waren.

Bei der mikroskopischen Beobachtung der unbehandelten Zellen nach Zugabe des CytoTox-FluorTM Cytotoxicity Assay bis nach Abschluss der fluoreszenzbasierten Messung fiel eine zunehmende Schädigung der zuvor hochvitalen Zellen auf. Eine endgültige Erklärung für diese Beobachtung konnte nicht gefunden werden, zu beachten ist allerdings, dass das *Assaysubstrat bis-AAF-R110 (=bis-Alanyl-Alanyl-Phenylalanyl-Rhodamine 110) in DMSO gelöst* geliefert wird und zur Herstellung des fertigen Assays nur 1:1 000 verdünnt wird. Dies führt zu einer DMSO-Konzentration von 1:1 000 im fertigen Assay und damit bis zur Messung von mindestens 1:2 000

im Kulturmedium der Zellen. Zusammen mit dem bereits im Verlauf zugegebenen DMSO ergab sich eine Konzentration von deutlich oberhalb der kritischen Grenze von 1:4000, sodass dadurch bedingte lytische Effekte auf die Zellmembranen als Erklärung auf jeden Fall nicht ausgeschlossen werden konnten. (Niles u. a. 2007)

Da – zumindest zu Beginn der Arbeit – ausschließlich adhärente Zellen für die Untersuchungen verwendet wurden und auf explizite Nachfrage von Promega® bestätigt wurde, dass die zu messenden Proteasen definitiv frei im Medium gelöst seien, entstand die Idee, die *dead-cell-protease activity* auch ausschließlich *im Medium* zu messen. Für orientierende Versuche wurden einfach je 50 µl Kulturmedium aus einem Well in ein entsprechendes Well einer frischen 96-Well-Platte überführt und mit dem Assay gemischt. Nachdem dies überzeugende Ergebnisse brachte, wurde zur weiteren Optimierung für die Messung jeweils eine schwarze 384-Well-Platte (Corning # 3573) verwendet. Dadurch konnten einerseits die bekannten Vorteile einer komplett schwarzen Messplatte bei fluoreszenzbasierten Messungen ausgenutzt werden und andererseits das benötigte Volumen an Kulturmedium und Assay auf nur noch 20 µl pro Well und Messung weiter reduziert werden. Somit konnte bei deutlich erhöhter Messsensitivität auch die Kosten pro Messung insgesamt um den Faktor 5 reduziert werden.

Durch die erhöhte Messsensitivität konnte auch die Zellzahl zu Versuchsbeginn auf 3000 Zellen pro Well reduziert werden. Damit sank die gemessene *dead-cell-protease activity* v. a. in den unbehandelten Wells noch weiter ab. Es wurde außerdem eine längere Inkubation der Zellen ermöglicht, da mehr Zeit bis zur vollständigen Überwucherung der Kontrollwells verblieb und auch der absolute Verbrauch an Nährstoffen aus dem Kulturmedium vermindert war. Es konnten somit dann Experimente mit bis zu sechs Tagen Inkubation, d. h. entsprechend acht Tagen Gesamtdauer sinnvoll und mit verwertbaren Ergebnissen, die den optischen Eindrücken entsprachen durchgeführt werden und wie bereits beschrieben mithilfe von 24-Well-Platten auch Zeitverläufe der relativen Zytotoxizität erstellt werden.

Literatur

- Aggarwal, B. B., L. Schwarz, M. E. Hogan und R. F. Rando (1996). »Triple helix-forming oligodeoxyribonucleotides targeted to the human tumor necrosis factor (TNF) gene inhibit TNF production and block the TNF-dependent growth of human glioblastoma tumor cells«. In: *Cancer Res.* 56.22, S. 5156–5164.
- Aldape, K., G. Zadeh, S. Mansouri, G. Reifenberger und A. von Deimling (2015). »Glioblastoma: pathology, molecular mechanisms and markers«. In: *Acta Neuropathologica* 129.6, S. 829–848.
- Aoyagi, K., M. Ohara-Imaizumi, C. Nishiwaki, Y. Nakamichi und S. Nagamatsu (2010). »Insulin/phosphoinositide 3-kinase pathway accelerates the glucose-induced first-phase insulin secretion through TrpV2 recruitment in pancreatic β -cells«. In: *Biochem. J.* 432.2, S. 375–386.
- Barami, K. (2007). »Biology of the subventricular zone in relation to gliomagenesis«. In: *J Clin Neurosci* 14.12, S. 1143–1149.
- Barciszewska, A. M., D. Gurda, P. Glodowicz, S. Nowak und M. Z. Naskret-Barciszewska (2015). »A New Epigenetic Mechanism of Temozolomide Action in Glioma Cells«. In: *PLoS ONE* 10.8, e0136669.
- Bent, M. J. van den, L. H. Looijenga, K. Langenberg u. a. (2003). »Chromosomal anomalies in oligodendroglial tumors are correlated with clinical features«. In: *Cancer* 97.5, S. 1276–1284.
- Beutler, B. und A. Cerami (1986). »Cachectin and tumour necrosis factor as two sides of the same biological coin«. In: *Nature* 320.6063, S. 584–588.
- Bhat, K. P., V. Balasubramaniyan, B. Vaillant u. a. (2013). »Mesenchymal differentiation mediated by NF- κ B promotes radiation resistance in glioblastoma«. In: *Cancer Cell* 24.3, S. 331–346.
- Böcker, W., H. Denk, P. U. Heitz und H. Moch, Hrsg. (2008). *Repetitorium Pathologie*. 2. Aufl. Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH, S. 130–135. ISBN: 9783437434013.
- Brat, D. J., R. G. Verhaak, K. D. Aldape u. a. (2015). »Comprehensive, Integrative Genomic Analysis of Diffuse Lower-Grade Gliomas«. In: *N. Engl. J. Med.* 372.26, S. 2481–2498.

Literatur

- Brennan, C. W., R. G. Verhaak, A. McKenna u. a. (2013). »The somatic genomic landscape of glioblastoma«. In: *Cell* 155.2, S. 462–477.
- Campbell, C. T., M. S. Phillips und K. Manasco (2017). »Cannabinoids in Pediatrics«. In: *J Pediatr Pharmacol Ther* 22.3, S. 176–185.
- Capper, D., H. Zentgraf, J. Balss, C. Hartmann und A. von Deimling (2009). »Monoclonal antibody specific for IDH1 R132H mutation«. In: *Acta Neuropathol.* 118.5, S. 599–601.
- Caprodossi, S., R. Lucciarini, C. Amantini u. a. (2008). »Transient receptor potential vanilloid type 2 (TRPV2) expression in normal urothelium and in urothelial carcinoma of human bladder: correlation with the pathologic stage«. In: *Eur. Urol.* 54.3, S. 612–620.
- Carswell, E. A., L. J. Old, R. L. Kassel u. a. (1975). »An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors«. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 72.9, S. 3666–3670.
- Caterina, M. J., A. Leffler, A. B. Malmberg u. a. (2000). »Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor«. In: *Science* 288.5464, S. 306–313.
- Caterina, M. J., T. A. Rosen, M. Tominaga, A. J. Brake und D. Julius (1999). »A capsaicin-receptor homologue with a high threshold for noxious heat«. In: *Nature* 398.6726, S. 436–441.
- Caterina, M. J., M. A. Schumacher, M. Tominaga u. a. (1997). »The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway«. In: *Nature* 389.6653, S. 816–824.
- Ceccarelli, M., F. P. Barthel, T. M. Malta u. a. (2016). »Molecular Profiling Reveals Biologically Discrete Subsets and Pathways of Progression in Diffuse Glioma«. In: *Cell* 164.3, S. 550–563.
- Charles, N. A., E. C. Holland, R. Gilbertson, R. Glass und H. Kettenmann (2012). »The brain tumor microenvironment«. In: *Glia* 60.3, S. 502–514.
- Chinot, O. L., W. Wick, W. Mason u. a. (2014). »Bevacizumab plus radiotherapy-temozolomide for newly diagnosed glioblastoma«. In: *N. Engl. J. Med.* 370.8, S. 709–722.
- Chirasani, S. R., A. Sternjak, P. Wend u. a. (2010). »Bone morphogenetic protein-7 release from endogenous neural precursor cells suppresses the tumorigenicity of stem-like glioblastoma cells«. In: *Brain* 133.Pt 7, S. 1961–1972.

Literatur

- Cho, S., S. Kim, Z. Jin u. a. (2011). »Isoliquiritigenin, a chalcone compound, is a positive allosteric modulator of GABAA receptors and shows hypnotic effects«. In: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 413.4, S. 637–642.
- Chu, C. J., S. M. Huang, L. De Petrocellis u. a. (2003). »N-oleoyldopamine, a novel endogenous capsaicin-like lipid that produces hyperalgesia«. In: *J. Biol. Chem.* 278.16, S. 13633–13639.
- Colak, D., T. Mori, M. S. Brill u. a. (2008). »Adult neurogenesis requires Smad4-mediated bone morphogenic protein signaling in stem cells«. In: *J. Neurosci.* 28.2, S. 434–446.
- Conover, J. C. und B. A. Shook (2011). »Aging of the subventricular zone neural stem cell niche«. In: *Aging Dis* 2.1, S. 49–63.
- Dasari, R., A. De Carvalho, D. C. Medellin u. a. (2015). »Wittig derivatization of sesquiterpenoid polygodial leads to cytostatic agents with activity against drug resistant cancer cells and capable of pyrrolylation of primary amines«. In: *Eur J Med Chem* 103, S. 226–237.
- De Petrocellis, L., A. Ligresti, A. S. Moriello u. a. (2011). »Effects of cannabinoids and cannabinoid-enriched Cannabis extracts on TRP channels and endocannabinoid metabolic enzymes«. In: *Br. J. Pharmacol.* 163.7, S. 1479–1494.
- Deng, W., M. D. Saxe, I. S. Gallina und F. H. Gage (2009). »Adult-born hippocampal dentate granule cells undergoing maturation modulate learning and memory in the brain«. In: *J. Neurosci.* 29.43, S. 13532–13542.
- Eckel-Passow, J. E., D. H. Lachance, A. M. Molinaro u. a. (2015). »Glioma Groups Based on 1p/19q, IDH, and TERT Promoter Mutations in Tumors«. In: *N. Engl. J. Med.* 372.26, S. 2499–2508.
- Elsohly, M. A. und D. Slade (2005). »Chemical constituents of marijuana: the complex mixture of natural cannabinoids«. In: *Life Sci.* 78.5, S. 539–548.
- Ferrer-Montiel, A., A. Fernandez-Carvajal, R. Planells-Cases u. a. (2012). »Advances in modulating thermosensory TRP channels«. In: *Expert Opin Ther Pat* 22.9, S. 999–1017.
- Fisher, T., G. Galanti, G. Lavie u. a. (2007). »Mechanisms operative in the antitumor activity of temozolomide in glioblastoma multiforme«. In: *Cancer J* 13.5, S. 335–344.
- Freije, W. A., F. E. Castro-Vargas, Z. Fang u. a. (2004). »Gene expression profiling of gliomas strongly predicts survival«. In: *Cancer Research* 64.18, S. 6503–6510.

Literatur

- Gargiulo, G., M. Cesaroni, M. Serresi u. a. (2013). »In vivo RNAi screen for BMI1 targets identifies TGF- β /BMP-ER stress pathways as key regulators of neural- and malignant glioma-stem cell homeostasis«. In: *Cancer Cell* 23.5, S. 660–676.
- Geisbrecht, B. V. und S. J. Gould (1999). »The human PICD gene encodes a cytoplasmic and peroxisomal NADP(+)-dependent isocitrate dehydrogenase«. In: *J. Biol. Chem.* 274.43, S. 30527–30533.
- Gilbert, D. F., G. Erdmann, X. Zhang u. a. (2011). »A novel multiplex cell viability assay for high-throughput RNAi screening«. In: *PLoS ONE* 6.12, e28338.
- Gilbert, M. R., J. J. Dignam, T. S. Armstrong u. a. (2014). »A randomized trial of bevacizumab for newly diagnosed glioblastoma«. In: *N. Engl. J. Med.* 370.8, S. 699–708.
- Glass, R., M. Synowitz, G. Kronenberg u. a. (2005). »Glioblastoma-induced attraction of endogenous neural precursor cells is associated with improved survival«. In: *J. Neurosci.* 25.10, S. 2637–2646.
- Granger, G. A., S. J. Shacks, T. W. Williams und W. P. Kolb (1969). »Lymphocyte in vitro cytotoxicity: specific release of lymphotoxin-like materials from tuberculin-sensitive lymphoid cells«. In: *Nature* 221.5186, S. 1155–1157.
- Han, J., S. H. Back, J. Hur u. a. (2013). »ER-stress-induced transcriptional regulation increases protein synthesis leading to cell death«. In: *Nat. Cell Biol.* 15.5, S. 481–490.
- Happold, C., P. Roth, W. Wick u. a. (2012). »Distinct molecular mechanisms of acquired resistance to temozolomide in glioblastoma cells«. In: *J. Neurochem.* 122.2, S. 444–455.
- Hegi, M. E., A. C. Diserens, T. Gorlia u. a. (2005). »MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma«. In: *N. Engl. J. Med.* 352.10, S. 997–1003.
- Hehlgans, T. und K. Pfeffer (2005). »The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games«. In: *Immunology* 115.1, S. 1–20.
- Hetz, C. (2012). »The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond«. In: *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13.2, S. 89–102.
- Hisanaga, E., M. Nagasawa, K. Ueki u. a. (2009). »Regulation of calcium-permeable TRPV2 channel by insulin in pancreatic beta-cells«. In: *Diabetes* 58.1, S. 174–184.
- Hochstim, C., B. Deneen, A. Lukaszewicz, Q. Zhou und D. J. Anderson (2008). »Identification of positionally distinct astrocyte subtypes whose identities are specified by a homeodomain code«. In: *Cell* 133.3, S. 510–522.

Literatur

- Howard, P., R. Twycross, J. Shuster, M. Mihalyo und A. Wilcock (2013). »Cannabinoids«. In: *J Pain Symptom Manage* 46.1, S. 142–149.
- Howlett, A. C., F. Barth, T. I. Bonner u. a. (2002). »International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of Cannabinoid Receptors«. In: *Pharmacological Reviews* 54.2, S. 161–202.
- Hurt, M. R., J. Moossy, M. Donovan-Peluso und J. Locker (1992). »Amplification of epidermal growth factor receptor gene in gliomas: histopathology and prognosis«. In: *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 51.1, S. 84–90.
- Jordan, C. T. (2009). »Cancer stem cells: controversial or just misunderstood?«. In: *Cell Stem Cell* 4.3, S. 203–205.
- Jordan, C. T., M. L. Guzman und M. Noble (2006). »Cancer stem cells«. In: *N. Engl. J. Med.* 355.12, S. 1253–1261.
- Kanzaki, M., Y. Q. Zhang, H. Mashima u. a. (1999). »Translocation of a calcium-permeable cation channel induced by insulin-like growth factor-I«. In: *Nat. Cell Biol.* 1.3, S. 165–170.
- Keane, J., S. Gershon, R. P. Wise u. a. (2001). »Tuberculosis associated with infliximab, a tumor necrosis factor alpha-neutralizing agent«. In: *N. Engl. J. Med.* 345.15, S. 1098–1104.
- Kim, S. Y., S. M. Lee, J. K. Tak u. a. (2007). »Regulation of singlet oxygen-induced apoptosis by cytosolic NADP⁺-dependent isocitrate dehydrogenase«. In: *Mol. Cell. Biochem.* 302.1-2, S. 27–34.
- Knoth, R., I. Singec, M. Ditter u. a. (2010). »Murine features of neurogenesis in the human hippocampus across the lifespan from 0 to 100 years«. In: *PLoS ONE* 5.1, e8809.
- Komori, T. (2017). »Updated 2016 WHO classification of tumors of the CNS: turning the corner where molecule meets pathology«. In: *Brain Tumor Pathol* 34.4, S. 139–140.
- Kriegstein, A. und A. Alvarez-Buylla (2009). »The glial nature of embryonic and adult neural stem cells«. In: *Annu. Rev. Neurosci.* 32, S. 149–184.
- LeBlanc, V. G. und M. A. Marra (2016). »DNA methylation in adult diffuse gliomas«. In: *Brief Funct Genomics* 15.6, S. 491–500.
- Lee, J., M. J. Son, K. Woolard u. a. (2008). »Epigenetic-mediated dysfunction of the bone morphogenetic protein pathway inhibits differentiation of glioblastoma-initiating cells«. In: *Cancer Cell* 13.1, S. 69–80.

Literatur

- Lee, S. M., H. J. Koh, D. C. Park u. a. (2002). »Cytosolic NADP(+)-dependent isocitrate dehydrogenase status modulates oxidative damage to cells«. In: *Free Radic. Biol. Med.* 32.11, S. 1185–1196.
- Leuner, B., Y. Kozorovitskiy, C. G. Gross und E. Gould (2007). »Diminished adult neurogenesis in the marmoset brain precedes old age«. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104.43, S. 17169–17173.
- Lim, D. A., A. D. Tramontin, J. M. Trevejo u. a. (2000). »Noggin antagonizes BMP signaling to create a niche for adult neurogenesis«. In: *Neuron* 28.3, S. 713–726.
- Link, T. M., U. Park, B. M. Vonakis u. a. (2010). »TRPV2 has a pivotal role in macrophage particle binding and phagocytosis«. In: *Nat. Immunol.* 11.3, S. 232–239.
- Liu, G., C. Xie, F. Sun u. a. (2010). »Clinical significance of transient receptor potential vanilloid 2 expression in human hepatocellular carcinoma«. In: *Cancer Genet. Cytogenet.* 197.1, S. 54–59.
- Locksley, R. M., N. Killeen und M. J. Lenardo (2001). »The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology«. In: *Cell* 104.4, S. 487–501.
- Louis, D. N., W. K. Cavenee, H. Ohgaki und O. D. Wiestler (2016a). *World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System*. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. ISBN: 978-9-283-24492-9.
- Louis, D. N., A. Perry, G. Reifenberger u. a. (2016b). »The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary«. In: *Acta Neuropathol.* 131.6, S. 803–820.
- Lynch, M. E. und M. A. Ware (2015). »Cannabinoids for the Treatment of Chronic Non-Cancer Pain: An Updated Systematic Review of Randomized Controlled Trials«. In: *Journal of Neuroimmune Pharmacology* 10.2, S. 293–301.
- Malta, T. M., C. F. de Souza, T. S. Sabedot u. a. (2018). »Glioma CpG island methylator phenotype (G-CIMP): biological and clinical implications«. In: *Neuro-Oncology* 20.5, S. 608–620.
- Marinelli, S., C. W. Vaughan, M. J. Christie und M. Connor (2002). »Capsaicin activation of glutamatergic synaptic transmission in the rat locus coeruleus in vitro«. In: *J. Physiol. (Lond.)* 543.Pt 2, S. 531–540.
- Masui, K., T. F. Cloughesy und P. S. Mischel (2012). »Review: molecular pathology in adult high-grade gliomas: from molecular diagnostics to target therapies«. In: *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 38.3, S. 271–291.

Literatur

- McLendon, R., A. Friedman, D. Bigner u. a. (2008). »Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways«. In: *Nature* 455.7216, S. 1061–1068.
- Mechoulam, R., E. Fride und V. Di Marzo (1998). »Endocannabinoids«. In: *Eur. J. Pharmacol.* 359.1, S. 1–18.
- Mechoulam, R., M. Peters, E. Murillo-Rodriguez und L. O. Hanus (2007). »Cannabidiol – recent advances«. In: *Chem. Biodivers.* 4.8, S. 1678–1692.
- mol2chemfig (2016). *Mol2chemfig Web ©2014 - 2016 Vitali Coltuclu*. [Stand 05. Oktober 2016]. URL: http://py-chemist.com/mol_2_chemfig.
- Monet, M., D. Gkika, V. Lehen'kyi u. a. (2009). »Lysophospholipids stimulate prostate cancer cell migration via TRPV2 channel activation«. In: *Biochim. Biophys. Acta* 1793.3, S. 528–539.
- Monet, M., V. Lehen'kyi, F. Gackiere u. a. (2010). »Role of cationic channel TRPV2 in promoting prostate cancer migration and progression to androgen resistance«. In: *Cancer Res.* 70.3, S. 1225–1235.
- Montell, C. (2005). »The TRP superfamily of cation channels«. In: *Sci. STKE* 2005.272, re3.
- Montell, C., L. Birnbaumer und V. Flockerzi (2002). »The TRP channels, a remarkably functional family«. In: *Cell* 108.5, S. 595–598.
- Morelli, M. B., M. Nabissi, C. Amantini u. a. (2012). »The transient receptor potential vanilloid-2 cation channel impairs glioblastoma stem-like cell proliferation and promotes differentiation«. In: *Int. J. Cancer* 131.7, E1067–1077.
- Muraki, K., Y. Iwata, Y. Katanosaka u. a. (2003). »TRPV2 is a component of osmotically sensitive cation channels in murine aortic myocytes«. In: *Circ. Res.* 93.9, S. 829–838.
- Nabissi, M., M. B. Morelli, C. Amantini u. a. (2010). »TRPV2 channel negatively controls glioma cell proliferation and resistance to Fas-induced apoptosis in ERK-dependent manner«. In: *Carcinogenesis* 31.5, S. 794–803.
- Nabissi, M., M. B. Morelli, M. Santoni und G. Santoni (2013). »Triggering of the TRPV2 channel by cannabidiol sensitizes glioblastoma cells to cytotoxic chemotherapeutic agents«. In: *Carcinogenesis* 34.1, S. 48–57.
- Nedungadi, T. P., M. Dutta, C. S. Bathina, M. J. Caterina und J. T. Cunningham (2012). »Expression and distribution of TRPV2 in rat brain«. In: *Exp. Neurol.* 237.1, S. 223–237.

Literatur

- Nekrutenko, A., D. M. Hillis, J. C. Patton, R. D. Bradley und R. J. Baker (1998). »Cytosolic isocitrate dehydrogenase in humans, mice, and voles and phylogenetic analysis of the enzyme family«. In: *Mol. Biol. Evol.* 15.12, S. 1674–1684.
- Niles, A., M. Scurria, L. Bernad u. a. (2007). »Using protease biomarkers to measure viability and cytotoxicity«. In: *Cell notes* 19, S. 16–20. URL: www.promega.com.
- Nobusawa, S., T. Watanabe, P. Kleihues und H. Ohgaki (2009). »IDH1 mutations as molecular signature and predictive factor of secondary glioblastomas«. In: *Clin. Cancer Res.* 15.19, S. 6002–6007.
- Notcutt, W. G. (2015). »Clinical Use of Cannabinoids for Symptom Control in Multiple Sclerosis«. In: *Neurotherapeutics* 12.4, S. 769–777.
- Noushmehr, H., D. J. Weisenberger, K. Diefes u. a. (2010). »Identification of a CpG island methylator phenotype that defines a distinct subgroup of glioma«. In: *Cancer Cell* 17.5, S. 510–522.
- Ohgaki, H., P. Dessen, B. Jourde u. a. (2004). »Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study«. In: *Cancer Res.* 64.19, S. 6892–6899.
- Ohgaki, H. und P. Kleihues (2005). »Epidemiology and etiology of gliomas«. In: *Acta Neuropathol.* 109.1, S. 93–108.
- Ohgaki, H. und P. Kleihues (2007). »Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma«. In: *Am. J. Pathol.* 170.5, S. 1445–1453.
- Ohgaki, H. und P. Kleihues (2013). »The definition of primary and secondary glioblastoma«. In: *Clinical Cancer Research* 19.4, S. 764–772.
- Ostrom, Q. T., H. Gittleman, J. Fulop u. a. (2015). »CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2008-2012«. In: *Neuro-Oncology* 17 Suppl 4, S. iv1–iv62.
- Pareek, T. K., J. Keller, S. Kesavapany u. a. (2007). »Cyclin-dependent kinase 5 modulates nociceptive signaling through direct phosphorylation of transient receptor potential vanilloid 1«. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104.2, S. 660–665.
- Park, K. S., Y. Kim, Y. H. Lee, Y. E. Earm und W. K. Ho (2003). »Mechanosensitive cation channels in arterial smooth muscle cells are activated by diacylglycerol and inhibited by phospholipase C inhibitor«. In: *Circ. Res.* 93.6, S. 557–564.
- Park, U., N. Vastani, Y. Guan u. a. (2011). »TRP vanilloid 2 knock-out mice are susceptible to perinatal lethality but display normal thermal and mechanical nociception«. In: *J. Neurosci.* 31.32, S. 11425–11436.
- Parsons, D. W., S. Jones, X. Zhang u. a. (2008). »An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme«. In: *Science* 321.5897, S. 1807–1812.

- Peng, G., W. Lu, X. Li u. a. (2010). »Expression of store-operated Ca²⁺ entry and transient receptor potential canonical and vanilloid-related proteins in rat distal pulmonary venous smooth muscle«. In: *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 299.5, S. L621–630.
- Peralvarez-Marin, A., P. Donate-Macian und R. Gaudet (2013). »What do we know about the transient receptor potential vanilloid 2 (TRPV2) ion channel?« In: *FEBS J.* 280.21, S. 5471–5487.
- Pertwee, R. G. (2006). »The pharmacology of cannabinoid receptors and their ligands: an overview«. In: *International Journal of Obesity* 30, S. 13–18.
- Pertwee, R. G., A. C. Howlett, M. E. Abood u. a. (2010). »International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXIX. Cannabinoid receptors and their ligands: beyond CB₁ and CB₂«. In: *Pharmacol. Rev.* 62.4, S. 588–631.
- Phillips, H. S., S. Kharbanda, R. Chen u. a. (2006). »Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis«. In: *Cancer Cell* 9.3, S. 157–173.
- Piaskowski, S., M. Bienkowski, E. Stoczynska-Fidelus u. a. (2011). »Glioma cells showing IDH1 mutation cannot be propagated in standard cell culture conditions«. In: *Br. J. Cancer* 104.6, S. 968–970.
- Piccirillo, S. G., B. A. Reynolds, N. Zanetti u. a. (2006). »Bone morphogenetic proteins inhibit the tumorigenic potential of human brain tumour-initiating cells«. In: *Nature* 444.7120, S. 761–765.
- PubChem (2016). *National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine*. [Stand 05. Oktober 2016]. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pccompound>.
- Qin, N., M. P. Neepser, Y. Liu u. a. (2008). »TRPV2 Is Activated by Cannabidiol and Mediates CGRP Release in Cultured Rat Dorsal Root Ganglion Neurons«. In: *Journal of Neuroscience* 28.24, S. 6231–6238.
- Römpp Enzyklopädie (2016). Georg Thieme Verlag KG. Online erhältlich unter <https://roempp.thieme.de/roempp4.0/do/data/RD-22-00131>; abgerufen am 06. Oktober 2016.
- Rozas, P., P. Lazcano, R. Pina u. a. (2016). »Targeted overexpression of tumor necrosis factor- α increases cyclin-dependent kinase 5 activity and TRPV1-dependent Ca²⁺ influx in trigeminal neurons«. In: *Pain* 157.6, S. 1346–1362.
- Sahm, F., D. Capper, A. Jeibmann u. a. (2012). »Addressing diffuse glioma as a systemic brain disease with single-cell analysis«. In: *Arch. Neurol.* 69.4, S. 523–526.

- Sanai, N., A. Alvarez-Buylla und M. S. Berger (2005). »Neural stem cells and the origin of gliomas«. In: *N. Engl. J. Med.* 353.8, S. 811–822.
- Sarfraz, S., V. M. Adhami, D. N. Syed, F. Afaq und H. Mukhtar (2008). »Cannabinoids for Cancer Treatment: Progress and Promise«. In: *Cancer Research* 68.2, S. 339–342.
- Saunders, C. I., D. A. Kunde, A. Crawford und D. P. Geraghty (2007). »Expression of transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) and 2 (TRPV2) in human peripheral blood«. In: *Mol. Immunol.* 44.6, S. 1429–1435.
- Scuderi, C., D. D. Filippis, T. Iuvone u. a. (2009). »Cannabidiol in medicine: a review of its therapeutic potential in CNS disorders«. In: *Phytother Res* 23.5, S. 597–602.
- Shibasaki, K., N. Murayama, K. Ono, Y. Ishizaki und M. Tominaga (2010). »TRPV2 enhances axon outgrowth through its activation by membrane stretch in developing sensory and motor neurons«. In: *J. Neurosci.* 30.13, S. 4601–4612.
- Solinas, M., P. Massi, V. Cinquina u. a. (2013). »Cannabidiol, a non-psychoactive cannabinoid compound, inhibits proliferation and invasion in U87-MG and T98G glioma cells through a multitarget effect«. In: *PLoS ONE* 8.10, e76918.
- Spicarova, D. und J. Palecek (2010). »Tumor necrosis factor alpha sensitizes spinal cord TRPV1 receptors to the endogenous agonist N-oleoyldopamine«. In: *J Neuroinflammation* 7, S. 49.
- Starowicz, K., S. Nigam und V. Di Marzo (2007). »Biochemistry and pharmacology of endovanilloids«. In: *Pharmacol. Ther.* 114.1, S. 13–33.
- Stock, K., J. Kumar, M. Synowitz u. a. (2012). »Neural precursor cells induce cell death of high-grade astrocytomas through stimulation of TRPV1«. In: *Nature Medicine* 18.8, S. 1232–1238.
- Stupp, R., M. E. Hegi, W. P. Mason u. a. (2009). »Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial«. In: *Lancet Oncol.* 10.5, S. 459–466.
- Stupp, R., W. P. Mason, M. J. van den Bent u. a. (2005). »Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma«. In: *N. Engl. J. Med.* 352.10, S. 987–996.
- Suzuki, T., S. Izumoto, K. Wada u. a. (2005). »Inhibition of glioma cell proliferation by neural stem cell factor«. In: *J. Neurooncol.* 74.3, S. 233–239.
- Szaflarski, J. P., K. Hernando, E. M. Bebin u. a. (2019). »Higher cannabidiol plasma levels are associated with better seizure response following treatment with a pharmaceutical grade cannabidiol«. In: *Epilepsy Behav* 95, S. 131–136.

Literatur

- Szallasi, A., D. N. Cortright, C. A. Blum und S. R. Eid (2007). »The vanilloid receptor TRPV1: 10 years from channel cloning to antagonist proof-of-concept«. In: *Nat Rev Drug Discov* 6.5, S. 357–372.
- Thakkar, J. P., T. A. Dolecek, C. Horbinski u. a. (2014). »Epidemiologic and molecular prognostic review of glioblastoma«. In: *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 23.10, S. 1985–1996.
- Thompson, M. R., D. Xu und B. R. G. Williams (2009). »ATF3 transcription factor and its emerging roles in immunity and cancer«. In: *Journal of Molecular Medicine* 87.11, S. 1053.
- Tominaga, M., M. J. Caterina, A. B. Malmberg u. a. (1998). »The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli«. In: *Neuron* 21.3, S. 531–543.
- Torres, S., M. Lorente, F. Rodriguez-Fornes u. a. (2011). »A combined preclinical therapy of cannabinoids and temozolomide against glioma«. In: *Mol. Cancer Ther.* 10.1, S. 90–103.
- Turcan, S., D. Rohle, A. Goenka u. a. (2012). »IDH1 mutation is sufficient to establish the glioma hypermethylator phenotype«. In: *Nature* 483.7390, S. 479–483.
- Varga, A., J. Nemeth, A. Szabo u. a. (2005). »Effects of the novel TRPV1 receptor antagonist SB366791 in vitro and in vivo in the rat«. In: *Neurosci. Lett.* 385.2, S. 137–142.
- Venkatachalam, K. und C. Montell (2007). »TRP channels«. In: *Annu. Rev. Biochem.* 76, S. 387–417.
- Verhaak, R. G., K. A. Hoadley, E. Purdom u. a. (2010). »Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1«. In: *Cancer Cell* 17.1, S. 98–110.
- Vrijens, K., W. Lin, J. Cui u. a. (2013). »Identification of small molecule activators of BMP signaling«. In: *PLoS ONE* 8.3, e59045.
- Wahl, P., C. Foged, S. Tullin und C. Thomsen (2001). »Iodo-resiniferatoxin, a new potent vanilloid receptor antagonist«. In: *Mol. Pharmacol.* 59.1, S. 9–15.
- Walter, P. und D. Ron (2011). »The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation«. In: *Science* 334.6059, S. 1081–1086.
- Walzlein, J. H., M. Synowitz, B. Engels u. a. (2008). »The antitumorigenic response of neural precursors depends on subventricular proliferation and age«. In: *Stem Cells* 26.11, S. 2945–2954.
- Watabe, T. und K. Miyazono (2009). »Roles of TGF- β family signaling in stem cell renewal and differentiation«. In: *Cell Research* 19.1, S. 103–115.

Literatur

- Watanabe, T., S. Nobusawa, P. Kleihues und H. Ohgaki (2009). »IDH1 mutations are early events in the development of astrocytomas and oligodendrogliomas«. In: *Am. J. Pathol.* 174.4, S. 1149–1153.
- Weller, M. (2015). »Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie – Gliome«. Deutsche Gesellschaft für Neurologie, online erhältlich unter http://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/030-0991_S2k_Gliome__2015-06.pdf; abgerufen am 28. November 2016.
- Weller, M., R. Stupp, G. Reifenberger u. a. (2010). »MGMT promoter methylation in malignant gliomas: ready for personalized medicine?« In: *Nat Rev Neurol* 6.1, S. 39–51.
- Westphal, M. und K. Lamszus (2011). »The neurobiology of gliomas: from cell biology to the development of therapeutic approaches«. In: *Nat. Rev. Neurosci.* 12.9, S. 495–508.
- Wheless, J. W., D. Dlugos, I. Miller u. a. (2019). »Pharmacokinetics and Tolerability of Multiple Doses of Pharmaceutical-Grade Synthetic Cannabidiol in Pediatric Patients with Treatment-Resistant Epilepsy«. In: *CNS Drugs*.
- Wick, W., C. Meisner, B. Hentschel u. a. (2013). »Prognostic or predictive value of MGMT promoter methylation in gliomas depends on IDH1 mutation«. In: *Neurology* 81.17, S. 1515–1522.
- Wick, W., M. Platten, C. Meisner u. a. (2012). »Temozolomide chemotherapy alone versus radiotherapy alone for malignant astrocytoma in the elderly: the NOA-08 randomised, phase 3 trial«. In: *Lancet Oncol.* 13.7, S. 707–715.
- Xu, X., J. Zhao, Z. Xu u. a. (2004). »Structures of human cytosolic NADP-dependent isocitrate dehydrogenase reveal a novel self-regulatory mechanism of activity«. In: *J. Biol. Chem.* 279.32, S. 33946–33957.
- Yamada, T., T. Ueda, Y. Shibata u. a. (2010). »TRPV2 activation induces apoptotic cell death in human T24 bladder cancer cells: a potential therapeutic target for bladder cancer«. In: *Urology* 76.2, S. 1–7.
- Zettl, U. K., P. Rommer, P. Hipp und R. Patejdl (2016). »Evidence for the efficacy and effectiveness of THC-CBD oromucosal spray in symptom management of patients with spasticity due to multiple sclerosis«. In: *Ther Adv Neurol Disord* 9.1, S. 9–30.

Danksagung

Am Ende der Arbeit möchte ich mich bei all jenen bedanken, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Ganz besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. rer. nat. R. Glaß für die Aufnahme in seine Forschungsgruppe, die Überlassung des Themas, die intensive Betreuung und Begleitung, das Einbringen seines großen wissenschaftlichen Sachverstandes und die Einführung in die Welt des wissenschaftlichen Arbeitens.

Ebenso möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. J.-C. Tonn dem Direktor der neurochirurgischen Klinik an der LMU für seine großzügige und wohlwollende Unterstützung der Forschungsabteilung bedanken.

Mein Dank gilt ebenfalls Frau Dr. rer. nat. V. Albrecht und Herrn Dr. sc. nat. R. Kälin, die als Postdocs diese Arbeit mit begleitet haben und mir stets mit Rat und Tat zur Seite standen.

Herzlichen Dank auch an meine Mit-Doktorandinnen Verena Brummer und Alisha Haug für die gute Zusammenarbeit und die vielen gemeinsamen Stunden im Labor.

Ebenfalls möchte ich mich bei den technischen Assistentinnen Frau Sabrina Lakotta und Frau Stefanie Lange bedanken, insbesondere für die Einarbeitung in die Zellkultur und die technische Unterstützung bei der Durchführung der Experimente.

Dem FöFoLe-Programm der LMU, vertreten durch Herrn Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. J. Heesemann, gilt mein Dank für die großzügige finanzielle und ausführliche ideelle Unterstützung meiner Arbeit und meines wissenschaftlichen Werdegangs.

Bedanken möchte ich mich auch bei meinem guten Freund Thomas Mertens, B. Sc. für die technische Unterstützung bei der Verwendung von \LaTeX und Excel, sowie seine Mithilfe bei der statistischen Auswertung.

Der größte Dank gilt allerdings meiner Familie für die immerwährende Unterstützung in Ausbildung, Studium und Lebensweg. Ganz besonders bedanke ich mich bei meiner Mutter Ulrike Nagl für das orthographische Korrekturlesen dieser Arbeit und bei meinem Vater Dipl. Ing. Alois Nagl für die IT-technische Unterstützung.

Abschließend möchte ich noch allen Freunden, Bekannten und Verwandten meinen Dank ausdrücken für Verständnis, Unterstützung und auch mal Ablenkung.

Eidesstattliche Versicherung

Nagl, Bernhard Jonathan

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

**Cannabinoide als mögliche Therapeutika für Glioblastome –
TRPV-vermittelte Pharmakologie körpereigener Tumorabwehr**

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre weiterhin, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Rosenheim, 17. Juli 2022

Ort, Datum

Bernhard Nagl

Unterschrift Doktorand