

Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik Tübingen
Abteilung Innere Medizin II
(Schwerpunkt: Hämatologie, Onkologie, Klinische Immunologie,
Rheumatologie)

**Vergleichende Wirkung von Cannabidiol (CBD) und
Tetrahydrocannabinol (THC) in akuten Leukämien**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Staudacker, Isabell

2021

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Privatdozent Dr. M. Schittenhelm

2. Berichterstatter: Privatdozentin Dr. M. Döring

Tag der Disputation: 27.10.2021

Für meine Familie.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abbildungsverzeichnis.....	IV
Tabellenverzeichnis.....	V
Abkürzungsverzeichnis	VI
1. Einleitung.....	1
1.1. Cannabinoide und deren Rezeptoren	2
1.1.1. Cannabinoid Rezeptoren.....	3
1.1.2. Pflanzliche Cannabinoide: Phytocannabinoide.....	5
1.2. Zelluläre Signalwege.....	6
1.2.1. Der PI3K/AKT-Signalweg	6
1.2.2. Der MAPK/ERK-Signalweg.....	7
1.3. Themafindung.....	8
1.4. Ethische Grundlagen, Datenschutz und S2 Berechtigung	9
2. Material	10
2.1. Verbrauchsmaterial.....	10
2.2. Substanzen.....	10
2.3. Laborgeräte	11
2.4. Chemikalien	12
2.5. Zelllinien.....	13
2.6. Patientenproben	14
2.7. Antikörper	15
2.7.1. Primärantikörper	15
2.7.2. Ladekontrolle	15
2.7.3. Sekundärantikörper	15
2.8. Puffer und Lösungen	16
2.8.1. Färbelösung für Apoptose	16
2.8.2. Lysepuffer für Western Blot	16
2.8.3. Bradford Albumin-Standardlösung.....	17

2.8.4. Bradford Reagens	17
2.8.5. SDS-PAGE Detergens	17
2.8.6. Laufpuffer für Gelelektrophorese	17
2.8.7. Transferpuffer für Transferzelle (pH 8,3)	17
2.8.8. TBS-Waschpuffer	17
2.8.9. BSA-Lösung	17
2.9. Medium	18
2.9.1. Nährmedium für Zellkulturen	18
2.9.2. Nährmedium für Patientenzellkulturen	18
2.9.3. Einfriermedium	18
2.10. Verwendete Software	18
2.11. Standorte der Herstellerfirmen	19
3. Methoden	20
3.1. Zellkulturen	20
3.2. Kryokonservierung und Auftauen von Zellen	20
3.3. Isolation mononukleärer Zellen	20
3.4. Apoptoseassay und Viabilitätsanalyse	21
3.4.1. Apoptoseassay	21
3.4.2. Viabilitätsanalyse zur Detektion leukämischer Populationen	21
3.5. Proteinanalyse	22
3.5.1. Zelllysate	22
3.5.2. Bestimmung der Proteinkonzentration	22
3.5.3. Gelelektrophorese: SDS-PAGE	22
3.5.4. Western Blot	23
3.5.5. Strippen der Membran	24
3.6. Proteom Profiler Human Phospho-Kinase Array Kit	24
3.7. Statistische Auswertung	24
4. Ergebnisse	25

4.1. Apoptose in Leukämiezelllinien durch Cannabinoide.....	25
4.1.1. Apoptose der Jurkat Zellen durch THC und CBD	27
4.1.2. Apoptose der MOLM13 Zellen durch Cannabinoide	30
4.1.3. Apoptose in MOLM14 Zellen durch THC und CBD	33
4.1.4. Apoptose in HL-60 Zellen durch Cannabinoide	36
4.2. Cannabinoid-Behandlung mononukleärer Zellen ex vivo.....	39
4.2.1. Apoptoseverhalten mononukleärer Zellen unter THC und CBD	40
4.3. Veränderung zellulärer Signalwege durch Cannabinoide	44
4.3.1. Das Human Phospho-Kinase Array.....	44
4.3.2. Veränderungen im PI3K/AKT-Signalweg durch Cannabinoide.....	47
4.3.2.1 Phosphorylierungsänderung in Jurkat Zellen	48
4.3.2.2 Phosphorylierungsänderung in MOLM13 Zellen	49
4.3.2.3 Phosphorylierungsänderung in MOLM14 Zellen	50
4.3.3. Regulierungen durch Cannabinoide im MAPK/ERK-Signalweg	51
5. Diskussion.....	52
6. Fazit	62
7. Zusammenfassung	63
8. Danksagung.....	64
9. Literaturverzeichnis.....	65
10. Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift.....	71

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Wirkmechanismus von Endocannabinoiden an der Synapse.	4
Abb. 2: Strukturformeln von THC und CBD. (Yamaori et al., 2011).....	5
Abb. 3: Apoptoseinduktion in Jurkat Zellen nach 48 h.....	27
Abb. 4: Apoptoseinduktion in Jurkat Zellen nach 48 h.....	28
Abb. 5: Apoptoseinduktion in MOLM13 Zellen nach 48 h.....	30
Abb. 6: Apoptoseinduktion in MOLM13 Zellen nach 48 h.....	31
Abb. 7: Apoptoseinduktion von MOLM14 Zellen nach 48 h.....	33
Abb. 8: Apoptoseinduktion in MOLM14 Zellen nach 48 h.....	34
Abb. 9: Apoptoseinduktion in HL-60 nach 48 h.	36
Abb. 10: Apoptoseinduktion in HL-60 Zellen nach 48 h.....	37
Abb. 11: Exemplarisches Beispiel der durchflusszytometrischen Analyse.	39
Abb. 12: Individueller und interindividueller Vergleich der Potenz der Cannabinoide.	41
Abb. 13: Anteil viabler Leukämie- und Donorenzellen nach 48 h CBD Behandlung.	43
Abb. 14: Schablone zur Auswertung des Human Phospho-Kinase Arrays.	45
Abb. 15: Ergebnis des durchgeführten Human Phospho-Kinase Arrays.	45
Abb. 16: Phosphorylierungsänderungen im PI3K/AKT-Signalweg in Jurkat Zellen.	48
Abb. 17: Phosphorylierungsänderungen im PI3K/AKT-Signalweg in MOLM13 Zellen.	49
Abb. 18: Phosphorylierungsänderungen im PI3K/AKT-Signalweg in MOLM14 Zellen.	50
Abb. 19: Phosphorylierungsänderungen im MAPK/ERK-Signalweg.	51

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Untersuchte Patientenproben.....	14
Tab. 2: Die IC ₅₀ -, IC ₇₀ - und IC ₉₀ -Werte der Jurkat Zellen.	29
Tab. 3: Apoptosewerte der Jurkat Zellen nach 48 h Cannabinoid-Behandlung.	29
Tab. 4: P-Werte und Signifikanzen der Apoptoseinduktion in Jurkat Zellen.	29
Tab. 5: Die IC ₅₀ -, IC ₇₀ - und IC ₉₀ -Werte der MOLM13 Zellen.....	32
Tab. 6: Apoptosewerte der MOLM13 Zellen nach Cannabinoid-Behandlung...	32
Tab. 7: P-Werte und Signifikanzen der Apoptoseinduktion in MOLM13 Zellen.	32
Tab. 8: Die IC ₅₀ -, IC ₇₀ - und IC ₉₀ -Werte der MOLM14 Zellen.....	35
Tab. 9: Apoptose in MOLM14 Zellen unter Cannabinoidbehandlung.	35
Tab. 10: P-Werte und Signifikanzen der Apoptoserate in MOLM14 Zellen.	35
Tab. 11: Die IC ₅₀ -, IC ₇₀ - und IC ₉₀ -Werte der HL-60 Zellen.	38
Tab. 12: Apoptose unter Cannabinoidbehandlung der HL-60 Zellen.....	38
Tab. 13: P-Werte und Signifikanzen der Apoptoserate der HL-60 Zellen.....	38
Tab. 14: Antigenklassen und Anzahl viabler mononukleärer Zellen.	42
Tab. 15: Tabelle der Membran A des Human Phospho-Kinase Arrays.	46
Tab. 16: Tabelle der Membran B des Human Phospho-Kinase Arrays.	46

Abkürzungsverzeichnis

2-AG	2-Arachidonoylglycerol
°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
a.d.	Aqua destillata
AEA	Anandamid
AG	Antigen
AK	Antikörper
ALL	Akute lymphoblastische Leukämie
ALS	Amyotrophe Lateralsklerose
AML	Akute myeloische Leukämie
ANKCL	Aggressive NK Zell Leukämie
AUL	Akute undifferenzierte Leukämie
Bis	Bis(2-hydroxyethyl)amino
BSA	Bovine serum albumin
CB	Cannabinoid
CBD	(-)-trans-Cannabidiol
CD	Cluster of differentiation
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Da	Dalton
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
ECR	Electron-coupling Reagent
ECS	Endocannabinoid-System
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FAB	Französisch-Amerikanisch-Britische Klassifikation
FACS®	Fluorescence activated cell sorting
FBS	Fetal bovine serum
FDA	U.S. Food and Drug Administration
FITC	Fluorescein-5-isothiocyanat
FSC	Forward light scatter (Vorwärtsstreulicht)

h	Stunde(n)
HLA	Humanes Leukozyten Antigen
IC ₅₀ / IC ₇₀ /IC ₉₀	Benötigte Konzentration eines Hemmstoffs, bei der 50/70/90% inhibiert werden
k	Kilo
M	Molar
MAPK/ERK	Mitogen activated protein kinase/ Extracellular signal regulated kinase
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
min	Minute
m/ ml/ mM	Micro (10 ⁻³)/ Milliliter/ Millimolar
MOPS	3-(N-morpholino)-propanesulfonic acid
MPO	Myeloperoxidase
n/ nm /nM	Nano (10 ⁻⁹)/ Nanometer/ Nanomolar
μ/ μl/ μM	Micro (10 ⁻⁶)/ Mikroliter/ Mikromolar
NaCl	Natrium-Chlorid
NEAA	Nicht essenzielle Aminosäuren
NK	Natürliche Killerzelle
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PI	Propidiumiodid
PMF	Primäre Myelofibrose
RPMI	Roswell Park Memorial Institute (medium)
Rpm	Rounds per minute
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SSC	Side Scatter (Seitwärtsstreulicht)
Tab.	Tabelle
TdT	Terminale Desoxyribonucleotidyltransferase
THC	(-)-Δ ⁹ -trans-Tetrahydrocannabinol
Tris	Tris(hydroxymethyl)methane
V	Volt

1. Einleitung

Die biologische Rolle des Endocannabinoid-Systems (ECS) des Körpers wurde durch eine Vielzahl an Studien untersucht. Es besteht aus neuromodulatorischen Lipiden und deren Rezeptoren. In Zellen reguliert das ECS verschiedene neuronale, kardiovaskuläre und immunologische Funktionen. Ein wichtiges Forschungsgebiet besteht darin, herauszufinden, wie die regulatorischen Funktionen im menschlichen Körper pharmakologisch genutzt werden können (Khan et al., 2016).

In den Neurowissenschaften ist das ECS daher Gegenstand intensiver Forschungen im Hinblick auf den klinischen Nutzen von Cannabinoidderivaten, wie zum Beispiel das Delta-9-Tetrahydrocannabinol (THC) und das Cannabidiol (CBD). Klinische Studien zeigen bei therapeutischer Anwendung von Cannabinoidderivaten bemerkenswerte spasmolytische Effekte bei Patienten mit Multipler Sklerose (Baker et al., 2000, Consroe et al., 1997). Des Weiteren ermöglichen sie Linderung neuropathischer Schmerzen von Patienten, bei denen Opiate oder andere Medikamente keine Wirkung mehr zeigen (Mao et al., 2000), (Berrocoso et al., 2017).

Es ist bekannt, dass Cannabinoide nicht nur Auswirkungen auf das zentrale Nervensystem haben, sondern weitere Organsysteme beeinflussen. Zu nennen sind anti-inflammatorische Effekte (Zurier et al., 1998), protektive Effekte bei Graft-versus-Host Reaktionen und anti-autoimmune Wirkungen im kardiovaskulären System (Lee et al., 2016).

Darüber hinaus lässt sich durch die Interaktion mit Signalwegen der Apoptose (Hermanson and Marnett, 2011), der Angiogenese (Ramer and Hinz, 2015), der Metastasierung (Murase et al., 2014) und der anti-Tumor Immunität (Hohmann et al., 2017) die These aufstellen, dass Cannabinoide ein therapeutisches Potential in der Krebsbehandlung aufweisen könnten (Chakravarti et al., 2014, Munson et al., 1975). Sein anti-Tumor Potential und seine regulatorische Funktion im Zusammenhang mit Krankheiten führten zu weiteren Untersuchungen des ECS. So zeigten Erkenntnisse, dass Cannabinoide schmerzlindernde Eigenschaften (Burstein et al., 1998) und ein antiemetisches Potential (Sallan et al., 1975) in der

Krebstherapie besitzen. Ebenso wurde gezeigt, dass sie eine antineoplastische Wirksamkeit in soliden und hämatologischen Tumormodellen aufweisen. Da bereits 1975 anti-Tumor Eigenschaften von Cannabisbestandteilen beschrieben wurden (Munson et al., 1975), entstand die Idee, bei Krebserkrankungen mit Cannabisderivaten gezielt das ECS anzusteuern. Diese Möglichkeit hat neuerdings für einen Anstieg des Interesses an Cannabinoiden gesorgt (Pisanti et al., 2013). Am besten erforscht ist die Wirkung von Cannabinoiden auf das humane Glioblastom, weshalb sich hier weitere Behandlungsansätze und Behandlungsmöglichkeiten eröffnen (Marcu et al., 2010, Torres et al., 2011, Galve-Roperh et al., 2000). 2014 erhielt CBD den „Orphan drug“- Status durch die U.S. Food and Drug Administration (FDA) zur Behandlung vom humanen Glioblastom (U.S. Food and Drug Administration, 2018, Masangkay, 2014).

Aufgrund des guten Sicherheitsprofils und der geringen Toxizität sind Cannabinoide von großem Interesse für die klinische Therapie, vor allem im Kontext von extensiv vortherapierten, therapierefraktären, älteren und komorbiden Patienten. Dennoch wird der klinische Einsatz der Substanzen noch immer heftig diskutiert und die Forschung in vielen Ländern durch Restriktionsmaßnahmen behindert (Pertwee, 2012, Kampa-Schittenhelm et al., 2016).

1.1. Cannabinoide und deren Rezeptoren

Cannabinoide können in drei verschiedene Gruppen unterteilt werden: zum einen in die pflanzlichen Cannabinoide wie z.B. THC und CBD, zum anderen in die endogenen Cannabinoide im menschlichen Körper wie Anandamid (N-Arachidonoyl-ethanolamine, AEA) (Devane et al., 1988) und 2-Arachidonoylglycerol (2-AG) (Mechoulam et al., 1995) sowie in synthetisch hergestellte Cannabinoide (z.B. WIN-55, 212-2) (Showalter et al., 1996), (V. Auwärter, 2012).

1.1.1. Cannabinoid Rezeptoren

Der Mensch besitzt zwei Cannabinoidrezeptoren, den CB1- und CB2-Rezeptor. Der CB1-Rezeptor wird physiologisch vermehrt im Gehirn exprimiert (Matsuda et al., 1990), wohingegen der CB2-Rezeptor vor allem im Immunsystem (in B- und T-Zellen, in Makrophagen, in der Milz und in Lymphknoten) (Munro et al., 1993, Guzmán, 2003, Howlett et al., 2002), dem Gehirn (Galve-Roperh et al., 2000), dem Gehirndothel (Golech et al., 2004), den Knochen (Ofek et al., 2006) und der Haut (Casanova et al., 2003) zu finden ist.

Cannabinoiden wirken über die Aktivierung von G-Protein-gekoppelten Cannabinoid-(CB) Rezeptoren (Devane et al., 1988), an welche normalerweise endogene Liganden, die Endocannabinoiden, binden und eine Rolle in der Neuromodulation spielen (Di Marzo et al., 1998).

Eine erhöhte neuronale Aktivität und die Bindung von Neurotransmitter an Rezeptoren der postsynaptischen Neurone sowie der Anstieg des freien zytosolischen Calciums aktivieren die postsynaptische Synthese und Freisetzung von Endocannabinoiden. Sie agieren als retrograde Botenstoffe, indem sie an den präsynaptischen CB1-Rezeptor binden, welcher den Calciumeinstrom in die Zelle inhibiert und daher zu einer Blockade der Neurotransmitterfreisetzung führt (Abb. 1). Dies erlaubt die Modifizierung der biologischen Schlüsselprozesse wie Gedächtnis, Bewegung, Appetit und Schmerz (Velasco et al., 2012, Guzmán, 2003).

Obwohl sowohl CB1- als auch CB2-Rezeptoren G-Protein-gekoppelte Rezeptoren sind, ist bekannt, dass sich die intrazelluläre Signaltransduktion teils signifikant unterscheiden kann (Felder et al., 1995) – wobei hier die exakten Mechanismen noch unklar sind (Atwood and Mackie, 2010, (Howlett et al., 2002), Ibsen et al., 2017).

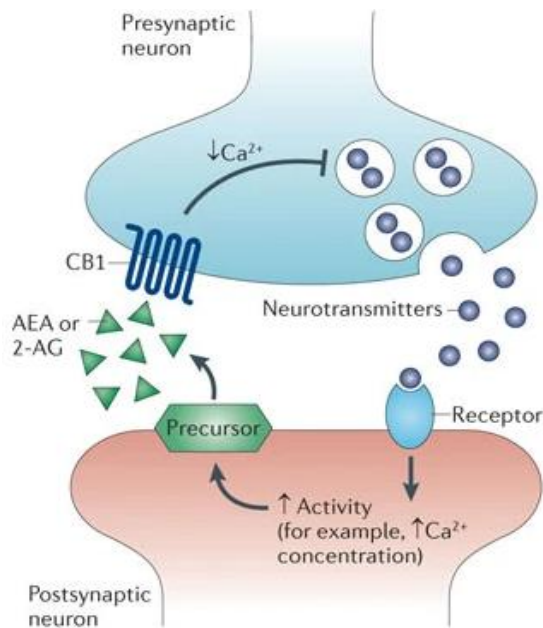


Abb. 1: **Wirkmechanismus von Endocannabinoiden an der Synapse.**

Nach Bindung von Neurotransmittern an der Postsynapse (postsynaptic neuron) werden durch neuronale Aktivität und erhöhte Calciumkonzentration (Ca^{2+}) Endocannabinoide (AEA, 2-AG) synthetisiert und in den synaptischen Spalt freigesetzt. Dort aktivieren sie an der Präsynapse (presynaptic neuron) körpereigene Cannabinoidrezeptoren (z.B. CB1), was zu einem negativen Feedbackmechanismus und abnehmender Neurotransmitterfreisetzung durch reduzierte Calciumkonzentration führt (Guzmán, 2003, Velasco et al., 2012).

Interessanterweise wurde entdeckt, dass sowohl CB1- als auch CB2-Rezeptoren häufig in malignen Tumoren überexprimiert werden, ungeachtet dessen, dass CB-Rezeptoren physiologisch ein gewebespezifisches Verteilungsmuster und eine definierte Rezeptordichte im Gewebe aufweisen (Velasco et al., 2016).

Subkohorten von akuten Leukämien exprimieren CB1- und CB2-Rezeptoren in hoher Dichte (Powles et al., 2005). An frisch isolierten Patientenproben und an Zelllinien akuter lymphatischer und myeloischer Leukämien konnte gezeigt werden, dass ein hohes Vorkommen von CB1- und CB2-Rezeptoren eine Grundvoraussetzung für eine potente proapoptotische Antwort bei Behandlung mit THC darstellt. Demgegenüber zeigte sich ein schlechteres Ansprechen auf eine THC-Behandlung bei mononukleären Zellen gesunder Spender und mononukleären Patientenzellen mit niedrigem CB1- und CB2-Vorkommen. Unter Vorbehandlung mit selektiven Antagonisten und inversen Agonisten für die Rezeptoren konnte eine rezeptorabhängige Apoptoseinduktion in den CB1- und CB2-Rezeptor exprimierenden Zelllinien bewiesen werden (Kampa-Schittenhelm et al., 2016).

Während THC eine hohe Affinität zu beiden Rezeptoren aufweist, wird angenommen, dass der Effekt von CBD vor allem über CB2-Rezeptoren und andere, noch nicht entdeckte G-Protein-gekoppelte Rezeptoren erzielt wird (Ramer and Hinz, 2016). Bekannt ist, dass CBD nicht über CB1-Rezeptoren reagiert. Dies wäre für die klinische Nutzung von CBD sinnvoll, um Patienten vor psychoaktiven Nebenwirkungen zu schützen (Pacher et al., 2006).

1.1.2. Pflanzliche Cannabinoide: Phytocannabinoide

Heutzutage sind mehr als 100 natürliche Cannabinoide bekannt. Die Blätter der Hanfpflanze *Cannabis sativa* L. enthalten mindestens 70 Cannabinoide, welche aus Kohlenstoff-, Wasserstoff- und Sauerstoffatomen bestehen (Abb. 2) (Yamaori et al., 2011).

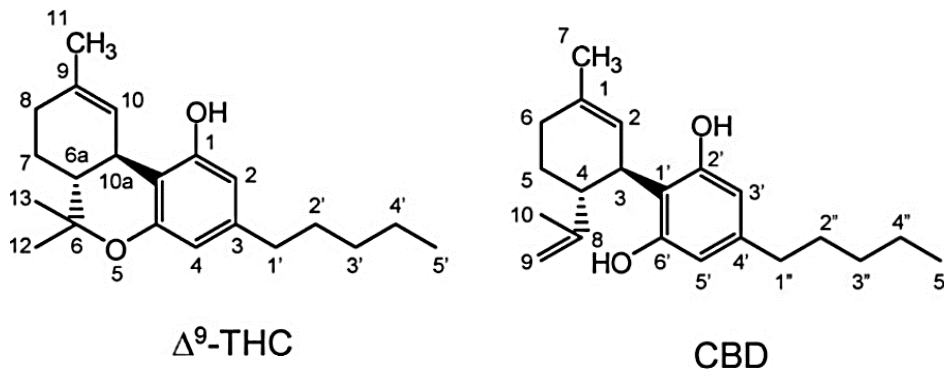


Abb. 2: **Strukturformeln von THC und CBD.** (Yamaori et al., 2011)

Die Hauptbestandteile der Hanfpflanze, welche im Fokus intensiver Forschungen stehen, sind THC und CBD. THC ist eine der wichtigsten Komponenten der Hanfpflanze wegen des reichlichen Vorkommens und der hohen psychoaktiven Wirksamkeit (Gaoni and Mechoulam, 1964). CBD hingegen ist ein nicht-psychoaktives Cannabinoide derivat (Appendino et al., 2011, Mechoulam and Hanuš, 2002). Verschiedene cannabisenthaltende Medizinprodukte sind für den medizinischen Gebrauch zugelassen, wie in den USA z.B. Marinol® (Dronabinol, THC) oder Cesamet®/ Canemes® (Nabilon, vollsynthetisches THC). Eingesetzt werden beide Produkte gegen Kachexie bei AIDS Patienten (Beal et al., 1995) sowie bei Patienten, die während der Chemotherapie an Übelkeit und Erbrechen leiden (Pertwee, 2009). Ein weiteres Produkt ist das in Deutschland zugelassene Sativex® (Nabiximols, THC/CBD im Verhältnis 1:1), welches als Spasmolytikum bei Patienten mit Multipler Sklerose verwendet wird (Vaney et al., 2004).

Da THC und CBD als Hauptkomponenten der Hanfpflanze *Cannabis sativa* L. in klinischen Teilbereichen zugelassen und medizinisch am meisten erforscht sind, wurden sie in dieser Arbeit für Versuche verwendet und deren Wirkungsweise untersucht. Zur Vereinfachung werden im Weiteren die in dieser Arbeit verwendeten Cannabinoide THC und CBD (siehe 2.2) schlicht Cannabinoide genannt.

1.2. Zelluläre Signalwege

Für die zelluläre Proliferation und Viabilität sind zwei CB-Rezeptor-abhängige Signalwege von besonderem Interesse: Der PI3K/AKT- und der MAPK/ERK-Signalweg.

1.2.1. Der PI3K/AKT-Signalweg

Der Phosphatidylinositol-3-Kinase/AKT (PI3K/AKT)-Signalweg ist bei einigen Krebsarten verändert oder überaktiviert. Er reguliert eine Vielzahl zellulärer Prozesse, wie zum Beispiel das Wachstum, das Überleben, die Proliferation und den Metabolismus der Zelle sowie die Angiogenese und Metastasierung (Marte and Downward, 1997), (Ersahin et al., 2015, Manning and Cantley, 2007). AKT ist ein nachgeschalteter Effektor von PI3K (Burgering and Coffey, 1995) und wird durch Cannabinoide beeinflusst (Sánchez et al., 2003). Die Serin/Threonin-Kinase AKT wird auch Proteinkinase B (PKB) genannt und gilt als Protoonkogen (Staal and Hartley, 1988). Durch Phosphorylierung wird AKT vollständig aktiviert. Dafür besitzt es zwei Residuen: Threonin (Thr308) und Serin (Ser473) (Alessi et al., 1996).

Durch Regulationsstörungen des PI3K/AKT-Signalwegs können Krankheiten entstehen (Brugge et al., 2007). Durch die Phosphorylierung und Aktivierung kann AKT viele andere Proteine phosphorylieren und zelluläre Prozesse regulieren (Liu et al., 2009). Daher ist der PI3K/AKT-Signalweg ein wichtiges therapeutisches Ziel für die Behandlung von Krebs, Diabetes (Chen and Raymond, 2008), neurologischen Krankheiten (Chong et al., 2012) und Herz-Kreislaufkrankungen (Aoyagi and Matsui, 2011).

1.2.2. Der MAPK/ERK-Signalweg

Anandamid und THC beeinflussen den Mitogen-Activated Protein Kinase/Extracellular Signal-Regulated Kinase (MAPK/ERK)-Signalweg (Wartmann et al., 1995). Der MAPK/ERK-Signalweg ist assoziiert mit Prozessen der Zellproliferation, Differenzierung, Migration, Seneszenz und Apoptose (Sun et al., 2015). MAPK sind Serin/Threonin-Kinasen. Der MAPK/ERK-Signalweg wird von Integrinen, Rezeptor-Tyrosin-Kinasen und Ionenkanälen (z.B. Calciumionenkanal) aktiviert, die durch extra- und intrazelluläre Faktoren wie Hormone, zelluläre Stressfaktoren, Zytokine und Wachstumsfaktoren stimuliert werden (Kim and Choi, 2010). Durch den Signalweg werden unter anderem die zelluläre Transkription, Zelladhäsion und zytoplasmatische Verankerung beeinflusst (Mendoza et al., 2011).

Änderungen im MAPK/ERK-Signalweg werden mit der Entwicklung von Krankheiten in Verbindung gebracht. Diese umfassen unter anderem Morbus Alzheimer, Morbus Parkinson, Amyotrophe Lateralsklerose (ALS) (Kim and Choi, 2010) und menschliche Tumore (Anjum and Blenis, 2008).

1.3. Themafindung

Beobachtungen in der Klinik legten nahe, dass Cannabinoide einen positiven Effekt auf den Verlauf akuter Leukämien haben. Dies führte dazu, dass das Potential von Cannabinoiden in der Behandlung von akuten Leukämien untersucht wurde. Die Vorarbeit unserer Arbeitsgruppe hat gezeigt, dass THC ein antiproliferatives und proapoptotisches Potential in ex vivo und in vitro Leukämiemodellen besitzt (Kampa-Schittenhelm et al., 2016).

Allerdings ist die klinisch relevante Konzentration hoch und THC besitzt einen starken psychoaktiven Effekt (Gaoni and Mechoulam, 1964). Dies schränkt den klinischen Einsatz von THC ein.

Ziel dieser Arbeit war es deshalb, die antileukämische Wirkung vom nicht-psychoaktiven Cannabisderivat CBD im Hinblick auf dessen proapoptotische Kapazität (McKallip et al., 2006), (Gallily et al., 2003), (Massi et al., 2006) und Wirkungsmechanismus im Vergleich zu THC zu untersuchen. Dies wurde mit in vitro Modellen untersucht, sowohl an AML- und ALL-Leukämiezelllinien als auch an Primärzellen akuter Leukämien.

Des Weiteren wurde THC mit CBD im Verhältnis 1:1 kombiniert, um den möglichen Einsatz vom etablierten Therapeutikum Sativex mit einem THC/CBD Verhältnis von 1:1 für den potenziellen Einsatz in akuten Leukämien zu untersuchen. Die Versuche sollten zeigen, ob durch Zugabe von CBD zu THC die Dosis des psychoaktiven THCs reduziert werden könnte, bei Erhalt oder sogar Steigerung des proapoptotischen Effekts.

1.4. Ethische Grundlagen, Datenschutz und S2 Berechtigung

Patientenproben werden im Rahmen der Routinediagnostik und mit dem Einverständnis der Patienten nach deren schriftlicher Aufklärung gewonnen (genehmigt durch die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät Tübingen, Projektnummer 405/2006BO2). Dasselbe gilt für die Probengewinnung von gesundem Spendermaterial. Das Labor ist für diese Arbeiten ausgewiesen.

2. Material

2.1. Verbrauchsmaterial

Well-Platten (Corning® CellBIND® 6-/ 12-well plates)	Corning
Elektrophoresegel (Criterion™ XT Precast Gel 10%-Bis-Tris)	Bio-Rad
Eppendorf Tubes®	Eppendorf
FACS-Röhrchen (BD Falcon™ Round-Bottom Tubes)	BD Falcon
Falcon-Röhrchen (15 ml, 50 ml; BD Falcon™ Conical Tubes)	BD Falcon
Filterpapier (Criterion Blotter Filter paper, 9,5 x 15,2 cm)	Bio-Rad
Handschuhe (unsteril)	Kimberly-Clark
Kryoröhrchen (CryoTube™ Vials)	Thermo Fisher
Nitrozellulose Membran (Amersham Protran 0.2 NC)	GE Healthcare
Pipettenspitzen (10 µl, 100 µl, 1000 µl)	Eppendorf
Zellkulturflaschen	BD Falcon

2.2. Substanzen

Mit Erlaubnis der Bundesopiumstelle des Bundesinstituts für Arzneimittel und Medizinprodukte (BfArM) wurde Dronabinol (Δ^9 -Tetrahydrocannabinol, THC), gelöst in Methanol (1mg/ml), von der THC Pharm (Frankfurt/ Main, Deutschland) bezogen (BtM Nummer 4582772).

Die CBD Lösung wurde bei Sigma-Aldrich erworben und als zertifiziertes analytisches Standardreagenz verwendet.

2.3. Laborgeräte

Absaugsystem mit integrierter Vakuumpumpe	Integra
CO ₂ -Brutschrank (HeraCell 240i CO ₂)	Thermo Fisher
Elektrophoresekammer (Criterion™ Cell)	Bio-Rad
FACS Calibur	Becton Dickinson
Heizblock (neoBlock Heizer Mono 1)	neoLab Migge
LI-COR Odyssey® Fluorescence Optical System	LI-COR®
Microplate Reader Magellan Sunrise	Tecan
Mikroskop (Wilovert S)	Helmut Hund
Pipetten (verstellbar 10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl)	Eppendorf
Pipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml)	BD Falcon
Pipetting Controller (Pipetboy/-girl)	Integra
Reinstwassersystem GenPur (TKA)	Thermo Fisher
Schütteltisch	GFL
Sicherheitswerkbank (HERAsafe)	Heraeus
Spannungsgerät (PowerPac™)	Bio-Rad
Transferkammer (Criterion™ Blotter)	Bio-Rad
Wasserbad	Köttermann
Vortex-Mixer (Genie 2)	Scientific Industries
Zentrifuge Varifuge 3.0 RS	Heraeus
Zentrifuge 5415 R	Eppendorf

2.4. Chemikalien

Albumin Fraktion V, proteasefrei	Carl Roth
Annexin V (Fluoresceinisothiocyanat FITC)	Becton Dickinson
Aprotinin	Roche
Biocoll	Biochrom/ Millipore
β -Glycerophosphat (50 mM)	Sigma-Aldrich
Calcium-Chlorid (CaCl ₂)	Thermo Fisher
Calcium Chloride Reagent	Thermo Fisher
CBD	Sigma-Aldrich
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Finnzymes
Dulbecco's MEM (DMEM)	Biochrom/ Millipore
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	Sigma-Aldrich
Fetales Kälberserum (fetal bovine serum FBS) (Cat: FBS-11A, Lot: CP14-1094)	Capricorn
Fetales Kälberserum (fetal bovine serum FBS) (CH 3016003, CNK 0055)	HyClone
Glycin (24.10.2013)	Sigma-Aldrich
Leupeptin	Roche
MEM Non-Essential Amino Acids Solution	Thermo Fisher
Methanol (AnalaR NORMAPUR® ACS)	BDH Prolabo
Natrium-Fluorid (0,5 M) (1,05 g + 50 ml H ₂ O)	Sigma-Aldrich
Natrium-Orthovanadat (1,84 g + 50 ml H ₂ O)	Sigma-Aldrich
Natrium-Pyruvat	Thermo Fisher Scientific
Nicht-essenzielle Aminosäuren (NEAA)	Biochrom
PageRuler™ + Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific
PBS pH 7,4 (10x)	Thermo Fisher Scientific
Pefabloc® SC	Roche
Penicillin/Streptomycin (10000 µg/ml)	Biochrom/ Millipore
Pepstatin	Roche
Phenazin Methosulfat (ECR)	Sigma-Aldrich
Phosphatase Inhibitor Cocktail II	Sigma-Aldrich

PP1 ≥98% (HPLC) in 500 µl DMSO	Sigma-Aldrich
Propidium-Iodid	Thermo Fisher
Protease Inhibitor Cocktail for use	BDH Prolabo
Proteom Profiler Humane Phospho Kinase Array Kit	R and D Systems
Bradford Reagens (Bio-Rad Protein Assay)	Bio-Rad
Restore Western Blot Stripping Buffer	Thermo Fisher
Rinder-Serumalbumin (bovine serum albumin BSA)	Carl Roth
RIPA Buffer	Sigma-Aldrich
RPMI 1640 Medium	Thermo Fisher
THC	THC Pharm
Trizma® base	Sigma-Aldrich
Trypsin/EDTA	Biochrom/ Millipore
Tween 20 (Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat)	Carl Roth
XT MOPS Running Buffer	Bio-Rad
XT Reducing Agent (30% TCEP, 10% NaCl in H ₂ O)	Bio-Rad
XT Sample Buffer	Bio-Rad
XT Tricine Running Buffer	Bio-Rad

2.5. Zelllinien

HL-60	Humane akute myeloische Leukämie; FAB M2 (Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen)
Jurkat	Humane akute T-Zell Leukämie (CLS Cell Line Service GmbH)
MOLM13	Humane akute myeloische Leukämie; sekundäre AML aus MDS; FAB M5a (Prof. Dr. Heinrich, Oregon Health and Science University, Portland, OR)
MOLM14	Humane akute myeloische Leukämie; sekundäre AML aus MDS; FAB M5a (Prof. Dr. Heinrich, Oregon Health and Science University, Portland, OR)

2.6. Patientenproben

Es wurden Knochenmarksaspirate und Proben aus peripherem Blut von insgesamt 12 Patienten mit einer akuten Leukämie untersucht. Es lag von jedem Patienten das schriftliche Einverständnis zur Konservierung von Zellmaterial und zur Verwendung dessen für wissenschaftliche Zwecke vor. Ebenfalls lag ein positives Votum der Ethikkommission der medizinischen Fakultät Tübingen vor (Projektnummer: 405/2006BO2). Für die untersuchten Proben wurden die individuellen Daten zur Auswertung geordnet und aufgelistet (Tab. 1).

Tab. 1: **Untersuchte Patientenproben.**

Überblick über die untersuchten extrahierten mononukleären Patientenzellen aus peripherem Blut. Abkürzungen: AML=akute myeloische Leukämie, AUL=akute undifferenzierte Leukämie, ED= Erstdiagnose, EL=Exitus letalis, FAB= Französisch-Amerikanisch-Britische Klassifikation, MDS= Myelodysplastisches Syndrom, Pat=Patient, PMF=Primäre Myelofibrose, sAML= sekundäre akute myeloische Leukämie.

Patient	♀/♂	Alter bei ED	Entität (FAB)	ED + EL	Probe: ED/ Rezidiv
Pat 1	♂	52	AML (M0)	ED 01/16	ED
Pat 2	♂	77	AML	ED 12/16	ED
Pat 3	♂	51	AML (M2)	ED 07/16	ED
Pat 4	♂	62	AML (M0)	ED 01/16, EL 02/16	ED
Pat 5	♂	63	sAML aus PMF (M5)	ED 04/16, EL 04/16	ED
Pat 6	♂	63	sAML aus MDS	ED 11/14, EL 06/16	Rezidiv
Pat 7	♂	36	AML(M4eo)	ED 08/16	ED
Pat 8	♂	21	AUL	ED 07/15, EL 05/16	Rezidiv
Pat 9	♂	59	sAML aus PMF	ED 08/16, EL 12/16	ED
Pat 10	♂	75	AML (M5)	ED 12/16	ED
Pat 11	♀	67	AML (M4)	ED 04/16, EL 05/16	ED
Pat 12	♀	58	AML (M5)	ED 11/16	ED

2.7. Antikörper

2.7.1. Primärantikörper

(1:1000 in BSA-Lösung)

Phospho-AKT (Ser473), Polyklonal (Hase)	Cell Signaling	60 kDa
Phospho-AKT (Thr308), Polyklonal (Hase)	Cell Signaling	60 kDa
Phospho-p70 S6 Kinase, Monoklonal (Hase)	Cell Signaling	70 kDa
ppERK, Polyklonal (Hase)	Cell Signaling	42/44 kDa

2.7.2. Ladekontrolle

(Verdünnung 1:1000 in BSA-Lösung)

α -Tubulin, Monoklonal (Maus)	Cell Signaling	52 kDa
β -Actin, Monoklonal (Maus)	Cell Signaling	45 kDa

2.7.3. Sekundärantikörper

(1:10 000 in Waschpuffer)

Goat anti-Rabbit IRDye 800CW	LI-Cor®
Goat anti-Mouse IRDye 680RD	LI-Cor®
Goat anti-Mouse IRDye 800CW	LI-Cor®

2.8. Puffer und Lösungen

2.8.1. Färbelösung für Apoptose

A.d. (90%)	93% (v/v)
+ Annexin V Binding Buffer (10x) (10%)	
Annexin FITC oder APC	2% (v/v)
PI	5% (v/v)

2.8.2. Lysepuffer für Western Blot

(auf Eis)

Ripa Buffer	90% (v/v)
β -Glycerophosphat (50 mM)	5% (v/v)
PP1	1% (v/v)
Phosphatase Inhibitor Cocktail II	1% (v/v)
Natrium Orthovanadat	
Natrium Molybdat	
Natrium Tartrat	
Imidazol	
Protease Inhibitor Cocktail for use	1% (v/v)
AEBSF und Aprotinin	
Bestatin	
E-64	
Leupeptin	
Pepstatin A	
Natrium-Fluorid (0,5 M)	1% (v/v)
Natrium-Orthovanadat (0,2 M)	0,5% (v/v)
Aprotinin	0,1% (v/v)
Leupeptin	0,1% (v/v)
Pefabloc	0,1% (v/v)
Pepstatin	0,1% (v/v)

2.8.3. Bradford Albumin-Standardlösung

(1 mg/ml)

A.d.	90% (v/v)
BSA	10% (v/v)

2.8.4. Bradford Reagens

A.d.	75% (v/v)
Bio-Rad Protein Assay	25% (v/v)

2.8.5. SDS-PAGE Detergens

XT-Sample-Buffer (4x)	83% (v/v)
XT-Reducing-Agent	17% (v/v)

2.8.6. Laufpuffer für Gelelektrophorese

A.d.	95% (v/v)
MOPS Running Buffer	5% (v/v)

2.8.7. Transferpuffer für Transferzelle (pH 8,3)

Glycin	129,6 g
Tris	27 g
Methanol 20% (v/v)	1800 ml
A.d.	7200 ml

2.8.8. TBS-Waschpuffer

Tween®	0,2% (v/v)
PBS (10x)	10% (v/v)
A.d.	~90% (v/v)

2.8.9. BSA-Lösung

TBS-Waschpuffer	90% (v/v)
Albuminfraktion (BSA)	10% (m/v)

2.9. Medium

2.9.1. Nährmedium für Zellkulturen

RPMI	87% (v/v)
FBS	10% (v/v)
Penicillin/Streptomycin	1% (v/v)
NEAA	1% (v/v)
Natrium-Pyruvat	1% (v/v)

2.9.2. Nährmedium für Patientenzellkulturen

DMEM	87% (v/v)
FBS	10% (v/v)
Penicillin/Streptomycin	1% (v/v)
NEAA	1% (v/v)
Natrium-Pyruvat	1% (v/v)

2.9.3. Einfriermedium

RPMI/DMEM	50% (v/v)
FBS	40% (v/v)
DMSO	10% (v/v)

2.10. Verwendete Software

CellQuest® Analyse Software (FACS)	BD
Magellan™ 6.0 - Data Analysis Software	Tecan
Microsoft Office 2007, 2010, 2016, 356	Microsoft Corporation
LI-COR® Imaging detection System	LI-COR®
GraphPad Prism 7 Software	GraphPad Software
Quick Calcs (Ungepaarter t-Test)	GraphPad Software
Quick Calcs (Compute EC _{anything} from EC ₅₀)	GraphPad Software

2.11. Standorte der Herstellerfirmen

AppliChem GmbH	D-64291 Darmstadt
Corning	Corning, New York, USA
Carl Roth GmbH & Co KG	D- 76185 Karlsruhe
Becton Dickinson Biosciences	Franklin Lakes, New Jersey, USA
Bio-Rad Laboratories GmbH	D- 80939 München
Dynatech Laboratories Inc.	Alexandria, Virginia, USA
Eppendorf AG	D-22339 Hamburg
GE (General Electric)	Boston, Massachusetts, USA
Gesellschaft für Labortechnik mbH	D- 30927 Burgwedel
Gibco	Grand Island, NY, USA
GraphPad Software	La Jolla, Californien, USA
Helmut Hund Gmb	D-35580 Wetzlar
Heraeus Holding GmbH	D-63450 Hanau
INTEGRA Biosciences GmbH	D-35444 Biebertal
Köttermann GmbH & Co KG	D-31311 Uetze/Hänigsen
LI-COR® Biosciences	Lincoln, Nebraska, USA
Microsoft Corporation	Redmond, Washington, USA
Merck KGaA (Biochrom/ Millipore, Sigma-Aldrich)	D-64293 Darmstadt
neoFroxx GmbH	D- 64683 Einhausen
neoLab Migge GmbH	D-69123 Heidelberg
Nordic-MUbio	6114 BC, Susteren, Niederlande
Olympus Corporation	Center Valley, Pennsylvania, USA
Tecan Group	8708 Männedorf, Schweiz
THC Pharm	D- 60599 Frankfurt/ Main
Thermo Fisher Scientific (Finnzymes)	Waltham, Massachusetts, USA
Roche Holding AG	4000 Basel, Schweiz
VWR International (BDH Prolabo)	Radnor, Pennsylvania, USA
Scientific Industries, Inc.	Bohemia, New York, USA
INTEGRA Biosciences GmbH	D-35444 Biebertal

3. Methoden

3.1. Zellkulturen

Alle Zelllinien wurden in 10 ml RPMI 1640-Medium (siehe 2.9.1) kulturiert. Für die Patientenzellen wurde DMEM-Medium (siehe 2.9.2) verwendet. Die Zellkulturen wurden jeweils bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. In Abhängigkeit von der Proliferationsgeschwindigkeit wurden die Zelllinien ca. alle 48 h im Verhältnis 1:10 - 1:15 passagiert. Für die jeweiligen Experimente wurden resuspendierte Zellen genutzt, welche sich in der exponentiellen Wachstumsphase befanden.

3.2. Kryokonservierung und Auftauen von Zellen

Die Zellkonservierung wurde in Kryoröhrchen mit Konservierungsmedium in einem Kryokonservierungscontainer vorgenommen. Dafür wurden die Zellen pelletiert und in Konservierungsmedium resuspendiert. Über 24 h wurden die Kryoröhrchen im Kryokonservierungscontainer (NUNC-Einfrierbox) auf -80 °C heruntergekühlt und bei -80 °C gelagert. Zum Auftauen der Zellen wurden die Kryoröhrchen schnell aufgetaut und in Kulturmedium überführt.

3.3. Isolation mononukleärer Zellen

Knochenmarksaspirate und Proben von peripherem Blut von gesunden Knochenmarkspendern und von Patienten mit diagnostizierter akuter Leukämie wurden in 5000 U Heparin gesammelt. Die mononukleären Zellen wurden mit Hilfe der Ficoll Hypaque density gradient fractionation isoliert (Ferrante and Thong, 1978).

3.4. Apoptoseassay und Viabilitätsanalyse

3.4.1. Apoptoseassay

Die Apoptose wurde mit dem Annexin V/PI basierten Assay und einem FACScalibur® Durchflusszytometer gemessen (Schutte et al., 1998). Nach Inkubation der Zellen für 24 h bzw. 48 h mit den jeweiligen Substanzen (THC, CBD, THC/CBD) mit den gewünschten Konzentrationen wurden die Zellen pelletiert und für ca. 30 min mit Annexin V FITC und PI gemäß den Herstellerangaben gefärbt. Danach wurde die Messung am FACScalibur® Durchflusszytometer durchgeführt. Die Messung wurde mit der CellQuest® Analyse Software ausgewertet. Die Messung der Apoptose beruht auf der Translokation von Phosphatidylserin von der inneren zur äußeren Membranschicht der Lipiddoppelmembran, was als früher Indikator der Apoptose dient. Annexin V lagert sich an das Phosphatidylserin der äußeren Membranschicht an und kann mit einem fluoreszierenden Farbstoff gekoppelt und in der Durchflusszytometrie gemessen werden. PI kann nicht die Zellmembran gesunder oder früh apoptotischer Zellen passieren.

Frühapoptotische Zellen werden im Analysefenster im Vorwärtsstreulicht (FSC) als Annexin V positiv und im Seitwärtsstreulicht (SSC) PI negativ angezeigt. Spätapoptotische Zellen verlieren die Integrität ihrer Zellmembran, weshalb bei diesen PI in die Zelle eindringen kann und an die DNA bindet (Rysavy et al., 2014). Sie sind im Graphen sowohl Annexin V als auch PI positiv. Nekrotische bzw. tote Zellen können bei der Auswertung ausgeschlossen werden. Im Graphen stellen sie sich als Annexin V negativ und PI positiv dar. Lebende Zellen sind sowohl für Annexin V als auch PI negativ, so dass hier auf den Anteil viabler Patientenzellen nach einer Cannabinoidbehandlung rückgeschlossen werden kann.

3.4.2. Viabilitätsanalyse zur Detektion leukämischer Populationen

Mit Hilfe des Annexin V/PI basierten Assays, welches durch unsere Arbeitsgruppe etabliert wurde, konnte in der Durchflusszytometrie die Reduktion der Anzahl viabler Blasten gemessen werden, als Maß für den antileukämischen Effekt der Cannabinoide (Salitzky, 2017).

3.5. Proteinanalyse

3.5.1. Zelllysate

Um bestimmte Proteine identifizieren zu können, wurden aus unbehandelten und aus mit THC bzw. CBD behandelten Zellen Zelllysate hergestellt, um die Proteine in der Gelelektrophorese auftrennen zu können.

Um die Zellen von der Suspension zu trennen und diese danach zu lysieren, wurde die Zellsuspension zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Zellpellet in 60-100 µl Lysepuffer (siehe 2.8.2) resuspendiert. Das Zellpellet-Lysepuffer-Gemisch wurde alle 5 min gevortext und insgesamt für 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden durch gekühlte Zentrifugation mit 13200 rpm übrige Zellbestandteile vom proteinreichen Überstand getrennt. Die gewonnenen Proteine im Überstand wurden bei -20 °C gelagert.

3.5.2. Bestimmung der Proteinkonzentration

Durch die Bradford-Messung konnten die Proteinkonzentrationen der Zelllysate bestimmt werden. Im Vergleich zur Bradford Albumin Standardlösung (siehe 2.8.3) wurden aus den zu analysierenden Lysaten deren genaue Proteinkonzentrationen abgeleitet. Von den Proteinlysaten wurde 1 µl in 50 µl a.d. gegeben. Anschließend wurde in jedes Well der Lochplatte 150 µl Bradford-Reagenz (Coomassie brilliant blue G-250, siehe 2.8.4) zur Färbung gegeben und für 10-60 min inkubiert. Die Menge der Farbstoffabsorption wurde mittels eines ELISA Readers bei 450 nm gemessen. Die Absorption korrelierte dabei linear mit der Proteinmenge der gemessenen Lösung (Ernst and Zor, 2010).

3.5.3. Gelelektrophorese: SDS-PAGE

Anhand der gemessenen Proteinkonzentration wurden die Anteile des Proteinlysats berechnet, die für die Gelelektrophorese benötigt wurden und entsprechend mit a.d. verdünnt. Für die Proteindenaturierung wurde das Reduktionsmittel SDS-PAGE Detergens (siehe 2.8.5) zu jeder Protein-a.d.-Lösung gegeben und bei ca. 95 °C für 5-10 min inkubiert. Anschließend wurde für die Proteinauftrennung die SDS-PAGE in 10%-Polyacrylamidgel (System von BioRad Criterion) verwendet.

In die mit Laufpuffer (siehe 2.8.6) gefüllte Elektrophoresekammer wurde das XT Criterion Precastgel nach Herstellerangaben (BioRad) eingesetzt. In die vorgefertigten Taschen des Gels wurden 100 µg Protein/Probe pipettiert. Es wurde für 40-60 min eine Spannung von 200 V angelegt.

Die durch die SDS-PAGE negativ geladenen Moleküle migrierten durch das Gel in Richtung der Anode, wobei kleinere Proteine leichter und schneller und weiter durch die Gelmaschen migrierten als die größeren, die eher zurückgehalten wurden. Parallel zu den Proteinproben wurde ein Proteingrößenmarker zur späteren Identifikation der Proteingrößen im Gel benutzt (Brunelle and Green, 2014).

3.5.4. Western Blot

Die aufgetrennten Proteine wurden gemäß den Herstellerangaben (BioRad) in der Transferzelle mit gekühltem Transferpuffer (siehe 2.8.7) auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Dies dauerte 30 min und wurde bei 4 °C im elektrischen Feld bei 100 V durchgeführt. Damit wurden die Proteine fixiert und konnten detektiert und quantifiziert werden. Freie Proteinbindungsstellen wurden durch einstündige Inkubation der Nitrozellulosemembran in BSA-Lösung blockiert. Zum Detektieren der Proteine wurde die Membran für 1 h oder über Nacht bei 4 °C mit dem jeweiligen Primärantikörper (siehe 2.7.1) auf einem Schwenktisch inkubiert. Nach 4 Waschgängen für jeweils 10 min mit TBS-Waschpuffer (siehe 2.8.8) wurde die Membran für 1 h mit einem kompatiblen fluoreszierenden Sekundärantikörper (siehe 2.7.3) im Dunkeln inkubiert, um die gebundenen Primärantikörper sichtbar zu machen. Nach erneutem Waschen (s.o.) konnten antikörperreaktive Proteine mit dem LI-COR Odyssey® System Fluoreszenzmesser visualisiert werden. Die Bestimmung der molekularen Größe der sichtbaren Proteinbanden erfolgte durch den Vergleich mit den Banden des Proteingrößenmarkers. Als Ladekontrolle wurden zusätzlich Antikörper gegen α -Tubulin und β -Actin verwendet und die Membran für 1 h inkubiert (siehe 2.7.2). Nach den Waschschritten (s.o.) inkubierte die Membran mit dem entsprechenden Sekundärantikörpern für die Ladekontrolle für 1h mit anschließenden Waschvorgängen (s.o.). Auch hier erfolgte die Visualisierung der Ladekontrollproteine mit dem LI-COR Odyssey® System Fluoreszenzmesser.

3.5.5. Strippen der Membran

Um auf der gleichen Membran weitere Proteine mit neuen Primärantikörper zu detektieren, wurden die Membranen gestrippt. Dafür wurden 50 ml des Stripping Buffers auf 60 °C erhitzt und für 15 min auf die Membran gegeben und auf einem Schwenktisch inkubiert. Danach wurde die Membran mit Waschpuffer einmal gewaschen und anschließend für 1 h mit BSA-Lösung blockiert. Die folgenden Inkubationsschritte mit Antikörpern erfolgten wie oben beschrieben.

3.6. Proteom Profiler Human Phospho-Kinase Array Kit

Zur Bestimmung von Phosphorylierungsänderungen von Proteinen in Jurkat Zellen unter THC-Behandlung wurden die Zellen für 90 min mit 80 µM THC behandelt. Danach wurde das Human Phospho-Kinase Array (R and D Systems) gemäß den Herstellerangaben durchgeführt. Die Membranen wurden für 1 h mit dem fluoreszierenden Sekundärantikörper anti-Rabbit AK 800CW auf einem Schwenktisch im Dunkeln inkubiert und anschließend 4-mal für jeweils 10 min mit TBS-Waschpuffer gewaschen. Visualisiert wurden die Phosphorylierungsunterschiede mit Hilfe des LI-COR Odyssey® System Fluoreszenzmessers.

3.7. Statistische Auswertung

Die Berechnung der Signifikanzen in 4.1 erfolgte mit einem ungepaarten t-Test. Die Graphen wurden mit Hilfe der oben genannten Software erstellt und eine nicht-lineare Regression durchgeführt. Dadurch ergab sich der IC₅₀-Wert. Die IC₇₀- und IC₉₀-Werte wurden anschließend mit Hilfe des Steigungsfaktors (Slope factor) und der EC₅₀ berechnet.

Die Grafiken aus 4.2 mit den gruppiert angeordneten Donoren- und Patientenzellen wurde ebenfalls mit der oben genannten Software erstellt. Der Mittelwert, markiert mit einem Querstrich, wurde durch das Programm aus den jeweiligen Werten berechnet und automatisch eingefügt.

4. Ergebnisse

4.1. Apoptose in Leukämiezelllinien durch Cannabinoide

Vorversuche unserer Arbeitsgruppe zeigten in Leukämiezelllinien eine Apoptoseinduktion durch eine THC-Behandlung (Salitzky, 2017, Kampa-Schittenhelm et al., 2016). Andere Studien sahen bei Beobachtung einzelner Zellen, die mit Cannabinoiden behandelt waren, unter dem Lichtmikroskop Hinweise für Apoptose. Die mononukleären Zellen wurden kleiner und unförmig, mit einem kleinen dichten Zellkern und zunehmender Bläschenbildung im Zytosol (Kerr et al., 1972).

Diese Beobachtungen gaben den Anlass dazu, Leukämiezelllinien mit verschiedenen Cannabinoiden zu behandeln, um mögliche Unterschiede in deren Apoptoseinduktion zu erkennen. Daher wurde in dieser Arbeit die zelluläre Apoptoseinduktion unter THC-, CBD- und THC/CBD-Behandlung untersucht und miteinander verglichen. Es sollte gezeigt werden, ob CBD oder THC/CBD eine vergleichbare oder sogar stärkere Apoptoseinduktion im Vergleich zu THC in Leukämiezelllinien aufwiesen.

Für die Apoptosemessung wurden die Zelllinien Jurkat, MOLM13, MOLM14 und HL-60 verwendet und mit unterschiedlichen Konzentrationen von THC, CBD oder THC/CBD behandelt. Nach 48 h konnten die Zellen mit Hilfe des Annexin V/PI basierten Assays und der Durchflusszytometrie auf das Ausmaß der Apoptoseinduktion untersucht werden (nähere Erklärung zur Methode in 3.4).

Neben den MOLM13 Zellen wurde auch die Schwesterzelllinie MOLM14 benutzt. Beide Zelllinien entstammen demselben Patienten und besitzen viele Gemeinsamkeiten. Beide Zelllinien zeigen aber auch signifikante Unterschiede in ihrer Antigenexpression (Cluster of Differentiation), was zu Sensitivitätsunterschieden von Cannabinoiden beitragen kann (vgl. hierzu Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe, zusammengefasst von Salitzky, 2017 und Kampa-Schittenhelm et al.,

2016). Daher wurde der apoptotische Effekt von Cannabinoiden an beiden Schwesterzelllinien untersucht.

Für jede untersuchte Zelllinie wurden die Apoptosewerte gemessen und tabellarisch mit der jeweiligen Standardabweichung aufgeführt.

Anschließend wurden mit Hilfe eines ungepaarten t-Tests Signifikanzen zwischen den Werten berechnet.

Zusätzlich wurden die gemessenen Apoptosewerte mit der Standardabweichung im Grafikprogramm aufgetragen und mit Hilfe einer nichtlinearen Regression die IC_{50} -, IC_{70} - und IC_{90} -Werte rechnerisch ermittelt. Teilweise ergaben sich durch das Grafikprogramm bei den rechnerisch ermittelten Ergebnissen extrapolierte IC_{90} -Werte.

4.1.1. Apoptose der Jurkat Zellen durch THC und CBD

Unter Cannabinoidbehandlung zeigten die Jurkat Zellen nach 48 h konzentrationsabhängig einen steigenden Anteil apoptotischer Zellen, welcher sich in der Durchflusszytometrie darstellen ließ (Abb. 3).

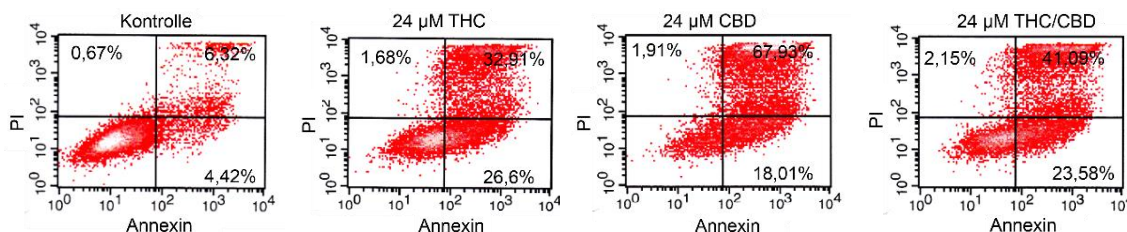


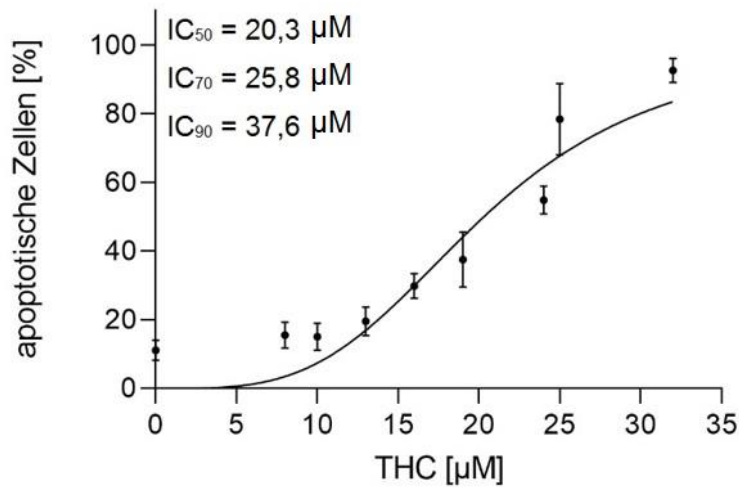
Abb. 3: **Apoptoseinduktion in Jurkat Zellen nach 48 h.**

Die Jurkat Zellen wurde mit verschiedenen Konzentrationen THC, CBD oder THC/CBD für 48 h inkubiert. Gefärbt wurden die Zellen mit Annexin V/PI. Am Durchflusszytometer wurde die Apoptoserate bestimmt. Abgebildet ist exemplarisch ein Dotplot-Diagramm für jedes Cannabinoid [24 µM]. Die in den Quadranten angegebenen Prozentzahlen sind die anteilig gezählten Zellen.

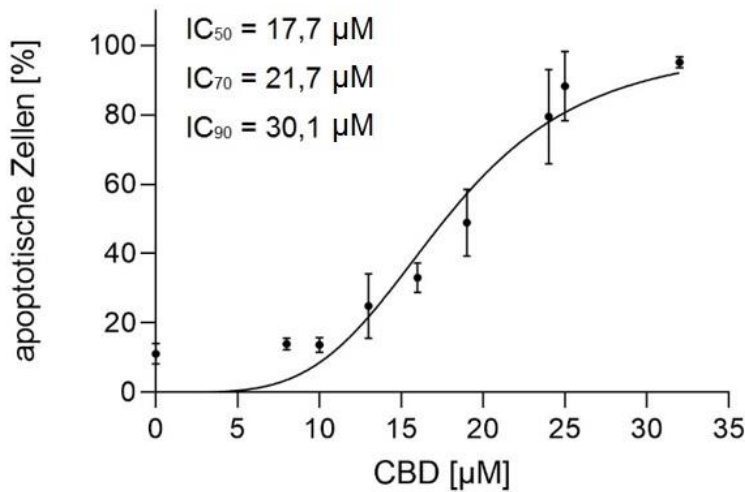
Die konzentrationsabhängige Zunahme der Anzahl apoptotischer Zellen war im direkten Vergleich der jeweiligen Cannabinoide unterschiedlich stark. Dies zeigte sich vor allem bei höheren Konzentrationen, die teilweise mit hohen Standardabweichungen einhergingen. Berechnete Signifikanzen zwischen den Apoptosewerten der jeweiligen Cannabinoide ergaben sich bei 16 µM und 24 µM.

Unter CBD-Behandlung zeigte sich eine tendenziell höhere Reduktion in der Anzahl viabler Jurkat Zellen als unter THC- oder THC/CBD-Behandlung. So wurde nach 48 h unter Einsatz von 24 µM CBD ein signifikant höherer Anteil apoptotischer Zellen gemessen als unter Behandlung mit 24 µM THC oder THC/CBD. Weiter zeigte eine CBD-Behandlung signifikant höhere Werte für anteilig apoptotische Zellen im Vergleich zu einer THC/CBD-Behandlung. So beispielsweise unter Zugabe von 16 µM (Abb. 4, Tab. 3, Tab. 4).

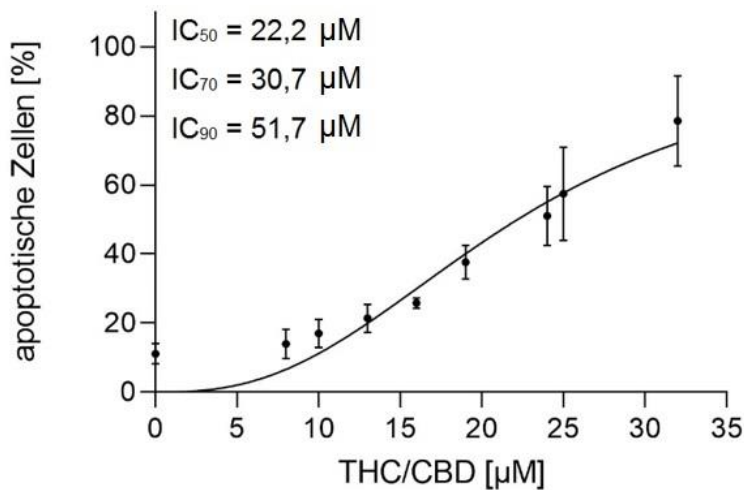
Durch nichtlineare Regression konnten die IC₅₀-, IC₇₀- und IC₉₀-Werte ermittelt werden. Allerdings ergab sich bei THC und THC/CBD ein extrapoliertes IC₉₀-Wert (Tab. 2). Die Werte veranschaulichen das oben beschriebene Ergebnis: die ermittelten IC-Werte bei CBD sind jeweils geringer als die von THC oder THC/CBD. Die durch THC-Behandlung ermittelten IC-Werten sind jeweils kleiner als die von THC/CBD.



[A]



[B]



[C]

Abb. 4: **Apoptoseinduktion in Jurkat Zellen nach 48 h.**

Die nach 48 h gemessenen Apoptosewerte für THC [A], CBD [B] und THC/CBD [C] wurden normalisiert und mit der Standardabweichung aufgetragen. Die IC_{50} -, IC_{70} - und IC_{90} -Werte der Jurkat Zellen wurde mit Hilfe einer nichtlinearen Regression ermittelt und zum Teil extrapoliert.

Tab. 2: **Die IC₅₀-, IC₇₀- und IC₉₀-Werte der Jurkat Zellen.**

Mit Hilfe nichtlinearer Regression wurden rechnerisch die IC₅₀-, IC₇₀- und IC₉₀-Werte ermittelt.

	THC	CBD	THC/CBD
IC ₅₀ [µM]	20,3	17,7	22,2
IC ₇₀ [µM]	25,8	21,7	30,7
IC ₉₀ [µM]	37,6	30,1	51,7

Tab. 3: **Apoptosewerte der Jurkat Zellen nach 48 h Cannabinoid-Behandlung.**

Abkürzungen: Konz.= Konzentration der eingesetzten Cannabinoide, M [%] = Mittelwert der apoptotischen Zellen in %, SD = berechnete Standardabweichung, N=Anzahl der Versuchsansätze für die jeweilige gemessene Konzentration nach 48 h zur Bildung des Mittelwerts.

Konz.	THC			CBD			THC/CBD		
	M [%]	SD	N	M [%]	SD	N	M [%]	SD	N
0 µM	11,1	3	6	11,1	3	6	11,1	3	6
8 µM	15,5	3,8	2	14	1,7	4	14	4,2	3
16 µM	29,8	3,6	4	33	4,3	3	25,8	1,5	3
24 µM	54,9	4,1	4	79,4	13,6	4	51	8,5	5
32 µM	92,6	3,5	3	95,1	1,6	3	78,5	13	5

Tab. 4: **P-Werte und Signifikanzen der Apoptoseinduktion in Jurkat Zellen.**

Zwischen den berechneten Mittelwerten der apoptotischen Zellen unter Cannabinoidbehandlung wurden die p-Werte berechnet, um vorhandene Signifikanzen zu erkennen.

	p-Werte	Signifikant	p-Werte	Signifikant	p-Werte	Signifikant
	THC-CBD		CBD-THC/CBD		THC-THC/CBD	
8 µM	0.5166	-	1	-	0.7155	-
16 µM	0.3315	-	0.0510	✓	0.1312	-
24 µM	0.0138	✓	0.0063	✓	0.4339	-
32 µM	0.3049	-	0.0767	-	0.1295	-

4.1.2. Apoptose der MOLM13 Zellen durch Cannabinoide

Bei Behandlung der AML Leukämiezelllinie MOLM13 war im Durchflusszytometer mit steigender Konzentration der Cannabinoide eine Zunahme der Annexin V und PI positiven Zellen erkennbar (Abb. 5).

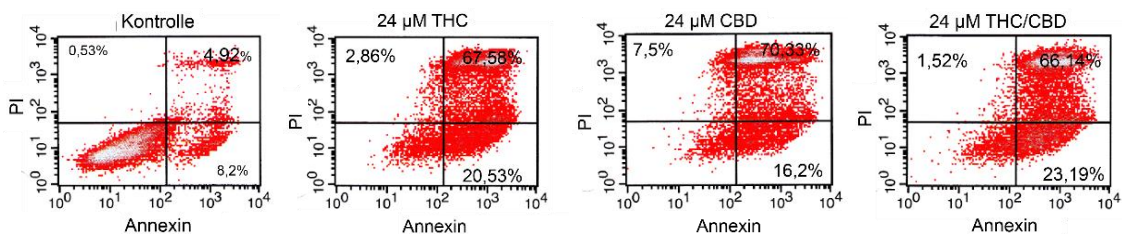


Abb. 5: Apoptoseinduktion in MOLM13 Zellen nach 48 h.

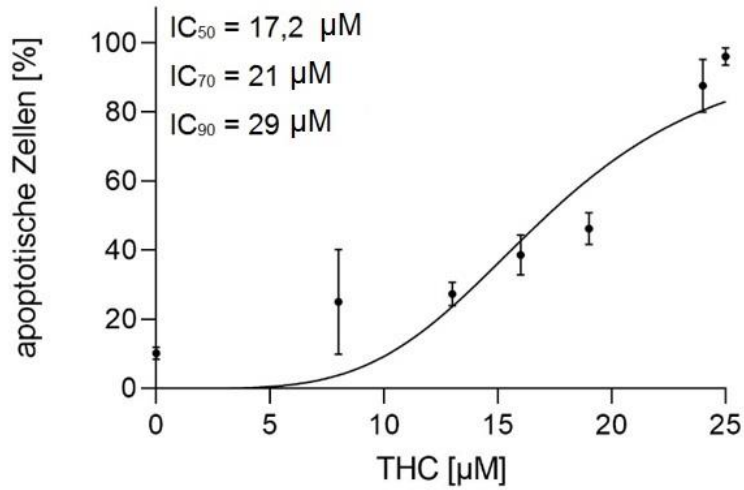
Die AML Leukämiezelllinie MOLM13 wurde für 48 h mit verschiedenen Konzentrationen THC, CBD oder THC/CBD inkubiert. Nach Färbung mit Annexin V/PI konnte durchflusszytometrisch die Apoptoserate der Zellen ermittelt werden. Dargestellt ist exemplarisch für jedes Cannabinoid [24 µM] ein Dotplot-Diagramm. Die in den Quadranten angegebenen Prozentzahlen sind die anteilig gezählten Zellen.

Nach 48 h waren keine großen Unterschiede in der Anzahl apoptotischer Zellen zwischen den einzelnen Cannabinoid-Behandlungen zu erkennen. Die als signifikant berechneten Unterschiede in der Anzahl apoptotischer Zellen (16 µM, 19 µM) zeigten hohe Standardabweichungen, weshalb diese Unterschiede nicht als stark signifikant betrachtet werden konnten.

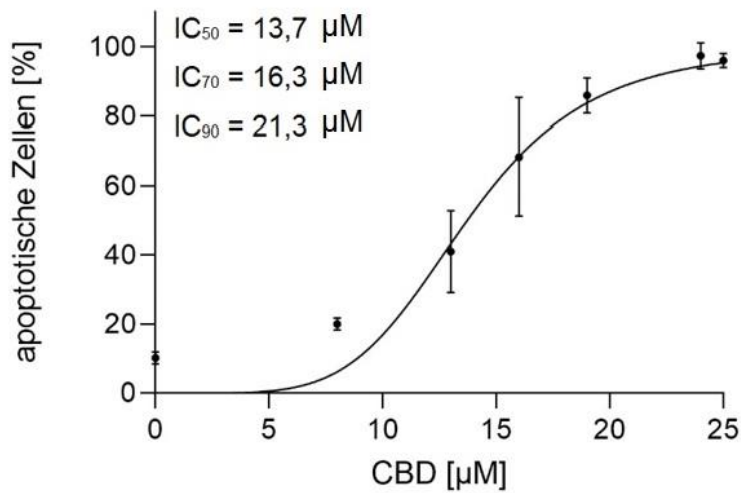
Eine CBD-Behandlung zeigte in MOLM13 Zellen bei höheren Konzentrationen eine tendenziell stärkere Zunahme der apoptotischen Zellen als eine THC- oder THC/CBD-Behandlung. 16 µM und 19 µM CBD bewirkten beispielsweise einen signifikant höheren Anteil apoptotischer Zellen im Vergleich zur jeweiligen Konzentration von THC oder THC/CBD (Abb. 6, Tab. 6, Tab. 7).

Die durch nichtlineare Regression ermittelten IC₅₀-, IC₇₀- und IC₉₀-Werte sind in Tab. 5 zu sehen. Die für THC und THC/CBD berechneten IC₉₀-Werte sind extrapoliert. Wie schon bei den Jurkat Zellen in 4.1.1 waren die bei CBD-Behandlung ermittelten IC-Werte jeweils geringer als die von THC oder THC/CBD.

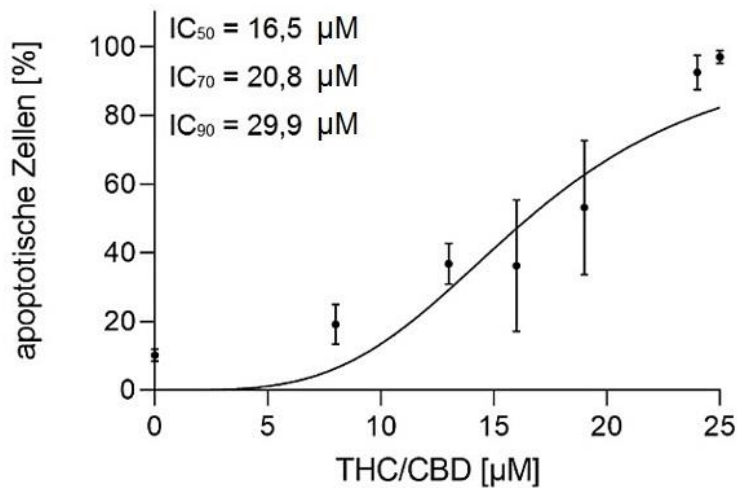
Die IC-Werte unter THC-Behandlung unterschieden sich kaum von denen der THC/CBD-Behandlung und es waren keine nennenswerten Unterschiede ersichtlich.



[A]



[B]



[C]

Abb. 6: **Apoptoseinduktion in MOLM13 Zellen nach 48 h.**

Die gemessenen Apoptosewerte für THC [A], CBD [B] und THC/CBD [C] wurden normalisiert und mit der Standardabweichung im Diagramm aufgetragen. Die IC_{50} -, IC_{70} - und IC_{90} -Werte der MOLM13 Zellen wurde mit Hilfe einer nichtlinearen Regression ermittelt und zum Teil extrapoliert.

Tab. 5: Die IC₅₀-, IC₇₀- und IC₉₀-Werte der MOLM13 Zellen.

Mit Hilfe nichtlinearer Regression wurden rechnerisch die IC₅₀-, IC₇₀- und IC₉₀-Werte ermittelt.

	THC	CBD	THC/CBD
IC ₅₀ [µM]	17,2	13,7	16,5
IC ₇₀ [µM]	21	16,3	20,8
IC ₉₀ [µM]	29	21,3	29,9

Tab. 6: Apoptosewerte der MOLM13 Zellen nach Cannabinoid-Behandlung.

Abkürzungen: Konz.= Konzentration der eingesetzten Cannabinoide, M [%] = Mittelwert der apoptotischen Zellen in %, SD = berechnete Standardabweichung, N=Anzahl der Versuchsansätze für die jeweilige gemessene Konzentration nach 48 h zur Bildung des Mittelwerts.

Konz.	THC			CBD			THC/CBD		
	M [%]	SD	N	M [%]	SD	N	M [%]	SD	N
0 µM	10,2	1,8	3	10,2	1,8	3	10,18	1,8	3
8 µM	25,1	15,2	3	20	1,8	2	19,16	5,8	4
16 µM	38,6	5,8	3	68,3	17,1	4	36,26	19,1	4
19 µM	46,2	4,6	3	85,9	5,1	4	53,25	19,6	5
24 µM	87,6	7,6	3	97,4	3,8	3	92,53	5	3

Tab. 7: P-Werte und Signifikanzen der Apoptoseinduktion in MOLM13 Zellen.

Tabellarische Aufführung der p-Werte und Signifikanzen der Leukämiezelllinien MOLM13 zwischen den berechneten Mittelwerten der apoptotischen Zellen unter Cannabinoidbehandlung.

	p-Werte THC-CBD	Signifikant	p-Werte CBD-THC/CBD	Signifikant	p-Werte THC-THC/CBD	Signifikant
8 µM	0.6835	-	0.8663	-	0.4990	-
16 µM	0.0371	✓	0.0469	✓	0.8463	-
19 µM	0.0001	✓	0.0149	✓	0.5715	-
24 µM	0.2363	-	0.6256	-	0.4002	-

4.1.3. Apoptose in MOLM14 Zellen durch THC und CBD

Zellen der Leukämiezelllinie MOLM14 zeigten mit steigender Konzentration der Cannabinoide eine steigende Anzahl apoptotischer Zellen (Abb. 7).

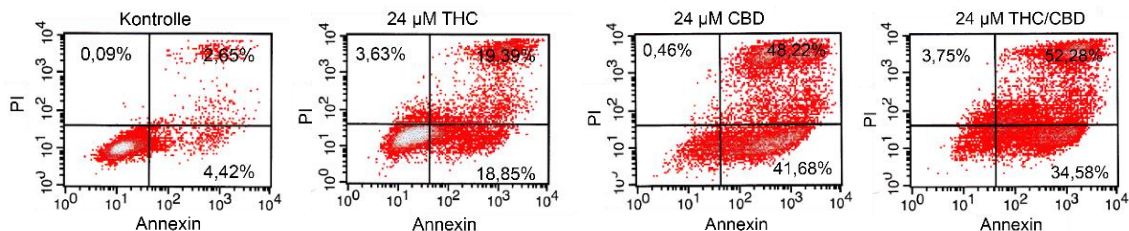


Abb. 7: Apoptoseinduktion von MOLM14 Zellen nach 48 h.

Unter Zugabe unterschiedlicher Konzentrationen von THC, CBD oder THC/CBD wurden die MOLM14 Zellen für 48 h inkubiert. Durchflusszytometrisch wurde mit Hilfe der Annexin V/PI Färbung die Apoptoserate bestimmt. Dargestellt ist exemplarisch für jedes Cannabinoid [24 µM] ein Dotplot-Diagramm. Die in den Quadranten angegebenen Prozentzahlen sind die anteilig gezählten Zellen.

Die Zunahme der Anzahl apoptotischer MOLM14 Zellen war konzentrationsabhängig und in allen Behandlungsansätzen gleich stark. Bei Einsatz höherer Konzentrationen ergaben sich große Standardabweichungen.

CBD zeigte tendenziell eine höhere Anzahl apoptotischer Zellen. Bei Behandlung der MOLM14 Zellen mit 16 µM CBD war ein signifikant höherer Anteil apoptotischer Zellen im Vergleich zu THC messbar (Abb. 8, Tab. 9, Tab. 10).

Die IC₅₀-, IC₇₀- und IC₉₀-Werte der durchgeführten Behandlungen mit Cannabinoiden, welche durch nichtlineare Regression ermittelt wurden, unterschieden sich nur gering (Tab. 8). Während der IC₅₀-Wert von CBD marginal niedriger war als der von THC oder THC/CBD, war im direkten Vergleich der Werte der drei unterschiedlichen Cannabinoide der IC₉₀-Wert von CBD am größten.

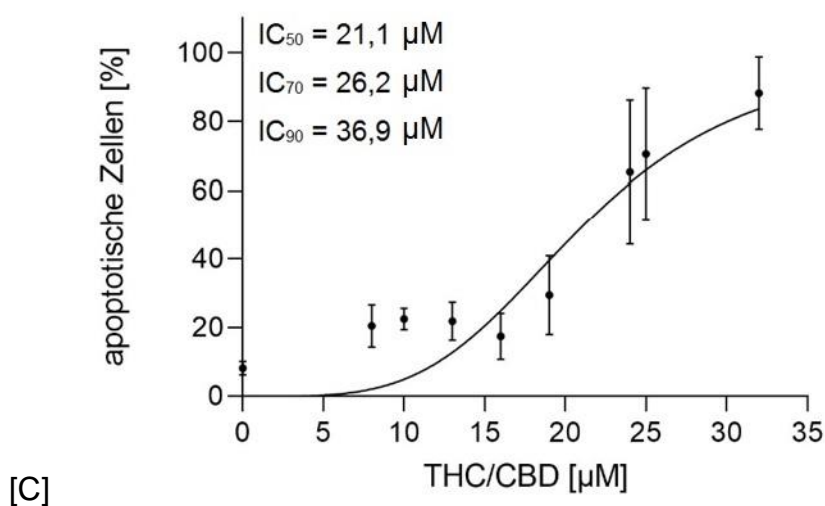
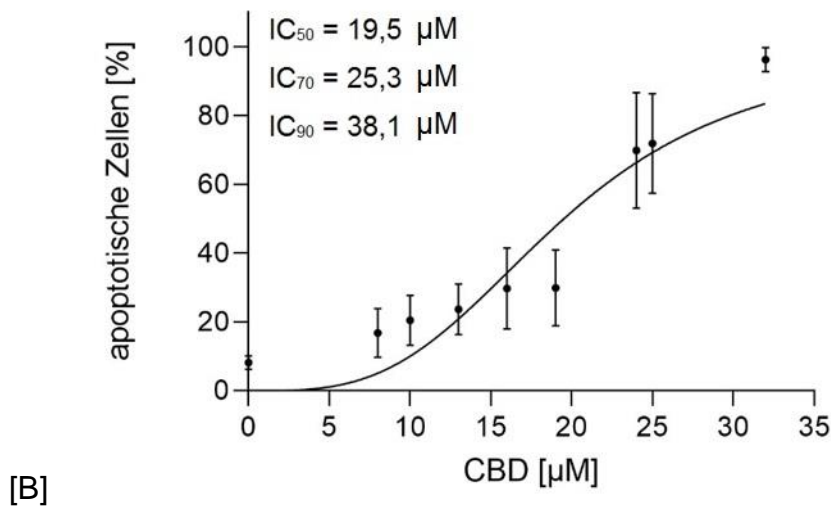
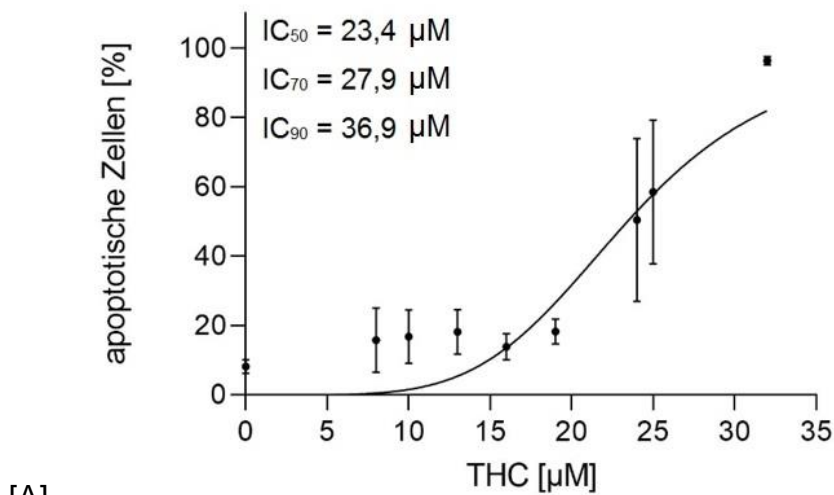


Abb. 8: **Apoptoseinduktion in MOLM14 Zellen nach 48 h.**

Die gemessenen Apoptosewerte für THC [A], CBD [B] und THC/CBD [C] wurden normalisiert und mit der Standardabweichung aufgetragen. Die IC_{50} -, IC_{70} - und IC_{90} -Werte der MOLM14 Zellen wurde mit Hilfe einer nichtlinearen Regression ermittelt und sind zum Teil extrapoliert.

Tab. 8: Die IC₅₀-, IC₇₀- und IC₉₀-Werte der MOLM14 Zellen.

Mit Hilfe nichtlinearer Regression wurden rechnerisch die IC₅₀-, IC₇₀- und IC₉₀-Werte ermittelt.

	THC	CBD	THC/CBD
IC ₅₀ [µM]	23,4	19,5	21,1
IC ₇₀ [µM]	27,9	25,3	26,2
IC ₉₀ [µM]	36,9	38,1	36,9

Tab. 9: Apoptose in MOLM14 Zellen unter Cannabinoidbehandlung.

Konz. = Konzentration der eingesetzten Cannabinoide, M [%] = Mittelwert der apoptotischen Zellen in %, SD = berechnete Standardabweichung, N=Anzahl der Versuchsansätze für die jeweilige gemessene Konzentration nach 48 h zur Bildung des Mittelwerts.

Konz.	THC			CBD			THC/CBD		
	M [%]	SD	N	M [%]	SD	N	M [%]	SD	N
0 µM	8,2	1,9	8	8,2	1,9	8	8,2	1,9	8
8 µM	15,8	9,3	5	16,8	7,1	5	20,5	6,12	5
16 µM	13,9	3,8	4	29,7	11,8	5	17,5	6,7	5
24 µM	50,5	23,5	7	69,9	16,8	8	65,34	20,9	5
32 µM	96,4	1,2	3	96,3	3,5	4	88,2	10,6	6

Tab. 10: P-Werte und Signifikanzen der Apoptoserate in MOLM14 Zellen.

Die p-Werte und Signifikanzen der berechneten Mittelwerte der apoptotischen Zellen unter Cannabinoidbehandlung wurden berechnet und tabellarisch aufgeführt.

	p-Werte	Signifikant	p-Werte	Signifikant	p-Werte	Signifikant
	THC-CBD		CBD-THC/CBD		THC-THC/CBD	
8 µM	0.8632	-	0.4046	-	0.3784	-
16 µM	0.0374	✓	0.0786	-	0.3673	-
24 µM	0.0864	-	0.6755	-	0.2853	-
32 µM	0.9684	-	0.1892	-	0.2426	-

4.1.4. Apoptose in HL-60 Zellen durch Cannabinoide

Unter Behandlung der Leukämiezelllinie HL-60 mit THC, CBD und THC/CBD stieg die Anzahl apoptotischer Zellen mit steigender Konzentration der eingesetzten Cannabinoide (Abb. 9).

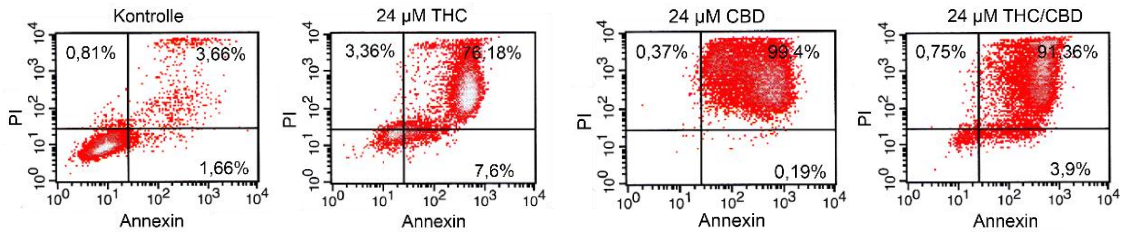


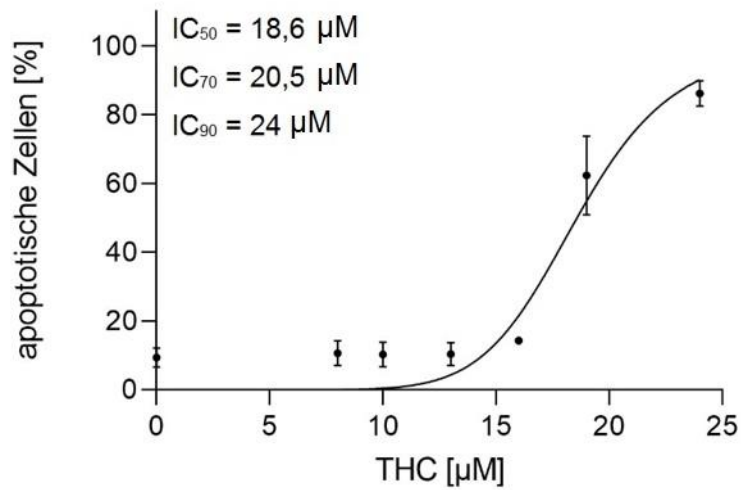
Abb. 9: **Apoptoseinduktion in HL-60 nach 48 h.**

Die AML-Zelllinie HL-60 wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen von THC, CBD oder THC/CBD behandelt und für 48 h inkubiert. Bestimmt wurde die Apoptoserate am Durchflusszytometer mittels Annexin V/PI Färbung. Dargestellt ist ein Dotplot-Diagramm exemplarisch für jedes Cannabinoid [24 µM]. Die in den Quadranten angegebenen Prozentzahlen sind die anteilig gezählten Zellen.

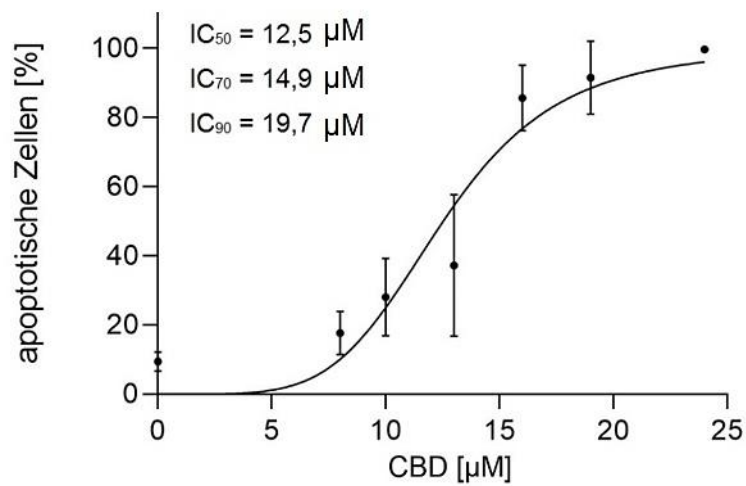
Die Anzahl apoptotischer Zellen waren nach 48 h bei allen drei eingesetzten Cannabinoiden bei niedrigeren Konzentrationen ähnlich hoch. Bei Verwendung höherer Konzentrationen war bei CBD eine tendenziell höhere Anzahl apoptotischer Zellen zu messen als unter Einsatz von THC oder THC/CBD. Die signifikanten Unterschiede bei Einsatz höherer Konzentrationen gingen mit hohen Standardabweichungen einher.

So zeigten sich bei 16 µM und 24 µM CBD im Vergleich zu THC signifikant höhere Werte in der Anzahl apoptotischer Zellen. Auch im Vergleich zu THC/CBD waren unter CBD-Behandlung bei 24 µM signifikant höhere Apoptosewerte zu verzeichnen (Abb. 10, Tab. 12, Tab. 13).

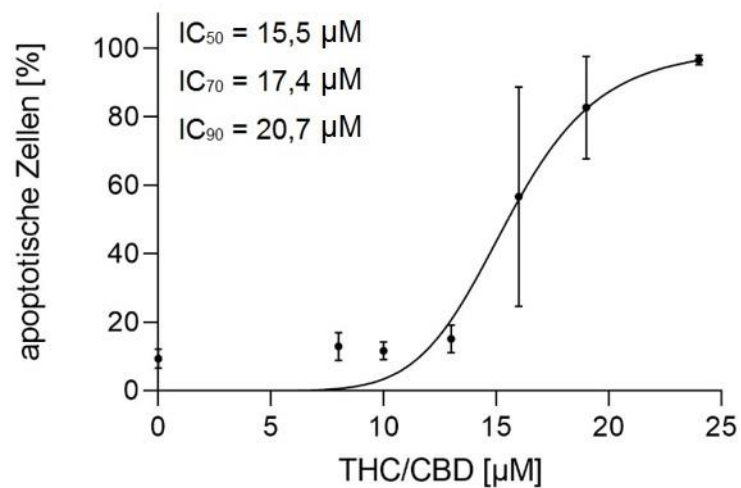
Die durch nichtlineare Regression ermittelten IC₅₀-, IC₇₀- und IC₉₀-Werte zeigten unter CBD-Behandlung die niedrigsten Werte im Vergleich zu THC und THC/CBD. Die höchsten IC-Werte waren unter THC-Behandlung zu erkennen (Tab. 11).



[A]



[B]



[C]

Abb. 10: **Apoptoseinduktion in HL-60 Zellen nach 48 h.**

Die gemessenen Apoptosewerte für THC [A], CBD [B] und THC/CBD [C] wurden normalisiert und mit der Standardabweichung aufgetragen. Die IC_{50} -, IC_{70} - und IC_{90} -Werte der HL-60 Zellen wurde mit Hilfe einer nichtlinearen Regression ermittelt und zum Teil extrapoliert.

Tab. 11: **Die IC₅₀-, IC₇₀- und IC₉₀-Werte der HL-60 Zellen.**

Mit Hilfe nichtlinearer Regression wurden rechnerisch die IC₅₀-, IC₇₀- und IC₉₀-Werte ermittelt.

	THC	CBD	THC/CBD
IC ₅₀ [μM]	18,6	12,5	15,5
IC ₇₀ [μM]	20,5	14,9	17,4
IC ₉₀ [μM]	24	19,7	20,7

Tab. 12: **Apoptose unter Cannabinoidbehandlung der HL-60 Zellen.**

Abkürzungen: Konz.= Konzentration der eingesetzten Cannabinoide, M [%] = Mittelwert der apoptotischen Zellen in %, SD = berechnete Standardabweichung, N=Anzahl der Versuchsansätze für die jeweilige gemessene Konzentration nach 48 h zur Bildung des Mittelwerts.

Konz.	THC			CBD			THC/CBD		
	M [%]	SD	N	M [%]	SD	N	M [%]	SD	N
0 μM	9,4	2,8	5	9,4	2,8	5	9,4	2,8	5
8 μM	10,7	3,6	4	17,6	6,3	4	13	4,1	4
16 μM	14,3	0,9	4	85,6	9,5	4	56,7	32	5
24 μM	86,2	3,7	5	99,6	0,4	3	96,6	1,4	3

Tab. 13: **P-Werte und Signifikanzen der Apoptoserate der HL-60 Zellen.**

Für die Zellen der Leukämiezelllinie HL-60 wurden tabellarisch die p-Werte und Signifikanzen der Mittelwerte der apoptotischen Zellen unter Cannabinoidbehandlung aufgeführt.

	p-Werte THC-CBD	Signifikant	p-Werte CBD-THC/CBD	Signifikant	p-Werte THC-THC/CBD	Signifikant
8 μM	0.1102	-	0.2615	-	0.4638	-
16 μM	0.0001	✓	0.1284	-	0.0349	✓
24 μM	0.0009	✓	0.0215	✓	0.0039	✓

4.2. Cannabinoid-Behandlung mononukleärer Zellen ex vivo

In 4.1 konnte in Leukämiezelllinien eine konzentrationsabhängige Apoptoseinduktion durch THC, CBD und THC/CBD gezeigt werden. Tendenziell war die Anzahl apoptotischer Zellen vor allem bei den höheren Konzentrationen bei CBD größer im Vergleich zur THC- oder THC/CBD-Behandlung.

Um die Apoptoseinduktion durch THC, CBD und THC/CBD auch in nativen Zellen zu untersuchen, wurden extrahierte Leukozyten von gesunden Knochenmarkspendern (Donoren) und mononukleären Zellen von Patienten mit akuter Leukämie (siehe 2.6) mit 32 μM der jeweiligen Cannabinoide behandelt. Nach 48 h wurde der Anteil viabler Zellen mit Hilfe der Durchflusszytometrie gemessen (Methodik 3.4.2, Salitzky, 2017), exemplarisch dargestellt in Abb. 11.

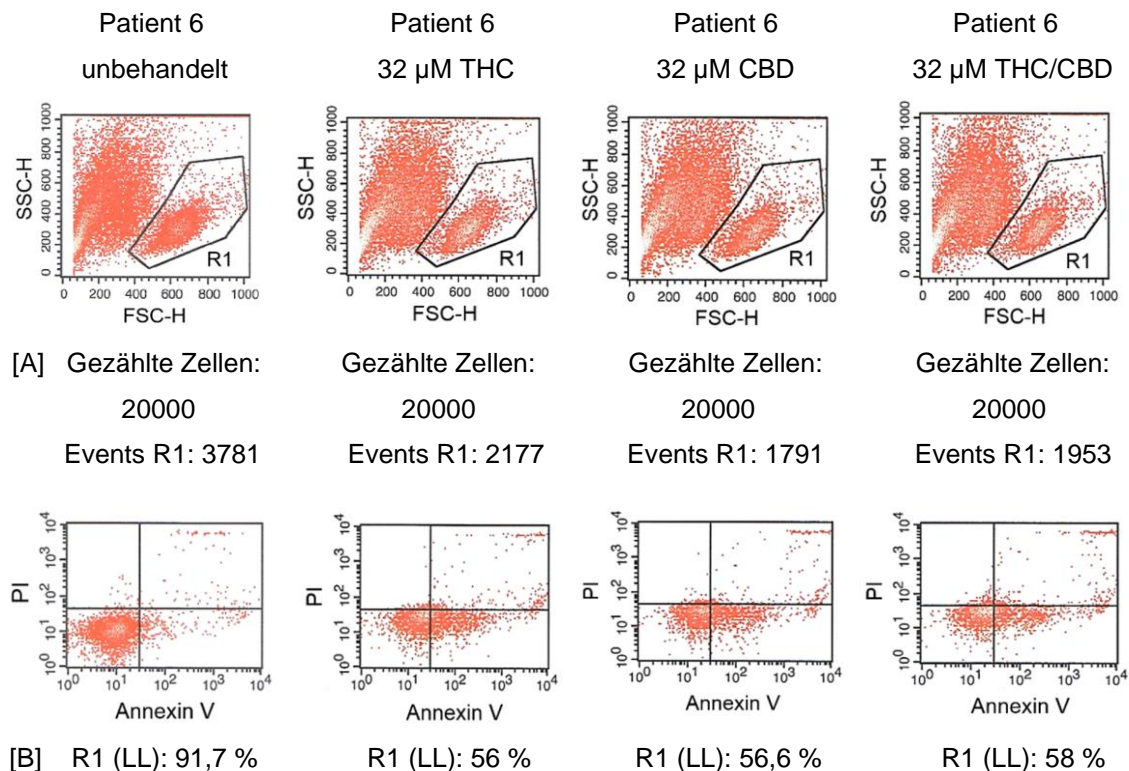


Abb. 11: **Exemplarisches Beispiel der durchflusszytometrischen Analyse.**

In [A] ist mit R1 die Blastenpopulation im FSC/SSC Dichtediagramm gekennzeichnet sowohl für die unbehandelten als auch für die mit Cannabinoiden behandelten Zellen. Zusätzlich wurden die in R1 gezählten Events für die jeweilige Behandlung aufgeführt. In [B] ist die Viabilität der in R1 gemessenen Zellen dargestellt, welche mit einem Annexin V/PI Assay überprüft wurde. Darunter ist die jeweilige Anzahl der viablen Zellen angegeben (Annexin V/PI negativ=LL=Lower Left).

4.2.1. Apoptoseverhalten mononukleärer Zellen unter THC und CBD

Mittels Durchflusszytometrie wurde der Anteil viabler Zellen mit Hilfe des Annexin V/PI basierten Assays gemessen (Annexin negativ, PI negativ). Der prozentuale Anteil der viablen Zellen in R1 (LL=Lower Left, Abb. 11B) wurde für die unbehandelten Zellen als 100% definiert, um bei der Berechnung des prozentualen Anteils viabler Zellen unter Cannabinoid Behandlung auf diese zu normieren und grafisch darzustellen (Abb. 12, Tab. 14).

Die Messungen bestätigten die tendenziell stärkere proapoptotische Wirkung von CBD im Vergleich zu THC und THC/CBD. In Abb. 12 [A] ist zu sehen, dass der aus allen viablen Patientenzellen durch das Grafikprogramm berechnete Mittelwert bei CBD am niedrigsten war.

In Abb. 12 [B] und Tab. 14 ist erkennbar, dass durch die eingesetzten Cannabinoide nach 48 h Behandlung die Anzahl viabler nativer Blasten mit individueller Sensitivität reduziert wurde. Während in den Patienten 1-4 die Abnahme viabler Zellen nicht oder nur teilweise beobachtet werden konnte, war in den Patienten 5-12 mit ansteigender Patientenummerierung eine Reduktion in der Anzahl viabler Blasten zu sehen (Abb. 12 [B]).

Die Patienten 1-4 zeigten bei mindestens einem Cannabinoid unter Behandlung eine Zunahme in der Anzahl viabler Blasten. Die Patientenproben 5-12 reagierten bei allen drei Cannabinoid-Behandlungen gleichgerichtet mit einer Abnahme in der Anzahl viabler Zellen. Das Ausmaß der Reduktion viabler Blasten war bei THC, CBD und THC/CBD ähnlich hoch. Nur bei Patient 11 war nach CBD- und THC/CBD-Behandlung eine wesentlich geringere Anzahl viabler Zellen messbar als unter THC-Behandlung. Des Weiteren war (mit Ausnahme der Patienten 1 und 3) durch CBD und THC/CBD eine stärkere Abnahme der Anzahl viabler Blasten im Vergleich zur THC-Behandlung zu erkennen.

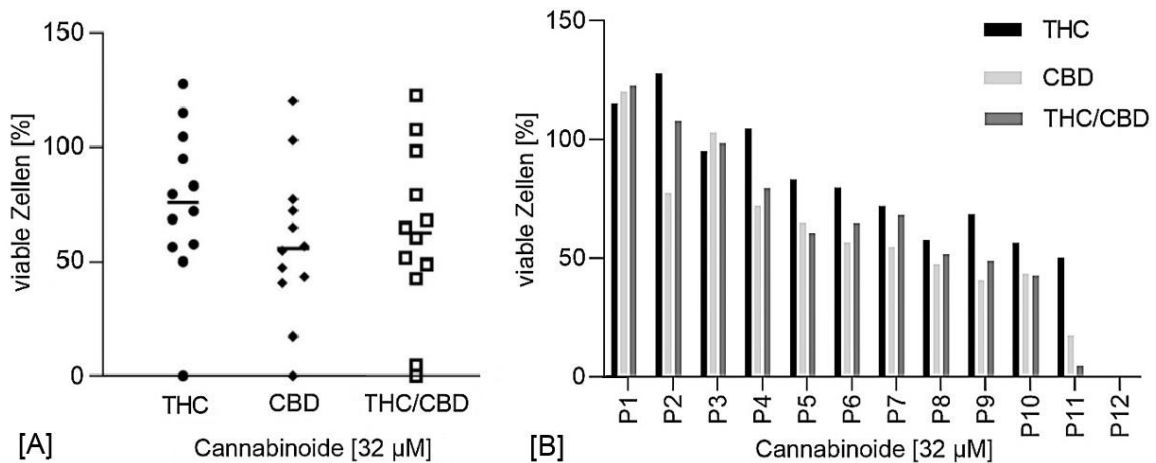


Abb. 12: Individueller und interindividueller Vergleich der Potenz der Cannabinoide.
 Die Behandlung der extrahierten Patientenzellen erfolgte über 48 h unter Zugabe von 32 µM des entsprechenden Cannabinoids und wurde mittels Durchflusszytometrie gemessen. Der prozentuale Anteil wurde jeweils normiert auf die Gruppe der unbehandelten Zellen, welche definiert wurden als 100% viable Zellen. Aus dem Anteil der gezählten Events wurde der Anteil der viable Zellen bestimmt und prozentual umgerechnet. [A] zeigt gruppiert die Verteilung des prozentualen Anteils mononukleärer Zellen der Patienten, sortiert nach der jeweiligen Cannabinoid-Behandlung. Der Mittelwert wurde durch das Programm ermittelt und als Querstrich eingefügt. Ein Vergleich der Potenz zwischen den eingesetzten Cannabinoiden ist ersichtlich. Das Balkendiagramm [B] zeigt zum individuellen Vergleich den prozentualen Anteil viable mononukleärer Zellen der Patienten 1-12 (P1-P12) nach der jeweiligen Behandlung. Individuell kann die Abnahme viable Zellen durch die verschiedenen Cannabinoide innerhalb eines Patienten verglichen werden.

In Tab. 14 sind die Antigenklassen der extrahierten Blasten der Patienten aufgeführt. Obwohl die Patienten 1 und 12 identische Antigenklassen aufwiesen, zeigten diese unter Cannabinoid-Behandlung sowohl die schwächste (Pat. 1) als auch die stärkste (Pat. 12) Abnahme in der Anzahl viable Blasten aller getesteten Patientenzellen. Ein Unterschied zwischen den zwei Patienten fiel auf: die Zellen von Patient 1 exprimierten noch zusätzlich das NK-Zell-AG.

Die Patienten 1-3, welche keine oder nur teilweise eine Abnahme in der Anzahl viable Zellen durch Cannabinoide zeigten, wiesen alle das NK-Zell-AG auf. Patient 10 stellte dazu eine Ausnahme dar. Obwohl dieser ebenfalls als einzige weitere Probe das NK-Zell-AG aufwies, konnte bei diesem Patienten durch eine Cannabinoid-Behandlung eine Reduktion in der Anzahl viable Blasten um ~50% gezeigt werden.

Tab. 14: **Antigenklassen und Anzahl viabler mononukleärer Zellen.**

Die Proben 1,3,4,5,6,7,8,9,11 waren bei -80°C eingefroren und wurden für Versuche aufgetaut. Die Proben 2,10,12 waren frisch isolierte mononukleäre Zellen von Patienten mit akuter Leukämie. Für jeden Patienten wurden die molekulargenetisch bestimmten Antigenklassen und die im FACS gezählte Anzahl viabler Zellen [%] nach Behandlung mit 32 µM des jeweiligen Cannabinoide aufgeführt. Abkürzungen: AG=Antigen, HLA-DR=Human Leukocyte AG - DR isotype, NK=Natürliche Killerzelle AG, MPO=Myeloperoxidase, T=T-Zell-AG, TdT=terminale Desoxyribonukleotidyltransferase, Pan=Panleukozytenantigen. Myeloische AG: CD11c, CD13, CD14, CD15, CD33, CD65, MPO. Vorläufer AG: CD34, CD117, CD133, TdT, HLA-DR. NK-Zell-AG: CD56. Panleukozyten-AG: CD45

Patient	Antigenklassen			Viable Zellen [%]		
	myeloisch	Vorläufer	Weitere AG	THC	CBD	THC/CBD
1	++	(+)	NK	115,2	120,2	122,7
2	++	+*	NK	127,8	77,4	107,8
3	++	++*	Pan/ NK	95,1	103,1	98,4
4	++	++		104,6	72,3	79,4
5				83,2	64,9	60,3
6	+	++		79,7	56,7	64,8
7	++	++	T	72,1	54,7	68,2
8				57,6	47,4	51,7
9		+		68,5	40,7	48,8
10	++		NK	56,3	43,4	42,5
11	++	(+)		50,1	17,3	4,7
12	++	(+)		0,1	0,1	0,1

(+) = schwach positiv für 1 AG, + = 1 AG, ++ ≥ 2 Antigene, *=Vorläufer-AG HLA-DR

Im Vergleich zu den Leukämiezellen wurden die Donorenzellen ebenfalls mit CBD behandelt. Die Donorenzellen von gesunden Knochenmarksspender zeigten unter steigender Konzentration eine Zunahme der Apoptoseinduktion (Abb. 13). Im Vergleich zu den behandelten Leukämiezellen war das Ausmaß der Apoptose in Donorenzellen unter 32 μM CBD weniger stark ausgeprägt. Der Mittelwert der gruppiert aufgetragenen Zellen wurde durch das verwendete Grafikprogramm ermittelt und als Querstrich in die Grafik eingefügt. Bei den Donoren wurde zusätzlich noch die Standardabweichung aufgetragen.

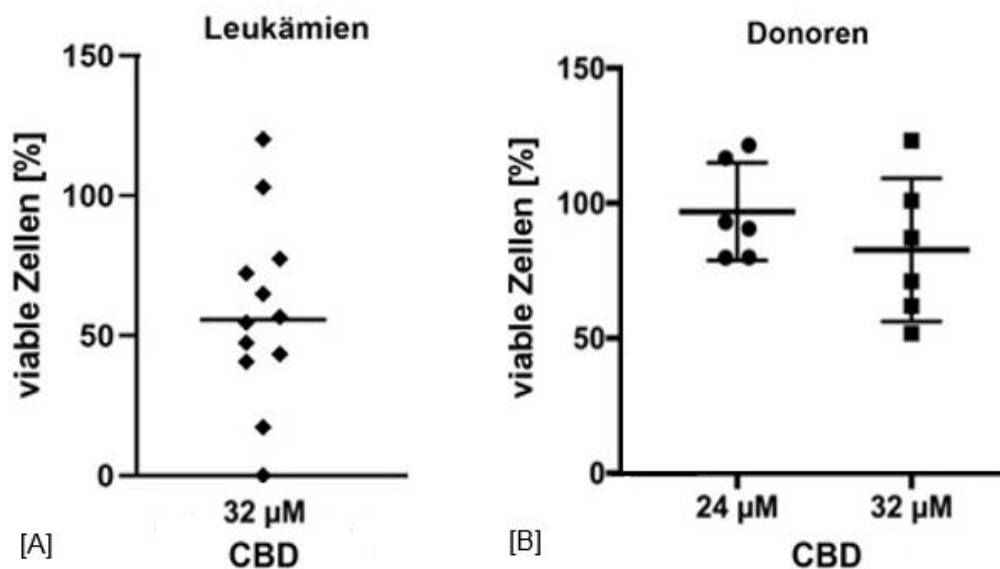


Abb. 13: Anteil viabler Leukämie- und Donorenzellen nach 48 h CBD Behandlung. Die Grafik zeigt den prozentualen Anteil viabler Zellen der getesteten Leukämiezellen von Patienten und Zellen von 6 gesunden Knochenmarksspendern (Donoren) nach Behandlung mit CBD über 48 h. Zur Messung wurde die Durchflusszytometrie verwendet. Die Apoptoseinduktion wurde auf die unbehandelte Kontrollzellgruppe normalisiert. Der aus den jeweiligen Zellen ermittelte Mittelwert und die Standardabweichung (nur in [B]) wurde durch das Programm berechnet und in die Grafik eingefügt.

4.3. Veränderung zellulärer Signalwege durch Cannabinoide

In 4.1 und 4.2 wurden an Leukämiezelllinien und extrahierten mononukleären Zellen von Patienten mit akuter Leukämie Veränderungen in der Zellzahl durch eine Cannabinoid-Behandlung gezeigt. Um mehr Information darüber zu erhalten, wie Cannabinoide wirken und was in Signalwegen durch THC oder CBD verändert wird, wurden Phosphorylierungsänderungen der Leukämiezelllinien unter Cannabinoid-Behandlung untersucht.

Initial sollte gezeigt werden, ob und in welchen Signalwegen Phosphorylierungsänderungen durch THC stattfanden. Anschließend sollte dies für THC validiert und für CBD untersucht und ebenfalls validiert werden. Weiter wurde durch den Einsatz zweier unterschiedlicher Konzentrationen von THC und CBD die Dosis-Wirkungs-Beziehung der Phosphorylierungsänderungen untersucht.

4.3.1. Das Human Phospho-Kinase Array

Zur Detektion des Einflusses von THC auf wichtige intrazelluläre Signalwege wurde das Human Phospho-Kinase Array (R and D Systems) mit der Jurkat Zelllinie durchgeführt. Es wurden 80 μM THC im Sinne einer inhibitorischen Konzentration von mindestens 90% (IC_{90}) verwendet. Mit Hilfe der Schablonen der zwei Membranen A und B (Abb. 14) und den dazugehörigen Tabellen (Tab. 15, Tab. 16) konnten die Membranen ausgewertet werden, um Phosphorylierungsänderungen festzustellen. Detektierte Phosphorylierungsänderungen in Signalwegen unter THC-Behandlung sollten im Verlauf für THC und CBD verifiziert und auf eine Konzentrationsabhängigkeit untersucht werden.

Auf den Membranen A2 und B2 konnte man durch Behandlung der Jurkat Zellen mit THC eine abnehmende Phosphorylierung verschiedener Proteine erkennen, die in die Signaltransduktion von Proliferation und Viabilität involviert sind. Auffallend waren unter anderem die Felder des AKT- (⊙) und ERK-Signalwegs (⊙) (Abb. 15).

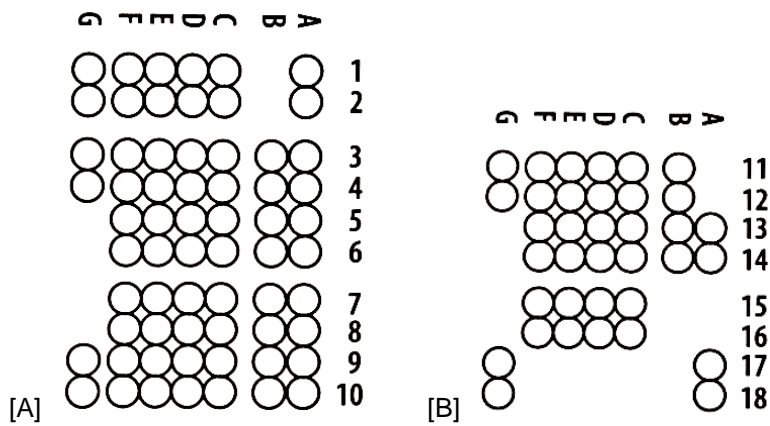


Abb. 14: **Schablone zur Auswertung des Human Phospho-Kinase Arrays.**
 Auswertung der Phosphorylierungsänderung in Membran [A] und [B] mit Hilfe der Schablone.

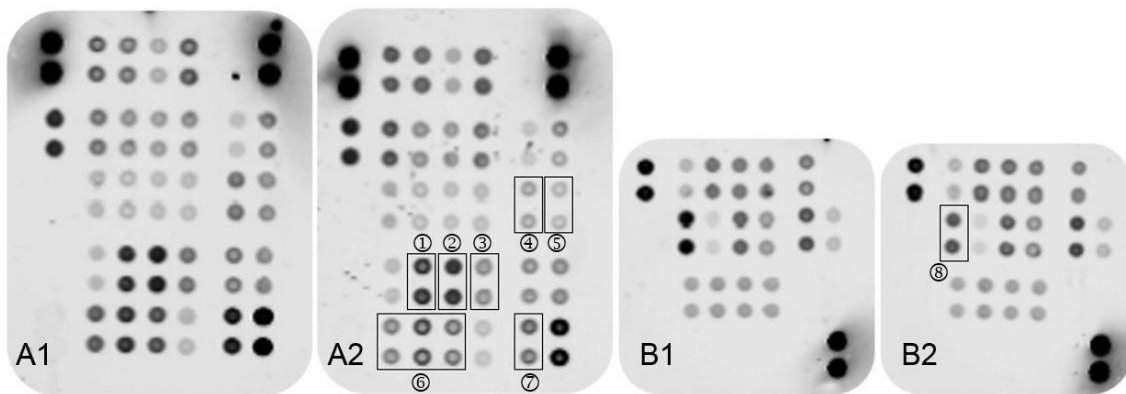


Abb. 15: **Ergebnis des durchgeführten Human Phospho-Kinase Arrays.**
 Durchführung des Phosphorylierungs-Arrays nach dem Standardprotokoll von R and D Systems. In A1 und B1 sind die Phosphorylierungen der unbehandelten Jurkat Zellen zu sehen. In A2 und B2 sind die Phosphorylierungen der für 90 min mit 80 µM THC behandelten Jurkat Zellen dargestellt; zusätzlich wurden die signifikant alterierten Phosphorylierungsstellen markiert: ① STAT6, ② STAT2, ③ AMPK α 2, ④ MSK1/2, ⑤ ERK1/2, ⑥ STAT5a/b, ⑦ AKT 1/2/3 (Ser473), ⑧ WNK1.

Tab. 15: **Tabelle der Membran A des Human Phospho-Kinase Arrays.**
 Koordinaten zum Auswerten der Phosphorylierungsänderungen (A-G: 1-10).

Membran A	Ziel/ Kontrolle	Phosphorylierungsstelle
A1, A2	Referenz Feld	-
A3, A4	P38 α	T180/Y182
A5, A6	ERK1/2	T202/Y204, T185/Y187
A7, A8	JNK1/2/3	T183/Y185, T221/Y223
A9, A10	GSK-3 α/β	S21/S9
B3, B4	EGF R	Y1086
B5, B6	MSK 1/2	S376/S360
B7, B8	AMPK α 1	T183
B9, B10	Akt 1/2/3	S473
C1, C2	TOR	S2448
C3, C4	CREB	S133
C5, C6	HSP27	S78/S82
C7, C8	AMPK α 2	T172
C9, C10	B-Catenin	-
D1, D2	Src	Y419
D3, D4	Lyn	Y397

Membran A	Ziel/ Kontrolle	Phosphorylierungsstelle
D5, D6	Lck	Y394
D7, D8	STAT2	Y689
D9, D10	STAT5a	Y694
E1, E2	Fyn	Y420
E3, E4	Yes	Y426
E5, E6	Fgr	Y412
E7, E8	STAT6	Y641
E9, E10	STAT5b	Y699
F1, F2	Hck	Y411
F3, F4	Chk-2	T68
F5, F6	FAK	Y397
F7, F8	PDGF R β	Y751
F9, F10	STAT5a/b	Y694/Y699
G1, G2	Referenz Feld	-
G3, G4	PRAS40	T246
G9, G10	PBS (negativ Kontrolle)	-

Tab. 16: **Tabelle der Membran B des Human Phospho-Kinase Arrays.**
 Koordinaten zum Auswerten der Phosphorylierungsänderungen (A-G: 11-18).

Membran B	Ziel/ Kontrolle	Phosphorylierungsstelle
A13, A14	p53	S392
A17, A18	Referenz Feld	-
B11, B12	Akt 1/2/3	T308
B13, B14	p53	S46
C11, C12	p70 S6 Kinase	T389
C13, C14	p53	S15
C15, C16	c-Jun	S63
D11, D12	p70 S6 Kinase	T421/S424
D13, D14	RSK 1/2/3	S380/S386/S377

Membran B	Ziel/ Kontrolle	Phosphorylierungsstelle
D15, D16	eNOS	S1177
E11, E12	STAT3	Y705
E13, W14	p27	T198
E15, E16	PLC-y1	Y783
F11, F12,	STAT3	S727
F13, F14	WNK1	T60
F15, F16	PYK2	Y402
G11, G12	HSP60	-
G17, G18	PBS (negativ Kontrolle)	-

4.3.2. Veränderungen im PI3K/AKT-Signalweg durch Cannabinoide

Zur Validierung und weiteren Untersuchung der im Kapitel 4.3.1 gezeigten Dephosphorylierung im AKT-Signalweg wurden Western Blots mit den entsprechenden Phospho-Antikörpern (AK) im Jurkat Model und zusätzlich in den MOLM-Zelllinien durchgeführt. Anhand der Bandenstärke der Western Blots sollte gezeigt werden, ob THC und CBD ähnliche Phosphorylierungsänderungen bewirken und ob diese konzentrationsabhängig sind.

Benutzt wurden zwei spezifische AK zur Darstellung zweier essenzieller Residuen zur Aktivierung von AKT, Threonin 308 (Thr308) und Serin 473 (Ser473). Die im PI3K/AKT-Signalweg vorkommende p70 S6 Kinase, welche dem AKT nachgeschaltet ist, wurde ebenfalls mit einem spezifischen Phospho-AK der p70 S6 Kinase (Thr389) untersucht. Dies diente der Kontrolle der Phosphorylierungsänderungen auf mehreren Ebenen des PI3K/AKT-Signalwegs. Es wurden zwei unterschiedliche Konzentrationen von THC und CBD ($IC_{50} \sim 20 \mu M$, $IC_{90} \sim 40 \mu M$) für 90 min eingesetzt, um eine Konzentrationsabhängigkeit der Phosphorylierungsänderung durch THC und CBD zu überprüfen.

4.3.2.1 Phosphorylierungsänderung in Jurkat Zellen

Unter Verwendung der oben beschriebenen Phospho-AK von AKT und der p70 S6 Kinase (Thr389) konnte gezeigt werden, dass in den Jurkat Zellen konzentrationsabhängig eine Abnahme der Signalintensität der Banden durch eine Cannabinoid-Behandlung bestand.

Es zeigte sich konzentrationsabhängig eine abnehmende Bandenintensität unter Verwendung der drei Phospho-AK. Im Allgemeinen zeigte CBD in Jurkat Zellen eine potentere Dephosphorylierung im PI3K-Signalweg als THC. Eine vergleichbare Abnahme in der Bandenintensität durch THC und CBD zeigte sich lediglich beim Phospho-AK der p70 S6 Kinase (Thr389) (Abb. 16).

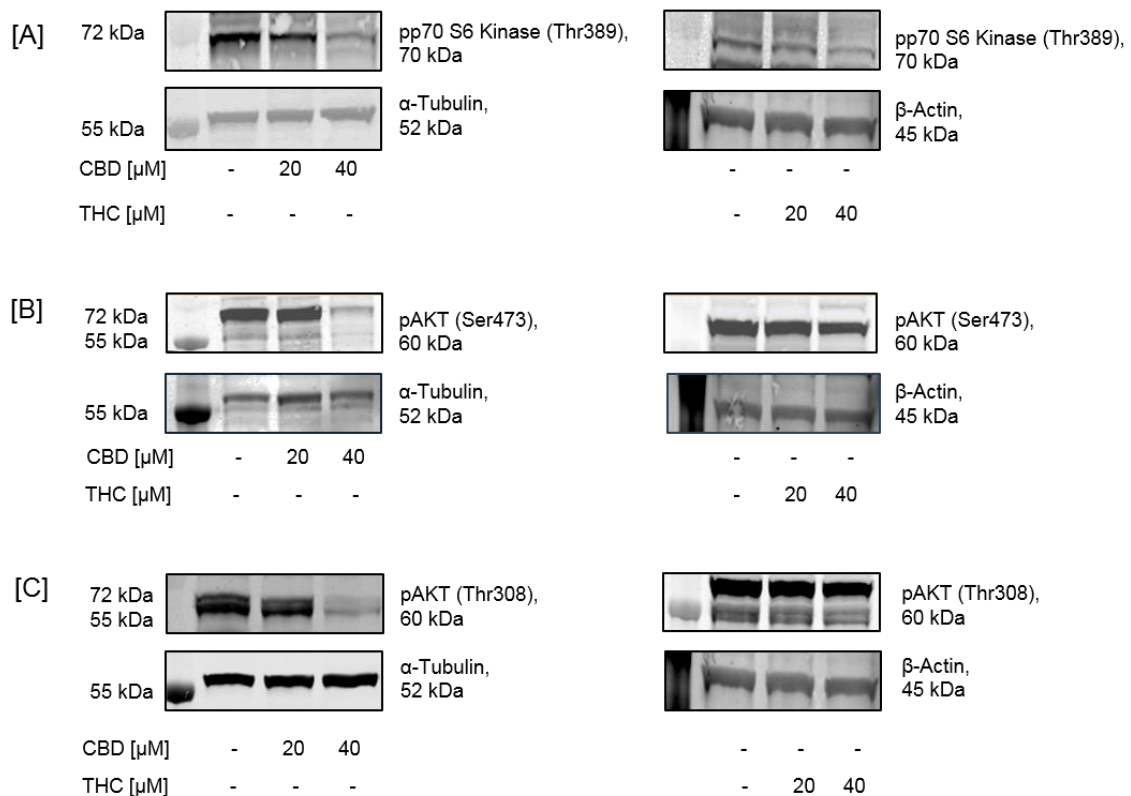


Abb. 16: **Phosphorylierungsänderungen im PI3K/AKT-Signalweg in Jurkat Zellen.** Die Jurkat Zellen wurden für 90 min mit 0 μM, 20 μM und 40 μM CBD oder THC behandelt. Die Proteine wurden mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und durch Western Blots fixiert. Es erfolgte die Inkubation mit den AK pAKT(Thr308) [A], pAKT(Ser473) [B] und pp70 S6 Kinase (Thr389) [C]. α-Tubulin-AK und β-Actin-AK dienten als Ladekontrolle.

4.3.2.2 Phosphorylierungsänderung in MOLM13 Zellen

In MOLM13 Zellen zeigte sich eine Abnahme der Bandenintensität unter Cannabinoid-Behandlung (Abb. 16).

Bei der hohen Konzentration zeigten THC und CBD in Jurkat Zellen eine hoch potente Dephosphorylierung im PI3K/AKT-Signalweg, mit Ausnahme der Bande des pAKT(Ser473)-AKs unter THC-Behandlung (Abb. 17). Während unter THC-Behandlung eine konzentrationsabhängige Abnahme der Bandenintensität zu erkennen war, fiel auf, dass bei 20 μM CBD in [B] und [C] eine stärkere Bandenintensität als bei der unbehandelten Vergleichsprobe auftrat.

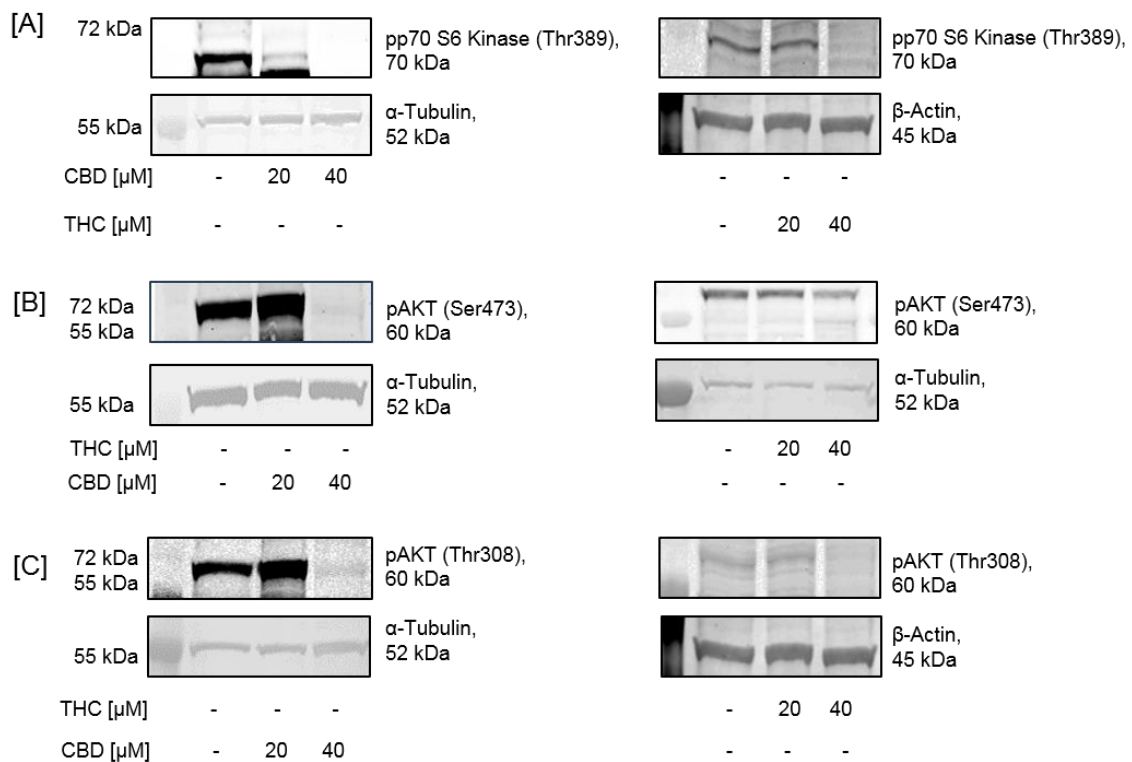


Abb. 17: **Phosphorylierungsänderungen im PI3K/AKT-Signalweg in MOLM13 Zellen.** Darstellung der Phosphorylierungsänderung von AKT und p70 S6 Kinase in der Leukämiezelllinie MOLM13. Die Zellen wurden jeweils für 90 min mit 0 μM , 20 μM und 40 μM CBD oder THC behandelt. Die Proteine wurden mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und durch Western Blots fixiert. Es erfolgte die Inkubation mit den AK pp70 S6 Kinase (Thr389) [A], pAKT(Ser473) [B] und pAKT(Thr308) [C]. Als Ladekontrolle wurden die AK α -Tubulin und β -Actin verwendet.

4.3.2.3 Phosphorylierungsänderung in MOLM14 Zellen

Eine Untersuchung der Phosphorylierung von AKT und der p70 S6 Kinase in der AML Leukämiezelllinie MOLM14 zeigte eine reduzierte Bandenintensität unter steigender Konzentration von THC und CBD.

Im Allgemeinen schien CBD potenter in Bezug auf die Dephosphorylierung des PI3K-Signalwegs in Jurkat Zellen als THC zu sein (Abb. 18). Auffallend war die Bandenintensität in [B] unter THC-Behandlung. Hier zeigte sich kaum eine Abnahme in der Bande unter steigender Konzentration von THC bei Verwendung des AKs pAKT(Ser473).

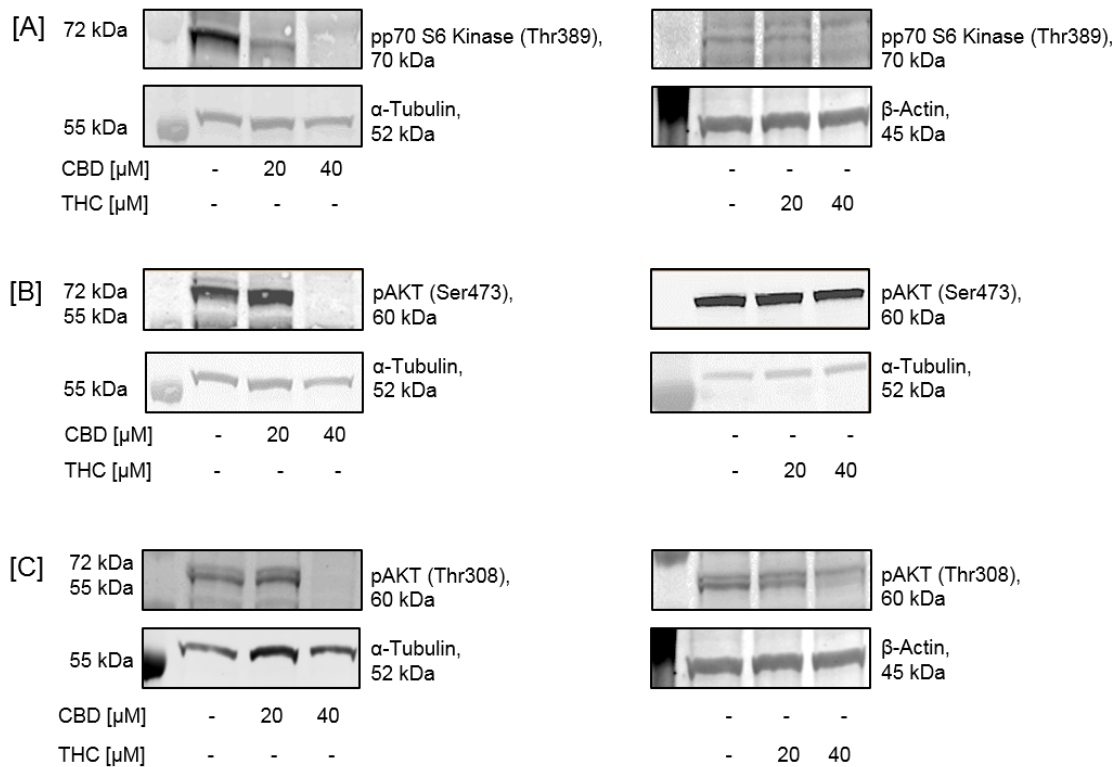


Abb. 18: **Phosphorylierungsänderungen im PI3K/AKT-Signalweg in MOLM14 Zellen.** Darstellung der Phosphorylierungsänderung von AKT und p70 S6 Kinase in den Leukämiezelllinien MOLM14. Die Zellen wurden jeweils für 90 min mit 0 μ M, 20 μ M und 40 μ M CBD oder THC behandelt. Die Proteine wurden mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und durch Western Blots fixiert. Es erfolgte die Inkubation mit den AK pp70 S6 Kinase (Thr389) [A], pAKT(Ser473) [B] und pAKT(Thr308) [C]. Als Ladekontrolle wurden die AK α -Tubulin und β -Actin verwendet.

4.3.3. Regulierungen durch Cannabinoide im MAPK/ERK-Signalweg

Analog zu den Western Blots mit den Phospho-AK des PI3K/AKT-Signalwegs wurden Untersuchungen des MAPK/ERK-Signalwegs in den Leukämiezelllinien Jurkat, MOLM13 und MOLM14 mit dem Phospho-Primär-AK ppERK (Thr980) durchgeführt.

Es konnte gezeigt werden, dass in allen 3 Zelllinien durch eine Behandlung mit THC oder CBD eine konzentrationsabhängige Abnahme in der Bandenintensität von pERK stattfand (Abb. 19), wobei wiederum CBD potenter in der Regulation des MAPK/ERK-Signalwegs war als THC.

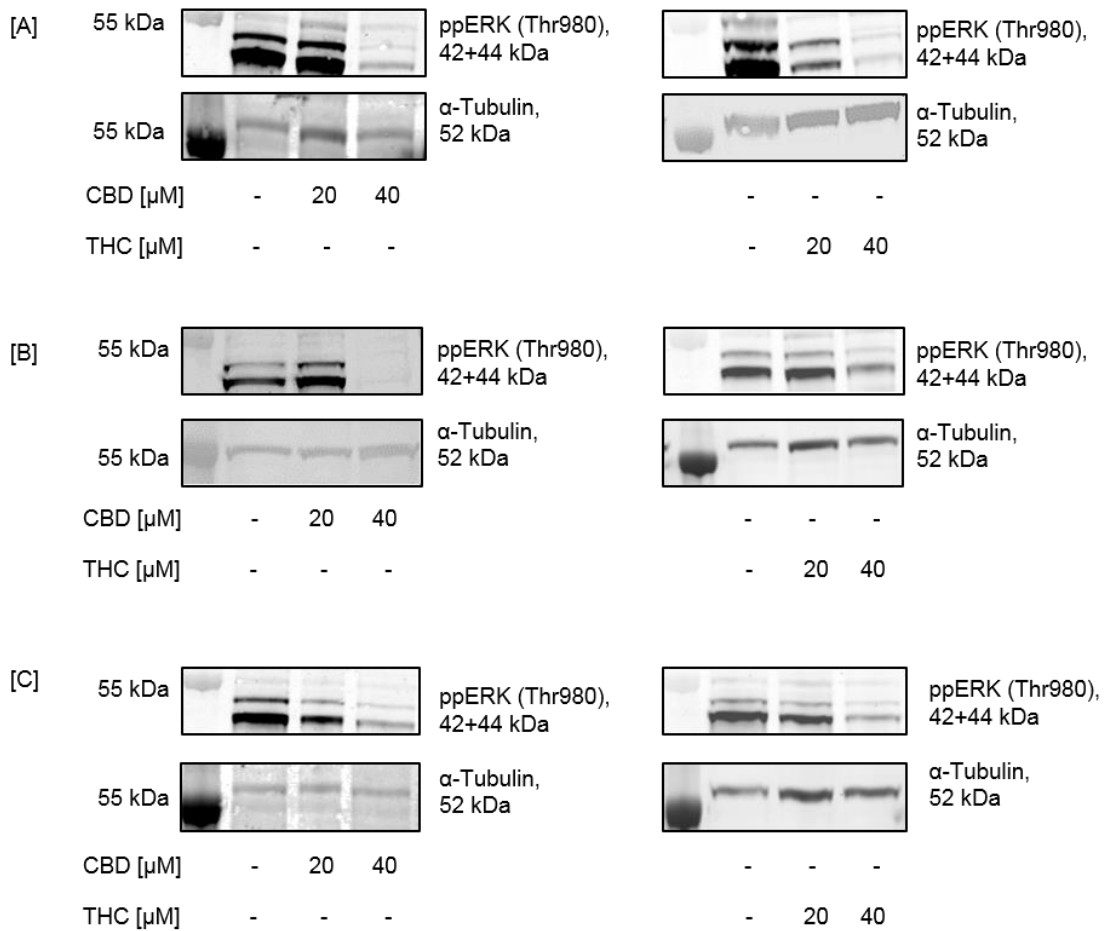


Abb. 19: **Phosphorylierungsänderungen im MAPK/ERK-Signalweg.** Vorbehandlung der Jurkat [A], MOLM13 [B] und MOLM14 [C] Zellen für 90 min mit 0 μM, 20 μM und 40 μM CBD oder THC. Die Proteine wurden mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und durch Western Blots fixiert. Verwendeter Primäntikörper war ppERK (Thr980) und als Ladekontrolle diente der α-Tubulin-AK.

5. Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit konnte im Hinblick auf die Frage nach der antileukämischen Wirkung vom nicht-psychoaktiven Cannabisderivat CBD eine eindeutige proapoptotische Kapazität nachgewiesen werden. Sowohl im Ausmaß der Apoptoseinduktion als auch im Wirkungsmechanismus schien sich CBD marginal vom THC zu unterscheiden. Weiter konnte geklärt werden, ob durch die Kombination THC/CBD das nebenwirkungsreiche THC reduziert werden könnte, mit einer vergleichbaren oder stärkeren proapoptotischen Kapazität als THC oder CBD allein.

Bei der Messung der Anzahl apoptotischer Zellen im Annexin V/PI basierten Assay zeigte sich durch die Behandlung mit Cannabinoiden in allen untersuchten Leukämiezelllinien konzentrationsabhängig eine Apoptoseinduktion. Durch die hohen Standardabweichungen konnten allerdings nur wenige signifikante Unterschiede zwischen den verwendeten Cannabinoiden gemessen werden. Die durch nichtlineare Regression ermittelten IC_{50} -, IC_{70} - und IC_{90} -Werte zeigten eine tendenziell stärkere Apoptoseinduktion durch CBD als durch THC oder THC/CBD. Zu beachten ist, dass die IC_{90} -Werte durch die nichtlineare Regression des Grafikprogramms teilweise extrapoliert wurden.

Die Ergebnisse lassen hinsichtlich der Stärke der Apoptoseinduktion in Leukämiezellen einen Vorteil für CBD vermuten. Die ebenfalls eingesetzte Kombination THC/CBD unterschied sich anhand der erhobenen Apoptosedaten kaum von der THC-Behandlung bezüglich des Ausmaßes der Apoptoseinduktion. Die Kombination vom nebenwirkungsreichen THC ist durch die Kombination mit CBD geringer, mit einer ähnlich hohen Apoptoseinduktion wie THC allein. Daher könnte es als eine potenzielle Alternative zu THC für einen möglichen klinischen Einsatz von Cannabinoiden gesehen werden.

Allerdings zeigte THC/CBD eine geringere proapoptotische Kapazität als CBD. Daher war von den drei getesteten Cannabinoiden CBD das potenteste und das am ehesten erfolgversprechendste Cannabinoid für einen möglichen künftigen klinischen Einsatz zur Therapie von Patienten mit akuter Leukämie.

Vergleicht man nun die Stärke der Apoptoseinduktion der vier untersuchten Leukämiezelllinien miteinander, zeigen HL-60 Zellen die stärkste Apoptoseinduktion durch Cannabinoide, gefolgt von MOLM13 Zellen und der T-ALL Leukämiezelllinie Jurkat. In MOLM14 Zellen erzielte die Behandlung mit Cannabinoiden die schwächste Apoptoseinduktion. Zusätzlich zeigen MOLM14 Zellen kaum nennenswerte Unterschiede in der Anzahl apoptotischer Zellen im Vergleich der drei eingesetzten Cannabinoide.

MOLM13 und MOLM14 Zellen entstammen demselben Patienten und besitzen viele Gemeinsamkeiten. Trotzdem war erkennbar, dass MOLM14 Zellen auf eine Behandlung mit Cannabinoiden mit einer geringeren Apoptoseinduktion reagierten als MOLM13 Zellen. Möglicherweise könnte dies auf relevante Unterschiede in ihrer Antigenexpression hinweisen, die Cannabinoiden eine stärkere Apoptoseinduktion in MOLM13 Zellen ermöglichten als in MOLM14 Zellen.

Dies könnte auch als Erklärung für das starke proapoptotische Ansprechen von HL-60 Zellen auf Cannabinoide dienen. Die HL-60 Zellen unterscheiden sich möglicherweise in relevanten Antigenen und zellulären Eigenschaften von anderen Leukämiezelllinien, so dass sie auf eine Cannabinoid-Behandlung am Stärksten ansprachen.

Salitzky konnte leukämiezelllinienübergreifend eine Apoptoseinduktion durch THC nachweisen (Salitzky, 2017). Vergleicht man die berechneten IC_{50} -Werte aus 4.1 mit Vordaten der Kollegen, war durch eine THC-Behandlung in dieser Arbeit eine stärkere Apoptoseinduktion in den Leukämiezellmodellen erkennbar. Erklärungen für die unterschiedlich hohen IC_{50} -Werte könnten methodische Differenzen sein, wie zum Beispiel Kulturbedingungen, Dosierungen und individuelle zelluläre Sensitivitätsunterschiede auf THC.

Beispielsweise ist der Anteil von Serumproteinen im Kulturmedium entscheidend für die Wirkung von THC auf Zellen von Gliomen. Jacobsson zeigte, dass ein Zusammenhang zwischen der FBS-Konzentration und der THC-Wirkung auf die Zellviabilität besteht: je geringer die Konzentration von FBS im Kulturmedium, desto stärker die Reduktion der Zellviabilität durch THC. Eine genaue Erklärung für diesen Effekt konnte nicht gefunden werden (Jacobsson et al., 2000).

Außerdem ist THC ein Phytocannabinoid (Yamaori et al., 2011). Als Naturprodukt muss man in Betracht ziehen, dass THC unterschiedlich stark proapoptotisch in Leukämiezellen wirken kann. Unter anderem ist THC sehr licht- und luftempfindlich (FAIRBAIRN et al., 1976) und als Lösung sollte es bei -20°C gelagert werden (Herstellerangaben der THC Pharm).

Unter Anbetracht der vielen Variablen in der Methodik können die Unterschiede zwischen den IC_{50} -Werten dieser Arbeit und denen von Salitzky erklärt werden.

Vergleichbare Versuche zur Apoptoseinduktion durch Cannabinoide in HL-60 Zellen wurden 2017 von Scott durchgeführt (Scott et al., 2017). 2017 konnte gezeigt werden, dass CBD im Vergleich zu THC einen stärkeren proapoptotischen Effekt auf akute Leukämiezellen hatte. Dies konnte mit den in Kapitel 4.1 erhobenen Daten bestätigt werden.

In Scotts Arbeit wurde anhand der IC_{50} -Werte THC/CBD die höchste proapoptotische Kapazität zugesprochen, was im Rahmen dieser Arbeit nicht bestätigt werden konnte. In Kapitel 4.1 kristallisierte sich heraus, dass CBD von allen drei getesteten Cannabinoiden tendenziell die stärkste Apoptoseinduktion in akuten Leukämiezelllinien besaß. THC/CBD hingegen erreichte eine ähnlich hohe Apoptoseinduktion wie THC, die aber geringer war als die von CBD.

Die von Scott erhobenen IC_{50} -Werte waren wesentlich geringer als die in Kapitel 4.1 generierten Werte. Dies könnte wie oben schon erwähnt an methodischen Differenzen liegen, wie zum Beispiel in unterschiedlichen Kulturbedingungen und dem verwendeten THC.

Um die Versuche so gut wie möglich an den klinischen Alltag anzupassen, wäre eine Kombination der Cannabinoidbehandlung mit den gängigen Chemotherapeutika sinnvoll. Der Effekt durch die kombinierte Behandlung wurde von Scott untersucht. Die Ergebnisse zeigten eine zunehmende Zytotoxizität durch die Kombination von Chemotherapeutika (Vincristin, Cytarabin) mit Cannabinoiden. HL-60 Zellen zeigten einen IC_{50} -Wert von 20 nM unter Vincristin, während unter Zugabe einer subtoxischen Dosis von THC/CBD der IC_{50} -Wert auf 3,2 nM reduziert werden konnte (Scott et al., 2017).

Wegen der hohen Standardabweichung konnten die Ergebnisse des Annexin V/PI basierten Assays im Kapitel 4.1 nur als Tendenz für eine höhere zelluläre Apoptoserate durch Behandlung mit CBD interpretiert werden. Es bedarf weiterer Versuche, um einen klaren proapoptotischen Vorteil von CBD gegenüber THC in Leukämiezelllinien zu zeigen.

Ein weiterer Schritt könnten randomisierte prospektive Studien mit THC/CBD und CBD sein, um das therapeutische Potential im klinischen Einsatz bei akuter Leukämie abschätzen zu können.

Wie oben beschrieben bewirken Cannabinoide in Leukämiezelllinien eine Apoptoseinduktion. Diese sollte in nativen Blasten ex vivo untersucht und gegebenenfalls gezeigt werden.

In den Versuchen konnte in nativen Blasten durch eine Cannabinoid-Behandlung eine zytoreduktive Wirkung mit individueller Sensitivität beobachtet werden. Diese individuelle Sensitivität der nativen Blasten auf Cannabinoide könnte mit der jeweiligen Antigenexpression zusammenhängen (Tab. 14). Wie in Kapitel 4.2 beschrieben, wurde das NK-Zell-AG CD56 von den drei Patienten exprimiert, die das schwächste proapoptotische Ansprechen auf eine Cannabinoid-Behandlung aufwiesen (Patient 1,2,3). Möglicherweise spielt CD56 eine wichtige Rolle bei der zellulären Wirkung von Cannabinoiden in akuten Leukämien.

Die NK-Zell-Leukämie (ANKCL) ist als eine sehr aggressive Neoplasie mit hoher Mortalität bekannt. Die zugrundeliegende Pathophysiologie der ANKCL ist eine unkontrollierte Aktivierung der Monozyten und Makrophagen als Reaktion auf Zytokine der NK-Zellen (Okuda et al., 1991, KaizU et al., 2004). In der Definition der NK-Zell-Leukämie ist neben dem CD56-AG unter anderem das Vorliegen des Vorläufer-AG HLA-DR genannt (Okuda et al., 1991, (Imamura et al., 1990), welches bei Patient 2 und 3 molekulargenetisch nachgewiesen werden konnte.

Salitzky beschreibt eine antiproliferative und proapoptotische Wirkung von THC in Leukämiezelllinien und mononukleären Patientenzellen mit vor allem lymphatischer Differenzierung oder in myeloischen Zellen mit aberranter Expression lymphatischer Marker (Salitzky, 2017). Die Ergebnisse dieser Arbeit konnten diese Aussagen nicht unterstützen, da die untersuchten mononukleären Zellen kaum B- oder T-Zell Antigene exprimierten.

Um eine fundierte Aussage zu Einflüssen von bestimmten Antigenen auf das Ansprechen einer Cannabinoid-Behandlung treffen zu können bedarf es weiterer Versuche. Hier sollte ein Schwerpunkt daraufgelegt werden, inwieweit Antigenklassen den zytoreduktiven Effekt von Cannabinoiden beeinflussen. In Zukunft könnte es möglich sein, anhand eines molekularen Profils zu entscheiden, ob ein

Patient von einer Cannabinoid-Behandlung profitiert oder nicht. Weitere Versuche sollten diese Aussage an größeren Patientenkohorten mit Blick auf AG-Klassen validieren. Das NK-Zell-AG könnte beispielsweise solch ein molekularer Marker sein. Bei Expression von NK-Zell spezifischen AG könnte man möglicherweise davon ausgehen, dass bei diesen Patienten nur eine geringe zytoreduktive Wirkung von Cannabinoiden auf mononukleären Zellen zu erwarten ist.

Da in dieser Arbeit native Blasten von Patienten mit AML oder ALL untersucht wurden, sollten ebenfalls Patienten mit einer ALL mit in die Versuchsplanung aufgenommen werden, um eine leukämiezellübergreifende Aussage treffen zu können.

Diese weiteren Analysen von Mutationen und Antigenexpressionen mononukleären Zellen mit Blick auf das Therapieansprechen von Cannabinoiden könnten ein erfolgsversprechendes Konzept sein, um möglicherweise in Zukunft im klinischen Alltag eine Patientengruppe definieren zu können, die von einer THC- oder CBD-Behandlung profitieren könnte.

Bisherige Versuche zeigten, dass gesundes Gewebe von Knochenmarksspendern eine niedrige Expression von CB1/2-Rezeptoren aufweisen (Salitzky, 2017, Kampa-Schittenhelm et al., 2016). Durch die Messung der Apoptoseinduktion durch CBD in Zellen gesunder Knochenmarksspenders konnte gezeigt werden, dass CBD in gesunden Zellen weniger stark Apoptose induziert als in Leukämiezellen. Durch diesen Nachweis und das Wissen, dass Cannabinoide vor allem über die CB1/2-Rezeptoren Apoptose induzieren, könnten Cannabinoide im klinischen Kontext eingesetzt werden, um maligne Zellen zu reduzieren, ohne aber zu stark auf gesunde Zellen zu wirken.

Um die unterschiedlich starke Apoptoseinduktion durch THC oder CBD in Leukämiezellen auf zellulärer Ebene zu erklären, wurde deren Wirkungsweise in zwei Signalwegen untersucht und miteinander verglichen. Ziel war es, Änderungen in zellulären Signalwegen durch Behandlung mit THC oder CBD aufzudecken und in Hinblick auf die Stärke des bewirkten Effekts Unterschiede zwischen beiden Cannabinoiden zu beschreiben. Dies könnte Aufschluss über die Wirkweise von Cannabinoiden geben und eine Erklärung dafür liefern, warum sie in Leukämiezelllinien unterschiedlich stark wirkten.

Mit Hilfe des Human Phospho-Kinase Arrays und den Auswertungen der angefertigten Western Blots konnte gezeigt werden, dass THC und CBD konzentrationsabhängig eine Dephosphorylierung des PI3K/AKT-(AKT Threonin/Serin, p70 S6 Kinase) und MAPK/ERK-Signalwegs (pERK) bewirkten.

Kalenderoglou beschrieb 2017, dass durch eine Behandlung von Jurkat Zellen mit CBD das Phosphorylierungslevel von AKT und dem ribosomalen Protein S6 signifikant herabreguliert wurde und die Deaktivierung von S6 zeitabhängig war. Unter steigender Konzentration von CBD wurde keine Dosis-Wirkungs-Beziehung festgestellt (Kalenderoglou et al., 2017). Mit Hilfe von Western Blots und den verwendeten Phospho-Antikörpern konnte in dieser Arbeit eine konzentrationsabhängige Dephosphorylierung unter CBD-Behandlung bestätigt werden. Allerdings zeigte sich, anders als durch Kalenderoglou beschrieben, durch den Einsatz zweier Konzentrationen der Cannabinoide eine Dosis-Wirkungs-Beziehung bezüglich der Dephosphorylierung in akuten Leukämien.

Unter CBD- und THC-Behandlung ist in Jurkat Zellen konzentrationsabhängig eine Dephosphorylierung erkennbar. Bei der Behandlung mit THC ist diese unter Verwendung des pAKT-AKs allerdings nur gering ausgeprägt.

In den MOLM13 Zellen sind bei hohen Konzentrationen von CBD die Banden kaum mehr zu erkennen. Dies spricht dafür, dass eine starke Dephosphorylierung stattfand. Allerdings nahm im Vergleich zur Kontrollgruppe die Bandenintensität, also die Phosphorylierung, bei den pAKT-AK unter geringerer

Konzentration von CBD zu. THC zeigte im Vergleich zur hohen Dosis CBD eine weniger stark ausgeprägte konzentrationsabhängige Dephosphorylierung, vor allem beim Einsatz des pAKT(Ser473)-AKs.

Die MOLM14 Zellen zeigten unter CBD eine konzentrationsabhängige Dephosphorylierung mit einer kaum wahrnehmbaren Bande nach Behandlung mit 40 μ M CBD. Unter THC zeigt sich ebenfalls eine Abnahme der Bandenintensität, allerdings in geringerem Ausmaß als unter CBD. Auch in MOLM14 Zellen fiel eine schwächere Dephosphorylierung beim AK pAKT(Ser473) auf.

Die schwächere Abnahme der Bandenintensität bei Verwendung des pAKT(Ser473)-AKs nach einer THC-Behandlung könnte ein Hinweis dafür sein, dass sich THC und CBD möglicherweise in ihrer Wirkung auf das Serin-Residuum des AKTs unterscheiden. Es ist bekannt, dass AKT durch Phosphorylierung vollständig aktiviert wird. Wie in der Einleitung beschrieben wurde, reguliert der PI3K/AKT-Signalweg zelluläre Prozesse wie Wachstum, Überleben, Proliferation und Metabolismus. Die Dephosphorylierung der AKT-Residuen durch Cannabinoide könnte Einschränkungen in genau diesen Regulationsmöglichkeiten nach sich ziehen und eine zelluläre Apoptoseinduktion bewirken. Die beobachtete unterschiedliche Dephosphorylierung im Serin-Residuum des AKTs durch THC und CBD könnte eine mögliche Erklärung für die unterschiedlich starke Apoptoseinduktion sein, da sie das Zellüberleben unterschiedlich regulieren.

Um diese Hypothese weiter zu untersuchen und zu bestätigen, müsste das Ausmaß der Dephosphorylierung unter THC- und CBD-Behandlung in weiteren Versuchen an Leukämiezellen getestet und quantifiziert werden. Um zu zeigen, dass unter THC-Behandlung eine geringere Dephosphorylierung des Serin-Residuums von AKT in Zellen zu beobachten ist als unter CBD-Behandlung, sollte mit weiteren Phospho-AK der Effekt auf das Serin-Residuum validiert werden.

Im Gegensatz zur Dephosphorylierung des PI3K/AKT-Signalwegs durch Cannabinoide beschreibt Kalenderoglou in Jurkat Zellen nach Behandlung mit CBD eine nicht signifikante Zunahme der Phosphorylierung von MAPK (Kalenderoglou et al., 2017). Die im Kapitel 4.3 erhobenen Daten widersprechen den Ergebnissen von Kalenderoglou. Diese zeigten eine konzentrationsabhängige Dephosphorylierung von pERK durch THC und CBD in allen untersuchten Zelllinien.

Um sicher zu stellen, dass eine konzentrationsabhängige Herabregulierung im MAPK-Signalweg besteht, bedarf es weiterer Versuche zur Validierung der Phosphorylierungsänderungen in Leukämiezellen unter Cannabinoid-Behandlung. Diese sollten mit verschiedenen Konzentrationen und mit Phospho-AK nachgeschalteter Kinasen des pERKs durchgeführt werden. Dies könnte möglicherweise die Diskrepanz beseitigen, die sich durch den Nachweis von sowohl einer Dephosphorylierung (Kapitel 4.3) als auch einer Phosphorylierungszunahme (Kalenderoglou) von pERK unter Cannabinoid-Behandlung ergeben hat.

Obwohl sich in den Signalwegen eine starke Regulation durch Cannabinoide zeigte, war diese nicht in gleichem Ausmaß in der Apoptoseinduktion erkennbar. CBD induzierte unter steigender Konzentration die zelluläre Apoptose und eine Dephosphorylierung in den Signalwegen. Allerdings schien die Wirkung der Cannabinoide potenter in der Dephosphorylierung als in der zellulären Apoptoseinduktion zu sein. Es könnte sein, dass CBD die untersuchten Signalwege beeinflusste und herabregulierte, der Effekt aber durch Änderungen in noch nicht untersuchten Signalwegen relativiert wurde und sich dadurch die Apoptoseinduktion nicht so eindrücklich darstellte wie die Dephosphorylierung.

Die Erkenntnis, dass THC und CBD einen herabregulierenden Effekt auf den PI3K/AKT- und MAPK-Signalweg besitzen, könnte helfen, den Wirkmechanismus von Cannabinoiden zu erklären und genauer zu verstehen. Da beide untersuchten Signalwege wichtige zelluläre Funktionen regulieren und bei Krankheiten und Tumorerkrankungen verändert bzw. fehlreguliert sind, könnte hier ein Ansatzpunkt für weitere Forschungen zur Wirkungsweise von THC und CBD liegen.

Ein weiteres Forschungsfeld eröffnet sich in Hinblick auf den PI3K/AKT-Signalweg. Durch die unterschiedlich starke Regulation des Signalwegs durch THC und CBD könnten die Unterschiede im Wirkmechanismen der beiden Cannabinoide weiter erforscht werden.

Um den Wirkungsmechanismus von Cannabinoiden, vor allem von CBD, weiter zu klären, sollten weitere Signalwege untersucht werden. Beispielsweise zeigten sich im Human Phospho-Kinase Array (Abb. 14) weitere Phosphorylierungsänderungen. Diese wurden im Rahmen dieser Forschungsarbeit nicht näher untersucht und könnten weitere Forschungsfelder darstellen, um die Wirkungsweise von Cannabinoiden in akuten Leukämien weiter zu spezifizieren.

6. Fazit

Da der klinische Einsatz von THC wegen der psychogenen Nebenwirkungen limitiert und reglementiert wird, wäre CBD als optionales Therapeutikum ohne psychogene Nebenwirkungen sehr attraktiv, vor allem da es eine starke proapoptotische Kapazität in Leukämiezellen aufweist.

THC/CBD hat sich im Vergleich zu THC als ähnlich stark proapoptotisch erwiesen. Daher könnte es ebenfalls ein optionales Therapeutikum darstellen, da bereits etablierte Medikamente mit der THC/CBD-Kombination im klinischen Alltag bei anderen Krankheiten eingesetzt werden.

Die Ergebnisse geben Anhaltspunkte für weitere klinische Studien zur Untersuchung von Signalwegen und zur Definition von Patientenkohorten mit bestimmten Antigenen, die von einer Therapie mit Cannabinoiden profitieren könnten.

7. Zusammenfassung

Das Endocannabinoidsystem ist Gegenstand intensiver Tumorforschung. Für verschiedene Cannabinoidderivate konnte in präklinischen wie auch klinischen Studien ein antiemetisches, schmerzlinderndes, appetitsteigerndes und antineoplastisches Potential nachgewiesen werden. Während für den supportiven Einsatz als Antiemetikum eine Therapiezulassung begleitend zur Chemotherapie besteht, ist der antineoplastische Effekt weiter Gegenstand präklinischer Forschung. In diesem Zusammenhang konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass Delta-9-Tetrahydrocannabinol (THC) eine antiproliferative und proapoptotische Wirkung auf native Leukämiezellen besitzt. Allerdings werden hohe Dosen benötigt und der klinische Einsatz von THC ist wegen des begleitenden psychoaktiven Effektes begrenzt. Cannabidiol (CBD) ist ein nicht-psychoaktives Cannabinoidderivat was für den klinischen Einsatz von Vorteil wäre – wobei bislang nicht bekannt ist, ob bezüglich des antineoplastischen Effektes CBD dem THC äquivalent wäre. Dieser Aspekt wird in der vorliegenden Promotionsarbeit adressiert.

In dieser Arbeit wurde die antileukämische Wirkung von CBD versus THC versus einer 1:1 Kombination von THC und CBD auf Leukämiezellmodelle wie auch native Patientenproben untersucht. Methodisch kamen Zellexperimente in Bezug auf den Nachweis von Apoptoseinduktion und Zellviabilität zum Einsatz. Die involvierten Signalwege wurden auf Proteinebene mittels einem Phosphokinase Array untersucht. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass CBD in den untersuchten Modellen mindestens äquipotent zu der antileukämischen Wirkung von THC ist. Im Proteinarray zeigt sich dieser Effekt vermittelt durch Inhibition der PI3K/AKT- und MAPK/ERK-Signalwege. Im Besonderen zeigten sich weiter auch die ex vivo behandelten nativen Patientenproben gegenüber beiden Cannabinoiden sensitiv – wobei dies interindividuell stark variierte. Im Vergleich erwiesen sich Proben gesunder Knochenmarksspende deutlich weniger sensitiv gegenüber CBD und THC, was ein therapeutisches Fenster für Cannabinoide eröffnet. Die Ergebnisse dieser Arbeit dienen damit als prinzipiellen Nachweis eines antileukämischen Effektes von CBD als auch THC, was eine weitere klinische Evaluation rechtfertigt.

8. Danksagung

Mein Dank gilt Herrn PD Dr. M. Schittenhelm und Frau Dr. med K. Kampa-Schittenhelm, für die Annahme als Doktorandin in ihrer Arbeitsgruppe sowie die hervorragende, stetige Betreuung der Dissertation.

Bei der Arbeitsgemeinschaft des Labors möchte ich mich für die Unterstützung sowie die stets freundliche Hilfestellung während der Durchführung der Versuche bedanken.

9. Literaturverzeichnis

- ALESSI, D. R., ANDJELKOVIC, M., CAUDWELL, B., CRON, P., MORRICE, N., COHEN, P. & HEMMING, B. A. 1996. Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *The EMBO journal*, 15, 6541-6551.
- ANJUM, R. & BLENIS, J. 2008. The RSK family of kinases: emerging roles in cellular signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9, 747.
- AOYAGI, T. & MATSUI, T. 2011. Phosphoinositide-3 kinase signaling in cardiac hypertrophy and heart failure. *Curr Pharm Des*, 17, 1818-24.
- APPENDINO, G., CHIANESE, G. & TAGLIALATELA-SCAFATI, O. 2011. Cannabinoids: occurrence and medicinal chemistry. *Curr Med Chem*, 18, 1085-99.
- ATWOOD, B. K. & MACKIE, K. 2010. CB2: a cannabinoid receptor with an identity crisis. *Br J Pharmacol*, 160, 467-79.
- BAKER, D., PRYCE, G., CROXFORD, J. L., BROWN, P., PERTWEE, R. G., HUFFMAN, J. W. & LAYWARD, L. 2000. Cannabinoids control spasticity and tremor in a multiple sclerosis model. *Nature*, 404, 84-87.
- BEAL, J. E., OLSON, R., LAUBENSTEIN, L., MORALES, J. O., BELLMAN, P., YANGCO, B., LEFKOWITZ, L., PLASSE, T. F. & SHEPARD, K. V. 1995. Dronabinol as a treatment for anorexia associated with weight loss in patients with AIDS. *Journal of Pain and Symptom Management*, 10, 89-97.
- BERROCOSO, E., REY, R., FERNÁNDEZ-ARÉVALO, M., ANTONIO MICÓ, J. & MARTIN-BANDERAS, L. 2017. *Single oral dose of cannabinoid derivate loaded PLGA nanocarriers relieves neuropathic pain for eleven days*.
- BRUGGE, J., HUNG, M. C. & MILLS, G. B. 2007. A new mutational AKTivation in the PI3K pathway. *Cancer Cell*, 12, 104-7.
- BRUNELLE, J. L. & GREEN, R. 2014. Chapter Twelve - One-dimensional SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (1D SDS-PAGE). In: LORSCH, J. (ed.) *Methods in Enzymology*. Academic Press.
- BURGERING, B. M. T. & COFFER, P. J. 1995. Protein kinase B (c-Akt) in phosphatidylinositol-3-OH kinase signal transduction. *Nature*, 376, 599-602.
- BURSTEIN, S., FRIDERICH, E., KÖGEL, B., SCHNEIDER, J. & SELVE, N. 1998. Analgesic effects of Q2,Q2 dimethylheptyl⁰8-THC-11-oic acid (CT3) in mice. *Life Sciences*, 63, 161-168.
- CASANOVA, M. L., BLAZQUEZ, C., MARTINEZ-PALACIO, J., VILLANUEVA, C., FERNANDEZ-ACENERO, M. J., HUFFMAN, J. W., JORCANO, J. L. & GUZMAN, M. 2003. Inhibition of skin tumor growth and angiogenesis in vivo by activation of cannabinoid receptors. *J Clin Invest*, 111, 43-50.
- CHAKRAVARTI, B., RAVI, J. & GANJU, R. K. 2014. Cannabinoids as therapeutic agents in cancer: current status and future implications. *Oncotarget*, 5, 5852-72.
- CHEN, J. & RAYMOND, K. 2008. Beta-glucans in the treatment of diabetes and associated cardiovascular risks. *Vascular Health and Risk Management*, 4, 1265-1272.
- CHONG, Z. Z., SHANG, Y. C., WANG, S. & MAIESE, K. 2012. A Critical Kinase Cascade in Neurological Disorders: PI 3-K, Akt, and mTOR. *Future neurology*, 7, 733-748.

- CONSROE, P., MUSTY, R., REIN, J., TILLERY, W. & PERTWEE, R. 1997. The Perceived Effects of Smoked Cannabis on Patients with Multiple Sclerosis. *European Neurology*, 38, 44-48.
- DEVANE, W. A., DYSARZ, F. A., JOHNSON, M. R., MELVIN, L. S. & HOWLETT, A. C. 1988. Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Molecular Pharmacology*, 34, 605.
- DI MARZO, V., MELCK, D., BISOGNO, T. & DE PETROCELLIS, L. 1998. Endocannabinoids: endogenous cannabinoid receptor ligands with neuromodulatory action. *Trends in Neurosciences*, 21, 521-528.
- ERNST, O. & ZOR, T. 2010. Linearization of the Bradford protein assay. *J Vis Exp*.
- ERSAHIN, T., TUNCBAG, N. & CETIN-ATALAY, R. 2015. The PI3K/AKT/mTOR interactive pathway. *Mol Biosyst*, 11, 1946-54.
- FAIRBAIRN, J. W., LIEBMANN, J. A. & ROWAN, M. G. 1976. The stability of cannabis and its preparations on storage. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 28, 1-7.
- FELDER, C. C., JOYCE, K. E., BRILEY, E. M., MANSOURI, J., MACKIE, K., BLOND, O., LAI, Y., MA, A. L. & MITCHELL, R. L. 1995. Comparison of the pharmacology and signal transduction of the human cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Molecular Pharmacology*, 48, 443.
- FERRANTE, A. & THONG, Y. H. 1978. A rapid one-step procedure for purification of mononuclear and polymorphonuclear leukocytes from human blood using a modification of the hypaque-ficoll technique. *Journal of Immunological Methods*, 24, 389-393.
- GALLILY, R., EVEN-CHEN, T., KATZAVIAN, G., LEHMANN, D., DAGAN, A. & MECHOULAM, R. 2003. γ -Irradiation Enhances Apoptosis Induced by Cannabidiol, a Non-psychoactive Cannabinoid, in Cultured HL-60 Myeloblastic Leukemia Cells. *Leukemia & Lymphoma*, 44, 1767-1773.
- GALVE-ROPERH, I., SANCHEZ, C., CORTES, M. L., GOMEZ DEL PULGAR, T., IZQUIERDO, M. & GUZMAN, M. 2000. Anti-tumoral action of cannabinoids: involvement of sustained ceramide accumulation and extracellular signal-regulated kinase activation. *Nat Med*, 6, 313-9.
- GAONI, Y. & MECHOULAM, R. 1964. Isolation, Structure, and Partial Synthesis of an Active Constituent of Hashish. *Journal of the American Chemical Society*, 86, 1646-1647.
- GOLECH, S. A., MCCARRON, R. M., CHEN, Y., BEMBRY, J., LENZ, F., MECHOULAM, R., SHOHAMI, E. & SPATZ, M. 2004. Human brain endothelium: coexpression and function of vanilloid and endocannabinoid receptors. *Brain Res Mol Brain Res*, 132, 87-92.
- GUZMÁN, M. 2003. Cannabinoids: potential anticancer agents. *Nature Reviews Cancer*, 3, 745.
- HERMANSON, D. J. & MARNETT, L. J. 2011. Cannabinoids, endocannabinoids, and cancer. *Cancer Metastasis Rev*, 30, 599-612.
- HOHMANN, T., GRABIEC, U., GHADBAN, C., FEESE, K. & DEHGhani, F. 2017. The influence of biomechanical properties and cannabinoids on tumor invasion. *Cell Adh Migr*, 11, 54-67.

- HOWLETT, A. C., BARTH, F., BONNER, T. I., CABRAL, G., CASELLAS, P., DEVANE, W. A., FELDER, C. C., HERKENHAM, M., MACKIE, K., MARTIN, B. R., MECHOULAM, R. & PERTWEE, R. G. 2002. International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of Cannabinoid Receptors. *Pharmacological Reviews*, 54, 161.
- IBSEN, M. S., CONNOR, M. & GLASS, M. 2017. Cannabinoid CB(1) and CB(2) Receptor Signaling and Bias. *Cannabis and cannabinoid research*, 2, 48-60.
- IMAMURA, N., KUSUNOKI, Y., KAWA-HA, K., YUMURA, K., HARA, J., ODA, K., ABE, K., DOHY, H., INADA, T., KAJIHARA, H. & ET AL. 1990. Aggressive natural killer cell leukaemia/lymphoma: report of four cases and review of the literature. Possible existence of a new clinical entity originating from the third lineage of lymphoid cells. *Br J Haematol*, 75, 49-59.
- JACOBSSON, S. O. P., RONGÅRD, E., STRIDH, M., TIGER, G. & FOWLER, C. J. 2000. Serum-dependent effects of tamoxifen and cannabinoids upon C6 glioma cell viability. *Biochemical Pharmacology*, 60, 1807-1813.
- KAIZU, K., MAEDA, M., OHKAWA, T., HAYASHIDA, M., NAKAJIMA, S., SUGISAKI, Y. & FUKUNAGA, Y. 2004. Marked Elevation of Soluble Fas Ligand and Cytokine Secretion after Splenectomy in Aggressive Natural Killer Cell Leukemia/Lymphoma. *Leukemia & Lymphoma*, 45, 2291-2294.
- KALENDEROĞLU, N., MACPHERSON, T. & WRIGHT, K. L. 2017. Cannabidiol Reduces Leukemic Cell Size - But Is It Important? *Front Pharmacol*, 8, 144.
- KAMPA-SCHITTENHELM, K. M., SALITZKY, O., AKMUT, F., ILLING, B., KANZ, L., SALIH, H. R. & SCHITTENHELM, M. M. 2016. Dronabinol has preferential antileukemic activity in acute lymphoblastic and myeloid leukemia with lymphoid differentiation patterns. *BMC Cancer*, 16, 25.
- KERR, J. F., WYLLIE, A. H. & CURRIE, A. R. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, 26, 239-57.
- KHAN, M. I., SOBOCIŃSKA, A. A., CZARNECKA, A. M., KRÓL, M., BOTTA, B. & SZCZYLIK, C. 2016. The Therapeutic Aspects of the Endocannabinoid System (ECS) for Cancer and their Development: From Nature to Laboratory. *Current pharmaceutical design*, 22, 1756-1766.
- KIM, E. K. & CHOI, E.-J. 2010. Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1802, 396-405.
- LEE, W.-S., ERDELYI, K., MATYAS, C., MUKHOPADHYAY, P., VARGA, Z. V., LIAUDET, L., HASK', G., 'IHÁKOVÁ, D., MECHOULAM, R. & PACHER, P. 2016. Cannabidiol Limits T Cell-Mediated Chronic Autoimmune Myocarditis: Implications to Autoimmune Disorders and Organ Transplantation. *Molecular Medicine*, 22, 136-146.
- LIU, P., CHENG, H., ROBERTS, T. M. & ZHAO, J. J. 2009. Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer. *Nat Rev Drug Discov*, 8, 627-44.
- MANNING, B. D. & CANTLEY, L. C. 2007. AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell*, 129, 1261-1274.
- MAO, J., PRICE, D. D., LU, J., KENISTON, L. & MAYER, D. J. 2000. Two distinctive antinociceptive systems in rats with pathological pain. *Neuroscience Letters*, 280, 13-16.

- MARCU, J. P., CHRISTIAN, R. T., LAU, D., ZIELINSKI, A. J., HOROWITZ, M. P., LEE, J., PAKDEL, A., ALLISON, J., LIMBAD, C., MOORE, D. H., YOUNT, G. L., DESPREZ, P. Y. & MCALLISTER, S. D. 2010. Cannabidiol enhances the inhibitory effects of delta9-tetrahydrocannabinol on human glioblastoma cell proliferation and survival. *Mol Cancer Ther*, 9, 180-9.
- MARTE, B. M. & DOWNWARD, J. 1997. PKB/Akt: connecting phosphoinositide 3-kinase to cell survival and beyond. *Trends Biochem Sci*, 22, 355-8.
- MASANGKAY, E. G. 2014. *FDA Awards Orphan Status To Insys' Cannabidiol For GBM* [Online]. Available: <https://www.clinicalleader.com/doc/fda-awards-orphan-status-to-insys-cannabidiol-for-gbm-0001> [Accessed 6 January 2020].
- MASSI, P., VACCANI, A., BIANCHETTI, S., COSTA, B., MACCHI, P. & PAROLARO, D. 2006. The non-psychoactive cannabidiol triggers caspase activation and oxidative stress in human glioma cells. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 63, 2057-2066.
- MATSUDA, L. A., LOLAIT, S. J., BROWNSTEIN, M. J., YOUNG, A. C. & BONNER, T. I. 1990. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature*, 346, 561-564.
- MCKALLIP, R. J., JIA, W., SCHLOMER, J., WARREN, J. W., NAGARKATTI, P. S. & NAGARKATTI, M. 2006. Cannabidiol-Induced Apoptosis in Human Leukemia Cells: A Novel Role of Cannabidiol in the Regulation of p22^{phox} and Nox4 Expression. *Molecular Pharmacology*, 70, 897.
- MECHOULAM, R., BEN-SHABAT, S., HANUS, L., LIGUMSKY, M., KAMINSKI, N. E., SCHATZ, A. R., GOPHER, A., ALMOG, S., MARTIN, B. R., COMPTON, D. R., PERTWEE, R. G., GRIFFIN, G., BAYEWITCH, M., BARG, J. & VOGEL, Z. 1995. Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochemical Pharmacology*, 50, 83-90.
- MECHOULAM, R. & HANUŠ, L. R. 2002. Cannabidiol: an overview of some chemical and pharmacological aspects. Part I: chemical aspects. *Chemistry and Physics of Lipids*, 121, 35-43.
- MENDOZA, M. C., ER, E. E. & BLENIS, J. 2011. The Ras-ERK and PI3K-mTOR Pathways: Cross-talk and Compensation. *Trends in biochemical sciences*, 36, 320-328.
- MUNRO, S., THOMAS, K. L. & ABU-SHAAR, M. 1993. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature*, 365, 61-5.
- MUNSON, A. E., HARRIS, L. S., FRIEDMAN, M. A., CARCHMAN, R. A. & DEWEY, W. L. 1975. Antineoplastic Activity of Cannabinoids². *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 55, 597-602.
- MURASE, R., KAWAMURA, R., SINGER, E., PAKDEL, A., SARMA, P., JUDKINS, J., ELWAKEEL, E., DAYAL, S., MARTINEZ-MARTINEZ, E., AMERE, M., GUJJAR, R., MAHADEVAN, A., DESPREZ, P. Y. & MCALLISTER, S. D. 2014. Targeting multiple cannabinoid anti-tumour pathways with a resorcinol derivative leads to inhibition of advanced stages of breast cancer. *Br J Pharmacol*, 171, 4464-77.
- OFEK, O., KARSAK, M., LECLERC, N., FOGEL, M., FRENKEL, B., WRIGHT, K., TAM, J., ATTARNAMDAR, M., KRAM, V., SHOHAMI, E., MECHOULAM, R., ZIMMER, A. & BAB, I.

2006. Peripheral cannabinoid receptor, CB2, regulates bone mass. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 696-701.
- OKUDA, T., SAKAMOTO, S., DEGUCHI, T., MISAWA, S., KASHIMA, K., YOSHIHARA, T., IKUSHIMA, S., HIBI, S. & IMASHUKU, S. 1991. Hemophagocytic syndrome associated with aggressive natural killer cell leukemia. *American Journal of Hematology*, 38, 321-323.
- PACHER, P., BATKAI, S. & KUNOS, G. 2006. The endocannabinoid system as an emerging target of pharmacotherapy. *Pharmacol Rev*, 58, 389-462.
- PERTWEE, R. G. 2009. Emerging strategies for exploiting cannabinoid receptor agonists as medicines. *British journal of pharmacology*, 156, 397-411.
- PERTWEE, R. G. 2012. Targeting the endocannabinoid system with cannabinoid receptor agonists: pharmacological strategies and therapeutic possibilities. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 367, 3353-3363.
- PISANTI, S., PICARDI, P., D'ALESSANDRO, A., LAEZZA, C. & BIFULCO, M. 2013. The endocannabinoid signaling system in cancer. *Trends Pharmacol Sci*, 34, 273-82.
- POWLES, T., POELE, R. T., SHAMASH, J., CHAPLIN, T., PROPPER, D., JOEL, S., OLIVER, T. & LIU, W. M. 2005. Cannabis-induced cytotoxicity in leukemic cell lines: the role of the cannabinoid receptors and the MAPK pathway. *Blood*, 105, 1214.
- RAMER, R. & HINZ, B. 2015. New insights into antimetastatic and antiangiogenic effects of cannabinoids. *Int Rev Cell Mol Biol*, 314, 43-116.
- RAMER, R. & HINZ, B. 2016. Antitumorigenic targets of cannabinoids - current status and implications. *Expert Opin Ther Targets*, 20, 1219-35.
- RYSAVY, N. M., SHIMODA, L. M., DIXON, A. M., SPECK, M., STOKES, A. J., TURNER, H. & UMEMOTO, E. Y. 2014. Beyond apoptosis: the mechanism and function of phosphatidylserine asymmetry in the membrane of activating mast cells. *Bioarchitecture*, 4, 127-37.
- SALITZKY, O. 2017. Systematische Untersuchung des antileukämischen Effekts von Dronabinol bei akuter lymphoblastischer und myeloischer Leukämie. Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik Tübingen: Medizinischen Fakultät der Eberhard Karls Universität zu Tübingen.
- SALLAN, S. E., ZINBERG, N. E. & FREI, E. 1975. Antiemetic Effect of Delta-9-Tetrahydrocannabinol in Patients Receiving Cancer Chemotherapy. *New England Journal of Medicine*, 293, 795-797.
- SÁNCHEZ, M., X, A. G., RUIZ-LLORENTE, L., SÁNCHEZ, A. M., DI, X & AZ-LAVIADA, I. 2003. Activation of phosphoinositide 3-kinase/PKB pathway by CB1 and CB2 cannabinoid receptors expressed in prostate PC-3 cells. Involvement in Raf-1 stimulation and NGF induction. *Cellular Signalling*, 15, 851-859.
- SCHUTTE, B., NUYDENS, R., GEERTS, H. & RAMAEKERS, F. 1998. Annexin V binding assay as a tool to measure apoptosis in differentiated neuronal cells. *J Neurosci Methods*, 86, 63-9.
- SCOTT, K. A., DALGLEISH, A. G. & LIU, W. M. 2017. Anticancer effects of phytocannabinoids used with chemotherapy in leukaemia cells can be improved by altering the sequence of their administration. *Int J Oncol*, 51, 369-377.

- SHOWALTER, V. M., COMPTON, D. R., MARTIN, B. R. & ABOOD, M. E. 1996. Evaluation of binding in a transfected cell line expressing a peripheral cannabinoid receptor (CB2): identification of cannabinoid receptor subtype selective ligands. *J Pharmacol Exp Ther*, 278, 989-99.
- STAAL, S. P. & HARTLEY, J. W. 1988. Thymic lymphoma induction by the AKT8 murine retrovirus. *Journal of Experimental Medicine*, 167, 1259-1264.
- SUN, Y., LIU, W. Z., LIU, T., FENG, X., YANG, N. & ZHOU, H. F. 2015. Signaling pathway of MAPK/ERK in cell proliferation, differentiation, migration, senescence and apoptosis. *J Recept Signal Transduct Res*, 35, 600-4.
- TORRES, S., LORENTE, M., RODRÍGUEZ-FORNÉS, F., HERNÁNDEZ-TIEDRA, S., SALAZAR, M., GARCÍA-TABOADA, E., BARCIA, J., GUZMÁN, M. & VELASCO, G. 2011. A Combined Preclinical Therapy of Cannabinoids and Temozolomide against Glioma. *Molecular Cancer Therapeutics*, 10, 90.
- U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. 2018. *Search Orphan Drug Designations and Approvals* [Online]. Available: <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/opdlisting/oopd/detailedIndex.cfm?cfgridkey=620417> [Accessed 6 January 2020].
- V. AUWÄRTER, S. K., M. HUTTER, A. THIERAUF. 2012. *Synthetische Cannabinoide-Forensische Relevanz und Interpretation analytischer Befunde* [Online]. Springer-Verlag Available: file:///C:/Users/Isabell/AppData/Local/Temp/Auw%C3%A4rter2012_Article_SynthetischeCannabinoideSynthe.pdf [Accessed 15.11.2020 2020].
- VANEY, C., HEINZEL-GUTENBRUNNER, M., JOBIN, P., TSCHOPP, F., GATTLEN, B., HAGEN, U., SCHNELLE, M. & REIF, M. 2004. Efficacy, safety and tolerability of an orally administered cannabis extract in the treatment of spasticity in patients with multiple sclerosis: a randomized, double-blind, placebo-controlled, crossover study. *Multiple Sclerosis Journal*, 10, 417-424.
- VELASCO, G., SANCHEZ, C. & GUZMAN, M. 2012. Towards the use of cannabinoids as antitumour agents. *Nat Rev Cancer*, 12, 436-44.
- VELASCO, G., SÁNCHEZ, C. & GUZMÁN, M. 2016. Anticancer mechanisms of cannabinoids. *Current oncology (Toronto, Ont.)*, 23, S23-S32.
- WARTMANN, M., CAMPBELL, D., SUBRAMANIAN, A., BURSTEIN, S. H. & DAVIS, R. J. 1995. The MAP kinase signal transduction pathway is activated by the endogenous cannabinoid anandamide. *FEBS Lett*, 359, 133-6.
- YAMAORI, S., OKAMOTO, Y., YAMAMOTO, I. & WATANABE, K. 2011. Cannabidiol, a Major Phytocannabinoid, As a Potent Atypical Inhibitor for CYP2D6. *Drug Metabolism and Disposition*, 39, 2049.
- ZURIER, R. B., ROSSETTI, R. G., LANE, J. H., GOLDBERG, J. M., HUNTER, S. A. & BURSTEIN, S. H. 1998. Dimethylheptyl-THC-11 OIC acid: A nonpsychoactive antiinflammatory agent with a cannabinoid template structure. *Arthritis & Rheumatism*, 41, 163-170.

10. Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift

Die Arbeit wurde in der Medizinischen Universitätsklinik unter Betreuung von PD Dr. med. Marcus Schittenhelm durchgeführt.

Frau Dr. Kerstin Kampa-Schittenhelm hat das Projekt konzipiert, die Arbeit betreut und das Manuskript korrigiert.

Ich war an der Konzeption des Projekts beteiligt und habe das Manuskript selbstständig erstellt.

Die Versuche wurden von mir eigenständig durchgeführt. Die Ergebnisse zur Apoptose von gesunden Knochenmarksspendern in Kapitel 4.2. durften freundlicherweise von Frau L. Häuser übernommen und für die Auswertung benutzt werden (Abb. 13).

Die Analyse der Daten und die statistische Auswertung erfolgte eigenständig durch mich.

Ich versichere, das Manuskript selbstständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Esslingen, den 09.11.2020

Isabell Staudacker