

Aus der
Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik Tübingen
Abteilung Innere Medizin II
Hämatologie, Onkologie, klinische Immunologie und
Rheumatologie

**Evaluierung des antineoplastischen Effekts von
Cannabinoiden in Sarkomen**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
Braun, Sebastian Willi**

2026

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Privatdozentin Dr. K. Kampa-Schittenhelm

2. Berichterstatter: Professor Dr. M. Ebinger

Tag der Disputation: 29.01.2026

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	1
Abkürzungsverzeichnis	3
1 Einleitung	5
1.1 Adulte Weichteilsarkome	5
1.1.1 Definition und Epidemiologie	5
1.1.2 Ätiologie, Risikofaktoren und molekulare Pathogenese adulter Weichteilsarkome	6
1.1.3 Diagnostik	9
1.1.4 Stadiengerechte Therapieoptionen	11
1.2 Cannabinoide	14
1.2.1 Grundlagen	14
1.2.2 Das Endocannabinoid-System	15
1.2.3 Cannabinoidrezeptoren	16
1.2.4 Medizinische Verwendung	18
1.3 O-linked β -N-acetyl Glucosamine Transferase	20
1.4 Fragestellung	23
2 Material und Methoden	24
2.1 Material	24
2.1.1 Verbrauchsmaterialien	24
2.1.2 Laborgeräte	25
2.1.3 Reagenzien und Versuchs-Kits	26
2.1.4 Zelllinien	29
2.2 Methoden	30
2.2.1 Zellkultivierung	30
2.2.2 Genexpressionsanalyse mittels qRT-PCR	31
2.2.3 Proteinanalyse mit Western Blot	34

2.2.4	Apoptoseinduktion durch Cannabinoide und Apoptosebestimmung mit fluorenszenzbasierter Durchflusszytometrie (FACS)	38
2.2.5	Bestimmung des Proliferationsverhaltens unter Cannabinoidtherapie durch mikroskopische Zellzahlbestimmung	42
2.2.6	Migrationsverhalten unter Cannabinoidtherapie mittels Wundheilungs-Scratch Assay	44
2.2.7	Etablierung eines stabilen OGT-Knockdowns in Sarkomzelllinien mittels Short Hairpin RNA Interferenz	45
2.2.8	Statistische Auswertung	48
2.2.9	Ethische Grundlagen und Berechtigungen	48
3	Ergebnisse	49
3.1	Rhabdomyosarkom-, Synovialsarkom- und Liposarkom-Zelllinien exprimieren die Cannabinoidrezeptoren CB ₁ und CB ₂	49
3.2	Dosisabhängige Apoptose-Induktion durch Cannabinoide in Sarkom-Zelllinien	50
3.2.1	THC induziert die Apoptose in allen untersuchten Sarkom-Zelllinien	50
3.2.2	Konzentrationsabhängige Apoptose-Induktion durch CBD in Sarkom-Zelllinien	53
3.3	Cannabinoide zeigen eine antiproliferative Wirkung in Sarkomzellen	56
3.3.1	Cannabinoide weisen eine antiproliferative Wirkung in Weichteilsarkom-Zelllinien auf	57
3.4	Cannabinoide hemmen die Migration von Sarkomzelllinien	59
3.4.1	Methanol zeigt keinen migrationshemmenden Effekt auf die untersuchten Sarkom-Zelllinien	59
3.4.2	Die Migration von Sarkomzellen wird durch THC signifikant gehemmt	62

3.4.3	CBD hemmt die Migration von Rhabdomyosarkom-, Synovialsarkom- und Liposarkom-Zelllinien signifikant	65
3.5	Etablierung eines stabilen OGT-Knockdown Zellmodells mittels shorthairpin RNA (shRNA)	68
3.5.1	Verifizierung des OGT-Knockdowns mittels qRT-PCR	69
3.5.2	Validierung der reduzierten OGT-Expression auf Proteinebene	70
3.6	Die Suppression von OGT hemmt die Proliferation in Sarkomzelllinien	72
3.7	Die antiproliferative Wirkung von Cannabinoiden ist Weichteilsarkom-Zelllinien OGT-abhängig	74
3.7.1	Der antiproliferative Effekt von THC ist in OGT-defizienten Zellen abgeschwächt	74
3.7.2	Eine reduzierte OGT-Expression führt zu einer verminderten antiproliferativen Wirkung von CBD	76
3.8	Cannabinoiden haben in Sarkomzellen mit reduzierter OGT-Expression einen verminderten proapoptotischen Effekt	78
3.8.1	Eine verminderte OGT-Expression reduziert den proapoptotische Effekt von THC	78
3.8.2	CBD zeigt in OGT-defizienten Sarkomzellen eine verminderte Sensitivität in der Apoptose-Induktion	80
3.9	OGT beeinflusst die Migration von Sarkomzellen	83
3.10	OGT-defiziente Sarkomzellen zeigen ein zellspezifisches Migrationsverhalten unter einer Cannabinoidtherapie	86
3.10.1	THC zeigt in OGT-defizienten Sarkomzellen divergente Effekt auf die Migration	86
3.10.2	CBD führt zu einem zellspezifischem Migrationsverhalten in Sarkomzellen mit reduzierter OGT-Expression	89

4	Diskussion	92
5	Zusammenfassung	105
6	Literaturverzeichnis	107
7	Erklärung zum Eigenanteil	117
8	Veröffentlichungen	118
9	Danksagung	119

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Expressionsanalyse von Cannabinoidrezeptoren in Sarkomzelllinien	49
Abbildung 2: Apoptose-Induktion in Sarkom-Zelllinien durch THC	52
Abbildung 3: Apoptose-Induktion in Sarkom-Zelllinien durch CBD	54
Abbildung 4: THC und CBD inhibieren die Proliferation von Sarkomzellen	58
Abbildung 5: Methanol hat keinen signifikanten Effekt auf die Migration von Sarkomzellen	60
Abbildung 6: THC inhibiert die Migration von Sarkom-Zelllinien	63
Abbildung 7: Die Migration von Sarkom-Zelllinien ist unter CBD Behandlung signifikant gehemmt	66
Abbildung 8: Signifikante Reduktion der OGT-Expression nach shRNA-Interferenz	69
Abbildung 9: Western Blot zur Validierung des OGT-Knockdowns	70
Abbildung 10: Proliferationsverhalten von Sarkom-Zelllinien in Abhängigkeit von OGT	73
Abbildung 11: Reduzierter antiproliferativer Effekt von THC in OGT-defizienten Sarkomzellen	75
Abbildung 12: Verminderter antiproliferativer Effekt von CBD in OGT-defizienten Sarkomzellen	77
Abbildung 13: THC zeigt eine verminderte Apoptose-Induktion in OGT-defizienten Sarkomzellen	79
Abbildung 14: Verminderte Apoptose-Induktion durch CBD in OGT-defizienten Sarkomzellen	81
Abbildung 15: Migrationsverhalten von Sarkomzellen mit reduzierter OGT-Expression	84
Abbildung 16: Migrationsverhalten von Sarkomzellen unter THC Behandlung in Abhängigkeit von OGT	87
Abbildung 17: Migrationsverhalten von Sarkomzellen unter CBD Behandlung in Abhängigkeit von OGT	90

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Überblick über die verwendeten Zelllinien	29
Tabelle 2: Verwendete Wirkstoffkonzentrationen im Rahmen der Cannabinoidtherapie	41
Tabelle 3: Ermittelte IC50-Konzentrationen für THC in den untersuchten Sarkomzelllinien	52
Tabelle 4: Ermittelte IC50-Konzentrationen für CBD in den untersuchten Sarkomzelllinien	54
Tabelle 5: Verwendete Zellzahl pro Versuchsansatz im Rahmen des Proliferationsassays	56
Tabelle 6: Verwendete Zellanzahl pro Versuchsansatz im Rahmen des Migrationsassays	59
Tabelle 7: Eine Methanol-Behandlung hat keinen signifikanten Einfluss auf die Migration	61
Tabelle 8: Übersicht über die Migrationsgeschwindigkeiten und prozentuale Reduktion der Migration von Sarkom-Zelllinien unter THC Behandlung	63
Tabelle 9: Übersicht über die Migrationsgeschwindigkeiten und prozentuale Reduktion der Migration von Sarkom-Zelllinien unter CBD Behandlung	66
Tabelle 10: Übersicht der Migrationsgeschwindigkeiten in Abhängigkeit von OGT	85
Tabelle 11: Übersicht über die Migrationsgeschwindigkeiten von Sarkomzellen unter THC Behandlung in Abhängigkeit von OGT	88
Tabelle 12: Übersicht über die Migrationsgeschwindigkeiten von Sarkomzellen unter CBD Behandlung in Abhängigkeit von OGT	90

Abkürzungsverzeichnis

μ	Mikro
%	Prozent
°C	Grad Celsius
μg	Mikrogramm
μl	mikroliter
7-AAD	7-Aminoactinomycin
Aqua dest.	Aqua destillata
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
CaCl₂	Kalziumchlorid
CBD	Cannabidiol
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CO₂	Kohlestoffdioxid
Da	Dalton
DMEM	Dulbeccos Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
EV	Empty Vector
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FBS	Fetales bovines Serum
fGFP	Turbo Green Fluorescent Protein
FITC	Fluorescein Isothiocyanate
FSC	forward light scatter
g	Gramm
G	G-Kraft
GOF	Gain-of-function Mutation
h	Stunden
HBSS	Hanks Balanced Salt Solution
k	Kilo
KO	Knock-Out
LOF	Loss-of-function Mutation

m	Milli
min	Minute
ml	Milliliter
MOPS	3-(N-morpholino)propanesulfonic acid
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
n	nano
NEAA	Non-essential Aminoacid
nm	Nanometer
ns	nicht signifikant
OGT	O-Linked N-Acetylglucosamine (GlcNAc) Transferase
OGTi	OGT Interferenz
PCR	Polymerase Chain Reaction
PI	Propidiumiodid
qRT-PCR	quantitative real time PCR
RD	Zelllinie Rhabdomyosarkom
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	revolutions per minute
shRNA	Short hairpin Ribonukleinsäure
SW872	Zelllinie Liposarkom
SW982	Zelllinie Synovialsarkom
THC	Δ^9 -trans-Tetrahydrocannabinol
U/min	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
v/v	Volumenprozent
vs.	versus

1 Einleitung

1.1 Adulte Weichteilsarkome

1.1.1 Definition und Epidemiologie

Weichteilsarkome gehören zu einer Gruppe seltener Tumorentitäten, welche aus mesenchyalem Gewebe stammen. Aufgrund ihres mesodermalen Ursprungs können sich Weichteilsarkome als entartetes Muskel-, Binde- oder Fettgewebe manifestieren [1]. Diese heterogene Gruppe an Malignomen wird histopathologisch in ~ 80 Subtypen unterteilt [2].

In der folgenden Dissertationsschrift wird insbesondere auf das Rhabdomyosarkom, das Synovialsarkom und das Liposarkom näher eingegangen.

Im Jahr 2020 wurden vom Zentrum für Krebsregisterdaten 4610 Sarkom-Neuerkrankungen in Deutschland registriert, Männer erkrankten mit 2420 Fällen etwas häufiger als Frauen (2190 Fälle) [3]. Dabei betrug das mittlere Erkrankungsalter in beiden Geschlechtern 69 Jahre [3]. Insgesamt machen Sarkome 0,9% aller malignen Neubildungen in Deutschland aus (Stand 12/2023), 70% davon entfallen auf Weichteilsarkome [3] [4].

Genaue Angaben zur Verteilung der unterschiedlichen Subtypen, sowie zur 5-Jahres-Überlebensrate und Mortalität in Deutschland sind aufgrund der geringen Inzidenz an Weichteilsarkomen schwer zu erheben. Als Bezugsquelle wurden publizierte Daten des Zentrums für Krebsregisterdaten aus dem Jahr 2020 verwendet [3]. Im Erwachsenenalter stellen das Leiomyosarkom, das Liposarkom sowie das Fibrosarkom die häufigsten Subtypen der Weichteilsarkome in Deutschland dar [3].

Die 5-Jahres Überlebensrate als wichtiger prognostischer Marker der Medizin wird vom Zentrum für Krebsregisterdaten mit 63 % für Männer und 53 % für Frauen angegeben. Die Mortalität hängt dabei von einer Vielzahl an Faktoren

wie Differenzierung, Tumorstadium und Alter zum Zeitpunkt der Diagnose ab [3].

Rhabdomyosarkome beschreiben dabei maligne Neubildungen mit Ursprung in der quergestreiften Muskulatur. Sie machen ca. 2,4 % aller Weichteilsarkome im Erwachsenenalter aus. Histopathologisch können bei Erwachsenen vor allem das alveoläre, spindelzell und das embryonalen Rhabdomyosarkom nachgewiesen werden. [4].

Synovialsarkome entstehen nicht direkt aus der Synovialmembran, sondern aus verschiedenen Weichteilen des Körpers. Häufig treten diese an paraartikulären Regionen wie beispielweise am Kniegelenk auf. Sie stellen 2,1 % aller Weichteilsarkome im Erwachsenenalter dar [4].

Liposarkome repräsentieren mit 10,3 % eine häufigere Malignomentität innerhalb der Weichteilsarkome. Histopathologisch lassen sich multiple Subtypen unterscheiden, die alle neoplastisch transformierten Adipozyten abstammen. Hierbei sind histopathologisch das gut-differenzierte, das pleomorphe, das myxoide und das dedifferenzierte Liposarkom zu unterscheiden [4].

1.1.2 Ätiologie, Risikofaktoren und molekulare Pathogenese adulter Weichteilsarkome

Die präzise ätiologische Identifikation spezifischer Auslöser der adulten Weichteilsarkome ist bislang nicht abschließend gelungen. Dabei ist die Entstehung dieser Malignome, wie bei einer Vielzahl maligner Neoplasien, multifaktoriell. In der Mehrzahl der Fälle lässt sich kein klarer Kausalzusammenhang mit bestimmten Faktoren herstellen. Durch den enormen Zuwachs wissenschaftlicher Erkenntnisse und die progressive globale Zusammenarbeit und Datenaggregation wurde es möglich, ein tieferes Verständnis und Risikofaktoren zur Entstehung adulter Weichteilsarkome zu identifizieren.

Prinzipiell kann man dabei modifizierbare von nicht-modifizierbaren Risikofaktoren unterscheiden.

Modifizierbare Risikofaktoren

Aufgrund der niedrigen Fallzahlen von Weichteilsarkomen und der verhältnismäßig geringen Studienlage ist eine evidenzbasierte Aussage von modifizierbaren Risikofaktoren schwer zu treffen. Neben allgemeinen Risikofaktoren der Malignomentstehung wie (iatrogene) ionisierende Strahlung (beispielweise vorangegangene Strahlentherapie) und chemische Noxen (z.B. Zytostatika) weisen einige Erkenntnisse darauf hin, dass Chlorphenole, die als Herbizid oder als Bleichungsmittel in der Papierherstellung verwendet werden, mit einem erhöhten Risiko der Entstehung von Weichteilsarkomen in Verbindung gebracht werden können [5]. Ein Zusammenhang zwischen der Entstehung von Weichteilsarkomen und Genussmittelkonsum (wie Alkohol und Tabak) kann nicht sicher bewiesen oder ausgeschlossen werden [6].

Nicht-modifizierbare Risikofaktoren

Neben den nicht modifizierbaren Risikofaktoren Alter und Geschlecht (Verteilung siehe oben) scheinen bei circa einem Drittel aller Weichteilsarkome diverse Mutationen (und damit verbundene Tumor-Syndrome) eine wichtige Rolle in der Entstehung zu spielen. Die ausgeprägte histopathologische Heterogenität der Weichteilsarkome stellt gegenwärtig einen Fokus in der onkologischen Forschung der Weichteilsarkome dar. Diese Komplexität spiegelt sich in einer Vielzahl an genetischen Alterationen wider, die mittels moderner molekulargenetischer Methoden detektiert und in Zusammenhang mit der Onkogenese gebracht werden können.

Rhabdomyosarkom

Der besonders im Erwachsenenalter häufig vorkommende Subtyp „alveoläres Rhabdomyosarkom“ kann mit einer t(1;13) bzw. t(2;13) Translokation assoziiert sein. Dabei fusionieren das PAX7-Gen (Regulation der Muskelentwicklung) bzw. PAX3-Gen (Regulation von Zellproliferation, Apoptose und Migration) mit dem FOXO1 (FKHR)-Gen (u.a. Zellzykluskontrolle, Regulation Apoptose). Die PAX3-FOXO1-bzw. PAX7-FOXO1-Translokation führt als aberranter Transkriptionsfaktor für das PAX3 bzw. PAX 7-Gen zu einer entsprechenden Dysregulation und einer schlechteren Prognose [7].

Das Li-Fraumeni Syndrom als klassisches, autosomal-dominant vererbtes Krebsyndrom ist gekennzeichnet durch eine Mutation des Tumorsuppressorgens TP53. TP53, welches für den gleichnamigen Transkriptionsfaktor „p53“ kodiert, nimmt eine entscheidende Rolle in der Zellregulation und der Suppression neoplastischer Zellen ein. Als „Wächter des Genoms“ verhindert p53 die Proliferation genomisch instabiler bzw. DNA-veränderter Zellen [8]. Neben Mammakarzinomen, zerebralen Tumoren und adrenalen Tumoren sind auch Sarkome wie das Rhabdomyosarkom häufig mit dem Li-Fraumeni-Syndrom assoziiert [9]. Die deutsche S3-Leitlinie für adulte Weichgewebesarkome empfiehlt eine molekulargenetische Analyse aller Patienten, die vor Vollendung des 46. Lebensjahr sowohl an einem Weichteilsarkom, als auch mit einer weiteren, mit dem Li-Fraumeni Syndrom assoziierten Neoplasie erkrankt sind [10].

Synovialsarkome

Bei etwa 95% aller Synovialsarkome ist eine t(X;18) (p11; q11) Translokation von X-Chromosom und Chromosom 18 zu finden und somit pathognomonisch für das Synovialsarkom. Das Fusionsgen SS18-SSX dient auch hier als aberranter Transkriptionsfaktor und reguliert in Folge vor allem proliferative Prozesse. Der Nachweis des SS18-SSX-Fusionsgens hat folglich signifikante diagnostische und therapeutische Relevanz, beispielweise als potenzielle Ansatzpunkte einer zielgerichteten Therapie [11].

Liposarkom

Die ausgeprägte histopathologische Heterogenität der Liposarkome spiegelt sich in molekulargenetischen Mutationsanalysen wider.

So lassen sich im gut differenzierten und im dedifferenzierten Liposarkom MDM2/ CDK4 Genmutationen nachweisen. Durch eine Amplifikation der Gensequenzen können neben sogenannten Supernumerary Chromosomes (zusätzliche, über die normale Chromosomenzahl hinausgehende Chromosomen) auch Ringchromosomen und elongierte, stabförmige Chromosomen (Giant Rod Chromosomes) nachgewiesen werden, welche die

Amplifikationssequenz enthalten. Aktuelle Forschungsergebnisse weisen darauf hin, dass diese genetischen Alterationen zu einer gesteigerten Zellproliferation führen [12].

Das myxoide Liposarkom, der häufigste Subtyp unter den Liposarkomen, zeigt in mehr als 95 % eine charakteristische reziproke Translokation t(12;16) (q13;p11) und gilt somit als pathognomonisch. Hierbei entsteht das aberrante Fusionsgen FUS-CHOP, welches als dysregulierter Transkriptionsfaktor fungiert und mit den komplexen Signalwegen während der Transkription interferiert. Resultierend sind eine gestörte adipozytäre Differenzierung sowie Akkumulation der veränderten Zellen [12].

1.1.3 Diagnostik

Die Diagnose eines Weichteilsarkoms erfolgt durch eine Kombination verschiedener Untersuchungsmethoden, um eine möglichst präzise Tumorcharakterisierung zu erhalten. Dies ist zur Therapieplanung und Prognoseabschätzung von entscheidender Bedeutung.

Die aktuelle deutsche S3-Leitlinie empfiehlt dabei eine leitliniengerechte Diagnostik idealerweise an bzw. in enger Abstimmung mit spezialisierten Sarkomzentren [10].

Die initiale diagnostische Evaluation bei Verdacht auf ein Weichteilsarkom umfasst eine ausführliche Anamnese zur Risikostratifizierung und eine körperliche Untersuchung, die gegebenenfalls eine Palpation des Befundes ermöglicht. Auffällige Befunde können zunächst durch eine Ultraschalluntersuchung visualisiert und zur Einschätzung der Dignität genutzt werden. Die kontrastmittelunterstützte Magnetresonanztomographie gilt jedoch aufgrund der überlegenen Weichteilkontrastierung und der präzisen Beurteilung etwaiger Infiltrationen benachbarter anatomischer Strukturen als Mittel der ersten Wahl [10]. Die erhobenen Befunde werden zur Beurteilung suspekter Weichteilläsionen genutzt, um weitere diagnostische Schritte einzuleiten.

Zur Diagnosesicherung erfolgt eine Stanzbiopsie bzw. eine Inzisionsbiopsie. Oberflächliche Tumore < 3 Zentimeter können durch eine Exzisionsbiopsie histologisch gesichert werden, sofern diese in sano exzidiert werden können [10].

Anschließend erfolgt eine histopathologischer Differenzierung, Subtypisierung und Einteilung in die Dignitätsgruppen benigne, intermediär (lokal aggressiv), intermediär (selten metastasierend) und maligne [10].

Eine Graduierung des Tumors erfolgt nach dem FNCLCC (Fédération Nationale des Centres de Lutte Contre le Cancer) -Grading System und schließt Differenzierungsgrad, Mitoserate und Nekrosegrad ein [13].

Die konventionelle histopathologische Analyse wird durch immunhistochemische und molekularpathologische Untersuchung ergänzt. Immunhistochemisch können verschiedene Antikörper gegenüber (Oberflächen-) Proteine verwendet werden, um eine genauere Differenzierung zu ermöglichen. Molekularpathologische Untersuchungsmethoden wie das Next-Generation-Sequencing können spezifische Mutationen, Fusionsgene und chromosomale Aberrationen (wie beispielweise die oben beschriebenen genetischen Veränderungen) nachweisen [14].

Bei der FISH-Analyse (Fluorescence-In-Situ-Hybridisation) binden fluoreszenzmarkierte DNA-Sonden an spezifische Zielabschnitte der DNA und weisen so spezielle Translokationen, Deletionen oder Amplifikationen nach [15]. Diese multimodale Herangehensweise in der pathologischen Aufarbeitung trägt zur präzisen und personalisierten Therapieplanung bei.

Nach histopathologischer Diagnosesicherung erfolgt eine Staginguntersuchung zur Evaluation der Tumorausbreitung und zum Nachweis möglicher Metastasen. Standardmäßig wird eine Computertomographie (CT) von Thorax, Abdomen und Becken durchgeführt. In Einzelfällen kann eine PET (Positron-Emission-Tomographie) -CT-Untersuchung zur genaueren Detektion metastatischer Läsionen aufgrund der erhöhten metabolischen Aktivität indiziert sein [10].

1.1.4 Stadiengerechte Therapieoptionen

Die Stadieneinteilung der adulten Weichteilsarkome basiert auf der TNM-Klassifikation, wie sie von der Union internationale contre le cancer (UICC) und der 8. Ausgabe der American Joint Committee on Cancer (AJCC) definiert wurde.

Dieses System verwendet die drei zentralen Aspekte der Tumorausbreitung:

- die Tumorgöße und lokale Ausdehnung (T)
- lymphatische Ausbreitung (N) und
- Metastasenbildung (M) [16] [17].

Aufgrund der Komplexität und Heterogenität der Lokalisation differenziert die AJCC verschiedene Klassifikationssysteme für Rumpf und Extremitäten, Kopf und Hals, abdominelle und thorakale Organe sowie Retroperitoneum. Ergänzt wird das TNM-System vom histopathologischen Grading des Primärtumors, welche ein wichtiger prognostischer Faktor darstellt [18].

Die Therapie des adulten Weichteilsarkoms basiert auf einem komplexen Entscheidungsprozess. Entscheidend sind hierbei neben klinischen Parameter wie Alter, Vorerkrankungen und ECOG (Eastern Cooperative Oncology Group) -Performance Status auch pathologische Parameter wie histologischer Subtyp, Lokalisation, Ausbreitungsdiagnostik sowie Mutationsanalysen.

Eine interdisziplinäre Tumorkonferenz ermöglicht dabei eine ganzheitliche Betrachtung zur Planung der multimodalen Therapieoptionen.

Therapeutisches Ziel eines lokal fortgeschrittenen Tumors (UICC / AJCC Stadium I-III) ist primär eine chirurgische Therapie mit vollständiger Resektion (R0) des Tumors. Eine lymphatische Metastasierung von Weichteilsarkomen ist selten und variiert je nach histologischem Subtyp. Epidemiologische Studien zeigen eine Inzidenz von 1,7-9 % für eine lymphatische Metastasierung. Insbesondere das Rhabdomyosarkom zeigt eine erhöhte Inzidenz für eine lymphogene Metastasierung auf [19]. Die Indikation zur primären Lymphadenektomie wird nur bei Nachweis oder Verdacht auf lymphogene Metastasierung im präoperativen Staging empfohlen [10].

Die perkutane Strahlentherapie stellt eine weitere evidenzbasierte Therapieoption in der multimodalen Behandlung der Weichteilsarkome dar,

insbesondere bei Tumoren mit höherem Grading (G2 und G3). Hierbei wird eine perioperative Strahlentherapie empfohlen.

Eine präoperative Strahlentherapie kann zu einer Verkleinerung des Tumors sowie der Reduktion einer Tumorzellverschleppung während der Operation führen. Eine postoperative Strahlentherapie senkt das Risiko eines Lokalrezidivs [10] [20]. In der Literatur wird die Strahlensensitivität histologischen Subtypen kontrovers diskutiert. Bisher konnte keine eindeutige Aussage bezüglich einer Strahlensensitivität getroffen werden [21].

Die medikamentöse Tumorthherapie als etablierte Therapieoption von zahlreichen malignen Neoplasien lässt sich im Kontext der Weichteilsarkom-Therapie aufgrund ihrer Heterogenität nur eingeschränkt anwenden. Prinzipiell findet eine differenzierte Herangehensweise basierend auf dem Erkenntnis der verschiedenen molekularen Charakteristika und Sensitivität auf diverse Therapieformen statt.

Eine (neo) adjuvante Chemotherapie mit einem Anthrazyklin (z.B. Doxorubicin) kombiniert mit Ifosfamid stellt das Rückgrat der systemischen Chemotherapie für viele Subtypen mit hohem Rezidivrisiko (größer 5 cm, Grading G2 und G3) dar [2] [22]. Die zunehmenden Erkenntnisse in der zielgerichteten Therapie stellen eine weitere medikamentöse Therapiestrategie in der Behandlung von Weichteilsarkomen dar. Durch das tiefere Verständnis der molekularen Pathogenese werden immer mehr zielgerichtete Therapien entwickelt und in Studien getestet.

Beispielgebend soll hier die MDM2/ CDK4-Mutation im differenzierten Liposarkom aufgeführt werden. CDK4 Inhibitor wie Abemaciclib induzieren eine zelluläre Seneszenz der entarteten Tumorzellen und hemmt somit das Tumorstadium und Progression der Erkrankung [23]. Ebenfalls werden in Studien Checkpoint-Inhibitoren wie Pembrolizumab bei der Behandlung von Weichteilsarkomen untersucht. Diese sind jedoch noch nicht ausreichend validiert, um eine evidenzbasierte Empfehlung in den Leitlinien zu rechtfertigen und sind somit (noch) nicht Teil der Standardtherapie [24].

Bei lokal fortgeschrittenen, nicht resektablen Tumoren, sowie bei metastasierter Weichteilsarkome soll gemäß der aktuellen S3-Leitlinie eine

Systemtherapie eingeleitet werden. Die Auswahl des Wirkstoffs bzw. von Wirkstoffkombinationen erfolgt individualisiert, basierend auf histologischem Subtyp, klinischem Zustand des Patienten, Tumorprogression sowie Abwägung des zu erwarteten Nutzen-Risiko Profils [10]. Die Indikationsstellung zur Metasen Chirurgie erfolgt individuell und wird im Rahmen eines multidisziplinären Tumorboards diskutiert [10].

Die derzeit verfügbaren Therapieoptionen des metastasierten Weichteilsarkoms sind jedoch in ihrer Wirksamkeit unzufriedenstellend, weshalb neue Therapiestrategien notwendig sind.

1.2 Cannabinoide

1.2.1 Grundlagen

Mit der Anpassung der Gesetzeslage und Verabschiedung des Gesetzes „zum kontrollierten Umgang mit Cannabis und zur Änderung weiterer Vorschriften (Cannabisgesetz)“ wurde in Deutschland zum 1. April 2024 eine langjährige Diskussion zur Legalisierung von Besitz, Anbau und Konsum Cannabis-haltiger Substanzen beendet [25]. Dieses Gesetz folgt einer zunehmenden gesellschaftlichen Akzeptanz und dem progressiven medizinischen und wirtschaftlichen Interesse von Cannabis.

Cannabis hat dabei als Nutz- und Heilpflanze eine jahrtausendalte Historie. Archäologische Befunde bestätigen den Nachweis von Cannabis seit 10.000 Jahren und stammen insbesondere aus dem heutigen China und Japan [26]. In der Folge verbreitete sich der Anbau und Konsum der Cannabispflanze weltweit.

Die moderne Cannabiszüchtung differenziert eine Vielzahl von Cannabispflanzen, aktuell werden drei Haupttypen unterschieden. Die am häufigsten vertretenen Pflanzen sind Cannabis sativa, welche tendenziell einen höheren THC-Gehalt aufweist, Cannabis indica mit einem erhöhten CBD-Gehalt und Cannabis ruderalis als robustere Pflanze, welche oft für Kreuzungen verwendet wird [27] [28].

Insgesamt können jedoch hunderte Cannabinoide in diversen Cannabispflanzen nachgewiesen werden [29].

„Cannabinoide“ beschreibt dabei eine große Gruppe chemischer Substanzen. Weiter differenziert man pflanzlich vorkommende Cannabinoide (sog. Phytocannabinoide, z.B. CBD und THC) von körpereigenen Endocannabinoiden und synthetisch hergestellten Cannabinoiden [30].

Die erste erfolgreiche Isolierung des nicht-psychoaktiven Cannabidiol (CBD) erfolgte im Jahr 1940 durch Roger Adams an der Universität von Illinois, ohne dabei die genaue chemische Struktur zu ermitteln. Der entscheidende Durchbruch gelang dem Chemiker Raphael Mechoulam im Jahr 1963 mit der Identifikation der chemischen Struktur von Cannabidiol. Nur ein Jahr später, im

Jahr 1964, gelang Raphael Mechoulam mit der Entdeckung von Δ^9 -Tetrahydrocannabinol (THC) als führende psychoaktive Wirksubstanz der Cannabispflanze erneut eine bahnbrechende Entdeckung.

Die Identifikation der chemischen Struktur von Cannabinoiden stellt einen bedeuteten Meilenstein für die pharmakologische Forschung dar [31] [32].

Eine unterschiedliche atomaren Anordnung in der Molekülstruktur führt zu unterschiedlichen pharmakologischen Eigenschaften von CBD und THC. Während CBD beispielweise angstlösende und antipsychotische Eigenschaften aufweist, zeigt THC eine ausgeprägte psychoaktive Wirkung. Dies ist für den klinischen Gebrauch aufgrund potenzieller Nebenwirkungen von großer Relevanz [33] [34].

1.2.2 Das Endocannabinoid-System

Das Endocannabinoid-System ist ein komplexes Signalsystem des Körpers und ist an der Regulation verschiedener physiologischer Prozesse beteiligt, darunter Schmerzwahrnehmung, Appetitregulation, Gedächtnis und Immunfunktion [35] [36]. Zudem nimmt das Endocannabinoidsystem eine fundamentale Rolle in Reproduktion, Embryogenese, Zelldifferenzierung und Organogenese ein [37].

Es besteht aus den Cannabinoid-Rezeptoren CB₁ und CB₂, körpereigener Cannabinoide (Endocannabinoide), sowie Enzyme, die für Synthese und Abbau verantwortlich sind [38].

Mit der Entdeckung von Cannabidiol und von Δ^9 -Tetrahydrocannabinol intensivierte sich das Interesse an der Forschung der Cannabinoide erheblich. Diese legte den Grundstein für die Entdeckung des Endocannabinoid-Systems (ECS) in den frühen 1990 Jahren als Zusammenspiel von endogenen und exogenen Cannabinoiden und deren Auswirkung auf den menschlichen Organismus [35].

Endogene Cannabinoide, wie das gut erforschte Arachidonsäure-Derivat N-Arachidonoyl ethanolamin (Anandamid) werden in postsynaptischen Neuronen gebildet und wirken als Liganden unter anderem an Cannabinoid-Rezeptoren (siehe unten). Die Anandamid-Bindung an Cannabinoid-Rezeptoren fungiert als

Neurotransmitter und initiiert retrograde und nicht-retrograde Signalkaskaden. Dieses komplexe Zusammenspiel kann zur Regulation der Nozizeption, Stimmungs- und Appetitwahrnehmung beitragen [39] [40].

Neuere Erkenntnisse weisen darauf hin, dass Anandamid auch mit dem TRPV1 (Transient Receptor Potential Vanilloid 1) -Ionenkanal interagiert und verstärkt damit die Annahme einer Beteiligung des endogenen Cannabinoids an der Nozizeption und Temperaturwahrnehmung [41].

Die intensivierete Forschung hat nicht nur zu einem genaueren Verständnis der Wirkungsweise von Cannabis geführt, sondern bilden das Fundament für neue innovative Therapieoptionen.

Insgesamt zeigt THC als partieller Agonist eine starke Rezeptoraffinität zu beiden Cannabinoidrezeptoren. Die Affinität zum CB₁-Rezeptor ist hierbei höher als die zum CB₂-Rezeptor. Dies korreliert mit der ausgeprägten psychoaktiven Wirkung von THC und der Lokalisation der CB₁-Rezeptoren vor allem im zentralen Nervensystem [42].

Eine alleinige Wirkung von CBD am CB₂-Rezeptor ist nach heutigem Wissenstand obsolet. Die pharmakologische Charakterisierung von CBD als inverser Agonist am CB₁-Rezeptor führt zu einer Reduktion der Rezeptoraktivität unterhalb des Basalniveaus. Diese Eigenschaft scheint günstig in der klinischen Anwendung aufgrund der fehlenden psychoaktiven Eigenschaft [43]. Cannabidiol bindet am CB₂-Rezeptor als Antagonist, was zu einer Blockade nachgeschalteter Signalwege führt [43].

1.2.3 Cannabinoidrezeptoren

Als grundlegende Signalrezeptoren des Endocannabinoid-Systems gelten der Cannabinoid-Rezeptor 1 (CB₁-R) und der Cannabinoid-Rezeptor 2 (CB₂-R).

Neben den bereits bekannten CB₁ und CB₂ Rezeptoren gibt es Hinweise auf weitere Rezeptoren, die mit Cannabinoiden interagieren. Diese „Orphan“-Rezeptoren, wie beispielsweise der TRPV-Rezeptor, sind Gegenstand aktueller Forschung [44] [45].

Der CB₁-Rezeptor ist vor allem im zentralen Nervensystem, aber auch in peripheren Geweben lokalisiert. Im Gehirn lässt sich der Rezeptor in der Großhirnrinde (zuständig für Kognition und Gedächtnis), Hippocampus (Gedächtnisbildung), Amygdala (Emotionsverarbeitung) und Hypothalamus (Appetitregulation) nachweisen. Im Rückenmark ist der CB₁-Rezeptor an der Schmerzmodulation beteiligt [46] [47] [48]. Man unterscheidet zwei Hauptsignalwege: Durch seine Aktivierung werden spannungsabhängige Kalziumkanäle gehemmt, was zu einem verminderten Kalziumeinstrom in die Zelle und folglich zu einer reduzierten Neurotransmitter-Ausschüttung führt. Zudem bewirkt eine Aktivierung des Rezeptors eine Inhibition der Adenylatcyclase, was in einer verminderten Bildung an cAMP und in Folge veränderter Signalübertragung resultiert [49] [50].

Die Lokalisation des CB₂-Rezeptors zeigt ein komplexes Verteilungsmuster. Eine signifikante Expression wurde in Zellen des Immunsystems nachgewiesen [51]. Neuere Ergebnisse zeigen zudem die Präsenz der Rezeptoren im zentralen Nervensystem auf Mikrogliazellen, die für die Immunabwehr im zentralen Nervensystem zuständig zu sein scheinen [52]. CB₂-Rezeptoren konnten ebenfalls in vielen peripheren Organen nachgewiesen werden, wie beispielweise dem gastrointestinalen System, Muskelzellen und der Haut [53] [54] [55]. Die Signaltransduktion des CB₂-Rezeptors erfolgt ebenfalls G-Protein vermittelt und führt somit über eine Inhibition der Adenylatcyclase zu einer Verringerung des cAMP-Spiegels [49].

Beiden Rezeptoren sind eine Vielzahl von Signalkaskaden nachgeschaltet, unter anderem der PI3K (Phosphatidylinositol-3 Kinase)-Signaltransduktionsweg und der MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase)-Signaltransduktionsweg, welche eine zentrale Rolle in Zellproliferation, Apoptose-Induktion, Differenzierung und Migrationsverhalten einnehmen [56].

Die Expression von Cannabinoidrezeptoren in malignen entarteten Zellen wurde in den letzten Jahren zunehmend nachgewiesen und erforscht [57]. Eine Vielzahl von Forschungsergebnissen konnten in eine Reihe von Tumorentitäten Cannabinoidrezeptoren in unterschiedlichen Expressionsmustern und Intensität

im Vergleich zu gesundem Gewebe nachweisen, wie beispielsweise dem Pankreaskarzinom [58] , Ovarialkarzinom [59] und dem Schilddrüsenkarzinom [60]. Diese Erkenntnis führte rasch zu der Hypothese eines antineoplastischen Effekts von Cannabinoiden. Eine Vielzahl von in-vitro Studien haben seitdem den antineoplastischen Effekt von Cannabinoiden, sowie die erhöhte Präsenz von Cannabinoid-Rezeptoren in heterogenen Neoplasien nachweisen können [61] [62] [63]. Beispielsweise konnte bei Patienten mit einem Hepatozellulären Karzinoms eine erhöhte CB₁ und CB₂ -Rezeptor Expression in Gewebeproben nachgewiesen werden. Diese Überexpression korrelierte mit einer verbesserten Prognose gegenüber Tumorproben mit niedriger Cannabinoidrezeptor-Expression [64]. Sarfaraz et al. konnten eine erhöhte Cannabinoid-Rezeptor Expression in Prostatakarzinom-Ziellinien nachweisen [65].

1.2.4 Medizinische Verwendung

Die klinische Anwendung der Phytocannabinoide CBD und THC hat in den letzten Jahren eine zunehmende Präsenz erfahren und gewinnt vermehrt an Bedeutung [30]. Einerseits durch eine erhöhte Patientennachfrage, zum anderen aufgrund gelockerter gesetzlicher Rahmenbedingungen und wachsender Evidenzlage.

In der Schmerzmedizin, insbesondere bei chronischen und neuropathischen Schmerzen, kommen Cannabinoide zum Einsatz [66] [67].

Ein weiteres klinisches Einsatzgebiet der Cannabinoide zeigt sich in der spasmolytischen Therapie der Multiplen Sklerose, die bei etwa 80% der Fälle auftritt. Das in Deutschland zugelassene Präparat Sativex, eine Lösung aus CBD und THC, kann bei unzureichendem Ansprechen von Spasmolytika wie Baclofen genutzt werden [68]. Die therapeutische Anwendung bei verschiedenen neurologischen Krankheitsbildern wie der Epilepsie und der Amyotrophen Lateralsklerose zeigen bezüglich der Symptomkontrolle gute Ergebnisse [69].

In der Onkologie hat sich die THC-Lösung „Dronabinol“ (2,5 %THC) zur Therapie der Chemotherapie-induzierter Übelkeit und Inappetenz etabliert.

Dabei wird Dronabinol in verschiedenen Darreichungsformen und Konzentrationen angeboten [69]. Diverse Cannabinoid-basierte Lösungen finden in der onkologischen Schmerztherapie zunehmend Anwendung. Neben der symptomatischen Therapie weisen immer mehr wissenschaftliche Ergebnisse auf einen antineoplastischen Effekt von Cannabinoiden hin [70] [71] [72].

Unsere Arbeitsgruppe konnte im Jahr 2016 die Überexpression der Cannabinoidrezeptoren auf Leukämie-Zelllinien und Patientenproben von Patienten mit einer akuten Leukämie nachweisen. Diese Überexpression resultiert in einer antiproliferativen und proapoptotischen Wirkung durch THC in akuten myeloischen und akut lymphatischen Leukämien [73].

Gegensätzliche Berichte über eine potentielle Proliferationssteigerung durch THC in Brustkrebszellen mit verminderter Cannabinoidrezeptor-Expression erschweren aber eine allgemeingültige Aussage zur antineoplastischen Wirkung von Cannabinoiden [74]. Dies unterstreicht die Notwendigkeit von dezidierten Untersuchungen eines potenziellen therapeutischen Nutzens von Cannabinoiden, sowohl in Abhängigkeit von der Tumorentität als auch von der Cannabinoid-Substanz.

1.3 O-linked β -N-acetyl Glucosamine Transferase

Die O-linked β -N-acetyl Glucosamine Transferase (im folgenden OGT genannt) ist ein evolutionär hochkonserviertes Enzym, welches eine zentrale Rolle in multiplen zellulären Prozessen einnimmt. Im humanen Genom ist das OGT-Gen auf Chromosom X lokalisiert. Es kodiert ein Polypeptid, welches als bisher einzig identifiziertes Enzym einen N-Acetylglucosamin-Rest auf Hydroxylgruppen von Serin oder Threonin katalysiert [75] [76] [77].

Diese posttranslationale Modifikation, auch O-GlcNAcylierung genannt, ist essenziell für die Viabilität von Organismen. Studienergebnisse zeigen eine embryonale Letalität bei OGT-Gen Knockout Modellen, was die fundamentale Rolle dieses Gens für den physiologischen zellulären Prozess unterstreicht [78]. Zusammen mit der O-GlcNAse, welche N-Acetylglucosamin-Reste hydrolytisch entfernt, wird ein hochdynamisches regulatorisches System zur Aufrechterhaltung einer zellulären Homöostase gebildet [79].

Im Gegensatz zu vielen anderen posttranslationalen Modifikationen, die am Endoplasmatischen Retikulum oder Golgi-Apparat stattfinden, erfolgt die O-GlcNAcylierung vor allem im Nukleus und im Zytoplasma, wo OGT eine Vielzahl von Proteinen modifiziert [80]. Darüber hinaus wurde die Präsenz von OGT auch in Mitochondrien nachgewiesen, was auf eine potenzielle Rolle in mitochondrialen Funktionen hinweist [81].

Die O-GlcNAcylierung betrifft eine Vielzahl an Proteinen, darunter zelluläre Proteine, Transkriptionsfaktoren, Signalproteine, Proteine des Zytoskelettes und metabolische Proteine. Diese posttranslationale Modifikation führt zu einer erhöhten Thermostabilität, Reduktion von Proteinaggregation, sowie Modulation in Aktivität, Lokalisation und Interaktion der modifizierten Proteine [82].

Die Epigenetik beschreibt die vererbare, meist reversible Beeinflussung in der Genexpression, beispielweise durch Methylierungen oder Histonmodifikationen, ohne dabei Veränderung in der DNA-Sequenz vorzunehmen. Sie ermöglicht dynamisch auf externe und interne Signale zu reagieren. Histone unterliegen ebenfalls einer O-GlcNAcylierung, was zu Veränderung der Chromatinstruktur

und veränderter Zugänglichkeit von Transkriptionsfaktoren an der DNA führen kann [83].

Die kausale Beziehung zwischen veränderter OGT-Expression und folglich dysregulierter Zellhomöostase mit der Entstehung pathologischer Zustände spiegelt die zentrale Rolle der O-GlcNAcylierung durch OGT wider [84] [85] [79].

Die O-GlcNAcylierung von Proteinen gilt neben einer Sensorfunktion für nutritive Stimuli, wie Schwankungen des Blutglucosespiegels, auch als Sensor für exogene Stressoren wie Hypoxie, Ischämie oder oxidativen Stress. Eine hyperglykämische Stoffwechsellage wirkt sich über verschiedene Signalwege in einer erhöhten O-GlcNAcylierung aus und kann zu einer erhöhten Insulinresistenz führen [86].

Neben signifikanten Effekten auf metabolische Vorgänge scheint die O-GlcNAcylierung durch OGT eine wichtige Rolle in der Pathogenese neurodegenerativer Erkrankungen wie Morbus Alzheimer zu spielen. Hier führt eine verminderte O-GlcNAcylierung von Tau-Proteinen durch OGT zu einer gesteigerten Phosphorylierung der Tau-Proteine, was die Aggregation und Ablagerungen fördert und zu Schädigungen in Neuronen führt [87] [88]. Weitere Forschungsergebnisse deuten zudem darauf hin, dass eine verminderte O-GlcNAcylierung von α -Synuclein, einem Protein, welches eine Schlüsselrolle in der Entstehung von Morbus Parkinson spielt, zu einer erhöhten Aggregation dieses Proteins führt [89].

In der Konsequenz deutet eine Dysregulation der O-GlcNAcylierung darauf hin, dass OGT auch zur Pathogenese von malignen Neoplasien beitragen könnte. Zahlreiche Untersuchungen konnten bereits molekulare Mechanismen identifizieren, die mit O-GlcNAc in Verbindung stehen. In diesem Kontext erweist sich die Hochregulation von OGT und die damit einhergehende vermehrte O-GlcNAcylierung als entscheidender Faktor. Dies konnte beispielsweise in Brustkrebs, dem Bronchialkarzinom und dem kolorektalen Karzinom gezeigt werden [90] [91] [92] [93].

Forschungsergebnisse unserer Arbeitsgruppe demonstrieren im Leukämie-Zellmodell einen THC-induzierten Anstieg der OGT-Expression durch epigenetische Modulation. Dabei führt THC zu einer Hypomethylierung von CpG-Inseln, was die Genexpression von OGT verstärkt. In der Folge wurde hierdurch eine verstärkte Apoptose-Induktion und Überwindung der Differenzierungsblockade in akuten Leukämien beobachtet [94].

1.4 Fragestellung

Das Verständnis und die Therapieoptionen fortgeschrittener adulter Weichteilsarkome als seltene Tumorentität sind bisher limitiert. Aufgrund ihrer geringen Inzidenz und erheblichen Heterogenität ist die wissenschaftliche Entwicklung neuer Therapiestrategien zusätzlich erschwert. Daher werden neue Therapieansätze dringend benötigt. Der Einsatz von Cannabinoiden in der Medizin gewinnt zunehmend an Bedeutung, so auch in der onkologischen Forschung. Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe konnte einen antineoplastischen Effekt von THC auf akute Leukämien nachweisen.

Ziel dieser Dissertation war die systematische Evaluation eines möglichen antineoplastischen Effektes der Cannabinoide Cannabidiol (CBD) und Δ^9 -Tetrahydrocannabinol (THC) in Rhabdomyosarkom-, Synovialsarkom- und Liposarkom-Zellmodellen im Hinblick auf antiproliferative, proapoptotische und migrationshemmende Effekte in vitro.

Um einen OGT-abhängigen, antineoplastischen Effekt der Cannabinoide zu untersuchen, wurden OGT-Knockdown Modelle der verwendeten Zelllinien etabliert und hinsichtlich Proliferation, Apoptose-Induktion und Migrationsverhalten untersucht.

Diese Untersuchung basiert auf vorherigen Erkenntnissen unserer Arbeitsgruppe, die einen günstigen, OGT-abhängigen Effekt von Cannabinoiden bei akuten Leukämien nachweisen konnte.

Trotz gemeinsamer mesodermalen Ursprungs von Blutzellen und Weichteilgeweben ist eine separate Untersuchung verschiedener Tumorentitäten unabdingbar.

Mit dieser Dissertation sollte eine fundierte wissenschaftliche Grundlage für die weitere Entwicklung einer potenziellen neuen Therapieoption für adulte Weichteilsarkome erarbeitet werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Verbrauchsmaterialien

12-Well-Lochplatten	Corning Inc.
6-Well-Lochplatten	Corning Inc.
96-Well-PCR-Platte (FrameStar® 480)	Genaxxon
Combitips® advanced, 5m	Eppendorf
CryoTube™ Vials-Kryoröhrchen	Thermo Scientific
Dichtungshafffolie 96-Well-PCR-Platte	Genaxxon
Elektrophoresegel (Criterion™ XT Precast Gel 10%-Bis-Tris)	Bio-Rad
Entsorgungsbeutel, autoklavierbar	BRAND
Eppendorf Tubes, Safelock (0,2ml, 0,5ml, 1ml, 2ml)	Eppendorf
FACS-Röhrchen (Round-Bottom Tubes)	BD
Falcon™ 6-well-Platten	Fisher Scientific
Falcon™ Einwegpipetten (2,5ml 5ml, 10ml, 25ml, 50ml)	Fisher Scientific
Falcon™ konische Zentrifugenröhrchen, 15ml	Fisher Scientific
Falcon™ konische Zentrifugenröhrchen, 50ml	Fisher Scientific
Falcon™ Zellkulturflaschen (25cm ² , 75cm ²)	Fisher Scientific
Handschuhe, unsteril	Hartmann
Incucyte® Imagelock 96-Well Plate	Sartorius
Migrationassay	
Nalgene™ Oak Ridge Zentrifugenröhrchen	Fisher Scientific
PARAFILM® M, double size	Sigma
Pasteur capillary pipettes	WU Mainz
Pipettenspitzen, diverse Größen	Nerbe

2.1.2 Laborgeräte

3017 Schüttler	GFL
AT 261 deltaRange	Mettler
CoolCell®-Einfrierbox	Biocision
FACSCalibur	BD
Gelelektrophoresekammer (Criterion™ Cell)	Bio-Rad
Heizblock (neo Block 1)	neoLab
HERAcell 240i-Brutschrank	Thermo Scientific
HERAsafe-Sicherheitswerkbank	Heraeus
Incucyte® Live-Cell Analysis Systems	Sartorius
Incucyte® Woundmaker Tool	Sartorius
IX51-Invertmikroskop	Olympus
LightCycler® 480	Roche
Mini-Fuge	Carl Roth
Mr Frosty Gefrierbehälter	ThermoFisher
NanoDrops Mikrovolumen Spektralphotometer	Thermo Scientific
Neubauer`sche Zählkammer	Hecht Assistent
Odyssey®	LI-COR®
Pipetboy-Pipettierhilfe	INTEGRA
Reax top-Shaker	Heidolph
Spannungsgerät (PowerPac™ HC)	Fa. Bio-Rad
Tecan Spark Multimodal Reader	Tecan
ThermoCycler (Mastercycler® gradient)	Eppendorf
Transferkammer (Criterion™ Blotter)	Bio-Rad
Vacunsafe-Absaugpumpe	Integra
Varifuge 3.0 RS-Standzentrifuge	Heraeus
verstellbare Pipetten, verschiedene Größen	Eppendorf
VIP Series-86°C-Kühlschrank	Sanyo
Vortex-Genie 2	Sci. Industries
Wasserbad	Köttermann
Zentrifuge 5415R	Eppendorf

2.1.3 Reagenzien und Versuchs-Kits

2.1.3.1 Reagenzien

0,05% Trypsin/ EDTA	Biochrom
10x Annexin V Binding Buffer	BD Biosciences
7-Aminoactinomycin D (7-AAD)	BD Biosciences
Fluorescein Isothiocyanat (FITC)-Annexin V	BD Biosciences
CBD	Sigma-Aldrich
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich
Ethanol (EMSURE®)	Merck Milipore
FACS-Flow	BD Biosciences
Festales Kälberserum (fetal bovine serum FBS)	Gibco
Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-Annexin V	BD Biosciences
HBSS (Hank`s Balanced Salt Solution)	Gibco
Hyclone-Dulbecco´s Minimum Essentials Kulturmedium (DMEM)	Gibco
L-Glutamin (200 mM)	Thermo Fischer
LB Broth Medium	Invitrogen
LightCycler Master® 480 SYBR Green I Master Kit	Roche
Natrium-Pyruvat	Life Technologies
Non-essential Aminoacids (NEAA)	Biochrom
PBS, calciumchloridfrei / magnesiumchloridfrei	Sigma
Penicillin/Streptomycin (10000µg/ml)	Biochrom
Propidiumiodid (PI)	Life Technologie
Puromycin (#3812)	Gibco
RPMI 1640 Medium, GlutaMAX™ Supplement	ThermoFisher
THC	THC Pharm
Lyse-Puffer	Sigma-Aldrich
Bradford-Reagenz (Bio-Rad Protein Assay)	Bio-Rad
XT Reducing Agent (30% TCEP, 10% NaCl in H2O)	Bio-Rad
XT Sample Puffer (35-50 % Glycerin, 5-10 %	Bio-Rad

Lithiumdodecylsulfat)		
Tween® 20 (Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat)		Carl Roth
TRIS (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan)		Sigma-Aldrich
Methanol (min. 99%)		Merck Millipore
PageRuler™ Plus Ladder		Thermo Scientific
OGT Human shRNA Plasmid		Origene

2.1.3.2 Primer

GAPDH vorwärts	5-ATCTCGCTCCTGGAAGATG-3`	Eurofins
GAPDH rückwärts	5`-TCGGAGTGAACGGATTCG-3`	Eurofins
OGT vorwärts	5`-CAGGAAGGCTATTGCTGAGAGG-3`	Eurofins
OGT rückwärts	5`-CGGAACTCACATATCCTACACGC-3`	Eurofins
18s vorwärts	5`-ATCCCTGAAAAGTTC-3`	Eurofins
18s rückwärts	`3-CACACCCTTAATGGC-5`	Eurofins

2.1.3.3 Probes

GAPDH	Universal ProbeLibrary Probe #60	Roche
OGT	Universal ProbeLibrary Probe #50	Roche
18s	Universal ProbeLibrary Probe #70	Roche

2.1.3.4 Antikörper

α-Tubulin Antikörper (Maus)		CellSig. Tech.
Humaner Cannabinoid-Rezeptor 1 Antikörper (Ziege)		Sigma-Aldrich
Humaner Cannabinoid-Rezeptor 2 Antikörper (Ziege)		Sigma-Aldrich
IRDye®-conjugated donkey anti-rabbit/goat/mouse IgG		LI-COR®
Anti-OGT antibody produced (Ziege)		Sigma-Aldrich

2.1.3.5 Puffer und Reagenz-Kits

RNeasy® Plus Mini	- gDNA Eliminator Mini Spin Columns (farblos) - RNeasy Mini Spin Columns (pink) - Sammeltubes (1.5 ml und 2 ml) - RLT Plus Puffer - RW1 Puffer - RPE (Konzentrat) Puffer - RNase-freies Wasser	Quiagen
Reverse Transcriptase Kit	- Random Primer (600pmol / µl) - RNase freies Wasser - Transkriptor Reverse Transkriptase Puffer 5x - RNase Inhibitor (40 U/l) - dNTPs (10nM) - Reverse Transkriptase	Roche
20x MOPS Running Puffer	- 30% (v/v) MOPS - 30% (v/v) Bis-Tris - 2% (v/v) Natriumdodecylsulfat in H ₂ O	Bio-Rad
Transferpuffer	- 25mM TRIS - 192mM Glycin - 20% (v/v) Methanol	Bio-Rad

Dharmacon™	- Trans-Lentiviral packaging mix	Dharmacon
Trans-Lentiviral packaging kits	- Calcium Phosphate - Dharmacon HEK293T Packaging Zelllinie	
	- Control Vectors	
	- Lenti-ORF RFP Kontrolle	
	- 2x HBSS	

2.1.4 Zelllinien

Zelllinie		Zelleigenschaften		Mutationen	Herkunft
RD	human	Rhabdomyosarkom	adhärent	NRAS _(GOF*) , TP53 _(LOF**)	AG C. Hinterleitner/ AG G. Kopp (UKT)
SW982	human	Synovialsarkom	adhärent	BRAF _(GOF*)	AG C. Hinterleitner/ AG G. Kopp (UKT)
SW872	human	undifferenziertes Liposarkom	adhärent	TP53 _(LOF**) , BRAF _(GOF*)	AG C. Hinterleitner/ AG G. Kopp (UKT)

Tabelle 1: Überblick über die verwendeten Zelllinien

* Gain-of-Function

** Loss-of-Function

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultivierung

Alle verwendeten Zelllinien wurden in einem definiertem Basismedium bei 37°C, 5% CO₂ und wassergesättigt in einem Begasungsbrutschrank kultiviert.

Als definiertes Basismedium fand entweder ein DMEM-Medium (RD, SW982), oder ein RPMI-Medium (SW872) Verwendung. Alle Medien wurden mit 10% FBS (fetal bovine serum, fetales Kälberserum), 1% NEAA (Non Essential Aminoacid) und 1% (v/v) Natrium-Pyruvat versetzt. Um das Risiko einer möglichen bakteriellen Kontamination zu minimieren, wurde dem Basismedium 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin (\cong 10000 μ g/ml) supplementiert.

2.2.1.1 Trypsin-basiertes Passagieren

Anhand täglicher, lichtmikroskopischer Kontrollen wurden die Zellen ab einer Konfluenz von ca. 70 % in einem Verhältnis von 1:10 gesplittet, um eine suffiziente Nährstoffversorgung und ein exponentielles Wachstum der Zellen zu gewährleisten. Durch einen im Basismedium enthaltenen Farbindikator konnte die Nährstoffversorgung der Zellen abgeschätzt werden.

Nach vollständiger Entfernung des Basismediums wurde der Zellrasen mit 1% PBS gewaschen. Anschließend erfolgte das enzymbasierte Ablösen der Zellen mit Trypsin/EDTA.

Unter optischer Kontrolle wurde der Zellrasen nach enzymatischem Ablösen mithilfe mäßiger, manueller Krafteinwirkung von der Zellkulturflasche separiert. Nach Inaktivierung des Trypsins mittels Basismedium wurden die Zellsuspension im Verhältnis 1:10 mit Basismedium verdünnt und erneut ausgesät. Alle verwendeten Lösungen wurden zuvor im Wasserbad auf 37°C vorgewärmt.

2.2.1.2 Kryokonservierung

Eine entsprechend 2.2.1.1 gewonnene Zellsuspension wurde unverdünnt in ein Falcon überführt und 5 min bei 1200 U/min zentrifugiert. Nach Abgießen des Überstandes wurde das Zellpellet in einem Konservierungsmedium, bestehend aus 50% DMEM bzw. RPMI 1650 Kulturmedium, 40% FBS, 10% DMSO resuspendiert und jeweils 1 ml in Kryoröhrchen verteilt. Anschließend wurden diese umgehend bei -80 °C eingefroren und gelagert.

2.2.1.3 Auftauen

Kryokonservierte Zellen wurden zügig in einem 37 °C warmen Wasserbad aufgetaut und anschließend in 5 ml Basismedium verdünnt. Nach 5-minütigem Zentrifugieren wurde der Überstand entsorgt und das Zellpellet mit 5 ml Basismedium resuspendiert und in eine Kulturflasche überführt.

2.2.2 Genexpressionsanalyse mittels qRT-PCR

Zur Detektion der Gen-Expression und zum Nachweis einer reduzierten Gen-Expression in Knockdown-Modellen wurde mRNA mithilfe des RNeasy® Plus Mini Kit der Firma Qiagen isoliert. Im Anschluss wurde die mRNA unter Verwendung es Reverse Transkriptase Kits der Firma Roche in cDNA reverse transkribiert. Die erzeugte cDNA wurde folglich in einer quantitativen, Echtzeit-Polymerase Kettenreaktion (QRT-PCR) amplifiziert, um die Expression des Zielgens im Vergleich zum GAPDH bzw. 18S Houskeeping-Gen zu quantifizieren.

2.2.2.1 RNA-Isolierung

Nach Herstellen einer Zellsuspension wird diese bei 1200U/min für 5 Minuten zentrifugiert und anschließend der entstandene Überstand an Nährmedium verworfen. Das gewonnene Pellet wird in RLT Plus Lysepuffer gelöst und für 1 Minute suspendiert. Der nun hergestellten, lysierten Zellsuspension wird 70%

Ethanol hinzugefügt und vorsichtig mehrfach vermischt. Anschließend wird die Suspension auf eine RNeasy spin column aufgetragen und für 15 Sekunden bei 10000 rpm zentrifugiert, wodurch alle nicht benötigten Zellbestandteile abgetrennt und verworfen werden. Im Anschluss folgen mehrere Reinigungsschritte (RW1 Puffer, RPE Puffer) sowie die Fixation der RNA mit 80% Ethanol. Im letzten Schritt wird die gewonnene RNA mithilfe RNase freiem Wasser in ein 1,5 ml Eppendorftube per Zentrifugation überführt.

2.2.2.2 cDNA Synthese

Zur weiteren Verwendung wurde die in 2.2.2.1 gewonnene RNA zunächst mithilfe eines Nanodrops Mikrovolumen-Spektralphotometers qualifiziert und quantifiziert, um basierend auf den Ergebnissen die weitere cDNA Synthese zu berechnen.

Für die Synthese von Einzelstrang-cDNA wurde das Reverse Transcriptase Kit der Firma Roche verwendet.

Zunächst wurden für einen „Template-Primer Mix“ 1 µg der jeweiligen RNA mit 2 µl Random Primer vorsichtig vermischt und im Anschluss mit RNase-freiem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 26 µl verdünnt. Es folgte nach erneutem, vorsichtigem Pipettieren eine Inkubationsphase von 10 Minuten bei 65 °C im Thermocycler.

Im Anschluss wurden jeweils 12 µl eines Reverse Transkriptase Mastermixes, bestehend aus 8 µl Transcriptor Reverse Transcriptase Buffer 5x, 1 µl RNase Inhibitor (40 U/ µl), 2 µl dNTPs (10 mM) und 1 µl Reverser Transcriptase, hinzugefügt. Die so entstandene Lösung wurde nun im Thermocycler für 25 Minuten bei 25 °C, anschließend 30 Minuten bei 55 °C und schlussendlich 5 Minuten bei 85 °C in cDNA synthetisiert. Nicht unmittelbar verwendete cDNA Proben wurden bei -20 °C konserviert.

2.2.2.3 Quantitative Echtzeit-PCR

Mithilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR, Polymerase Chain Reaction) können Nukleinsäuren in vitro amplifiziert werden. Diese findet sowohl in experimentellen als auch in klinischen Fragestellungen Verwendung und nimmt hierbei einen hohen Stellenwert ein. Dabei besteht das grundlegende Prinzip aus einer Denaturierung, Annealing des Primers und der Polymerisation.

Speziell mit der qRT-PCR besteht die Möglichkeit, mithilfe einer proportionalen Fluoreszenzmessung die Amplifikation in Echtzeit quantitativ zu detektieren.

Zunächst wurde ein „Mastermix“ aus 0,8 µl H₂O, jeweils 2 µl Vorwärtsprimer bzw. Rückwärtsprimer, 0,2 µl Probe (Probe # 50 OGT, Probe # 60 GAPDH, Probe # 70 18S) und 10 µl des 2 x LV 480 Mastermix hergestellt. In einer 96-Well-PCR-Platte wurden im Anschluss 5 µl cDNA vorgelegt. Dieser wurden jeweils 15 µl des Mastermixes hinzugefügt, die Platte mittels Dichtungshaftfolie verschlossen und 1 Minute bei 2000 G zentrifugiert. Hierbei wurden jeweils Triplikate ausgeführt, als Positivkontrolle diente das Housekeepinggen GAPDH (Probe #60) bzw. 18S (Probe # 70), als Negativkontrolle wurde H₂O verwendet. Zur Polymerasekettenreaktion wurde der LightCycler 480 der Firma Roche mit dem zuvor in der Arbeitsgruppe etablierten Programm „Mono Clonour Hydrolysis UPL“ verwendet.

Die Auswertung der generierten Rohdaten zur relativen Quantifizierung erfolgte mit Programm „LightCycler 480“ als $\Delta\Delta$ Ct-Methode:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{Probe behandelt}) - \Delta Ct (\text{Probe unbehandelt})$$

Ct = Anzahl an Zyklen, die benötigt werden, bis das PCR-Produkt über ein zuvor definiertes Hintergrundsignal detektierbar ist; kennzeichnet Eintritt in exponentielle Phase

$$\Delta Ct = Ct (\text{Zielgen}) - Ct (\text{Kontrollgen})$$

2.2.3 Proteinanalyse mit Western Blot

Der Western Blot bietet als biochemische Methode die Möglichkeit der Detektion und Analyse von Protein/-bestandteilen. Im Allgemeinen werden die Proteine in einem ersten Schritt aufgrund ihrer spezifischen Ladung durch eine Elektrophorese aufgetrennt und anschließend auf eine Membran übertragen. Auf der Membran werden die separierten Proteine mithilfe spezifischer Antikörper sichtbar gemacht.

Im Rahmen des Forschungsprojektes wurde die Methodik zum Nachweis der Cannabinoidrezeptor-Expression, sowie als ergänzende Kontrolle der Knockdown-Modelle genutzt.

2.2.3.1 Herstellen von Lysaten

Für einen Lysepuffer wurden Reagenzien der Firma Sigma-Aldrich verwendet:

- 943 RIPA-Puffer nach Laborstandard:
 - 150 mM NaCl,
 - 50 mM Tris pH 8
 - 1.0 % IGEPAL® CA-630
 - 0.1 % (v/v) SDS
 - 0.5 % (v/v) Natrium Deoxycholsäure
- 50 µl Glycerolphosphat
- 10 µl PP1
- 10 µl Phosphatase Inhibitor Cocktail II
- 10 µl NaF (0,5 M)
- 10 µl Protease Inhibitor Cocktail
- 5 µl NaVo (0,2 M)
- 1 µl Perfabloc
- 1 µl Pepstatin
- 1 µl Leupeptin
- 1 µl Aprotinin

Die verwendeten Zelllinien wurden nach Herstellung einer Zellsuspension für 5 Minuten bei 2000 g zentrifugiert. Der Überstand an Medium wurde entfernt, das Zellpellet wurde 100 µl Lysepuffer gelöst und direkt auf Eis gestellt. Anschließend wurde die so entstandene Suspension mehrfach unter strenger Einhaltung einer Kühlung vermischt. Schlussendlich wurde diese für 15 Minuten

bei 4 °C und 13500 rpm zentrifugiert. Nicht unmittelbar verwendete Lysate wurden bei -20 °C gelagert.

2.2.3.2 Bradford-Assay zur photometrischen, quantitativen Proteinbestimmung

Mithilfe des Bradford-Assay wurde die Proteinkonzentration der Lysate photometrisch bestimmt. Der Assay beruht auf einer Veränderung des Absorptionsmaximums des verwendeten Coomassie® Brilliant Blue G-250 Farbstoffes von 465 nm zu 595 nm. Über die Extinktion ist es nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz möglich, die Proteinkonzentration zu berechnen.

Zunächst wurden eine Standardlösung aus 180 µl Aqua dest. und 20 µl bovinem Serumalbumin hergestellt. In einem nächsten Schritt wurden 2,5 ml Bio-Rad Assay (beinhaltet Coomassie® Brilliant Blue G-250) und 7,5 ml MilliQ-Wasser verwendet, um ein Bradford Reagenz herzustellen. In einer 96-Well Platte wurden die Standardlösung und die jeweiligen Lysatproben in Triplikaten aufgetragen, 150 µl Bradford-Reagenz hinzugegeben und anschließend 10 Minuten inkubiert. Die Auswertung erfolgte mithilfe eines Tecan-Readers.

2.2.3.3 SDS-PAGE Gelelektrophorese

Die Sodium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese bietet als etablierte Methodik die Möglichkeit, Proteine aufgrund ihrer Größe und Ladung aufzutrennen.

Dabei werden den Proteinproben Natriumdodecylsulfat in Form eines Puffers zugesetzt. Dieses bewirkt eine Denaturierung durch Bindung an hydrophile Seitenverbindungen der Sekundär- und Tertiärstruktur. Zusätzlich erhält die Proteinstruktur damit eine negative Ladung.

Tris(2-carboxyethyl)phosphoniumchloride, welches ebenfalls der Probe zugeführt wird, löst bestehende Disulfidbrücken auf. Zusätzlich bewirkt eine Hyperthermie während des Denaturierungsprozesses eine Aufhebung der ursprünglichen Proteinstruktur. Ziel ist es, ein nahezu lineares Produkt zu erhalten, annähernd der Primärstruktur des Proteins. [95]

Das nun negativ geladene Makromolekül wandert in der Gelelektrophorese in Richtung Anode. Dabei durchläuft die Probe, je nach Verwendung der Gelmatrix, unterschiedlich schnell die Gelelektrophorese: größere Moleküle werden durch die Matrix verstärkt an der Migration gehindert als kleinere Moleküle. Somit durchlaufen kleinere Moleküle in der Matrix weiter in Richtung Anode.

Zunächst wird ein „Lämmli-Puffer“ aus 25 µl XT-Sample-Buffer (beinhaltet Lithiumdodecylsulfat und Glycerin) und 5 µl XT Reducing Agent (beinhaltet Tris(2-carboxyethyl)phosphonium chloride und Natriumchlorid) hergestellt.

Den Proteinlysaten werden 10µl „Lämmli-Puffer“ zugegeben und anschließend 5 Minuten bei 95 °C behandelt.

Nicht unmittelbar verwendete Lysate werden bei -20 °C asserviert.

Der Aufbau und die Inbetriebnahme erfolgte nach den Herstellerangaben der Firma BioRad. Nach Beladen der Kammer mit einem 10%tigen Criterion-Gels wurde die Kammer mit MOPS-Laufpuffer aufgefüllt. Im Anschluss wurde das Gel mit jeweils 30µl der entsprechenden Proben beladen. Zur Identifikation der Molekülgröße wurde 10 µl PageRule™ Plus (10 to 250 kDa) als Marker verwendet. Es folgte die Elektrophorese für 60 Minuten bei 200 V.

2.2.3.4 Western Blot

Die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine werden während des Western Blots auf eine Membran transferiert. Dies ermöglicht im Anschluss eine Immundetektion der gewünschten Proteine (s.u.). Dabei nutzt man erneut die Eigenschaft des Natriumdodecylsulfates, welches den Proteinen weiterhin eine negative Ladung gibt. Die Proteine werden anhand eines elektrischen Feldes auf eine Nitrocellulosemembran transferiert und im Anschluss fixiert. [96]

Der Aufbau des Criterion™ Blotter de Firma BioRad erfolgte ebenfalls nach Herstellerangaben. In die mit Transferpuffer gefüllten Blot-Kammer wird das Gel, welches sich zwischen Membran, Filterpapier und Schwämmen in einer Kompressionskassette befindet, hinzugegeben und für 30 Minuten bei 100 V im Kühlraum bei 4°C behandelt.

2.2.3.5 Immunodetektion

Die nun auf der Nitrocellulosemembran transferierten Proteine können durch den Einsatz spezifischer Antikörper nachgewiesen und visualisiert werden. Dabei bindet das Paratop des Primärantikörpers auf spezifische, dem Zielprotein gerichtete Epitope. Um die Bindung des Primärantikörpers sichtbar zu machen, wird ein Fluoreszenz-markierter Sekundärantikörper verwendet, welcher sich gegen speziesspezifische Oberflächenmerkmale des Primärantikörpers richtet und diesen bindet. [97]

Zunächst wird die Nitrocellulosemembran nach dem Transfer der Proteine mit einem Blocking-Puffer (5 ml BSA 45 ml Waschpuffer) inkubiert, um nicht-spezifische Bindungen zu minimieren. Im Anschluss folgten Waschschrte. Über die Nacht wurde die Membran mit dem Primärantikörper inkubiert, welcher wie folgt hergestellt wurde: 20 ml Blocking-Puffer (s.o.) und 40 µl Primärantikörper-Stock, entsprechend einer 1:500 Verdünnung.

Am darauffolgenden Tag wurde der Primärantikörper entfernt, mehrere Waschschrte mit TBS, welches 0.005 % (v/v) Tween 20 enthielt, folgten.

Zur Visualisierung wurde der Plot für eine Stunde im lichtgeschützten Raum mit einem Sekundärantikörper in einem 1:10000 Verhältnis inkubiert: 20 ml Waschpuffer wurden 2 µl Sekundärantikörper hinzugefügt.

Als Ladekontrolle wurde die Nitrocellulosemembran eine Stunde im Dunkeln mit einem Anti- α -Tubulin Primärantikörper inkubiert und folgend, wie oben beschrieben, mehrfach mit Waschpuffer gereinigt. Die Ladekontrolle wurde ebenfalls eine Stunde mit einem 1:10000 Anti-Maus Sekundärantikörper visualisiert.

Im letzten Schritt erfolgte die Auswertung des Blots mit dem LI-COR Odyssey® System Dabei entsprach 680nm rot und 800nm grün.

Primärantikörper

Zielepitop	Herkunft
Cannabinoidrezeptor-1	Ziege
Cannabinoidrezeptor-2	Ziege
OGT	Hase
α -Tubulin	Maus

Sekundärantikörper

Zielepitop	Herkunft
Anti-Ziege	Esel
Anti-Hase	Esel
Anti-Maus	Esel

2.2.4 Apoptoseinduktion durch Cannabinoide und Apoptosebestimmung mit fluoreszenzbasierter Durchflusszytometrie (FACS)

Die Durchflusszytometrie bietet als biotechnologische Methode die Möglichkeit, einzelne Zellen einer Zellpopulation quantitativ und qualitativ auszuwerten. Grundlegend nutzt man die spezifischen Eigenschaften einer Zelle wie Größe, Granularität oder andere Zelleigenschaften. Als Prinzip werden gelöste Zellen einzeln durch ein sehr feines Rohr geleitet, in dem diese auf eine Lichtquelle treffen. Dieses Licht wird, je nach Zelle, unterschiedlich gestreut und als Signal durch einen Detektor erfasst. Dabei unterscheidet man zwei Formen von Streulichtern: Das FSC (Forward Scatter, Vorwärtsstreulicht) gibt dabei Auskunft über die Größe der gemessenen Zelle, das sogenannte SCC (Side Scatter, Seitwärtsstreulicht) steht in 90° zum FSC und kann Auskunft zur inneren Struktur wie Granularität der Zelle geben. Fluoreszenzmarkierte Moleküle einer Zelle werden durch spezifische Wellenlängen angeregt und detektiert [98]. Diese fluoreszenzbasierte Methodik nutzt die FACS-Analyse

(engl. Fluorescence-Activated Cell Sorting, Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung). Dabei werden die Zellen mit Fluoreszenz-markierten Molekülen markiert, die an die gewünschten Zielstrukturen im Zellinneren oder an der Zelloberfläche binden. Eine Vielzahl von Reagenzien zur Detektion multipler Fragestellungen ermöglichen dabei den breiten Einsatz dieser Methodik, wie beispielsweise zur Immunphänotypisierung durch fluoreszenzmarkierte Antikörper gegen CD-Merkmale von Zellen, Proliferationsanalysen, oder Apoptoseanalysen [98].

Zur Auswertung wird eine Zellpopulation als Referenzgruppe bestimmt (sog. Gating), um beispielsweise lebende Zellen von Zellbestandteilen zu unterscheiden. Im Anschluss werden die speziellverwendeten Fluoreszenzmarker analysiert und verglichen [98].

2.2.4.1 Apoptoseassay mit Annexin V und PI / 7-AAD

Die Apoptose, auch kontrollierter Zelltod, beschreibt einen Prozess, der essenzieller Bestandteil zur Aufrechterhaltung der Homöostase eines Organismus ist [99]. Dabei werden aufgrund unterschiedlicher Stimuli Zellen in einem geordneten, für den Organismus vorteilbringenden Prozess abgebaut. Man unterscheidet einen extrinsischen Weg und einen intrinsischen Weg.

Die Bindung von extrinsischen Liganden an sog. „Death Receptors“ lösen beim extrinsischen Weg eine Signalkaskade mit folglich Apoptose-Induktion aus. Der intrinsische Weg zeichnet sich durch eine Apoptose-Induktion aufgrund intrazelluläre Stresssignale aus, wie beispielsweise irreversible Schädigungen der DNA.

Nach Induktion der Apoptose ist diese durch Zellschrumpfung, Abbauphase mit Bildung apoptotischer Körper und Phagozytose gekennzeichnet [99].

Während des kontrollierten Ablaufes kommt es zu multiplen Veränderungen der Zelle. Erwähnenswert ist die Translokation des Phospholipids Phosphatidylserin, welches bei viablen Zellen an der Innenseite der

Zellmembran vorliegt. Nach Translokation von Phosphatidylserin an die Außenseite der Zellmembran wirkt dies als Signal zur Phagozytose [100].

Die Apoptosebestimmung stellt somit ein wichtiger Parameter für die Effektivität einer Substanz dar und ist somit eine objektive Bewertung ihrer Wirksamkeit [99].

Das mit Fluorescein Isothiocyanat (FITC) konjugierte Reagenz Annexin V bindet mit hoher Affinität an Phosphatidylserin und kann daher zur Quantifizierung apoptotischer Zellen genutzt werden. Dieses erscheint in der Durchflusszytometrie grün.

Propidiumiodid (PI) oder 7-Aminoactinomycin D (7-AAD), etablierte und in diesem Forschungsprojekt verwendeter Farbstoff, interkaliert mit Nukleinsäuren einer Zelle. Dabei können diese nur eine perforierte Zellmembran durchdringen, wohingegen eine intakte Zellmembran lebender Zellen undurchlässig ist. Natives Propidiumiodid weist eine geringe Fluoreszenz auf, nach Bindung an DNA steigt die Intensität der Fluoreszenz jedoch an. Beide Reagenzien erschienen in der Durchflusszytometrie rot. Dies wird beispielsweise zur Viabilitätsbestimmung bzw. zum Nachweis toter Zellen genutzt.

Somit ergeben sich folgende Nachweismöglichkeiten:

	Annexin	PI / 7-AAD
Zelle viabel	negativ	negativ
Zelle frühapoptotisch	positiv	negativ
Zelle spätapoptotisch	positiv	positiv

In einem ersten Schritt wurden die Zellzahl der unterschiedlichen Zelllinien bestimmt, welche in einer 12-Well Platte ausgesäht werden müssen, sodass die Zellen nach 48 Stunden kein überkonfluierendes Wachstum zeigen. Hierdurch sollen Apoptoseinduktion durch kompetitives Wachstum der Zellen ausgeschlossen werden (s.u.).

Die so ermittelte Zellzahl wurde jeweils in Triplikaten in 12-Well Platten ausgesäht und in aufsteigender Konzentration mit CBD und THC behandelt (siehe Tabelle)

Wirkstoff	Konzentration [μM]								
CBD	8	16	24	32	40	48			
THC	8	16	24	32	40	48	56	64	80

Tabelle 2: Verwendete Wirkstoffkonzentrationen im Rahmen der Cannabinoidtherapie

Nach 48 Stunden Inkubationszeit im Brutschrank und täglicher, lichtmikroskopischer Kontrollen erfolgte das Entfernen des Mediums in ein FACS-Röhrchen, welches apoptotische bzw. nicht vitale, nicht-adhärenente Zellen enthielt. Im Anschluss erfolgte ein Waschschriff mit PBS. Adhärenente Zellen wurden trypsinbasierte abgelöst und nach Inaktivierung mit Nährmedium ebenfalls in das jeweilige FACS-Röhrchen transferiert und für 5 Minuten bei 1200 U/min zentrifugiert. Nach Entfernen des Überstandes wurde das Zellpellet mit 100 μl Annexin V Binding Buffer resuspendiert. Der nun entstandenen Suspension wurden jeweils 2 μl APC-Annexin V und 5 μl PI bzw. 5 μl 7-AAD hinzugefügt und für 30 Minuten lichtgeschützt auf Eis inkubiert.

Im Anschluss wurden erneut 300 μl Annexin V Binding Buffer hinzugefügt und die Probe unmittelbar analysiert. Da die verwendeten Cannabinoide CBD und THC in Methanol gelöst sind, wurde die jeweilige Zelllinie als Negativkontrolle ebenfalls mit Methanol behandelt. Im Anschluss erfolgte die Berechnung des IC-50 Wertes mit Graphpad Prism.

2.2.5 Bestimmung des Proliferationsverhaltens unter Cannabinoidtherapie durch mikroskopische Zellzahlbestimmung

Die Proliferationsrate einer Zelle beschreibt die Geschwindigkeit und Häufigkeit einer Zellteilung und gibt als Maß für das Wachstum wichtige Hinweise auf das Wachstumsverhalten einer Zellentität.

Genetische Faktoren, Umweltbedingungen und Medikamente haben Einfluss auf die Proliferationsrate. Dabei kann man ein benignes Proliferationsverhalten beispielsweise bei einer Wundheilung beobachten. Eine hohe Proliferationsrate ist jedoch auch typisch für maligne Prozesse und können Hinweis auf einen aggressiven Verlauf sein. In unterschiedlichen Proliferationsmodellen kann das Proliferationsverhalten, aber auch die Wirksamkeit von proliferationshemmenden Substanzen (wie beispielsweise Chemotherapien) untersucht werden.

In einem Cell Counting Assay wurde zunächst in einer Voranalyse die optimale Aussaatdichte ermittelt. Hierbei sollten die Zellzahl ermittelt werden, bei der die Zelllinien nach 5 Tagen kein überkonfluierendes Wachstum aufweisen und die Proliferationsfähigkeit erhalten bleibt.

Nach Herstellen einer Zellsuspension aus der jeweiligen Zellkultur wurde die Zellzahl lichtmikroskopisch in einer Neubauer'schen Zählkammer ermittelt und die benötigte Zellzahl berechnet. Im Anschluss erfolgte die Behandlung der Zelllinien mit CBD bzw. THC mit Konzentrationen, welche unterhalb des ermittelten IC_{50} -Wertes der jeweiligen Zelllinie lagen.

Es erfolgt ein täglicher Wechsel des Nährmediums mit der entsprechenden Cannabinoidbehandlung. Unter lichtmikroskopischer Kontrolle wurde nach 24, 48, 72, und 96 Stunden das Zellwachstum beobachtet und die Zellzahl bestimmt. Hierfür wurden nach Entfernen des Medium-Cannabinoid-Gemisches und eines Waschschrilles mit 1 ml PBS die adhärennten Zellen trypsinbasiert gelöst, mit Nährmedium verdünnt und ein Eppendorf Tube überführt.

Es folgte die Bestimmung der Zellzahl mithilfe einer Neubauer'schen Zählkammer.

$$\text{Zellzahl} = \frac{n}{4} \times 10^4 \times V_l$$

n = Anzahl der gezählten Zellen

V_l = Volumen der Gesamtlösung,

nach 24 bzw 48 h: 1 ml

nach 72 h 1,5 ml

nach 96 h 2 ml

Alle Experimente wurden mindestens in Triplikaten durchgeführt.

2.2.6 Migrationsverhalten unter Cannabinoidtherapie mittels Wundheilungs-Scratch Assay

Das Migrationsverhalten eines Zellverbandes stellt ein wichtiges Merkmal in der Krebsforschung dar, um Invasionsmuster bzw. Metastasierungsverhalten von Tumorentitäten zu untersuchen [101].

Um den Effekt der Cannabinoidtherapie auf die Migration zu untersuchen, wurden Wundheilungsversuche unter einer Cannabinoidtherapie durchgeführt. Zunächst wurde die benötigte Zellzahl ermittelt, die pro Well vorgelegt werden muss, damit eine 80-90 % Konfluenz entsteht.

Die Wundheilungsmigrationsanalyse wurde nach dem Protokoll der Firma Sartorius durchgeführt. Nach mikroskopischer Kontrolle der 96-Well Platte und Beurteilung der Konfluenz wurde mithilfe eines WoundMakers® ein ca. 750-800 µm breiter Scratch in allen Wells erzeugt. Um abgelöste Zellen zu entfernen, erfolgte ein zweimaliger Waschvorgang mit 100 µl PBS. Im Anschluss wurde jedem Well 100 µl Medium, welches entweder CBD oder THC enthielt, hinzugefügt. Mithilfe des Incucyte® Live-Cell Imagers erfolgte für 18 Stunden in 2-Stunden Abständen die Visualisierung des Scratches.

Im Anschluss wurden die erhobenen Daten mithilfe der Incucyte® Scratch Wound Analysis Software ausgewertet und die relative Migrationsrate und Migrationsgeschwindigkeit bestimmt und verglichen. Nachfolgende Formel beschreibt die Migrationsgeschwindigkeit in Mikrometer pro Stunde. Diese wird als Differenz zwischen Wundbreite zu Beginn des Versuchs (w_0) und Wundbreite nach 18 Stunden (w_1) geteilt durch die Zeit (18 Stunden) berechnet.

$$\text{Migrationsgeschwindigkeit} = \frac{w_0 - w_1}{t} \quad \left[\frac{\mu\text{m}}{\text{h}} \right]$$

w_0 = Scratchbreite bei Beginn [μm]

w_1 = Scratchbreite nach Ende des Versuchs [μm]

t = Zeit [h]

2.2.7 Etablierung eines stabilen OGT-Knockdowns in Sarkomzelllinien mittels Short Hairpin RNA Interferenz

Um eine spezielle Untersuchung der O-linked β -N Acetylglucosamintransferase (OGT)-Aktivität auf Proliferation, Apoptose und Migration in Weichteilsarkomen zu untersuchen, wurde eine in der Arbeitsgruppe etablierte Short Hairpin RNA (shRNA) Interferenz Technik verwendet.

RNA-Interferenz beschreibt einen natürlichen Zellprozess, bei dem die Expression von Genen durch den Abbau der entsprechenden mRNA gehemmt wird. Somit stellt sie einen wichtigen regulatorischen Vorgang der Genexpression dar.

Short Hairpin RNA (shRNA) sind kurze, künstlich synthetisierte Nukleinsäuren zwischen 19 und 22 bp welche durch Selbstkomplementarität eine Haarnadelstruktur bilden. Die komplementäre RNA-Stränge sind durch eine Schleife jeweils verbunden [102]. Die shRNA gelangt über einen Vektor (z.B. Virus) in die Zielzelle, wird transkribiert und bildet eine Haarnadelstruktur aus. Die Haarnadelstruktur wird von einem Enzym entfernt, sodass ein kurzes, doppelsträngiges RNA-Molekül entsteht. Diese werden in RNA-induziertem Silencing-Komplex (RISC) eingebaut. Der Antisense-Strang der RNA-Moleküle bindet dabei die komplementäre mRNA und initiiert dessen Abbau [102].

Mit dieser leistungsstarken Technik ist es möglich, die Genexpression des OGT-Gens zu senken.

2.2.7.1 Transfektion von HEK293T-Zellen mit OGT knock-down DNA-Plasmiden

Die folgenden Schritte sind dem „Trans-lentiviral packaging Kit“ der Firma Dharmacon/Thermo Scientific angelehnt. Zur Verwendung kam ein pGFP-V-RS-Retroviral shRNA Vektor der Firma OriGene. Dieser beinhaltet neben einem Puromycinresistenz-Gen zur späteren Zellselektion eine tGFP-Sequenz, welche zur Visualisierung der erfolgreichen Transduktion verwendet werden kann [94].

Zunächst wurden die HEK293T-Zellen in Zellkultur genommen und diese anschließend in eine 6-Well Platte vorgelegt.

Diese wurden über Nacht inkubiert, sodass eine Zelldichte zwischen 85-90 % erreicht wurde. Am Folgetag wurde zunächst eine Lösung aus 6µg OGT shRNA-bzw. EV-Kontrollvektoren, 4,3µl Trans-Lentiviral Packaging Mix und 135 µl steriles H₂O hergestellt. Dieser wurde 15 µl CaCl₂ und 150µl 2x HBBS beigefügt und vermischt. Die nun entstandene Lösung wurde den HEK293T-Zellen aufgetragen und für 10 Stunden bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde das Medium entfernt und gegen je 2 ml serumreduziertes DMEM-Medium (5 % FBS) ausgetauscht. Es folgte erneut eine Inkubationszeit von 48 Stunden bei 37 °C. Nach Ablauf der 48 Stunden konnten die lentiviralen Partikel durch Sammeln des Mediums isoliert werden und wurden anschließend durch einen 0,45µm-Filter filtriert, um eine konzentrierte, lentivirale Lösung zu erhalten.

2.2.7.2 Transduktion der Zelllinien RD, SW982 und SW872 mit OGT-shRNA Knock-Down-Plasmiden

Initial wurden die jeweiligen Zelllinien in Kulturmedium in einer 6-Well Platte vorgelegt und über Nacht inkubiert, sodass eine 80-90 % Konfluenz zu erkennen war. Am Folgetag wurde das Kulturmedium verworfen und gegen je 1 ml reinem DMEM-bzw. RPMI-Medium ausgetauscht. Daraufhin wurden pro Well 50 µl shOGT-bzw. EV-shOGT-Lentiviren hinzugefügt und für 6 Stunden bei 37 °C inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden pro Well 1 ml Kulturmedium ergänzt und erneut für 48 Stunden bei 37°C inkubiert.

2.2.7.3 Selektion der erfolgreich transduzierten Zelllinien

Um die benötigte Konzentration von Puromycin zur Resistenzselektion zu ermitteln, wurde im Vorfeld pro Zelllinie eine Verdünnungsreihe durchgeführt und die Konzentration bestimmt, bei denen nach 5 Tagen keine viablen Zellen mehr detektierbar waren.

Dabei wurden folgende Konzentrationen an Puromycin festgelegt:

Zelllinie	RD	SW982	SW872
Puromycinkonzentration $\left[\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}\right]$	0,5	1	1,5

Es erfolgte die Resistenzselektion mit oben genannten Konzentrationen für 72 Stunden bei 37 °C. Die nun selektierten Zelllinien wurde lichtmikroskopisch begutachtet, trypsinbasiert passagiert und in Zellkultur übernommen.

2.2.7.4 Transduktionskontrolle

Um eine stabile lentivirale OGT-Suppression nachzuweisen, wurde zunächst die Aufnahme des Plasmid-DNA Vektors Fluoreszenz-mikroskopisch überprüft. Im Anschluss folgten molekularbiologische Nachweiskontrollen mittels einer qPCR zum Nachweis einer Suppression auf Nukleinsäure-Ebene, ein Westerblot zum Nachweis der Suppression auf Proteinebene

2.2.8 Statistische Auswertung

Zunächst wurde im Rahmen dieser Arbeit eine methodische Beratung durch das Institut für Klinische Epidemiologie und Angewandte Biometrie der Universität Tübingen in Anspruch genommen. Die statistische Auswertung der Versuchsergebnisse erfolgte durch Graphpad Prism 10.3 für Windows mittels Varianzanalyse, wobei je nach Versuchsaufbau entweder eine einfaktorielle oder zweifaktorielle Varianzanalyse durchgeführt wurde. Für Versuche mit einer Gruppenvariablen und einer abhängigen Variablen wurde eine einfaktorielle Varianzanalyse durchgeführt. Bei Experimenten mit zwei Gruppenvariablen und einer abhängigen Variablen kam eine zweifaktorielle Varianzanalyse zum Einsatz.

Die statistische Signifikanz wurde bei einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ festgelegt. Ergebnisse mit p-Werten unter diesem Signifikanzniveau wurden als statistisch signifikant betrachtet.

Die Migrationsgeschwindigkeit wurde mithilfe von Microsoft Excel berechnet. Die graphisch dargestellten Ergebnisse wurden mit GraphpadPrism Version 10.3 für Windows visualisiert.

2.2.9 Ethische Grundlagen und Berechtigungen

Vor Aufnahme der Datenerhebung wurde das Forschungsvorhaben der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität Tübingen zur Prüfung vorgelegt und unter dem Aktenzeichen 188/2018BO2 gemäß den geltenden ethischen Richtlinien genehmigt. Dronabinol (Δ^9 -Tetrahydrocannabinol) wurde mit Genehmigung der Bundesopiumstelle des Bundesinstituts für Arzneimittel und Medizinprodukte (BfArM) von der Firma THC Pharm (Frankfurt am Main, Deutschland) bezogen (BTM-Nummer: 4582772).

3 Ergebnisse

3.1 Rhabdomyosarkom-, Synovialsarkom- und Liposarkom-Zelllinien exprimieren die Cannabinoidrezeptoren CB₁ und CB₂

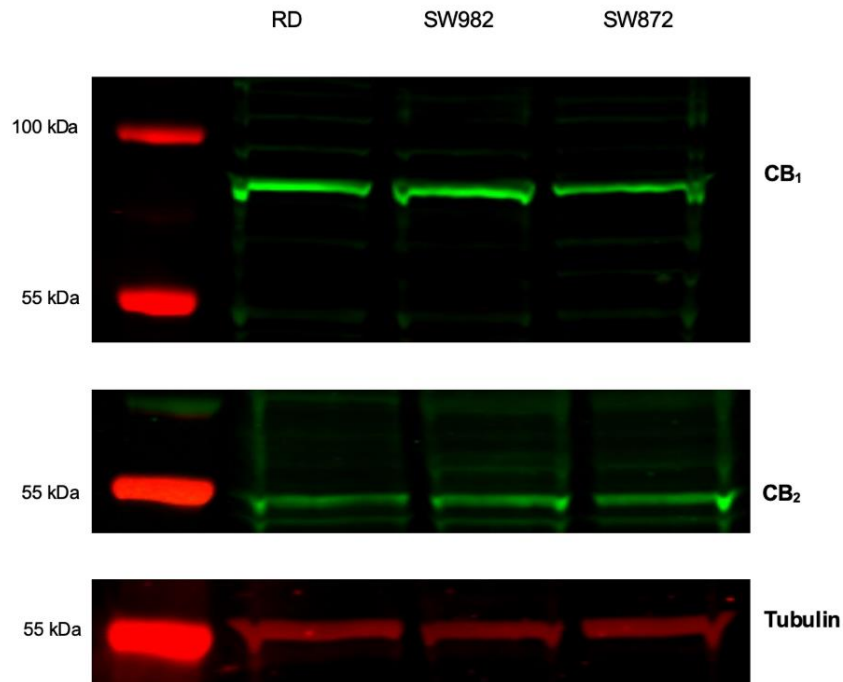


Abbildung 1: Expressionsanalyse von Cannabinoidrezeptoren in Sarkomzelllinien mittels Western Immunoblot: Die Expressionsanalyse bestätigt die Präsenz der Cannabinoidrezeptoren CB₁ und CB₂ in den untersuchten Ziellinien. Lane 1 (rot): Proteinleiter. RD: Rhabdomyosarkom-Zelllinie, SW982: Synovialsarkom-Zelllinie, SW872: Liposarkom-Zelllinie. CB₁: Cannabinoid-Rezeptor 1, CB₂: Cannabinoid-Rezeptor 2: Die Ladekontrolle erfolgte mit α -Tubulin

In der initialen Phase der Untersuchung wurde die Expression der Cannabinoidrezeptoren auf Proteinebene in den verwendeten Sarkomzelllinien untersucht.

Die Western Blot-Analyse bestätigen die Expression der Cannabinoidrezeptoren CB₁ und CB₂ in allen Zelllinien, was als Grundlage für die weiteren Untersuchungen dient.

3.2 Dosisabhängige Apoptose-Induktion durch Cannabinoide in Sarkom-Zelllinien

Um eine mögliche Apoptose-Induktion durch Cannabinoide zu untersuchen, wurden die Zelllinien für 48 Stunden mit aufsteigenden Konzentrationen von CBD und THC behandelt.

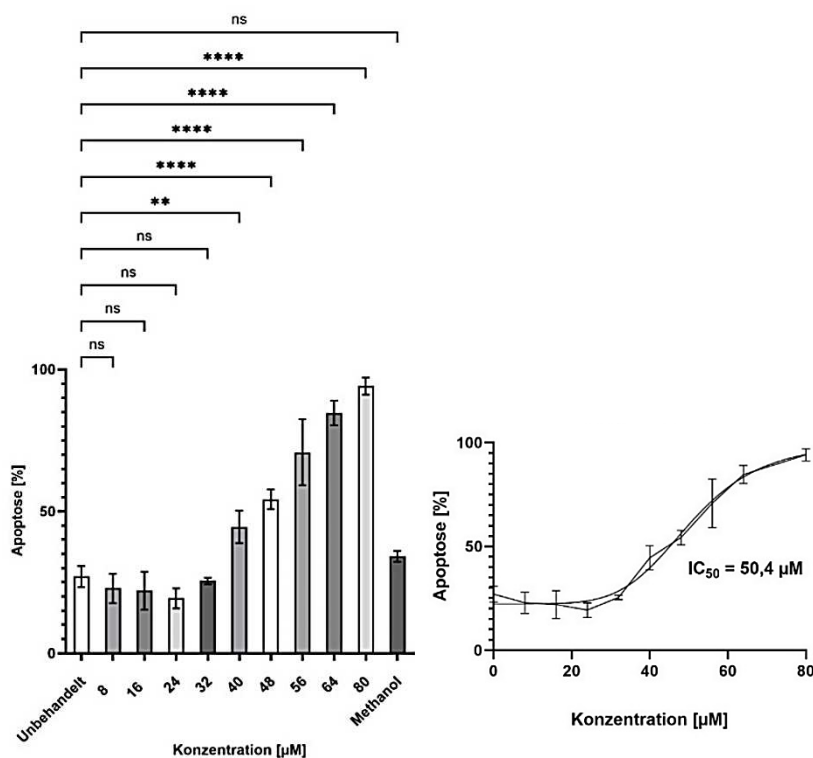
In allen untersuchten Zelllinien konnte eine konzentrationsabhängige Apoptose-Induktion nachgewiesen werden.

Basierend auf den erhobenen Messergebnissen wurde der halbmaximale inhibitorische Wert (IC₅₀-Wert) für die untersuchten Cannabinoide in den verschiedenen Sarkomzelllinien berechnet.

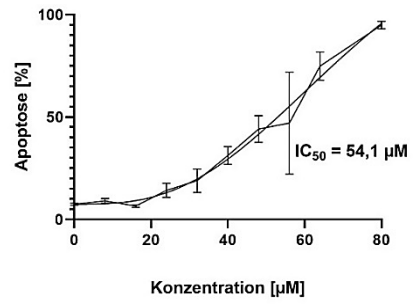
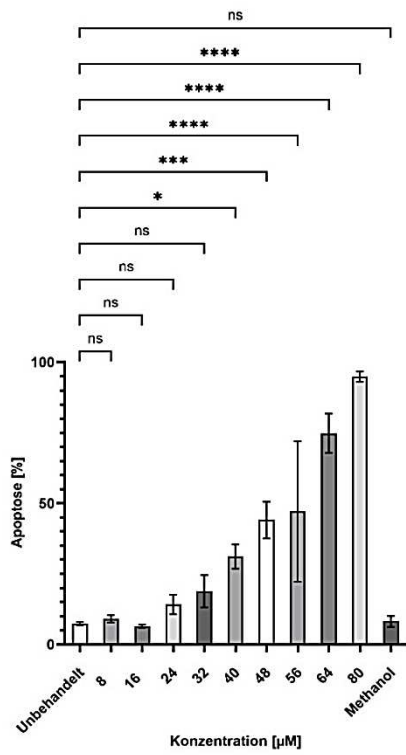
Die Ergebnisse zeigen den Mittelwert der durchgeführten Triplikate und deren Standardfehler. In den folgenden Kapiteln repräsentiert die x-Achse die ansteigenden Konzentrationen des Cannabinoids, die y-Achse zeigt die relative Anzahl der apoptotischen Zellen.

3.2.1 THC induziert die Apoptose in allen untersuchten Sarkom-Zelllinien

A: RD



B: SW982



C: SW872

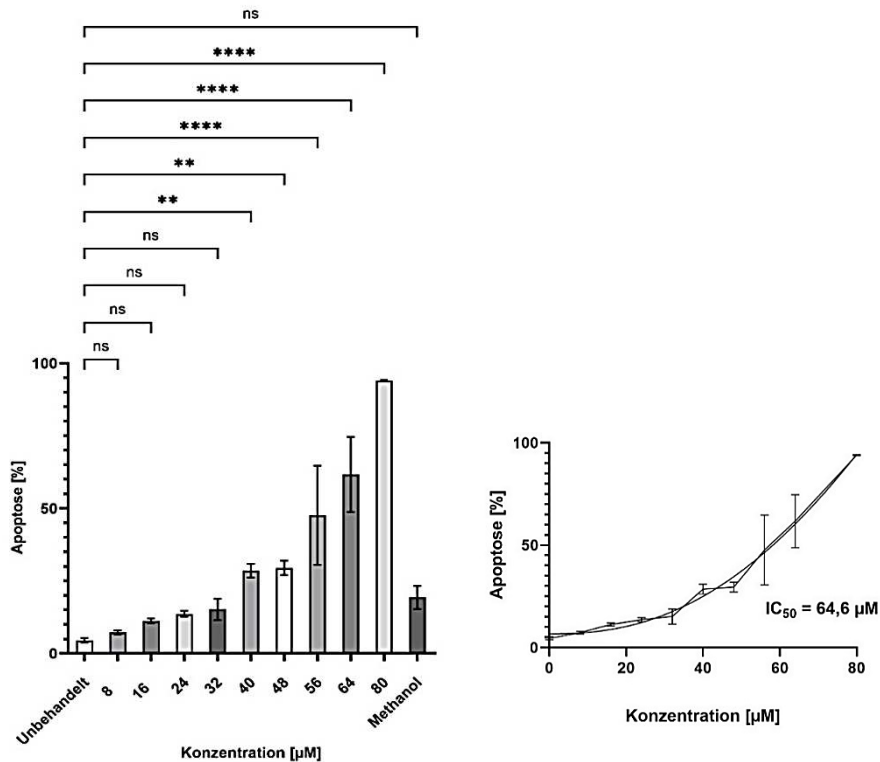


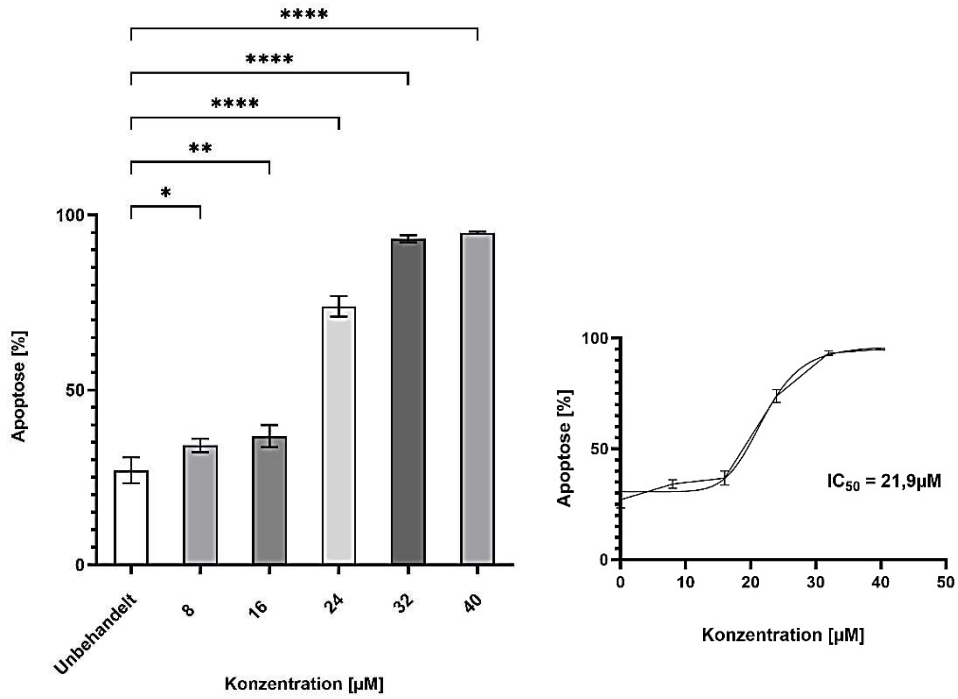
Abbildung 2: Apoptose-Induktion in Sarkom-Zelllinien durch THC: A: Rhabdomyosarkom-Zelllinie B: Synovialsarkom-Zelllinie C: Liposarkom-Zelllinie: Nach 48-stündiger Behandlung mit THC wurde der Anteil apoptotischer Zellen mittels Annexin V / PI durchflusszytometrisch bestimmt. Links: Säulendiagramm mit Darstellung der relativen Apoptoserate (y-Achse) in Abhängigkeit von der THC-Konzentration (x-Achse). Rechts: nichtlineare Regressionsanalyse mit berechnetem IC_{50} -Wert von THC für die jeweilige Zelllinie. Methanol als Trägersubstanz von THC diente als Negativkontrolle. Die Signifikanzniveaus wurden wie folgt klassifiziert: ns = nicht signifikant ($p > 0,05$), * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$

Zelllinie	IC_{50} THC [µM]
Rhabdomyosarkom (RD)	50,4
Synovialsarkom (SW982)	54,1
Liposarkom (SW872)	64,6

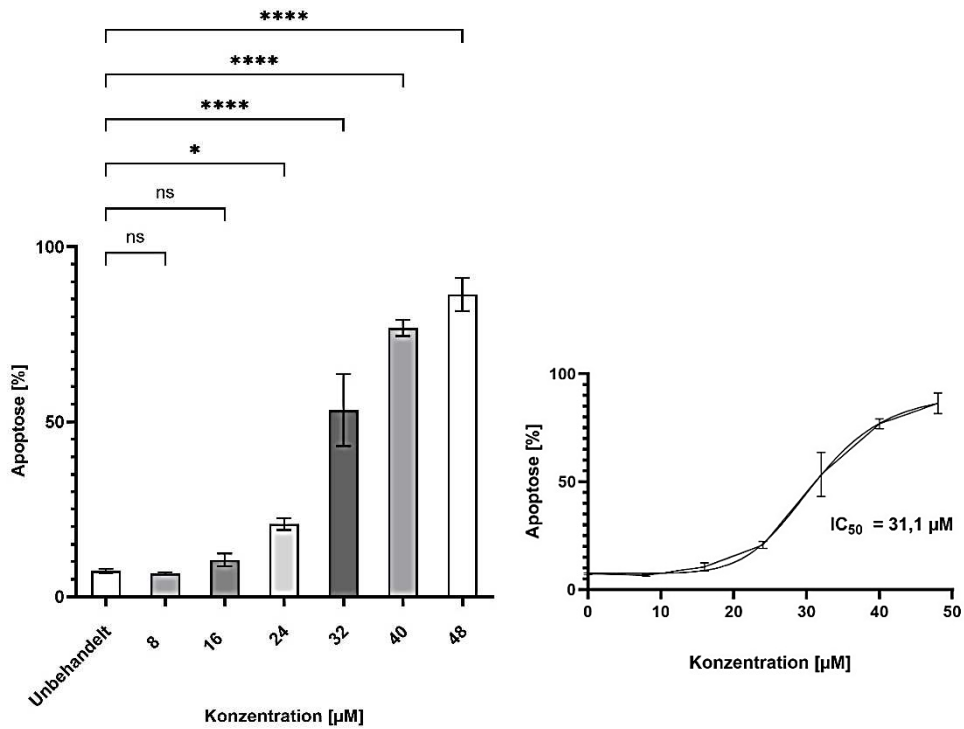
Tabelle 3: Ermittelte IC_{50} -Konzentrationen für THC in den untersuchten Sarkomzelllinien

3.2.2 Konzentrationsabhängige Apoptose-Induktion durch CBD in Sarkom-Zelllinien

A: RD



B: SW982



C: SW872

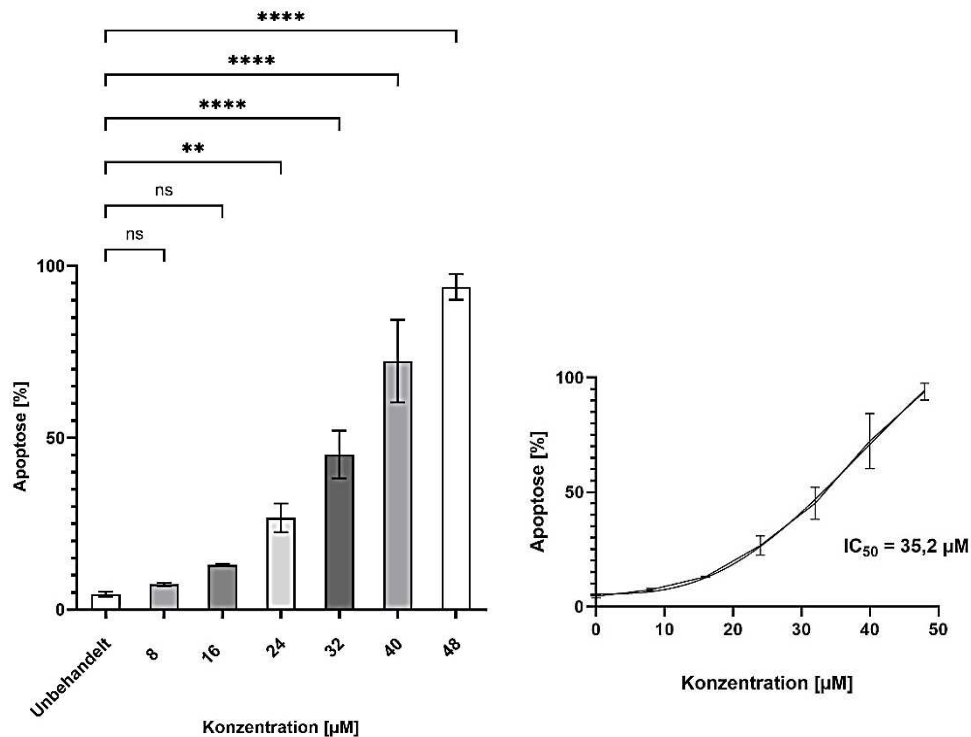


Abbildung 3: Apoptose-Induktion durch CBD: A: Rhabdomyosarkom-Zelllinie B: Synovialsarkom-Zelllinie. C: Liposarkom-Zelllinie. Nach 48-stündiger Behandlung mit CBD wurde der Anteil apoptotischer Zellen mittels Annexin V / PI durchflusszytometrisch bestimmt.

Links: Säulendiagramm mit Darstellung der relativen Apoptoserate (y-Achse) in Abhängigkeit von der CBD-Konzentration (x-Achse). Rechts: nichtlineare Regressionsanalyse mit berechnetem IC₅₀-Wert von CBD für die jeweilige Zelllinie. Die Signifikanzniveaus wurden wie folgt klassifiziert: ns = nicht signifikant ($p > 0,05$), * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, **** $p < 0,001$.

Zelllinie	IC ₅₀ CBD [µM]
Rhabdomyosarkom (RD)	21,9
Synovialsarkom (SW982)	31,1
Liposarkom (SW872)	35,2

Tabelle 4: Ermittelte IC₅₀-Konzentrationen für CBD in den untersuchten Sarkomzelllinien

Abbildung 2 und Abbildung 3 illustrieren die konzentrationsabhängige Induktion der Apoptose durch Cannabinoide. In Abbildung 2 ist dabei die Apoptose-Induktion durch THC und in Abbildung 3 durch CBD visualisiert.

Die Ergebnisse verdeutlichen, dass sowohl THC, als auch CBD in allen untersuchten Zelllinien eine signifikante, dosisabhängige proapoptotische Wirkung aufweist.

Im Anschluss wurden die jeweiligen IC_{50} -Werte mithilfe einer nichtlinearen Regressionsanalyse berechnet, welche in Tabelle 3 (THC) und Tabelle 4 (CBD) aufgeführt werden. Vergleichend bestätigen die Berechnungen die Beobachtung, dass CBD potenter in der Apoptose-Induktion erscheint als THC.

3.3 Cannabinoide zeigen eine antiproliferative Wirkung in Sarkomzellen

Zur Etablierung einer zuverlässigen Versuchsmethodik wurde zunächst in einer Voranalyse die optimale Aussaatdichte ermittelt. Die Zielsetzung war die Ermittlung der Zellzahl, die ausgesät werden muss, um nach 5 Tagen kein überkonfluierendes Wachstum zu erhalten, damit die Proliferationsfähigkeit erhalten bleibt. Tabelle 5 zeigt die in den Vorversuchen ermittelte Zellzahl, bei der 120 Stunden nach Versuchsbeginn lichtmikroskopisch kein überkonfluierendes Wachstum nachgewiesen werden konnte. Sie dient als Grundlage für die folgenden Versuchsreihen zum Proliferationsverhalten der Sarkomzelllinien.

Zelllinie	RD	SW982	SW872
Zellzahl	3000	5000	4000

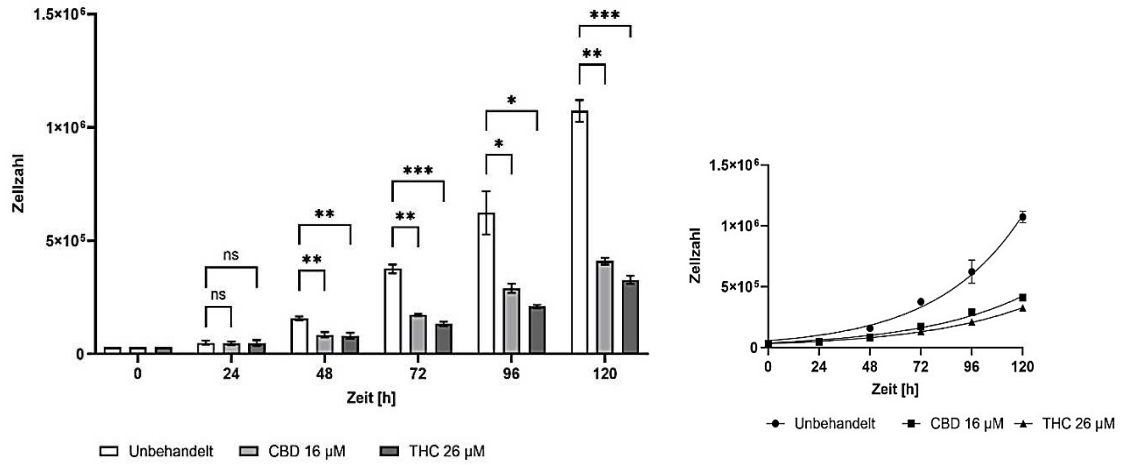
Tabelle 5: Verwendete Zellzahl pro Versuchsansatz im Rahmen des Proliferationsassays

Um das antiproliferative Potential der verwendeten Cannabinoide nachzuweisen, wurden die Zelllinien mit unterschiedlichen Konzentrationen an CBD bzw. THC behandelt, welche unterhalb des IC₅₀-Wertes der jeweiligen Zelllinien lagen.

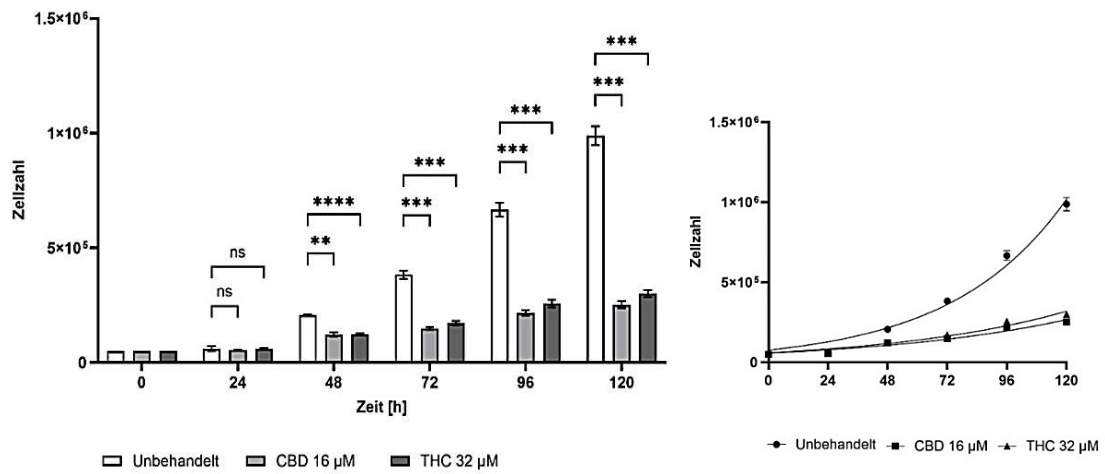
Dargestellt werden der Mittelwert der Triplikate, sowie der jeweilige Standardfehler.

3.3.1 Cannabinoide weisen eine antiproliferative Wirkung in Weichteilsarkom-Zelllinien auf

A: RD



B: SW982



C: SW872

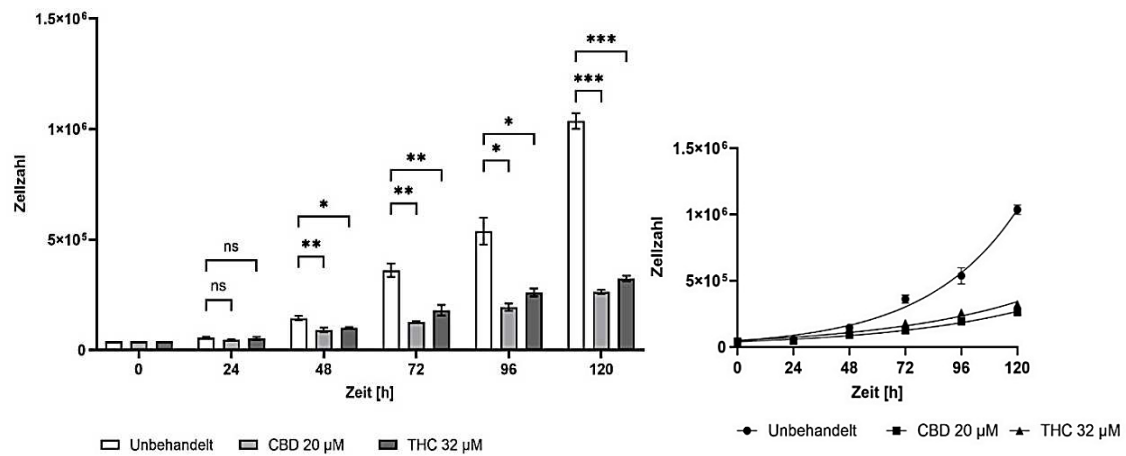


Abbildung 4: THC und CBD inhibieren die Proliferation von Sarkomzellen.

A: Rhabdomyosarkomzellen B: Synovialsarkomzellen C: Liposarkomzellen.

Links: Säulendiagramm mit Darstellung der Zellzahl (y-Achse) über 120 Stunden (x-Achse) unter Cannabinoidtherapie. Rechts: Wachstumskurven von Rhabdomyosarkomzellen unter Cannabinoidtherapie über 120 Stunden.

Die Signifikanzniveaus wurden wie folgt klassifiziert: ns = nicht signifikant ($p > 0,05$), * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

In allen untersuchten Zellmodellen konnte eine signifikante Reduktion der Proliferation unter einer Cannabinoidbehandlung nachgewiesen werden. Dabei kann eine signifikante, antiproliferative Wirkung sowohl für THC, als auch für CBD ab 48 Stunden nach Behandlungsstart beobachtet werden.

3.4 Cannabinoide hemmen die Migration von Sarkomzelllinien

Die Auswirkung einer Cannabinoidtherapie mit CBD und THC auf das Migrationsverhalten wurde mithilfe eines Wundheilungsassays untersucht (siehe 2.2.6).

Zunächst wurde in einem ersten Schritt die optimale Zellzahl ermittelt, die pro Well vorgelegt werden musste, damit ein 80 % - 90 % konfluenter Zellrasen entsteht.

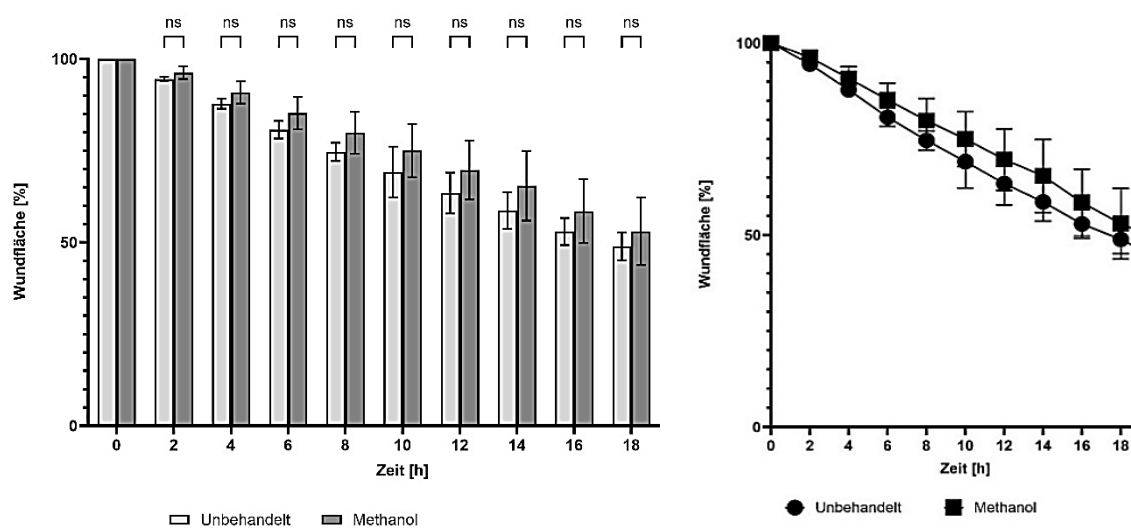
Zelllinie	RD	SW982	SW872
Zellzahl	30000	20000	30000

Tabelle 6: Verwendete Zellanzahl pro Versuchsansatz des Migrationsassays, um einen 80%-90% Konfluenz zu erhalten

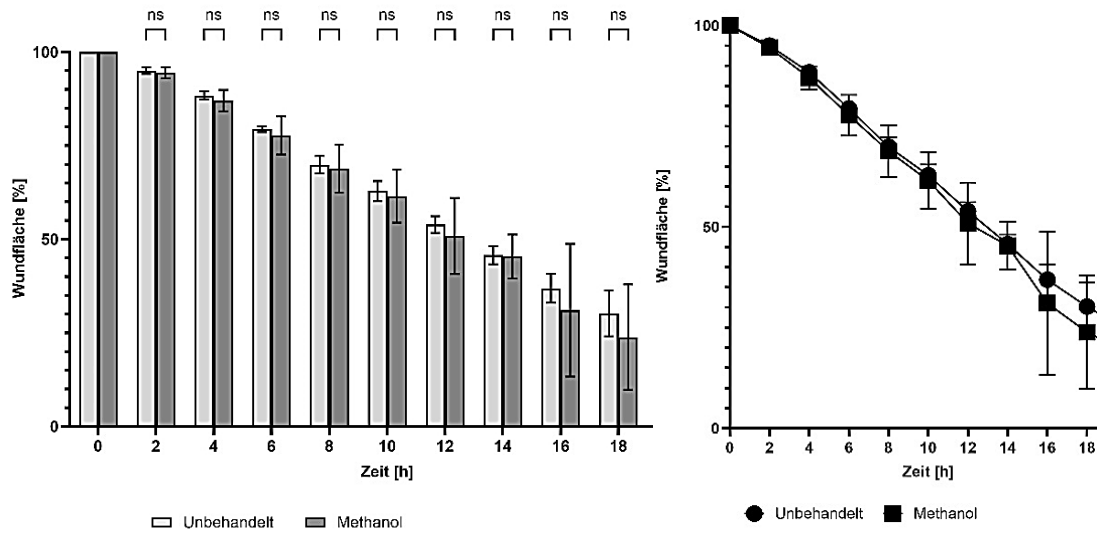
Basierend auf der ermittelten Zellzahl (Tabelle 6) wurden die Ziellinien mit CBD bzw. THC behandelt. Als Negativkontrolle wurde Methanol als Trägersubstanz von THC und CBD verwendet.

3.4.1 Methanol zeigt keinen migrationshemmenden Effekt auf die untersuchten Sarkom-Zelllinien

A: RD



B: SW982



C: SW872

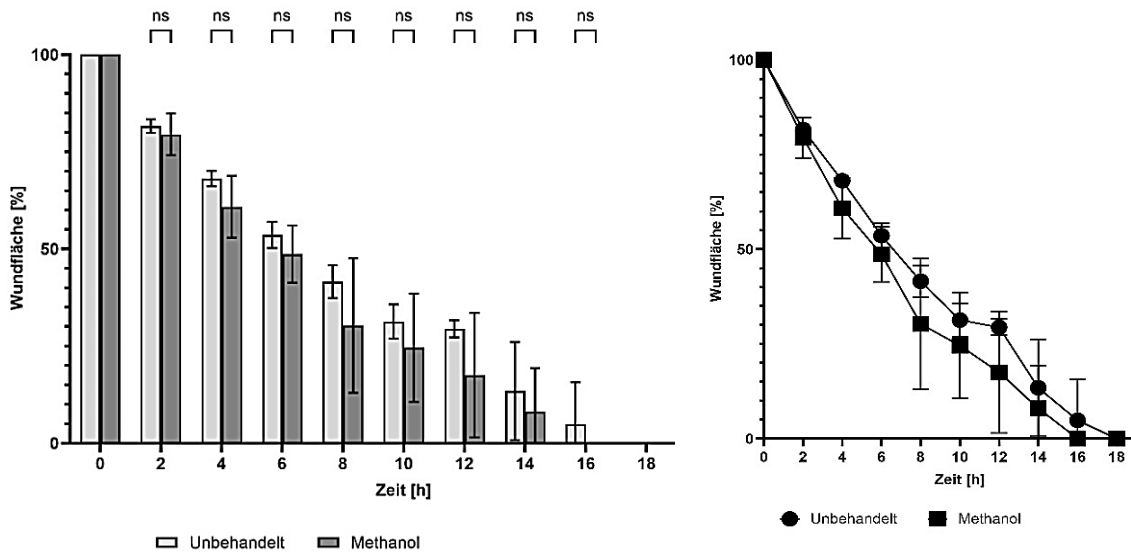


Abbildung 5: Methanol hat keinen signifikanten Effekt auf die Migration von Sarkomzellen.

A: RD. B: SW982. C: SW872. Die Zellen wurden gemäß Tabelle 6 ausgesät und für 24 Stunden inkubiert. Die Dokumentation des Wundheilungsprozesses erfolgte mit dem IncuCyte®.

Links: Säulendiagramm mit Darstellung der Wundheilung über einen Zeitraum von 18 Stunden (x-Achse) basierend auf der prozentualen Wundfläche (y-Achse). Rechts: Liniendiagramm mit Darstellung der zeitabhängigen Veränderung der Wundfläche. Die Signifikanzniveaus wurden wie folgt klassifiziert: ns = nicht signifikant ($p > 0,05$), * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, **** $p < 0,001$.

Zelllinie	V _{unbehandelt}	V _{Methanol}	Relative Reduktion
RD	20,72	18,95	-8,6 %
SW982	32,48	33,32	+ 2,6 %
SW872	33,12	29,71	-10,3 %

Tabelle 7: Eine Methanol-Behandlung hat keinen signifikanten Einfluss auf die Migration.

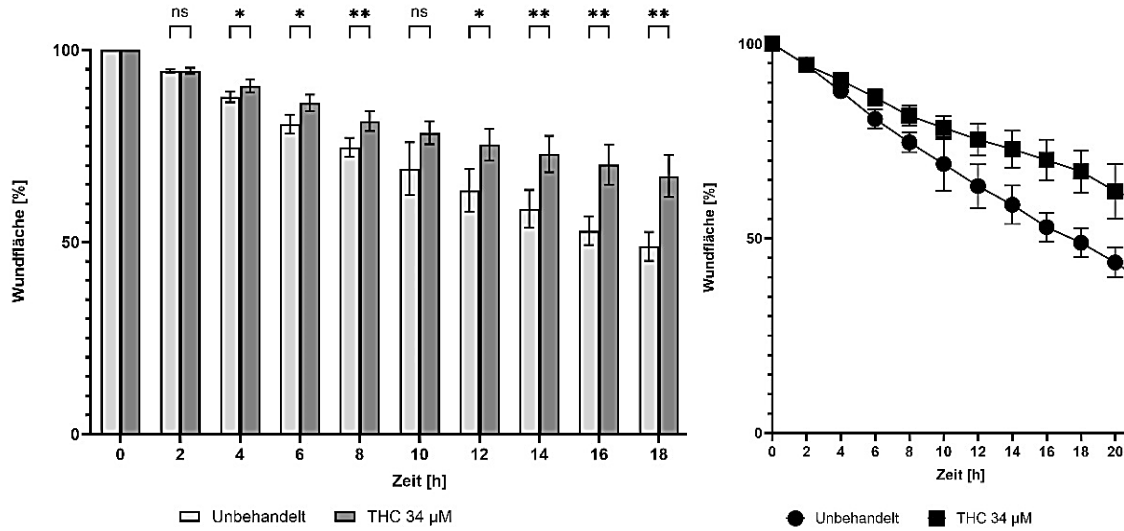
V_{unbehandelt}: Migrationsgeschwindigkeit [$\mu\text{m}/\text{h}$] der unbehandelten Zelllinien. **V_{Methanol}:**

Migrationsgeschwindigkeit [$\mu\text{m}/\text{h}$] der Zelllinien mit Methanol-Behandlung. Relative Reduktion: prozentuale Veränderung der Migrationsgeschwindigkeit unter Methanol-Behandlung im Vergleich zu unbehandelten Zelllinien.

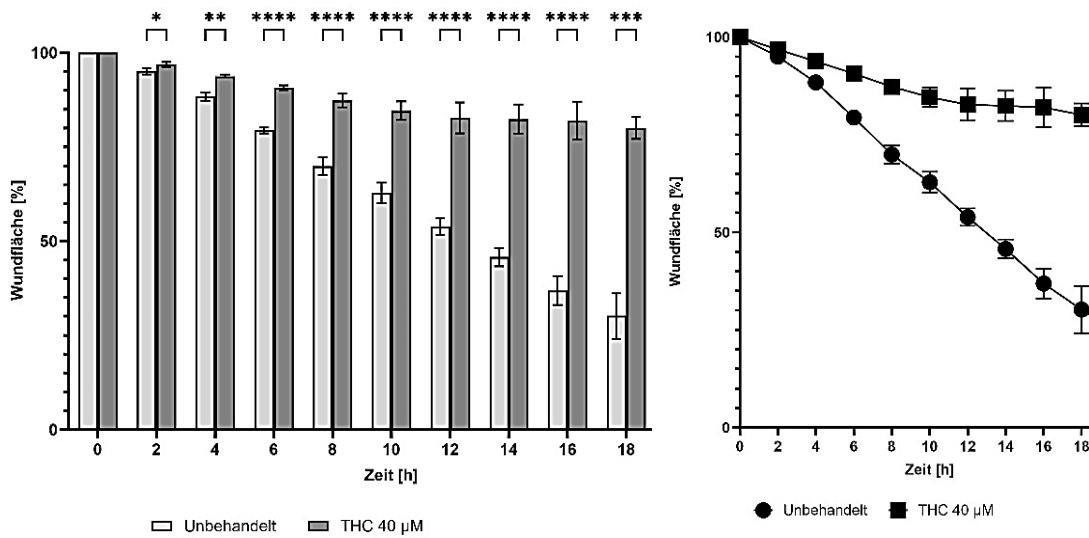
Abbildung 5 veranschaulicht das Migrationsverhalten der untersuchten Sarkom-Zelllinien unter Methanol-Behandlung. Es kann kein signifikant migrationshemmender Effekt von Methanol auf die untersuchten Zellmodelle nachgewiesen werden.

3.4.2 Die Migration von Sarkomzellen wird durch THC signifikant gehemmt

A: RD



B: SW982



C: SW872

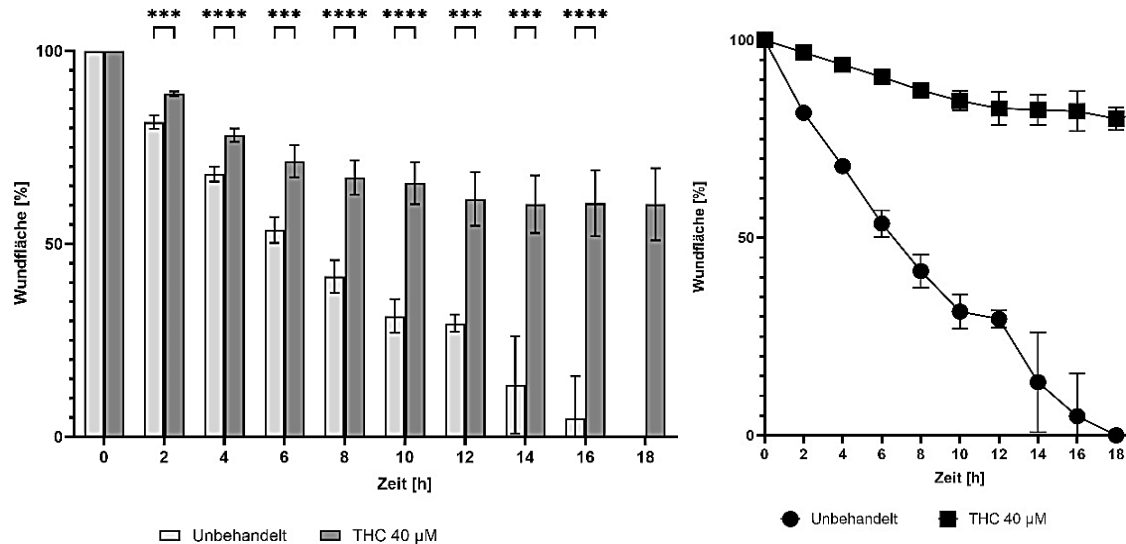


Abbildung 6: THC inhibiert die Migration von Sarkom-Zelllinien. A: RD mit 34 µM THC-Behandlung. B: SW982 mit 40 µM THC-Behandlung. C: SW872 mit 40 µM THC-Behandlung.

Links: Säulendiagramm mit Darstellung der Wundheilung über einen Zeitraum von 18 Stunden (x-Achse) basierend auf der prozentualen Wundfläche (y-Achse). Rechts: Liniendiagramm mit Darstellung der zeitabhängigen Veränderung der Wundfläche. Die Zellen wurden gemäß Tabelle 6 ausgesät und für 24 Stunden inkubiert. Die Dokumentation des Wundheilungsprozesses erfolgte mit dem IncuCyte®. Die Signifikanzniveaus wurden wie folgt klassifiziert: ns = nicht signifikant ($p > 0,05$), * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

Zelllinie	$V_{\text{unbehandelt}}$	V_{THC}	Relative Reduktion
RD	20,72	14,01	-32,4 %
SW982	32,48	7,75	-76,1 %
SW872	33,12	8,08	-75,6 %

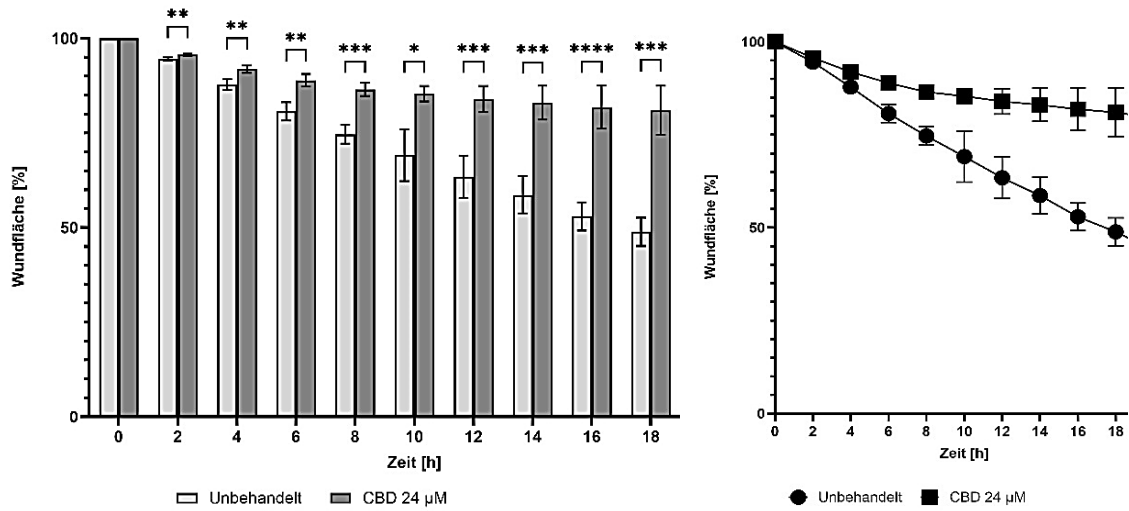
Tabelle 8: Übersicht über die Migrationsgeschwindigkeiten und prozentuale Reduktion der Migration von Sarkom-Zelllinien unter THC Behandlung. $V_{\text{unbehandelt}}$: Migrationsgeschwindigkeit [$\mu\text{m/h}$] der unbehandelten Zelllinien. V_{THC} : Migrationsgeschwindigkeit [$\mu\text{m/h}$] der Zelllinien mit THC Behandlung. Relative Reduktion: prozentuale Veränderung der Migrationsgeschwindigkeit unter THC Behandlung im Vergleich zu unbehandelten Zelllinien.

IncuCyte ®-Analysen über einen Versuchszeitraum von 18 Stunden bestätigen, dass die Zellmigration der Rhabdomyosarkom-, Synovialsarkom- und Liposarkom-Zelllinien durch eine Behandlung mit THC statistisch signifikant gehemmt wird.

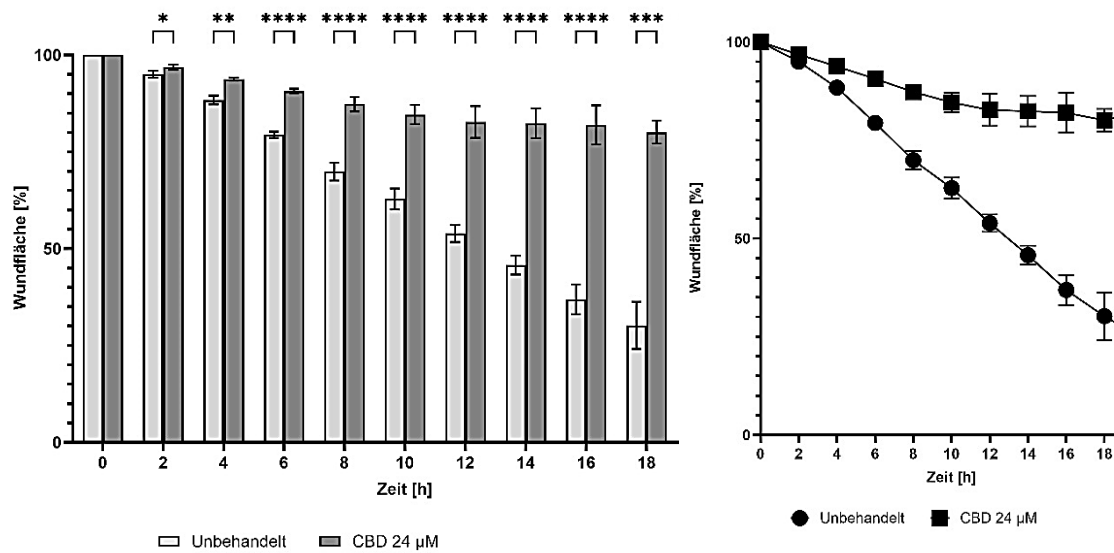
Einer signifikanten Hemmung der Migration kann im Rhabdomyosarkom-Zellmodell nach 4 Stunden, im Synovialsarkom- und Liposarkom-Modell bereits 2 Stunden nach Applikation der Cannabinoid-Behandlung beobachtet werden. Der migrationshemmende Effekt von THC wird zudem im Vergleich der Migrationsgeschwindigkeiten (Tabelle 8) über 18 Stunden deutlich. Hierbei kann ein ausgeprägter migrationshemmender Effekt von THC auf alle untersuchten Sarkomzelllinien nachgewiesen werden. Rhabdomyosarkomzellen werden im Vergleich zu unbehandelten Zellen durch THC um 32,4 % in der Migration gehemmt. Im Synovialsarkom-Modell bewirkte eine THC-Behandlung eine Reduktion der Migrationsgeschwindigkeit um 76,1 %. Die Liposarkom-Zelllinie zeigte unter THC Behandlung eine reduzierte Migrationsgeschwindigkeit um 75,6 %.

3.4.3 CBD hemmt die Migration von Rhabdomyosarkom-, Synovialsarkom- und Liposarkom-Zelllinien signifikant

A: RD



B: SW982



C: SW872

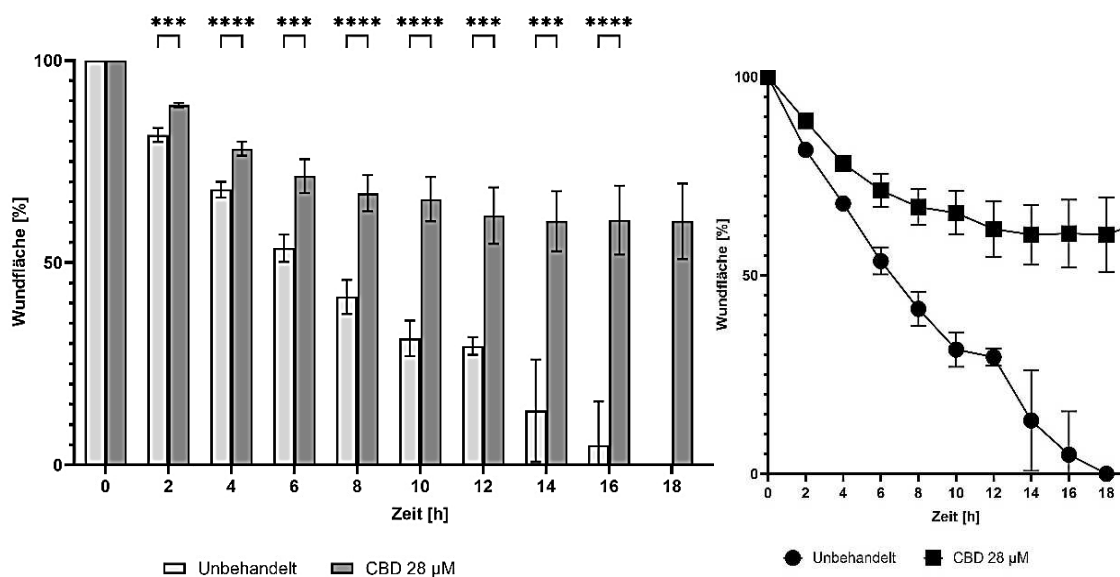


Abbildung 7: Die Migration von Sarkom-Zelllinien ist unter CBD Behandlung signifikant gehemmt. A: RD mit 24 µM CBD Behandlung. B: SW982 mit 24 µM CBD Behandlung. C: SW872 mit 28 µM CBD Behandlung.

Links: Säulendiagramm mit Darstellung der Wundheilung über einen Zeitraum von 18 Stunden (x-Achse) basierend auf der prozentualen Wundfläche (y-Achse). Rechts: Liniendiagramm mit Darstellung der zeitabhängigen Veränderung der Wundfläche. Die Zellen wurden gemäß Tabelle 6 ausgesät und für 24 Stunden inkubiert. Die Dokumentation des Wundheilungsprozesses erfolgte mit dem IncuCyte®. Die Signifikanzniveaus wurden wie folgt klassifiziert: ns = nicht signifikant ($p > 0,05$), * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$,

Zelllinie	$V_{\text{unbehandelt}}$	V_{CBD}	Relative Reduktion
RD	20,72	7,61	-63,3 %
SW982	32,48	16,10	-50,4 %
SW872	33,12	11,87	-64,2 %

Tabelle 9: Übersicht über die Migrationsgeschwindigkeiten und prozentuale Reduktion der Migration von Sarkom-Zelllinien unter CBD-Behandlung. $V_{\text{unbehandelt}}$: Migrationsgeschwindigkeit [$\mu\text{m}/\text{h}$] der unbehandelten Zelllinien. V_{CBD} : Migrationsgeschwindigkeit [$\mu\text{m}/\text{h}$] der Zelllinien mit CBD-Behandlung. Relative Reduktion: prozentuale Veränderung der Migrationsgeschwindigkeit unter Methanol-Behandlung im Vergleich zu unbehandelten Zelllinien

Die in Abbildung 7 präsentierten Daten demonstrieren einen signifikanten migrationshemmenden Effekt von CBD auf die untersuchten Sarkom-Zelllinien. Analog zu THC zeigen sich schon zu frühen Beobachtungszeitpunkten signifikant reduzierte Migrationsgeschwindigkeiten.

Tabelle 9 vergleicht die Migrationsgeschwindigkeiten unter CBD Behandlung. Im Rhabdomyosarkom-Modell konnte durch CBD eine Reduktion der Migration um 63,3 % nachgewiesen werden. CBD hemmte die Migration der Synovialsarkom-Zellen um 50,4 %. Im Liposarkom-Modell führte eine Behandlung mit CBD zu einer reduzierten Migration um 75,6 % im Vergleich zu unbehandelten Zellen.

3.5 Etablierung eines stabilen OGT-Knockdown Zellmodells mittels shorthairpin RNA (shRNA)

Zur Evaluation eines potenziellen Zusammenhangs der antineoplastischen Wirkung von Cannabinoiden mit OGT (O-linked β -N-acetyl Glucosamine Transferase) wurden stabile OGT-Knockdown Zelllinien etabliert.

Dabei wurden die verwendeten Ziellinien RD (Rhabdomyosarkom), SW982 (Synovialsarkom) und SW872 (Liposarkom) mittels RNA-Interferenz (shRNA) genetisch modifiziert, um die Expression von OGT zu inhibieren (vgl. Methodik).

Zur Sicherstellung unspezifischer Effekte und Differenzierung zwischen OGT-spezifischer Wirkung und potenziellen Vektoreinflüssen wurden parallel isogene Empty-Vektor (EV)-Modelle generiert. Diese dienen als Vergleichsbasis zur Validierung eines OGT-Knockdown-spezifischen Effektes. Zur Verifizierung des Knockdowns auf Transkriptions- und Translationsebene wurden eine qRT-PCR bzw. Western Immunoblot Analysen durchgeführt.

Nach erfolgter Verifizierung der Knockdown-Modelle (shOGT) bzw. Kontroll-Modelle (shEV) wurden diese analog den Wildtyp-Zellmodellen (Abbildungen 2-7) hinsichtlich Apoptose, Proliferation und Migration untersucht.

3.5.1 Verifizierung des OGT-Knockdowns mittels qRT-PCR

Zur Verifizierung einer signifikanten Reduktion der OGT-Genexpression wurde eine quantitative RT-PCR durchgeführt. Die Durchführung erfolgte gemäß dem in 2.2.2 detailliert beschriebenen Protokoll.

Dargestellt sind die Mittelwerte der durchgeführten Triplikate sowie die entsprechenden Standardfehler. Zur Normalisierung der Genexpressionsdaten wurde die 18s ribosomale RNA als Referenzgen genutzt.

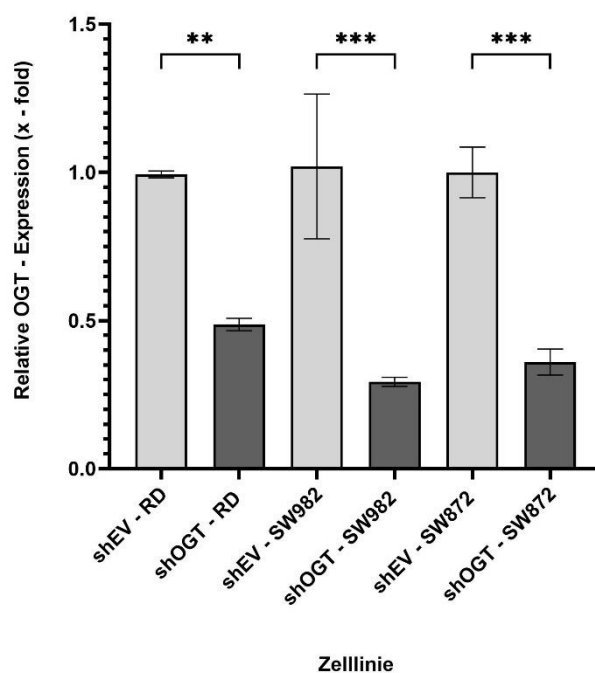


Abbildung 8: Signifikante Reduktion der OGT-Expression nach shRNA-Interferenz.

Die relative Genexpression (y-Achse) von OGT-mRNA der jeweiligen OGT-defizienten Zellmodelle (shOGT) wurde in Bezug zur Empty-Vektor (shEV) Kontrolle visualisiert. Auf der x-Achse ist das jeweilige Zellmodell aufgeführt. RD: Rhabdomyosarkom, SW982: Synovialsarkom. SW872: Liposarkom. Die Signifikanzniveaus wurden wie folgt klassifiziert: ns = nicht signifikant, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

In allen Zellmodellen konnte eine statistisch signifikante Reduktion der OGT-Genexpression durch shRNA-Interferenz erreicht werden.

Im Rhabdomyosarkom (RD) wurde so ein vermindertes Expressionsniveau von 52% im Vergleich zur Empty-Vektor Kontrolle nachgewiesen ($p < 0,01$). Das Synovialsarkom (SW982) zeigte ein reduziertes Expressionsniveau von 70 %

($p < 0,001$). Im Liposarkom-Modell (SW872) konnte ein reduziertes Genexpressionsniveau 64 % im Vergleich zum EV-Kontrollmodell nachgewiesen werden ($p < 0,001$).

3.5.2 Validierung der reduzierten OGT-Expression auf Proteinebene

Zur Verifizierung der bereits auf mRNA-Ebene nachgewiesenen reduzierten OGT-Expression wurde komplementär eine Untersuchung auf Proteinebene durchgeführt. Hierbei wurde in einem Western-Blot die OGT-Proteinexpression untersucht.

Die Western-Blot Analyse erfolgte der in Abschnitt 2.2.3 detaillierten Beschreibung. Als Ladekontrolle wurde α -Tubulin verwendet.

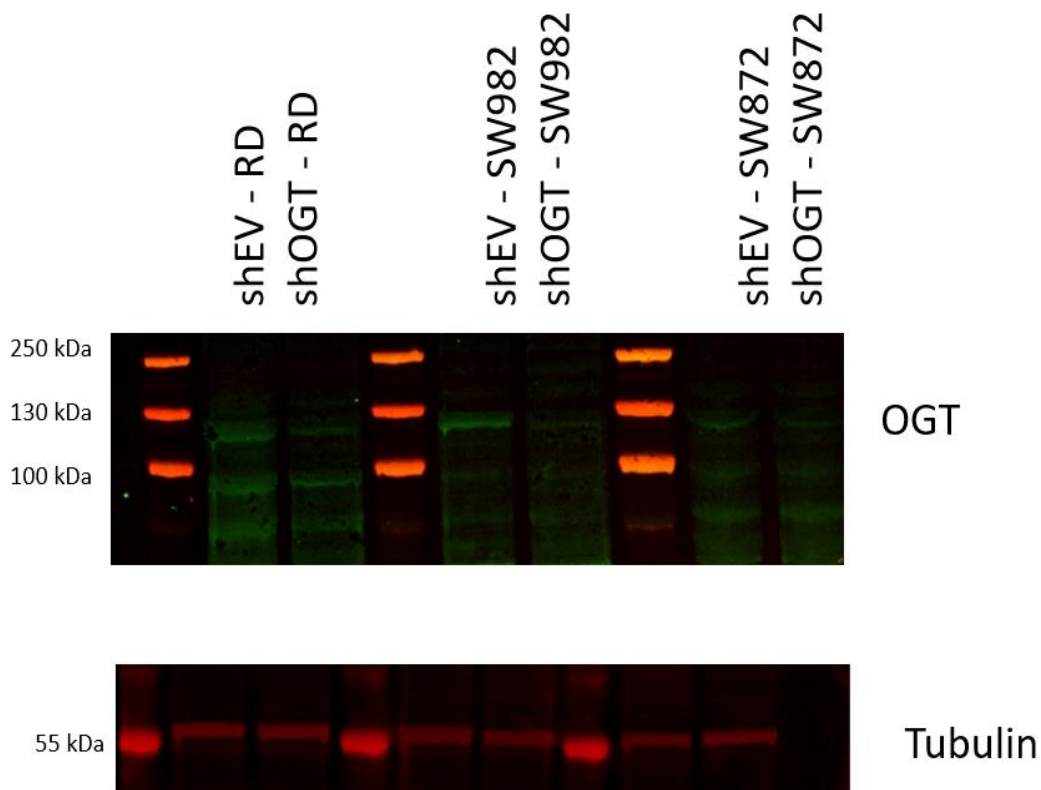


Abbildung 9: Western Blot zur Validierung des OGT-Knockdowns.

Erste Lane: Proteinleiter. **OGT**: O-linked β -N-acetyl Glucosamine Transferase, ca. 110-116 kDa.

shEV-RD: Empty-Vector Kontrollmodell des Rhabdomyosarkom. **shOGT-RD**: OGT-Knockdownmodell des Rhabdomyosarkoms. **shEV-SW982**: Empty-Vector Kontrollmodell des Synovialsarkoms. **shOGT-SW982**: OGT-Knockdownmodell des Synovialsarkoms. **shEV-SW872**: Empty-Vector Kontrollmodell des Liposarkoms. **shOGT-SW872**: OGT-Knockdownmodell des Liposarkoms. **α -Tubulin** als Ladekontrolle.

Abbildung 9 visualisiert das Ergebnis des Western Blots zur Validierung der reduzierten OGT-Proteinexpression im etablierten Zellmodell. OGT wird mit einem Molekulargewicht von ca. 110-116 kDa beschrieben.

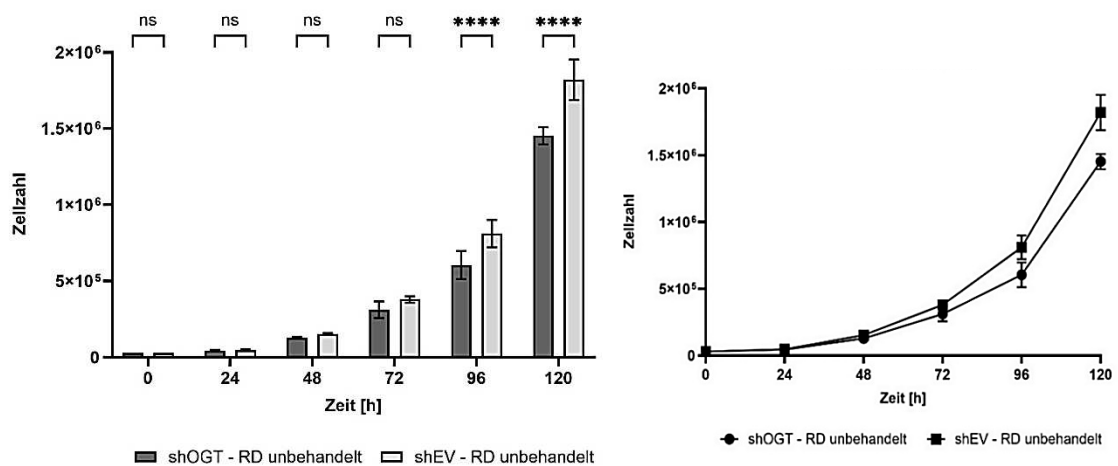
Die Abbildung zeigt eine sichtbare Verringerung der Bandenintensität der shOGT-Zelllinien im Vergleich zu shEV-Kontrollzelllinien. Dies bestätigt eine reduzierte Proteinexpression des OGT-Proteins und damit einen erfolgreichen OGT-Knockdown. Die Ladekontrolle Tubulin zeigt in allen Lanes eine gleichmäßige Proteinbeladung.

3.6 Die Suppression von OGT hemmt die Proliferation in Sarkomzelllinien

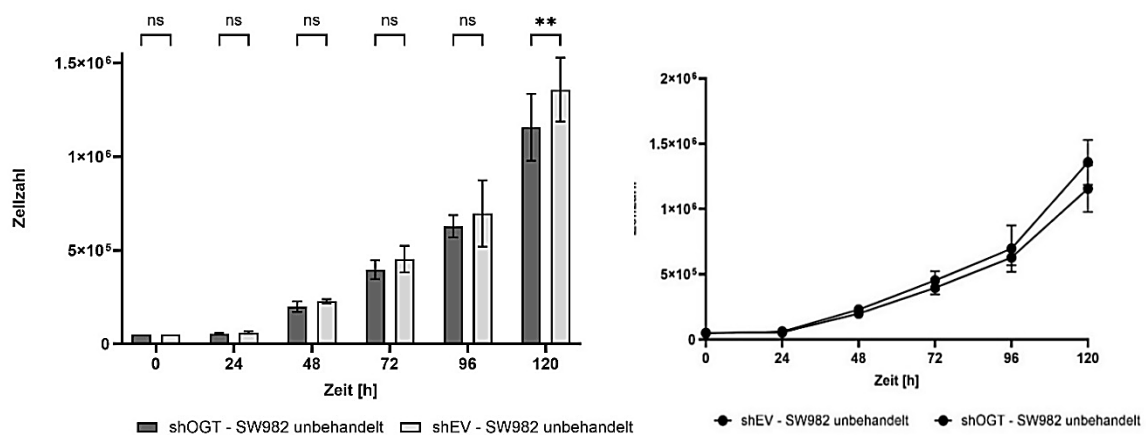
Um die Effekte einer verminderten OGT-Expression auf die Zellproliferation in Sarkomzelllinien zu untersuchen, wurden die in 3.5 etablierten Zellmodelle hinsichtlich des Proliferationsverhaltens in Abhängigkeit von OGT untersucht. Hierzu wurden die Zellmodelle, analog zum Wildtyp-Modell (siehe Ergebnis 3.3) für 120 Stunden täglichen, lichtmikroskopischen Zellzählungen unterzogen.

Dargestellt werden der Mittelwert der Triplikate sowie der jeweilige Standardfehler.

A: shOGT/EV-RD



B: shOGT/EV-SW982



C: shOGT/EV-SW872

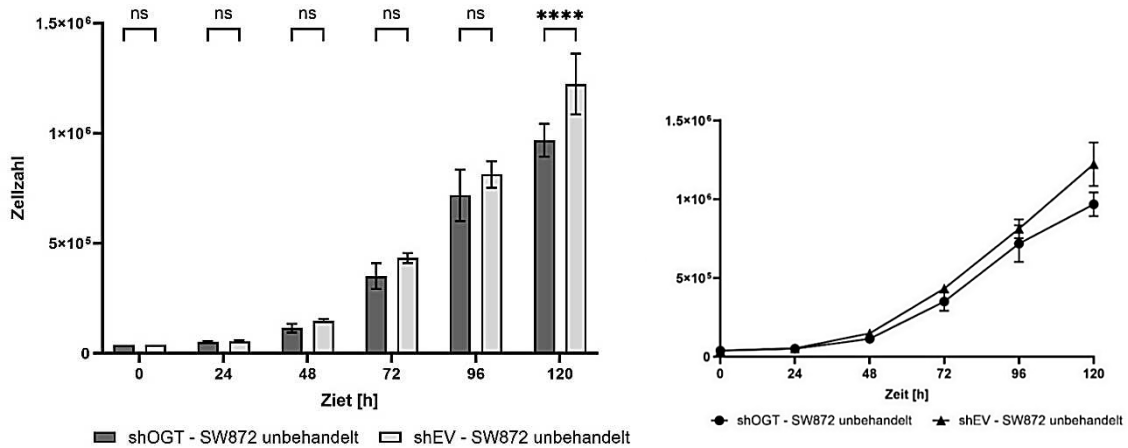


Abbildung 10: Proliferationsverhalten von Sarkom-Zelllinien in Abhängigkeit von OGT.

A: shOGT/EV-RD. B: shOGT/EV-SW982. C: shOGT/EV-SW872: Links: Säulendiagramm der Zellzahl über 120 Stunden. Rechts: Wachstumskurve über 120 Stunden. Die Signifikanzniveaus wurden wie folgt klassifiziert: ns = nicht signifikant ($p > 0,05$), $*p < 0,05$, $**p < 0,01$, $***p < 0,001$, $****p < 0,0001$

Abbildung 10 A zeigt das Proliferationsverhalten der Rhabdomyosarkom-Zelllinie in Abhängigkeit von der OGT-Expression. Hier ist nach 96 Stunden ein statistisch signifikanter Unterschied in der Zellproliferation zu erkennen ($p < 0,0001$).

In Abbildung 10 B wird das Proliferationsverhalten der Synovialsarkom-Zelllinie mit reduzierter OGT-Expression veranschaulicht. Die Proliferation ist in den OGT-defizienten Synovialsarkomzellen nach 120 Stunden signifikant reduziert ($p < 0,01$).

Abbildung 10 C veranschaulicht das Zellwachstum der Liposarkom-Zelllinie mit reduzierter OGT-Expression, welche nach 120 Stunden ein signifikant vermindertes Proliferationsverhalten im Vergleich zum Kontrollmodell zeigen ($p < 0,0001$).

Zusammenfassend zeigen Sarkomzelllinien mit reduzierter OGT-Expression im Vergleich zu den Kontrollmodellen eine reduzierte Proliferation.

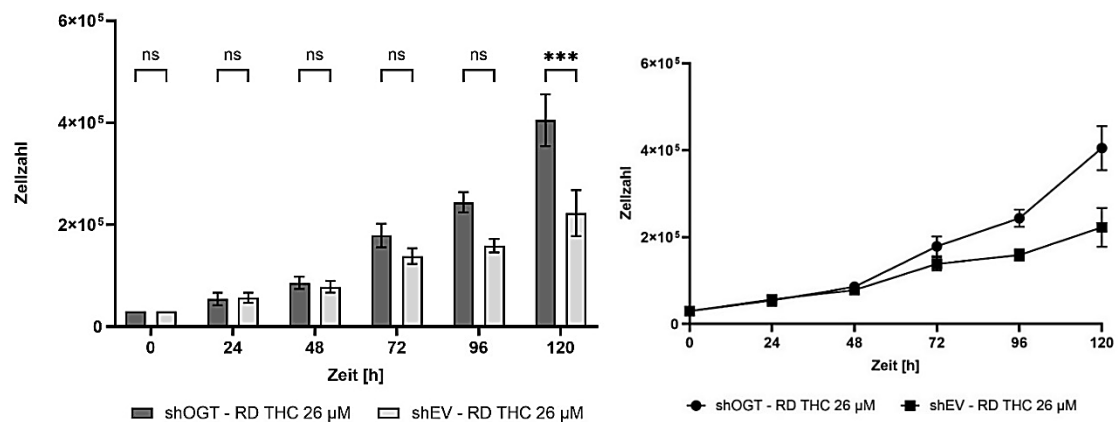
3.7 Die antiproliferative Wirkung von Cannabinoiden ist Weichteilsarkom-Zelllinien OGT-abhängig

Um die Auswirkung einer verminderten OGT-Expression und einer Cannabinoidbehandlung auf die Zellproliferation zu untersuchen, wurden die in 3.5 etablierten Zellmodelle, analog zum Wildtyp-Modell (siehe Ergebnis 3.3) für 120 Stunden mit THC und CBD inkubiert. Es erfolgten tägliche, lichtmikroskopische Zellzählungen.

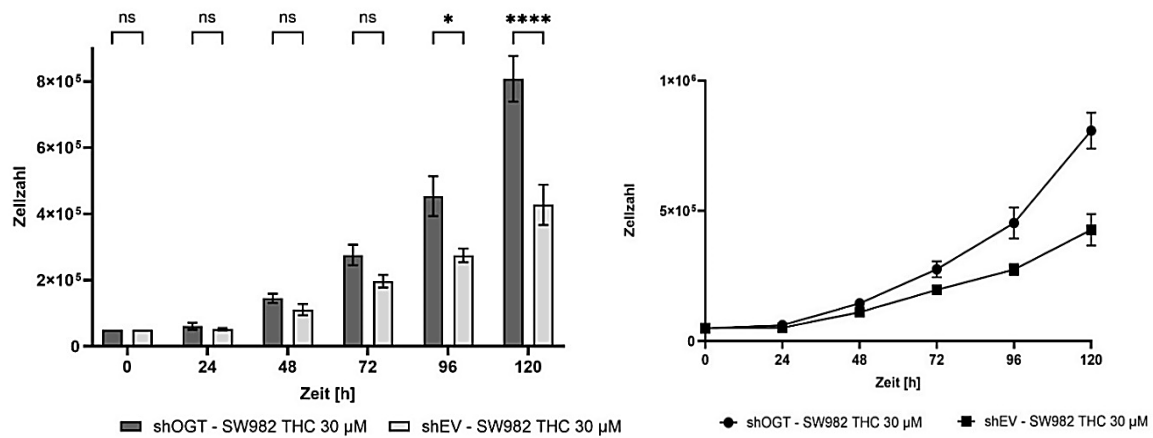
Dargestellt werden der Mittelwert der Triplikate, sowie der jeweilige Standardfehler.

3.7.1 Der antiproliferative Effekt von THC ist in OGT-defizienten Zellen abgeschwächt

A: shOGT/EV-RD



B: shOGT/EV-SW982



C: shOGT/EV-SW872

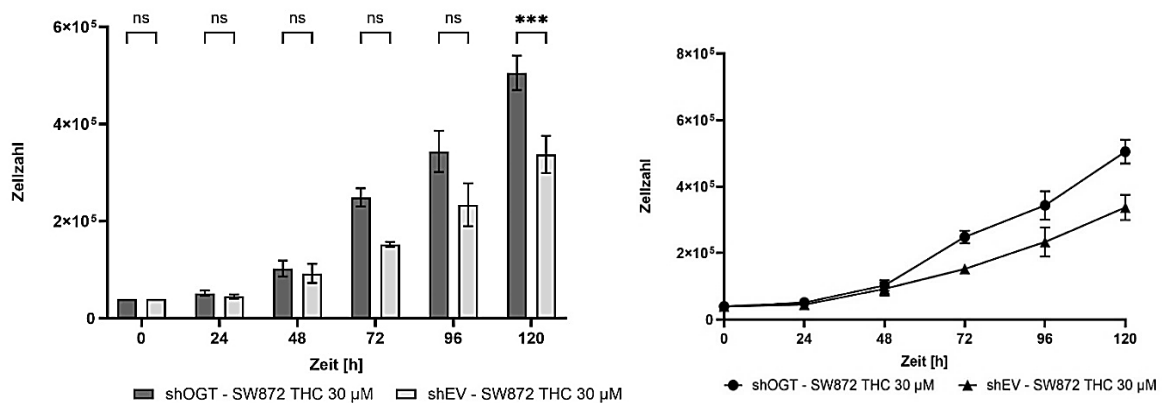


Abbildung 11: Reduzierter antiproliferative Effekt von THC in OGT-defizienten Sarkomzellen.

A: shOGT/EV-RD. B: shOGT/EV-SW982. C: shOGT/EV-SW872.

Links: Säulendiagramm der Zellzahl unter THC Behandlung über 120 Stunden.

Rechts: Wachstumskurve unter THC Behandlung über 120 Stunden.

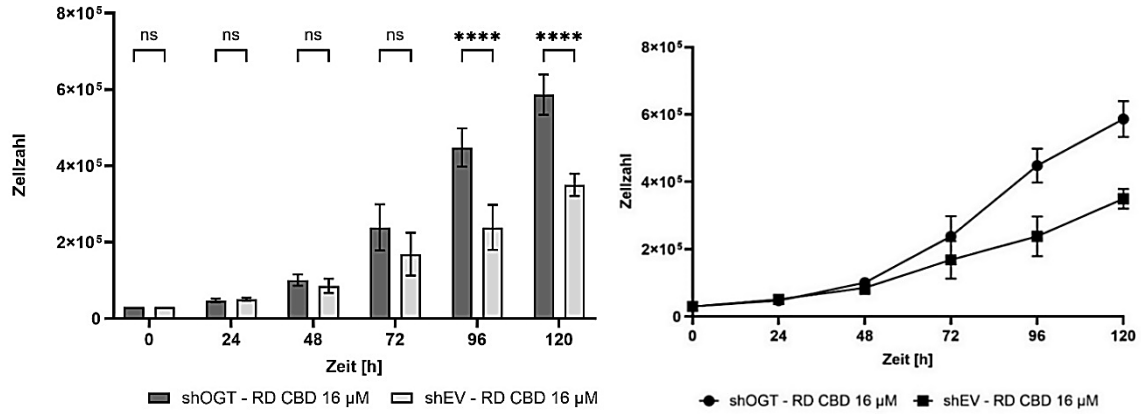
Die Signifikanzniveaus wurden wie folgt klassifiziert: ns = nicht signifikant ($p > 0,05$), * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$

Abbildung 11 veranschaulicht das Proliferationsverhalten von OGT-defizienten Sarkomzellen im Vergleich zu ihrem jeweiligen Kontrollmodell unter einer Behandlung mit THC.

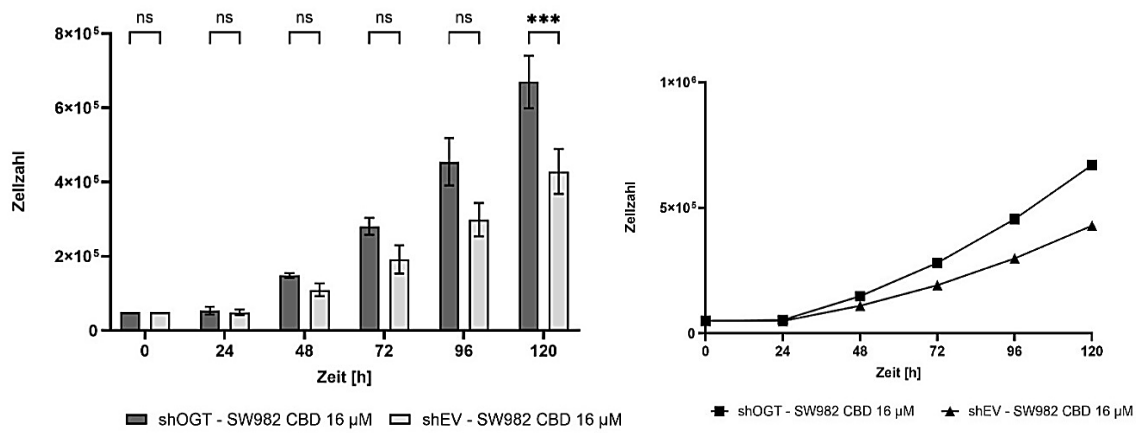
Die Ergebnisse zeigen, dass in allen untersuchten Zelllinien eine Inhibition der OGT-Expression zur Abschwächung des antiproliferativen Effektes von THC führt.

3.7.2 Eine reduzierte OGT-Expression führt zu einer verminderten antiproliferativen Wirkung von CBD

A: shOGT/EV-RD



B: shOGT/EV-SW982



C: shOGT/EV-SW872

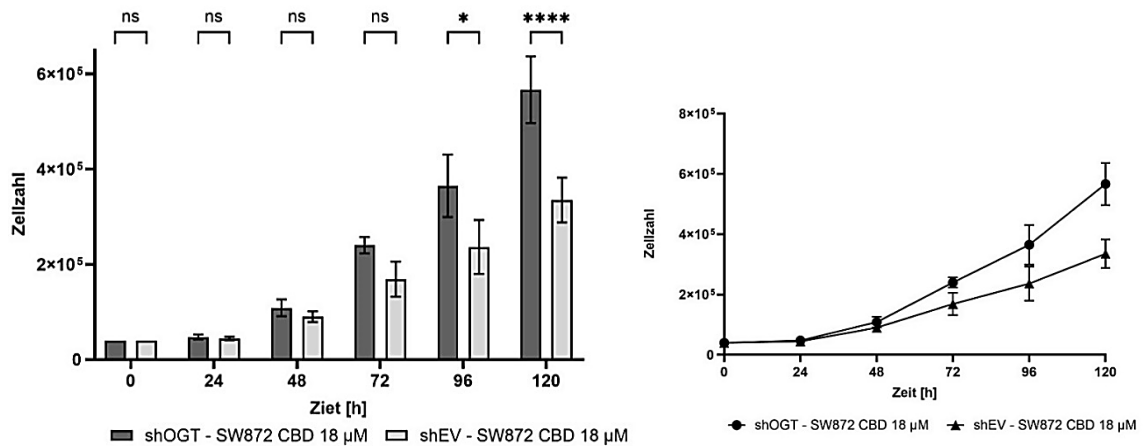


Abbildung 12: Verminderter antiproliferativer Effekt von CBD in OGT-defizienten Sarkomzellen.

A: shOGT/EV-RD. B: shOGT/EV-SW982. C: shOGT/EV-SW872.

Links: Säulendiagramm der Zellzahl unter CBD Behandlung über 120 Stunden.

Rechts: Wachstumskurve unter CBD Behandlung über 120 Stunden.

Die Signifikanzniveaus wurden wie folgt klassifiziert: ns = nicht signifikant ($p > 0,05$), * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$

Abbildung 12 zeigt das Proliferationsverhalten von OGT-defizienten Sarkomzellen unter Behandlung mit CBD. Analog zu einer THC-Behandlung sind OGT-defiziente Sarkomzellen weniger sensitiv gegenüber einer CBD-Behandlung.

Die antiproliferative Wirkung von CBD ist dabei, analog zum Wildtyp, in niedrigeren Dosierungen nachweisbar als für THC.

Zusammenfassend zeigen die vorliegenden Ergebnisse, dass OGT-defiziente Sarkomzellen hinsichtlich ihrer Proliferation eine verminderte Sensitivität gegenüber einer Behandlung mit THC und CBD aufweisen.

3.8 Cannabinoiden haben in Sarkomzellen mit reduzierter OGT-Expression einen verminderten proapoptotischen Effekt

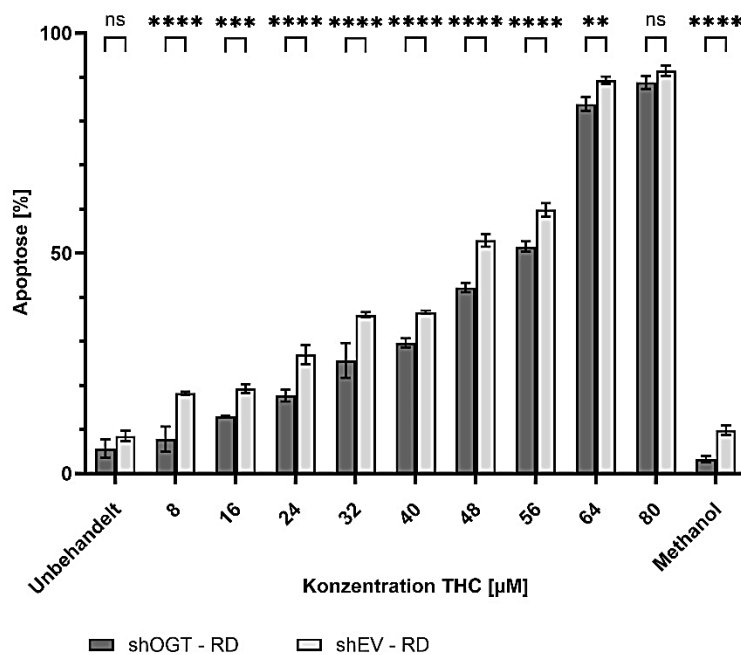
Um den Zusammenhang einer OGT-abhängigen Wirkung der Cannabinoide auf die Apoptose-Induktion zu untersuchen, wurden die etablierten OGT-Knockdown Zellmodelle einer 48-stündigen Behandlung mit THC bzw. CBD unterzogen.

Die Quantifizierung der Apoptose-Induktion erfolgte nach standardisiertem Protokoll, wie in 2.2.4.1 beschrieben. Methanol wurde als Negativkontrolle verwendet.

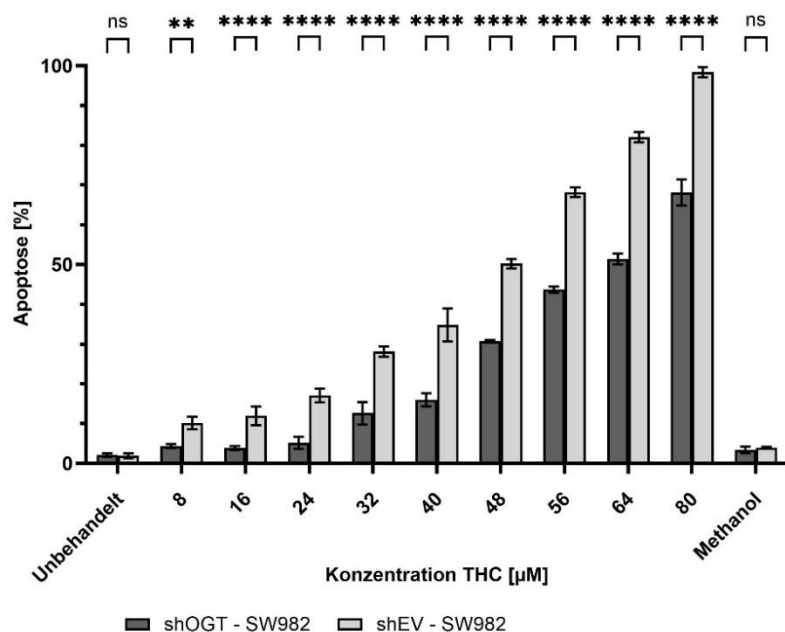
Abgebildet sind die Mittelwerte der durchgeführten Triplikate mit den zugehörigen Standardfehlern. In den folgenden Kapiteln repräsentiert die x-Achse die ansteigenden Konzentrationen des Cannabinoids, die y-Achse zeigt die relative Anzahl der apoptotischen Zellen.

3.8.1 Eine verminderte OGT-Expression reduziert den proapoptotische Effekt von THC

A: shOGT/EV-RD



B: shOGT/EV-SW982



C: shOGT/EV-SW872

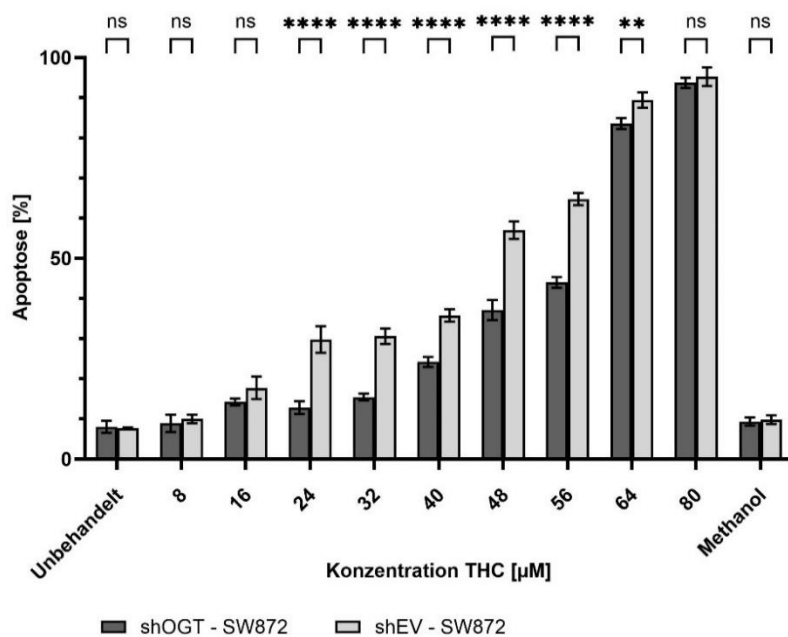


Abbildung 13: THC zeigt eine verminderte Apoptose-Induktion in OGT-defizienten Sarkomzellen.

Säulendiagramm mit Darstellung der relativen Apoptoserate (y-Achse) in Abhängigkeit der THC-Konzentration (x-Achse). **A: shOGT/EV-RD. B: shOGT/EV-SW982. C: shOGT/EV-SW872.** Methanol wurde als Negativkontrolle verwendet.

Die Signifikanzniveaus wurden wie folgt klassifiziert: ns = nicht signifikant ($p > 0,05$), * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$

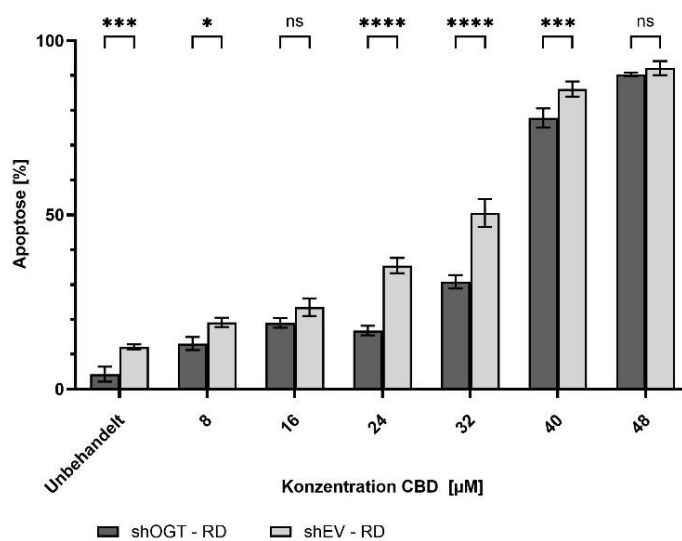
In Abbildung 13 wird das Apoptoseverhalten von OGT-defizienten Sarkomzellen bzw. ihres Kontrollmodelles unter THC Behandlung graphisch dargestellt.

Hierbei konnte in allen Zellmodellen ein statistisch signifikanter Unterschied im Ausmaß der Apoptose-Induktion durch THC zwischen der OGT-defizienten Zellen zu den Kontrollzellen nachgewiesen werden.

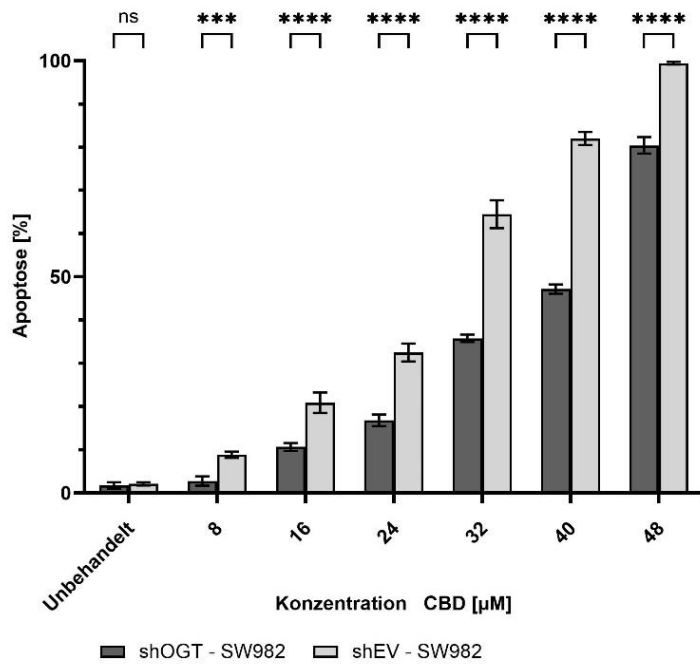
Bei den unbehandelten Zellpopulationen wurde kein statistisch signifikanter Unterschied in der Apoptose-Induktion zwischen OGT-defizienten Zellen und Kontrollzellen beobachtet. Die basale Apoptoserate war in beiden Zellpopulationen vergleichbar.

3.8.2 CBD zeigt in OGT-defizienten Sarkomzellen eine verminderte Sensitivität in der Apoptose-Induktion

A: shOGT/EV-RD



B: shOGT/EV-SW982



C: shOGT/EV-SW872

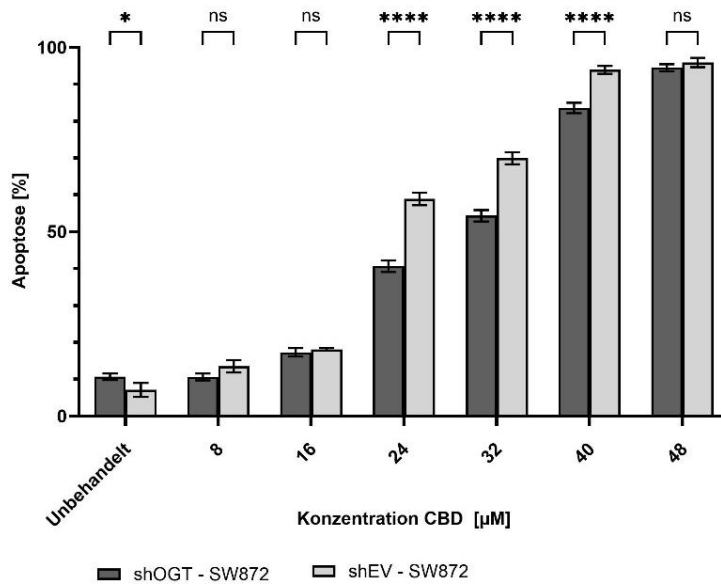


Abbildung 14: Verminderte Apoptose-Induktion durch CBD in OGT-defizienten Sarkomzellen.

Säulendiagramm mit Darstellung der relativen Apoptoserate (y-Achse) in Abhängigkeit der CBD-Konzentration (x-Achse). **A: shOGT/EV-RD. B: shOGT/EV-SW982. C: shOGT/EV-SW872.**

Die Signifikanzniveaus wurden wie folgt klassifiziert: ns = nicht signifikant ($p > 0,05$), * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

Abbildung 14 zeigt das Apoptoseverhalten von OGT-defizienten Sarkomzellen bzw. ihres Kontrollmodelles unter CBD Behandlung.

Es konnte in allen Zellmodellen mit reduzierter OGT-Expression ein verminderter proapoptotischer Effekt durch CBD nachgewiesen werden. Im Rhabdomyosarkom- und Liposarkom-Modell konnte der signifikante Effekt in höheren Konzentrationen nachgewiesen werden. In diesen beiden Zellmodellen gab es auch signifikante Unterschiede in der basalen Apoptoserate.

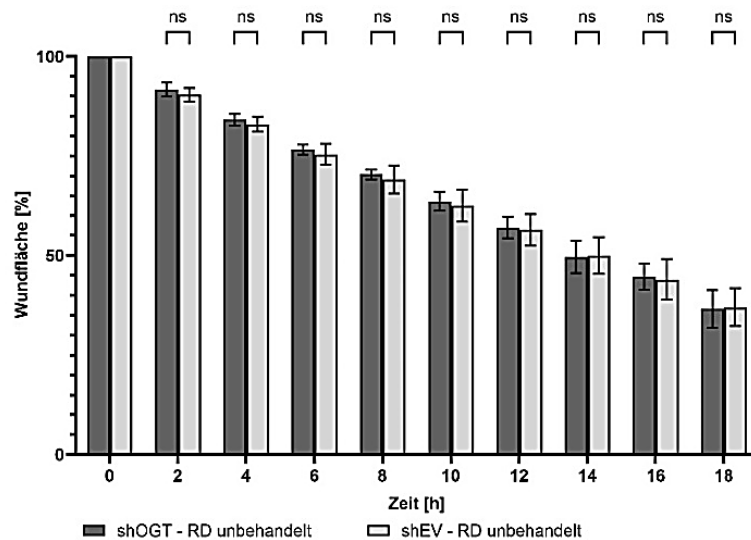
Das OGT-defiziente Synovialsarkom-Modell zeigte einen verminderten proapoptotischen Effekt von CBD schon ab Konzentrationen von 8 μM CBD.

3.9 OGT beeinflusst die Migration von Sarkomzellen

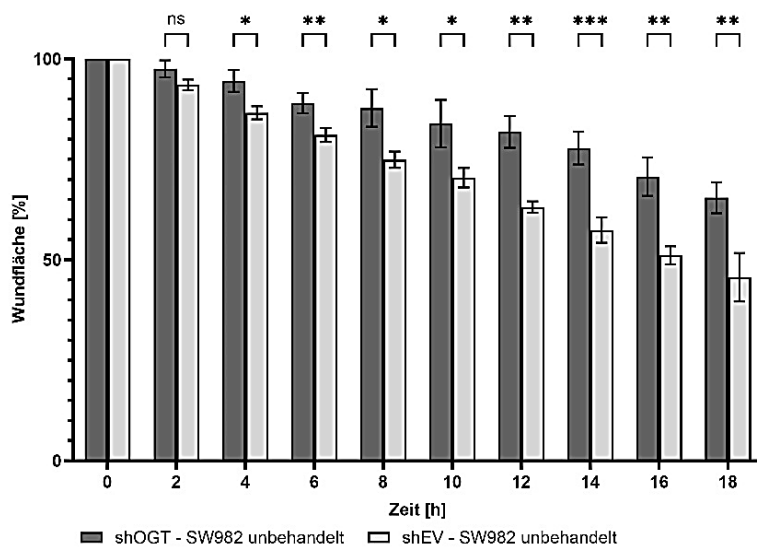
Um einen potenziellen Einfluss von OGT auf das Migrationsverhalten von Sarkomzellen zu untersuchen, wurden analog zu den OGT-Wildtyp Sarkomzellen (Ergebnisse 3.4) ein Wundheilungsassay durchgeführt. Dabei erfolgte die Durchführung gemäß dem in 2.2.6 beschriebenen Protokoll.

Dargestellt sind die Mittelwerte mit zugehörigen Standardabweichungen. Auf der x-Achse ist die Zeit, auf der y-Achse der prozentuale Wundverschluss zu sehen.

A: shOGT/EV-RD



B: shOGT/EV-SW982



C: shOGT/EV-SW872

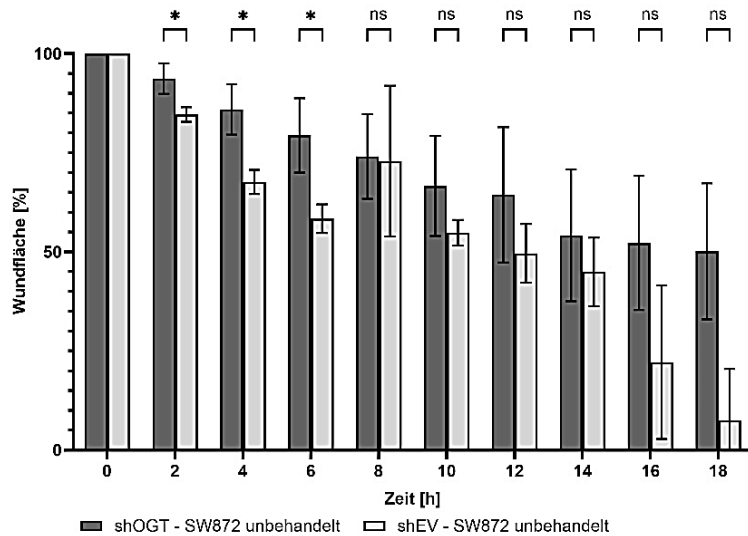


Abbildung 15: Migrationsverhalten von Sarkomzellen mit reduzierter OGT-Expression. Säulendiagramm mit Darstellung der Wundheilung über einen Zeitraum von 18 Stunden (x-Achse) basierend auf der prozentualen Wundfläche (y-Achse). **A: shOGT/EV-RD. B: shOGT/EV-SW982. C: shOGT/EV-SW872.**

Die Signifikanzniveaus wurden wie folgt klassifiziert: ns = nicht signifikant ($p > 0,05$), * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Zelllinie	RD		SW982		SW872	
	shOGT	shEV	shOGT	shEV	shOGT	shEV
Migrations- geschwindigkeit [$\mu\text{m}/\text{h}$]	21,75	20,32	13,61	22,17	17,38	21,58

Tabelle 10: Übersicht der Migrationsgeschwindigkeiten in Abhängigkeit von OGT.

Im Rhabdomyosarkom-Modell sind keine signifikanten Unterschiede im Wundverschluss über den gesamten Zeitraum zu beobachten (Abbildung 15 A). Dies wird zudem durch den Vergleich der Migrationsgeschwindigkeiten verdeutlicht (siehe Tabelle 10).

Im Synovialsarkom-Zellmodell zeigen sich schon nach 4 Stunden signifikante Unterschiede im Wundverschluss. OGT-defiziente Synovialsarkomzellen weisen einen deutlich verzögerten Wundverschluss im Vergleich zu den Kontrollzelllinien auf (Abbildung 15 B). Dieser Unterschied wird auch in der berechneten Migrationsgeschwindigkeit deutlich: Synovialsarkomzellen mit reduzierter OGT-Expression weisen eine Migrationsgeschwindigkeit von ca. 13,61 $\mu\text{m}/\text{h}$ auf, das Kontroll-Modell ungefähr 22,17 $\mu\text{m}/\text{h}$ (siehe Tabelle 10).

Das OGT-defiziente Liposarkom-Modell weist in frühen Beobachtungszeitpunkten eine signifikant verzögerte Migrationsgeschwindigkeit auf. Zu späteren Zeitpunkten lässt sich der Trend zwar weiter beobachten, ist jedoch statistisch nicht mehr signifikant (Abbildung 15 C). Diese Beobachtung wird auch durch Berechnung der Migrationsgeschwindigkeit deutlich: shOGT-SW872: 17,39 $\mu\text{m}/\text{h}$, shEV-SW872: 21,58 $\mu\text{m}/\text{h}$ (Tabelle 10).

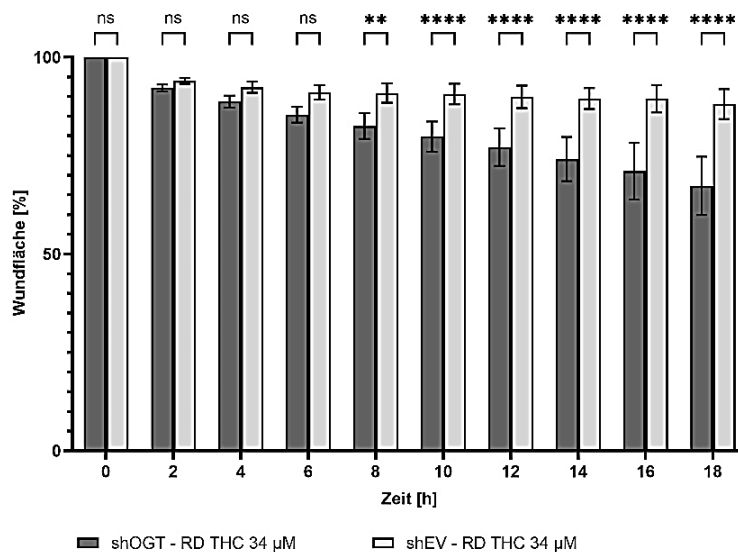
3.10 OGT-defiziente Sarkomzellen zeigen ein zellspezifisches Migrationsverhalten unter einer Cannabinoidtherapie

Zur Analyse eines potentiellen OGT-abhängigen Effektes der Cannabinoidwirkung auf das Migrationsverhalten von Sarkomzellen wurde analog zu 3.8 ein Wundheilungsassay mit den OGT-defizienten Zelllinien und deren jeweiligen Kontrollmodell durchgeführt.

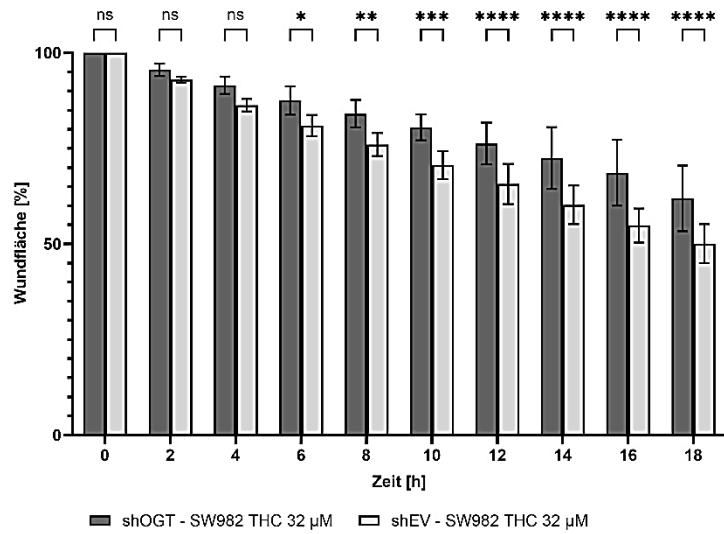
Folgende Abbildungen zeigen den mittleren prozentualen Wundverschluss (y-Achse) in Abhängigkeit von der Zeit in Stunden (x-Achse). Die Fehlerbalken stellen Standardabweichungen dar.

3.10.1 THC zeigt in OGT-defizienten Sarkomzellen divergente Effekt auf die Migration

A: shOGT/EV-RD



B: shOGT/EV-SW982



C: shOGT/EV-SW872

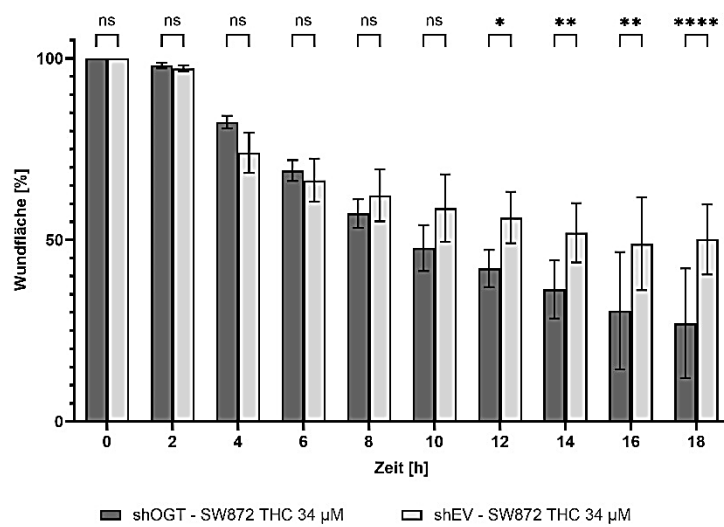


Abbildung 16: Migrationsverhalten von Sarkomzellen unter THC Therapie in Abhängigkeit von OGT:

Säulendiagramm mit Darstellung der Wundheilung über einen Zeitraum von 18 Stunden (x-Achse) basierend auf der prozentualen Wundfläche (y-Achse). **A: shOGT/EV-RD** mit 34 µM THC-Behandlung. **B: shOGT/EV-SW982** mit 32 µM THC-Behandlung. **shOGT/EV-SW872** 34 µM THC-Behandlung. Die Signifikanzniveaus sind wie folgt gekennzeichnet: ns = nicht signifikant ($p > 0,05$), * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

Zelllinie	RD		SW982		SW872	
	shOGT	shEV	shOGT	shEV	shOGT	shEV
Migrations- geschwindigkeit [$\mu\text{m/h}$]	8,59	2,60	16,09	21,47	27,48	12,82

Tabelle 11: Übersicht über die Migrationsgeschwindigkeiten von Sarkomzellen unter THC Behandlung in Abhängigkeit von OGT

Abbildung 16 demonstriert das Migrationsverhalten von Sarkomzellen mit reduzierter OGT-Expression bzw. ihr Kontroll-Modell unter einer Behandlung mit THC.

Im OGT-defizienten Rhabdomyosarkom-Modell führte eine THC Behandlung zu einer höheren Migrationsgeschwindigkeit im Vergleich zum Kontrollvektor. Dadurch erscheint der migrationshemmende Effekt von THC in dieser Beobachtung abgeschwächt (Abbildung 16A). Diese Unterschiede wird bei Betrachtung Migrationsgeschwindigkeit verdeutlicht: OGT-defiziente Rhabdomyosarkomzellen zeigen eine Migrationsgeschwindigkeit von 8,59 $\mu\text{m/h}$, ihr Kontrollmodell 2,60 $\mu\text{m/h}$ (Tabelle 11).

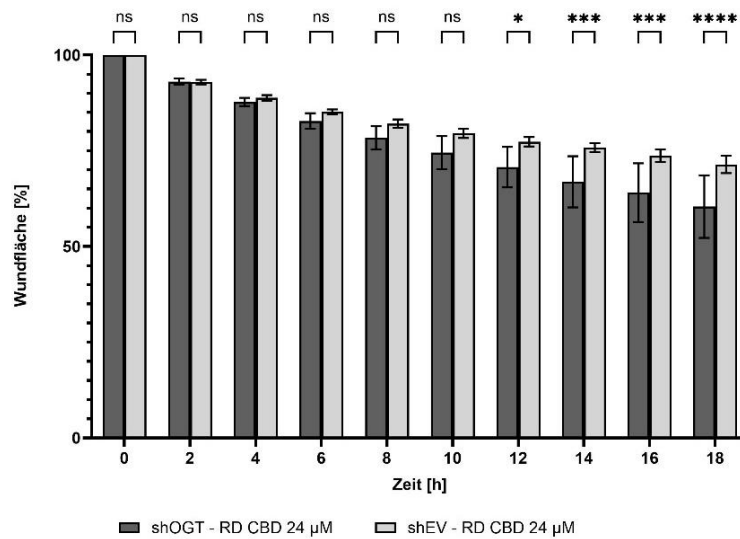
In Abbildung 16B ist das Migrationsverhalten von OGT-defizienten Synovialsarkomzellen veranschaulicht. Im Gegensatz zum OGT-defizienten Rhabdomyosarkom-Modell konnte eine divergente Beobachtung hinsichtlich eines OGT-abhängigen Effektes einer THC Behandlung auf die Zellmigration gemacht werden. OGT-defiziente Synovialsarkomzellen wiesen unter THC Behandlung eine reduzierte Migrationsgeschwindigkeit auf als ihr Kontrollmodell. Vergleicht man die Migrationsgeschwindigkeiten in Tabelle 11, so konnte für Synovialsarkomzellen mit reduzierter OGT-Expression eine Geschwindigkeit von 16,09 $\mu\text{m/h}$ unter THC Behandlung berechnet werden. Ihr Kontrollmodell wies eine Migrationsgeschwindigkeit von 21,47 $\mu\text{m/h}$ auf.

Analog zu den OGT-defizienten Rhabdomyosarkomzellen (Abbildung 16 A) konnte für OGT-defiziente Liposarkomzellen unter THC Behandlung ebenfalls eine erhöhte Migrationsgeschwindigkeit im Vergleich zum Kontrollmodell unter

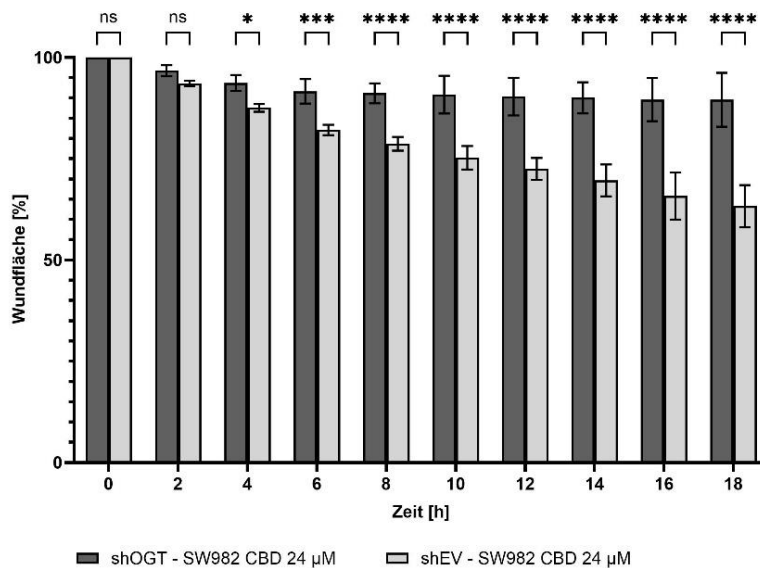
nachgewiesen werden (Abbildung 16C). Dabei zeigten OGT-defiziente Liposarkomzellen eine Migrationsgeschwindigkeit von 27,48 $\mu\text{m}/\text{h}$, ihr Kontrollmodell 12,82 $\mu\text{m}/\text{h}$ (Tabelle 11).

3.10.2 CBD führt zu einem zellspezifischem Migrationsverhalten in Sarkomzellen mit reduzierter OGT-Expression

A: shOGT/EV-RD



B: shOGT/EV-SW982



C: shOGT/EV-SW872

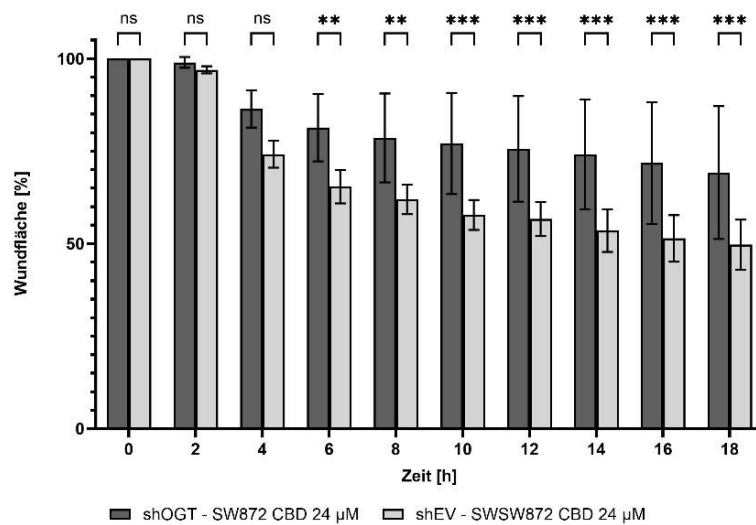


Abbildung 17: Migrationsverhalten von Sarkomzellen unter CBD Therapie in Abhängigkeit von OGT: Säulendiagramm mit Darstellung der Wundheilung über einen Zeitraum von 18 Stunden (x-Achse) basierend auf der prozentualen Wundfläche (y-Achse). **A:** shOGT/EV-RD mit 24 µM CBD-Behandlung. **B:** shOGT/EV-SW982 mit 24 µM CBD-Behandlung. **shOGT/EV-SW872** 24 µM CBD-Behandlung.

Die Signifikanzniveaus sind wie folgt gekennzeichnet: ns = nicht signifikant ($p > 0,05$), * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$

Zelllinie	RD		SW982		SW872	
	shOGT	shEV	shOGT	shEV	shOGT	shEV
Migrationsgeschwindigkeit [µm/h]	17,12	12,93	2,95	7,97	13,29	18,39

Tabelle 12: Übersicht über die Migrationsgeschwindigkeiten von Sarkomzellen unter CBD Behandlung in Abhängigkeit von OGT

Abbildung 17 zeigt das Migrationsverhalten von Sarkomzellen mit reduzierter OGT-Expression bzw. ihrer Kontroll-Modell unter CBD Behandlung.

Analog zu THC konnte auch für CBD im OGT-defizienten Rhabdomyosarkom-Modell ein reduzierter migrationshemmender Effekt nachgewiesen werden (Abbildung 17 A). Im Vergleich der Migrationsgeschwindigkeiten wurde im

Zellmodell mit reduzierter OGT-Expression eine Migrationsgeschwindigkeit unter CBD Behandlung von 17,12 $\mu\text{m}/\text{h}$ berechnet, im Kontrollmodell von 12,93 $\mu\text{m}/\text{h}$.

Für OGT-defiziente Synovialsarkom- und Liposarkomzellen zeigte sich kein Einfluss von CBD auf die Migrationshemmung. Die Kontrollmodelle wiesen unter CBD Behandlung sogar eine schnellere Migrationsgeschwindigkeit auf (Abbildung 17B und C, sowie Vergleich Tabelle 12).

4 Diskussion

Weichteilsarkome sind seltene maligne Tumore mesenchymalen Ursprungs, die etwa 1% aller bösartigen Neubildungen in Deutschland ausmachen. Die Heterogenität dieser Malignome zeigt sich in ~ 80 histologisch definierten Subtypen [1] [2]. Die frühzeitige Erkennung von Weichteilsarkomen bleibt eine Herausforderung. Aufgrund ihrer Seltenheit ist eine spezialisierte Versorgung in Sarkomzentren notwendig [10].

Trotz signifikanter Fortschritte im Bereich der Diagnostik und Therapie bleibt der Wissensstand bezüglich adulter Weichteilsarkome limitiert. Die Komplexität und Heterogenität dieser Tumorentität stellt nach wie vor eine erhebliche Herausforderung für die klinische Praxis dar. Trotz intensiver Bemühungen in der molekularen Charakterisierung und der Entwicklung zielgerichteter Therapien bleibt die Behandlung fortgeschrittener Erkrankungsstadien von Weichteilsarkomen weiterhin eine Herausforderung, weshalb neue Therapieoptionen dringend notwendig sind.

Die Nutzung von Cannabis als Nutz- und Heilpflanze reicht Jahrtausende zurück [26]. Die klinische Anwendung von Cannabinoiden, insbesondere Cannabidiol (CBD) und Δ^9 -Tetrahydrocannabinol (THC), hat in den letzten Jahren in der klinischen Praxis zunehmend an Bedeutung gewonnen. Sie werden im klinischen Alltag vorwiegend in der Behandlung von Chemotherapie-induzierter Übelkeit und Erbrechen, Appetitlosigkeit und Schmerzlinderung eingesetzt [67]. Die Anwendung sollte auf einer sorgfältigen Nutzen-Risiko-Abwägung basieren, da eine Therapie mit Cannabinoiden zu Müdigkeit, Benommenheit und Schwindel führen kann.

Unsere Forschungsgruppe konnte im Jahr 2016 einen signifikanten antineoplastischen Effekt von THC in akuten Leukämien nachweisen. In Patientenproben wurde eine Subpopulation mit spezifischen Expressionsprofil identifiziert, die eine erhöhte Expression der Cannabinoidrezeptoren CB₁ und CB₂ aufwies [73]. Diese Forschungsergebnisse entsprechen der wachsenden Evidenz einer antineoplastischen Wirkung von Cannabinoiden in verschiedenen

Tumorentitäten [70] [71], jedoch konnten auch divergente Ergebnisse in Brustkrebszellen beobachtet werden [74].

Die O-linked β -N-acetyl Glucosamine Transferase (OGT) ist ein evolutionär hochkonserviertes Enzym mit zentraler Bedeutung für eine Vielzahl zellulärer Prozesse. OGT katalysiert die Übertragung eines N-Acetylglucosamin-Rests auf Serin- oder Threoninreste eines Proteins, ein Prozess, der O-GlcNAcylierung genannt wird [75] [76] [77]. Eine Vielzahl von Proteinen wird durch O-GlcNAcylierung modifiziert, darunter Transkriptionsfaktoren, Signalprotein und Proteine des Zytoskeletts. Eine O-GlcNAcylierung von Histonen kann die Chromatinstruktur und damit die Genexpression beeinflussen [82]. So ist es wenig überraschend, dass eine dysregulierte OGT-Aktivität in der Pathogenese vieler Erkrankungen, wie beispielweise neurodegenerativer Erkrankungen, von Bedeutung ist [89]. Zudem konnte eine OGT-Überexpression mit konsekutiver erhöhter O-GlcNAcylierung in verschiedenen Krebsarten wie Brust-, Bronchial- und Kolorektalkarzinomen nachgewiesen werden [90] [91] [92] [93]. In diesem Kontext gibt es zunehmend Forschungsbemühungen, die OGT als therapeutisches Ziel nutzen [103].

Aufgrund der Heterogenität von malignen Neoplasien ist jedoch eine individuelle Analyse notwendig.

Kampa-Schittenhelm et al. haben in ihren Forschungsergebnissen einen signifikanten Zusammenhang zwischen der OGT-Expression und der antileukämischen Wirkung von Δ 9-Tetrahydrocannabinol nachgewiesen. Sie konnten zeigen, dass OGT eine zentrale Rolle in der antileukämischen Wirksamkeit von Δ 9-Tetrahydrocannabinol spielt [94].

Ziel dieser Forschungsarbeit war es, den antineoplastischen Effekt des psychoaktiven Δ 9-Tetrahydrocannabinol (THC) und des nicht-psychoaktiven Cannabidiols (CBD) in Sarkomzellen zu untersuchen.

Folglich sollte durch gezielte Suppression der OGT-Expression ein OGT-abhängiger Effekt der Cannabinoidwirkung nachgewiesen werden.

Diese Dissertation ist in zwei Abschnitte gegliedert.

Im ersten Teil wurde der antineoplastische Effekt von THC und CBD im Rhabdomyosarkom- (RD), Synovialsarkom- (SW982) und Liposarkom- (SW872) Zellmodell in vitro analysiert.

Im zweiten Teil dieser Forschungsarbeit wurde der Zusammenhang des antineoplastischen Effektes von THC und CBD in Abhängigkeit von der OGT-Expression untersucht. Hierzu wurden entsprechend OGT-defiziente Zellmodelle inklusive Kontrollzelllinien etabliert. Diese Zellmodelle wurden systematisch auf das Proliferations-, Apoptose- und Migrationsverhalten untersucht.

Zunächst wurde die Präsenz der Cannabinoid-Rezeptoren CB₁ und CB₂ in allen untersuchten Zelllinien mit einem Western Blot nachgewiesen. Dies steht im Einklang mit Forschungsergebnissen von Oesch et al., welche die Präsenz des CB₁-Rezeptors bei Rhabdomyosarkomen nachweisen konnten [104].

Eine Untersuchung zur Expression der Cannabinoid-Rezeptoren in Synovialsarkom- und Liposarkom Zellmodellen lagen aber bislang nicht vor. Diese Arbeit konnte jedoch erstmals die Präsenz der beiden Cannabinoid-Rezeptoren, CB₁ und CB₂, im Rhabdomyosarkom-, Synovialsarkom- und Liposarkom-Zellmodell nachweisen.

Dieses Ergebnis korreliert mit dem aktuellen Forschungsstand, die einen erhöhte Expression der Cannabinoid Rezeptoren in diversen malignen Tumoren, beschreiben, wie durch Shah et al. zusammengefasst wird [105]. Für die untersuchten Weichteilsarkom-Zellmodelle lagen jedoch bisher keine Daten vor.

Um ein differenziertes Expressionsmuster von Cannabinoid-Rezeptoren in Weichteilsarkomen im Vergleich zu gesundem Muskel, Synovial- und Fettgewebe präzise zu charakterisieren bedarf es weiterer systematischer Untersuchungen.

Der Nachweis einer direkten Proteinexpression der Rezeptoren ist als Voraussetzung einer Cannabinoidwirkung essenziell und war Basis weiterer Untersuchungen.

Vor diesem Hintergrund wurde der antineoplastische Effekt von THC und CBD untersucht.

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen mehrerer unabhängiger Studien in unterschiedlichen Tumorentitäten konnte in dieser Arbeit erstmals eine apoptoseinduzierende Wirkung sowohl für THC, als auch von CBD, in allen untersuchten Weichteilsarkom-Zelllinien nachgewiesen werden. Mittels Annexin V/PI Apoptose-Assay wurde eine dosisabhängige Induktion der Apoptose durch THC und CBD bewiesen. Die konzentrationsabhängige Wirkung weist auf eine rezeptorvermittelte Wirkung hin.

Dies korreliert mit vergleichbaren Beobachtungen in Pankreas-, Prostata- und Kolorektalen Karzinomen, welche proapoptotische Effekte von Cannabinoiden nachweisen konnten [58] [106].

Frühere Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe konnte ebenfalls eine konzentrationsabhängige Apoptose-Induktion durch THC in akuten Leukämien nachweisen, die vom Expressionsniveau der Cannabinoid-Rezeptoren CB1 und CB2 abhängig ist. Bemerkenswerterweise manifestieren sich die beobachteten Effekte dabei in THC-Konzentrationen, die mit physiologisch erreichbaren Plasmaspiegeln im Menschen korrespondieren. Dabei scheint eine langsame Dosissteigerung die psychoaktiven Nebenwirkungen zu minimieren, gleichzeitig bleibt die antineoplastische Wirkung erhalten. Dies ist besonders für die onkologische Supportivtherapie relevant [73].

Ein Vergleich der in dieser Arbeit nachgewiesenen IC_{50} -Werte von CBD und THC für die jeweiligen Sarkomzelllinien zeigt, dass CBD niedrigere IC_{50} -Werte aufweist als THC. Dies spricht für dafür, dass CBD potenter in der Apoptose-Induktion ist. Diese Erkenntnis deckt sich mit Forschungsergebnissen einer Dissertationsarbeit aus unserer Arbeitsgruppe, die einen vergleichbaren Effekt in akute Leukämien aufzeigt [107]. Dies ist vor allem für den klinischen Einsatz relevant, da CBD keine psychoaktive Wirkung verursacht und somit eine bessere Verträglichkeit in der therapeutischen Anwendung aufweist.

Trotz des gemeinsamen mesenchymalen Ursprungs aller untersuchten Zelllinien zeigt sich im Rhabdomyosarkom-Modell eine besondere Sensitivität gegenüber einer Cannabinoidbehandlung hinsichtlich der Apoptose-Induktion.

Im Vergleich zum Synovialsarkom- und zum Liposarkom-Modell wurden für die Rhabdomyosarkomzellen die niedrigsten IC_{50} -Werte für CBD und THC ermittelt. Die beobachtete Heterogenität in den IC_{50} -Werten kann auf multiple zelluläre und molekulare Faktoren zurückzuführen sein, beispielsweise unterschiedlicher Expressionsdichte der Cannabinoid-Rezeptoren oder einer zellspezifischen Pharmakokinetik.

Zusammenfassend wird in dieser Forschungsarbeit erstmals der proapoptische Effekt von THC und CBD in Sarkomzelllinien bewiesen.

In der Konsequenz wurde folglich das Proliferationsverhalten der untersuchten Sarkom-Zelllinien unter Cannabinoidtherapie untersucht.

In einem systematischen Review von Pogano et al. werden Forschungsergebnisse zusammengefasst, die sowohl ein antiproliferatives als auch proliferationssteigerndes Effekt von CBD in gesunden humanen Zellen beschreiben [108]. Valenti et al. beschreiben eine antiproliferative Wirkung von CBD in verschiedenen humanen Malignomen. Hierbei wurde sich jedoch nur auf den antiproliferativen Effekt durch CBD konzentriert [109].

In dieser Forschungsarbeit konnte ein antiproliferativer Effekt nicht nur für CBD, sondern auch für THC nachgewiesen werden.

Die in diesem Forschungsprojekt gewonnenen Ergebnisse beweisen eine signifikante Proliferationshemmung durch THC und CBD in allen untersuchten Zelllinien, wobei die inhibitorischen Effekte bereits in Konzentrationen unterhalb des ermittelten IC_{50} -Werts beobachtet wurden.

Die Persistenz des antiproliferativen Effektes auch nach 120 Stunden (5 Tagen) lässt diskutieren, ob dieser späte Effekt auf eine rezeptorvermittelte Cannabinoidwirkung zurückzuführen ist, oder ob dieser Effekt schon Resultat einer intrazellulären Akkumulation mit konsekutiven zellulären Veränderungen ist.

Zu erwähnen ist, dass die gewonnenen Ergebnisse eine Wirksamkeit in subletalen Konzentrationen zeigen. So tritt ein proliferationshemmender Effekt bereits in Konzentrationen auf, die unterhalb des jeweiligen, aus den Apoptoseversuchen bestimmten IC_{50} -Wertes liegen. Dies ist von besonderer

klinischer Relevanz, da sie potenzielle therapeutische Fenster mit reduziertem Nebenwirkungsprofil eröffnen.

Basierend auf dem bereits nachgewiesenen proapoptischen und antiproliferativen Effekt von CBD und THC wurde im nächsten Schritt das Migrationsverhalten unter einer Cannabinoidbehandlung untersucht.

So wurde vermutet, dass Cannabinoide das Migrationsverhalten von Weichteilsarkomen beeinflussen und somit möglicherweise das Metastasierungspotential reduzieren könnten.

Die gewonnenen Ergebnisse zeigen in der Tat eine signifikante Reduktion des Migrationsverhalten von Weichteilsarkomzellen unter THC und CBD.

Dies deckt sich mit Forschungsergebnissen an Gliomzellen, die eine konzentrationsabhängige Hemmung der Zellmigration beschrieben. Bemerkenswerterweise trat diese Migrationshemmung in Gliomzellen bereits in Konzentrationen von 0,01-9 μM auf, was deutlich unter den in dieser Forschungsarbeit eingesetzten Dosierungen liegt [110]. Dies unterstreicht die Möglichkeit von zellspezifischen Effekten der Cannabinoide und betont die Notwendigkeit einer differenzierten, zelltypspezifischen Untersuchung.

Eine vergleichende Analyse der Migrationsgeschwindigkeiten der untersuchten Sarkomzelllinien zeigt, dass Liposarkomzellen die höchste Migrationsgeschwindigkeit mit durchschnittlich 33,12 $\mu\text{m}/\text{h}$ aufweisen. Die Interpretation der erhöhten Migrationsgeschwindigkeit von Liposarkomzellen in vitro als Indikator für ein erhöhtes Metastasierungsrisiko im Vergleich zu den Rhabdomyosarkom- oder Synovialsarkom-Modellen ist mit Vorsicht zu betrachten. Vielmehr scheint das Metastasierungsrisiko vom histologischen Subtyp und genetischer Faktoren abhängig zu sein [111].

Im Rhabdomyosarkom weist Cannabidiol eine stärkere Migrationshemmung auf als THC. Konkret wurde für CBD eine relative Migrationshemmung um 63,3 % beobachtet, für THC lediglich ein migrationshemmender Effekt um 32,4 %.

Interessanterweise zeigen sich für das Synovialsarkom und Liposarkom umgekehrte Beobachtungen.

THC wirkt im Synovialsarkom mit einer relativen Hemmung der Migration von 76,1 % stärker migrationshemmend als CBD (50,4%). Analog lässt sich für das Liposarkom eine relative Migrationshemmung durch THC von 75,6 % berechnen, CBD führt zu einer relativen migrationshemmenden Wirkung von 64,2 %. Die Erkenntnis über die differenzierte Wirkung der Cannabinoide auf verschiedene Sarkomtypen liefern wichtige präklinische Hinweise für einen potenziell klinischen Einsatz.

Zusammenfassend wird für das Rhabdomyosarkom-, Synovialsarkom- und Liposarkom-Modell erstmals ein antiproliferativer, proapoptotischer und migrationshemmender Effekt durch die Cannabinoide THC und CBD nachgewiesen.

Im zweiten Teil dieser Forschungsarbeit wurde der Zusammenhang des antineoplastischen Effektes von THC bzw. CBD in Abhängigkeit von der OGT-Expression untersucht.

Der aktuelle Forschungsstand bezüglich des Zusammenhangs zwischen erhöhter OGT-Aktivität und Apoptose-Induktion zeigt sich komplex und teilweise widersprüchlich.

In vitro Untersuchungen an Pankreaskarzinomzellen haben gezeigt, dass eine Reduktion der Hyper-O-GlcNAcylierung (= eine durch OGT überdurchschnittlich hohe O-GlcNAcylierung) die Apoptose induzieren kann. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die O-GlcNAcylierung eine anti-apoptotische Wirkung aufweist [112].

Die O-GlcNAcylierung von Proteinen gilt auch als Sensorfunktion für nutritive Stimuli [113]. So führen Hyperglykämien zu einer verstärkten O-GlcNAcylierung [114]. Ferrer et al. beschreiben eine signifikante Reprogrammierung des Glucosestoffwechsels in Krebszellen [115].

Eine erhöhte Glucoseaufnahme in die Zellen und konsekutiv vermehrter aerober Glycolyse, sowie Bildung von Laktat anstelle einer oxydativen

Phosphorylierung, trotz ausreichendem Angebot an Sauerstoff (Warburg-Effekt), befähigt Krebszellen, ihren erhöhten Energiebedarf zu decken und benötigte Energieträger selbst zu generieren. Dies führt zu einer erhöhten Proliferationsrate und erhöhten Apoptoseresistenz [115].

Neue wissenschaftliche Erkenntnisse zeigen einen signifikanten Zusammenhang zwischen erhöhter Metastasierungsrate und Invasion, sowie erhöhter Angiogenese maligne entarteter Zellen durch Aktivierung des Transkriptionsfaktor Notch 1, welcher ebenfalls durch O-GlcNAcylierung erhöht wird [116] [117].

Die zentrale Rolle von OGT in der Zellbiologie macht dieses Enzym attraktiv für mögliche Therapieoptionen. In einer Studie mit Darmkrebszellen wurde gezeigt, dass eine Kombination von OGT-Inhibitoren und niedrigdosierter Irinotecan-Chemotherapie zu einer Überwindung der zellulären Seneszenz und zur Induktion der Apoptose führt [103].

Die Literatur zeigt jedoch widersprüchliche Ergebnisse im Hinblick auf einen Zusammenhang zwischen erhöhter Chemotherapie-Resistenz und unterschiedlichem OGT-Expressionsniveau. Einerseits konnte in Gewebeproben von Cisplatin-resistenten Ovarialkarzinom eine verminderte O-GlcNAcylierung nachgewiesen werden, was zu einer gesteigerten Autophagie und reduzierten Cisplatin-induzierten Apoptose führt und so das Überleben von Krebszellen ermöglicht [118]. Andererseits zeigte eine erhöhte O-GlcNAcylierung in Bronchialkarzinom-Zelllinien eine verminderten Cisplatin-induzierten Apoptose [119].

Unsere Forschungsgruppe publizierten im Jahr 2020 Erkenntnisse zur epigenetischen Aktivierung der O-linked β -N-acetyl Glucosamine Transferase durch THC. Hierbei wurde gezeigt, dass THC als unspezifischer epigenetischer Modulator fungiert, welcher die Genexpression vieler Gene durch Demethylierung von CpG-Inseln beeinflusst. In Folge kommt es zu einer verstärkten Induktion der OGT-Genexpression mit konsekutiver Hyper-O-GlcNAcylierung, was funktionell in einer erhöhten Apoptose-Induktion resultierte [94].

Um die funktionelle Rolle der O-linked β -N-acetyl Glucosamine Transferase (OGT) für die antineoplastischen Wirkung von Cannabinoiden in Weichteilsarkomen zu untersuchen, wurden OGT-defiziente Zellenmodelle mithilfe der RNA-Interferenz Technik etabliert.

Im OGT-defizienten Rhabdomyosarkom-Modell konnte durch eine qRT-PCR ein vermindertes Expressionsniveau von 52%, im OGT-defizienten Synovialsarkom-Modell ein reduziertes Expressionsniveau von 70 % und im OGT-defizienten Liposarkom-Modell ein reduziertes OGT-Expressionsniveau 64 % im Vergleich zum EV-Kontrollmodell nachgewiesen werden.

Die auf mRNA-Ebene nachgewiesene Reduktion der OGT-Expression wurde simultan auch auf Proteinebene durch einen Western Blot verifiziert. Es konnte davon ausgegangen werden, dass ein zuverlässiger und valider OGT-Knockdown für weitere Untersuchungen vorlag.

Um den Zusammenhang einer potentiellen OGT-vermittelten Wirkung der Cannabinoide auf die Apoptose-Induktion von Weichteilsarkomzellen zu untersuchen, wurden OGT-defiziente Zellmodelle analog zu den OGT-Wildtyp-Zelllinien für 48 Stunden mit THC und CBD behandelt.

Eine Behandlung mit THC zeigt in allen OGT-defizienten Sarkomzellmodellen im Vergleich zum Kontrollmodell einen signifikant reduzierten apoptotischen Effekt. So konnte für THC eine OGT-abhängige Wirkung in der Apoptose-Induktion gezeigt werden. Interessanterweise bestätigen diese Ergebnisse die Forschungsergebnisse unserer Arbeitsgruppe, welche einen reduzierte proapoptotische Wirkung von THC in OGT-defizienten Leukämiezellen nachwiesen [94]. Darüber hinaus konnte erstmalig ein vergleichbarer, OGT-abhängiger Effekt von CBD auf die Apoptose-Induktion in dieser Forschungsarbeit gezeigt werden. In OGT-defizienten Sarkomzellen zeigte sich ein signifikant abgeschwächter proapoptotischen Effekt von CBD, was ebenfalls eine OGT-abhängige Wirkung von CBD vermuten lässt.

Im OGT-defizienten Rhabdomyosarkom- und Liposarkom-Modell zeigte sich jedoch in den höchsten Konzentration THC (80 μ M) bzw. CBD (48 μ M)

statistisch kein signifikanter Unterschied. Dies ist jedoch vor dem Hintergrund der ausgeprägten Apoptose-Induktion zu werten, die möglicherweise die Maskierung potentiell unterschiedlicher Effekte zur Folge hat.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Apoptose-Induktion durch Cannabinoide von der OGT-Expression abhängig ist.

Die ubiquitäre Präsenz und multifunktionale Rolle von OGT in vielen zellulären Prozessen macht eine Betrachtung des Proliferationsverhaltens unter einer Cannabinoidtherapie in Abhängigkeit von OGT notwendig.

Hierfür wurden die etablierten OGT-defizienten Zellmodelle hinsichtlich ihres Proliferationsverhaltens untersucht.

In allen Zelllinien zeigten die unbehandelten shOGT-Zellmodelle im Vergleich zu ihren Kontrollmodellen (shEV) einen statistisch signifikanten Unterschied im Proliferationsverhalten auf. So wurde in OGT-defizienten Zellen eine reduzierte Proliferation beobachtet.

Diese Beobachtung steht im Einklang mit dem aktuellen Forschungsstand. Vergleichbare Forschungsergebnisse konnten von Minh et al. in einer Übersichtsarbeit gezeigt werden. Hierbei wird ein Zusammenhang zwischen erhöhter OGT-Expression und gesteigerter Proliferation in malignen Zellen beschrieben. Eine OGT-Suppression scheint einen Arrest der Zellen in verschiedenen Zellzyklusphasen zu verursachen und somit die Proliferation zu hemmen [120].

Um ein verändertes Proliferationsverhalten im Kontext mit einer möglichen Cannabinoidtherapie zu bringen, wurden die etablierten shOGT-Zellmodelle mit THC bzw. CBD behandelt.

Dabei zeigte sich in allen OGT-defizienten Zellmodellen ein reduzierter antiproliferativer Effekt durch THC und CBD. Es konnte nachgewiesen werden, dass shOGT-Zellmodelle eine erhöhte Proliferation unter Cannabinoidtherapie aufwiesen als die zugehörige Kontroll-Zelllinien (shEV). Die Ergebnisse sind stimmig zu den durchgeführten Apoptoseassays, die eine reduzierte proapoptische Wirkung der Cannabinoide in OGT-defizienten Zellen

beschreibt. Diese Beobachtung unterstützt die Vermutung einer OGT-abhängigen antineoplastischen Wirkung der Cannabinoide.

Basierend auf den vorherigen Erkenntnissen einer verminderten proapoptischen und antiproliferativen Wirkung von CBD und THC in OGT-defizienten Zellmodellen, wurde im Anschluss das Migrationsverhalten in Abhängigkeit von OGT untersucht.

In Rhabdomyosarkomzellen mit reduzierter OGT-Expression zeigte sich die Tendenz einer reduzierten Migration im Vergleich zum Kontrollmodell. Vergleicht man die Migrationsgeschwindigkeiten, so ist kein signifikanter Unterschied zu erkennen.

Diese Tendenz ist in den OGT-defizienten Synovialsarkom- und Liposarkom-Modellen deutlicher zu beobachten. Im Synovialsarkom-Modell konnte eine statistisch signifikante Reduktion des Migrationsverhaltens in OGT-defizienten Zellen nachgewiesen werden. Im Vergleich der Migrationsgeschwindigkeit zeigt sich in Synovialsarkomzellen mit reduzierter OGT-Expression mit 13,61 $\mu\text{m}/\text{h}$ eine deutlich reduzierte Migration als ihr Kontrollmodell mit 22,17 $\mu\text{m}/\text{h}$. Die Ergebnisse am Liposarkom-Modell zeigen ähnlich deutliche Effekte, allerdings erreichen die Ergebnisse aufgrund hoher Standardabweichungen keine statistische Relevanz. Die shOGT-Liposarkomzellen wiesen mit 17,38 $\mu\text{m}/\text{h}$ eine langsamere Migrationsgeschwindigkeit auf als ihr Kontrollmodell (shEV-Liposarkom) mit 21,59 $\mu\text{m}/\text{h}$.

Insgesamt scheint eine Reduktion der OGT-Expression in den Zelllinien SW982 und SW872 tendenziell zu einem verzögerten Migrationsverhalten zu führen. Dies deutet darauf hin, dass eine verminderte OGT-Expression die Zellmigration hemmt, was die zentrale Rolle von OGT in einer Vielzahl von zellulären Prozessen bestätigt.

Im Anschluss wurden die OGT-defizienten Zellmodelle einer Behandlung mit Cannabinoiden unterzogen und das Migrationsverhalten untersucht.

So wurde in Rhabdomyosarkomzellen mit reduzierter OGT-Expression ein verminderter migrationshemmender Effekt von THC und CBD nachgewiesen,

was die Hypothese einer OGT-abhängigen Wirkung von Cannabinoiden unterstreicht.

Interessanterweise konnte dieser Effekt in OGT-defizienten Synovialsarkomzellen experimentell nicht beobachtet werden. Hier konnte ein verstärkter migrationshemmender Effekt von THC und CBD im Vergleich zu ihren Kontrollzellen gezeigt werden.

Bemerkenswerterweise wiesen die erhobenen Ergebnisse für das OGT-defiziente Liposarkom divergente Effekte innerhalb der Cannabinoide auf. So führte eine THC Behandlung zu einer erhöhten Migrationsgeschwindigkeit in OGT-defizienten Liposarkomzellen, was über eine OGT-abhängige Wirkung von THC auf das Migrationsverhalten schließen lässt. Erstaunlicherweise konnte für die Behandlung mit CBD eine konträre Beobachtung gemacht werden. So führte CBD in OGT-defizienten Liposarkomzellen zu einer verzögerten Migrationsgeschwindigkeit und somit einem verstärkten migrationshemmenden Effekt. Das Kontrollmodell wies dabei eine höhere Migrationsgeschwindigkeit unter CBD Behandlung auf. Dies steht im Gegensatz zu den Ergebnissen der THC Behandlung und lässt auf einen reduzierten migrationshemmenden Effekt von CBD in Liposarkomzellen mit reduzierter OGT-Expression schließen.

Die Ursachen des divergenten Effektes in den Sarkomzelllinien können multifaktoriell sein. Die Zellmigration repräsentiert ein hochkomplexer Mechanismus, der durch eine Vielzahl von molekularen Signalwegen reguliert wird. Daher ist eine eindeutige Zuordnung spezifischer Effekte zu einzelnen Faktoren ohne weiterführende Untersuchungen nicht möglich.

Insgesamt weisen die Ergebnisse der durchgeführten Experimente darauf hin, dass die OGT-abhängige Wirkung von THC und CBD auf das Migrationsverhalten als zell- und wirkstoffspezifisch charakterisiert werden kann. Ein definitiver, OGT-abhängiger Effekt der Cannabinoide auf das Migrationsverhalten kann nicht für alle Zellmodelle nachgewiesen werden. Diese Beobachtungen verdeutlichen die Notwendigkeit einer systematischen Untersuchung, um die zugrunde liegenden Mechanismen und deren potenziellen therapeutischen Relevanz umfassend zu analysieren.

Zusammenfassend bestätigen die in der vorliegenden Arbeit erhobenen Ergebnisse die durch Kampa-Schittenhelm et al. vorgeschriebene OGT-abhängige Wirkung von Cannabinoiden hinsichtlich der Apoptose-Induktion und der antiproliferativen Wirkung in den untersuchten Weichteilsarkom-Zelllinien. Die Ergebnisse zur Zellmigration können hingegen nicht für alle untersuchten Zellmodelle eine OGT-abhängige Wirkung beweisen, unter Cannabinoidbehandlung zeigen sich ein zell- und wirkstoffspezifisches Migrationsverhalten. Insgesamt legt diese in-vitro Beobachtung nahe, dass OGT als möglicher prädiktiver Biomarker für die Effektivität einer cannabinoidbasierten Therapie dienen könnte. Eine definitive Bewertung ist jedoch anhand des Zellmodells nicht möglich und benötigt weiterführende klinischer Untersuchungen.

Abschließend ist hervorzuheben, dass die Untersuchungen in vitro an einzelnen Zellmodellen erfolgte und an weiteren Zellmodellen, Gewebeproben und in-vivo Modellen verifiziert werden müssen. Die In-Vitro-In-Vivo-Exploration (IVIVE) stellt eine zentrale Herausforderung insbesondere in den Bereichen Pharmakologie und Toxikologie dar. Zukünftige Studien sollten sich auf die Aufklärung der präzisen Wirkmechanismen von THC und CBD konzentrieren, insbesondere im Hinblick auf die potentere antineoplastische Wirkung von CBD. Ferner sind weitere Forschungsbemühungen sinnvoll, um exakte, möglichst nebenwirkungsarme Dosierungen und potenzielle Kombinationstherapien zu evaluieren.

5 Zusammenfassung

Weichteilsarkome sind seltene maligne Tumore mesenchymalen Ursprungs, die etwa 1 % aller neu diagnostizierten Krebserkrankungen in Deutschland ausmachen. Die Heterogenität und geringe Inzidenz dieser Malignome stellt Herausforderungen für Diagnostik und Therapie dar, weshalb eine spezialisierte Versorgung an Sarkomzentren notwendig ist.

Die Cannabinoide Cannabidiol (CBD) und Δ^9 -Tetrahydrocannabinol (THC) gewinnen im klinischen Alltag als Supportiva zunehmend an Bedeutung. In Deutschland sind CBD und THC beispielsweise zur Behandlung einer Spastik im Rahmen einer Multiplen Sklerose, Kachexie bei AIDS Patienten oder als Antiemetikum bei Chemotherapie-induzierter Übelkeit zugelassen. Eine Vielzahl von experimentellen Studien untersucht zudem die antineoplastische Wirkung der Cannabinoide auf diverse Tumorentitäten.

Die O-linked β -N-acetyl Glucosamine Transferase (OGT) ist als Schlüsselenzym an einer Vielzahl zellulärer Regulationsmechanismen involviert. Eine dysregulierte OGT-Aktivität wurde in einer Vielzahl von neurodegenerativen, aber auch malignen Erkrankungen nachgewiesen.

Unsere Arbeitsgruppe veröffentlichte im Jahr 2020 Forschungsergebnisse, die einen OGT-abhängigen Wirkung von THC in akuten Leukämien beschreibt.

Im Rahmen dieser Dissertation sollte die antineoplastische Wirkung von THC und CBD in Weichteilsarkom-Modellen untersucht werden. Anschließend wurde ein möglicher OGT-abhängiger Effekt der antineoplastischen Wirkung von Cannabinoiden evaluiert.

Die Apoptose-Induktion wurde dabei mittels einem Annexin-V basierten Assays durchflusszytometrisch (FACS) quantifiziert. Zur Evaluation des Proliferationsverhaltens wurde eine mikroskopische Zellzählung durchgeführt, um die Verdopplungszeit zu beurteilen. Die Zellmigration wurde mit einem sog. Wundheilungsassay untersucht.

Unsere Untersuchungen bestätigen zunächst die Präsenz der Cannabinoid-Rezeptoren CB₁ und CB₂ in den untersuchten Weichteilsarkomen-Zelllinien.

Sowohl für THC als auch für CBD konnte in der Konsequenz eine dosisabhängige Induktion der Apoptose in den untersuchten Weichteilsarkom-Modellen gezeigt werden.

Weitere Analysen bewiesen zudem einen antiproliferativen und migrationshemmenden Effekt beider Cannabinoide. Interessanterweise konnten diese Effekte in Konzentrationen unterhalb des jeweils ermittelten IC₅₀-Werts für die Apoptose-Induktion beobachtet werden, was wichtige Informationen für ein mögliches therapeutisches Fenster liefert. Erwähnenswert ist die Beobachtung eines stärkeren antineoplastischen Effektes durch CBD im Vergleich zu THC, was zudem in Hinblick der fehlenden psychotropen Nebenwirkungen für die klinische Anwendung günstig erscheint.

Zur systematischen Untersuchung OGT-abhängiger Effekte der Cannabinoide wurden OGT-defiziente Zellmodelle mithilfe lentiviral vermittelter RNA-Interferenz generiert.

In allen Zellmodellen mit reduzierter OGT-Expression konnte tendenziell eine verringerte basale Induktion der Apoptose, eine reduzierte Proliferationsrate und eine verlangsamte Zellmigration beobachtet werden.

Eine OGT-abhängige Wirkung von Cannabinoiden konnte dabei experimentell in Bezug auf die Apoptose-Induktion und die antiproliferative Wirkung verifiziert werden. Im Hinblick auf das Migrationsverhalten zeigten sich divergente Effekte in Bezug zur OGT-Expression.

Mit dieser Dissertation konnte eine erste fundierte wissenschaftliche Grundlage über den antineoplastischen Effekt der Cannabinoide THC und CBD in Weichteilsarkomen erarbeitet werden. Dies dient als Basis für zukünftige präklinische Studien zur Evaluierung einer potenziellen neuen Therapieoption mit Cannabidiol und Δ^9 -Tetrahydrocannabinol in Weichteilsarkomen.

6 Literaturverzeichnis

- [1] Gilbert, NA., et al., „Soft-tissue Sarcoma" Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons, 2009, **17** (1), S. 40-47
- [2] Gronchi, A., et al., „Soft tissue and visceral sarcomas: ESMO EURACAN GENTURIS Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up" ESMO, 2021, **32** (11), S. 1348 - 1365
- [3] Robert - Koch-Institut (Hrsg.) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg.), „Krebs in Deutschland für 2019/2020", 2023, Ausgabe 14, S. 74 - 77, Berlin
- [4] Ressing, M., et al., „Strengthening health data on a rare and heterogeneous disease: sarcoma incidence and histological subtypes in Germany", BMC Public Health, 2018, **18** (1), S. 1-11
- [5] Hoppin, JA., et al., „Occupational Risk Factors for Sarcoma Subtype" Epidemiology, 1999, **10** (3), S. 300-306
- [6] Serraino, D., et al., „Non-occupational risk factors for adult soft-tissue sarcoma in northern Italy" Cancer Causes Control 2, 1991, **2** (3), S. 157 - 164
- [7] Hanna, J., et al. „PAX3-FOXO1 drives miR-486-5p and represses miR-221 contributing to pathogenesis of alveolar rhabdomyosarcoma.," Oncogene, 2018, **37** (15), S. 1991– 2007
- [8] Levine, AJ., „p53, the cellular gatekeeper for growth and division" Cell., 1997, **88** (3), S. 323-331
- [9] Zarrabi, A., et al., „Rhabdomyosarcoma: Current Therapy, Challenges, and Future Approaches to Treatment Strategies", Cancers (Basel), 2023, **15** (2), S. 1 - 72
- [10] Deutsche Krebsgesellschaft (DKG), „S3-Leitlinie Adulte Weichgewebesarkome", 2022, letzter Zugang 15.06.2025, https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/fileadmin/user_upload/Downloads/Leitlinien/Adulte_Weichgewebe_sarkome/LL_Weichgewebesarkome_Langversion_1.1.pdf AWMF - Registernummer: 032/044OL
- [11] Blay JY., et al., „Synovial sarcoma: characteristics, challenges, and evolving therapeutic strategies", ESMO Open, 2023, **8** (5), S. 1- 14

- [12] Conyers, R., Young, S., Thomas, DM., „Liposarcoma: molecular genetics and therapeutics" Sarcoma, 2011, Vol. 2011, S.1-12
- [13] ESMO/European Sarcoma Network Working Group, „Soft tissue and visceral sarcomas: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up", Annals of Oncology, 2014, **25** (3), S. 102 - 112
- [14] Yadav, D., et al., „Next-Generation sequencing transforming clinical practice and precision medicine", Clinica Chimica Acta, 2023, Vol. 551
- [15] Bayani J., Squire JA, „Fluorescence in situ Hybridization (FISH)", Current Protocols in Cell Biology, 2004, vol. Chapter 22:Unit 22.4
- [16] UICC, „TNM Classification of Malignant Tumours", 8. Auflage, Wiley-Blackwell, 2024.
- [17] AJCC, „Cancer Staging Manual", 8. Auflage, Springer, 2018.
- [18] Danieli M., Gronchi A., „Staging Systems and Nomograms for Soft Tissue Sarcoma", Current Oncology, 2023, **30** (4), S. 3648–3671
- [19] Chmiel P., et al., „Review on Lymph Node Metastases, Sentinel Lymph Node Biopsy, and Lymphadenectomy in Sarcoma", Current Oncology, 2024, **31** (1), S. 307 - 323
- [20] Correa R., et al., „Radiotherapy in soft-tissue sarcoma of the extremities" Clinical and Translational Oncology, 2018, **20** (9), S. 1127-1135
- [21] Kepka L., et al., „Results of radiation therapy for unresected soft-tissue sarcomas", International Journal of Radiation, Oncology, Biology an Physics, 2005, **63** (3), S. 852-859
- [22] Sleijfer, S., „Prognostic and predictive factors for outcome to first-line ifosfamide-containing therapy (IFM) in patients (pts) with advanced soft tissue sarcomas (STS) treated in EORTC-STBSG studies", European Journal of Cancer, 2009, **46** (1), S. 72-83
- [23] Gleason, CE., „Therapy-Induced Senescence Contributes to the Efficacy of Abemaciclib in Patients with Dedifferentiated Liposarcoma", Clinical Cancer Research, 2024, **30** (4), S. 703-718
- [24] Ayodele, O., Razak ARA., „Immunotherapy in soft-tissue sarcoma", Current Oncology, 2020, **27** (1), S. 17-23
- [25] Bundesgesetzblatt „Gesetz zum kontrollierten Umgang mit Cannabis und zur Änderung weiterer Vorschriften (Cannabisgesetz - CanG)" vom 27. März 2024,

in Kraft getreten am 1. April 2024, BGBl. I, Nummer 109, 2024, letzter Zugang 15.05.2025,

https://www.recht.bund.de/bgbl/1/2024/109/regelungstext.pdf?__blob=publicationFile&v=1

- [26] Jiang, HE., et al. , „A new insight into Cannabis sativa (Cannabaceae) utilization from 2500-year-old Yanghai Tombs, Xinjiang, China", *Journal of Ethnopharmacology*, 2006, **108** (3), S. 414-422
- [27] Rock EM., Parker La., „Constituents of Cannabis Sativa", *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2021, Vol. 1264, S. 1-13
- [28] Sommano SR., Chittasupho C., Ruksiriwanich W., et al., „The Cannabis Terpenes", *Molecules*, 2020, 25 (24), S. 1-16
- [29] Andre CM, Hausman, JF., Guerriero, G., et al., „Cannabis sativa: The Plant of the Thousand and One Molecules", *Frontiers in Plant Science*, 2016, **7**(19), S. 1 - 17
- [30] Lowe H., et al., „The Endocannabinoid System: A Potential Target for the Treatment of Various Diseases", *International Journal of Molecular Science*, 2021, **22** (17), S. 1-42
- [31] Burstein, S., „Cannabidiol (CBD) and its analogs: a review of their effects on inflammation", *Bioorg Med Chem.*, 2015, **23** (7), S. 1377 - 1385
- [32] Maccarrone, M., „Tribute to Professor Raphael Mechoulam, The Founder of Cannabinoid and Endocannabinoid Research", *Molecules*, 2022, **27** (1), S. 1 - 5
- [33] Stella, N., „THC and CBD: Similarities and differences between siblings", *Neuron.*, 2023, **111** (3), S. 302-327
- [34] Pintori, N., et al., „THC and CBD: Villain versus Hero? Insights into Adolescent Exposure", *International Journal of Molecular Science*, 2023, 24 (6), S. 1 - 36
- [35] Kilaru A., Chapman, KD., „The endocannabinoid system", *Essays in Biochemistry*, 2020, **64** (3), S. 485-490
- [36] Zou, S., Kumar, U., „Cannabinoid Receptors and the Endocannabinoid System: Signaling and Function in the Central Nervous System", *International Journal of Molecular Science*, 2018, **19** (3), S. 1 - 23
- [37] Fride, E., et al., „The endocannabinoid system during development: emphasis on perinatal events and delayed effects", *Vitamines and Hormones*, 2009, Vol. 81, S. 139-158

- [38] Lu, HC., Mackie, H., „An Introduction to the Endogenous Cannabinoid System", *Biological Psychiatry*, 2016, **79** (7), S. 516-525
- [39] Mock, ED., Gagestein, B., van der Stelt, M., „Anandamide and other N-acylethanolamines: A class of signaling lipids with therapeutic opportunities", *Progress in Lipid Research*, 2023, Vol. 89
- [40] Scherma, M., „Brain activity of anandamide: a rewarding bliss?" *Acta Pharmacology Sinica*, 2019, **40** (3), S. 309-323
- [41] Carrascosa AJ., et al., „Additive antinociceptive action of intrathecal anandamide reuptake inhibitor and morphine in the management of post-incisional pain in rats", *Biomed Pharmacotherapy*, 2024, Vol. 177
- [42] Pertwee, RG., „The diverse CB1 and CB2 receptor pharmacology of three plant cannabinoids: delta9-tetrahydrocannabinol, cannabidiol and delta9-tetrahydrocannabivarin", *British Journal of Pharmacology*, 2008, **153** (2), S. 199-215
- [43] Peng, J., et al., „A narrative review of molecular mechanism and therapeutic effect of cannabidiol (CBD)", *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*, 2022, **130** (4), S. 439-456
- [44] De Petrocellis L., et al., „Cannabinoid actions at TRPV channels: effects on TRPV3 and TRPV4 and their potential relevance to gastrointestinal inflammation", *Acta Physiology*, 2012, **204** (2), S. 255-266
- [45] Qin, N., et al., „TRPV2 is activated by cannabidiol and mediates CGRP release in cultured rat dorsal root ganglion neurons", *The Journal of Neuroscience*, 2008, **28** (24), S. 6231–6238
- [46] Lutz, B., „Neurobiology of cannabinoid receptor signaling", *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 2020, **22** (3), S. 207-222
- [47] Egertová, M., Elphick, MR., „Localisation of cannabinoid receptors in the rat brain using antibodies to the intracellular C-terminal tail of CB", *Journal of Comparative Neurology*, 2000, **422** (2), S. 159-171
- [48] Pertwee, RG., et al., „International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXIX. Cannabinoid receptors and their ligands: beyond CB₁ and CB₂", *Pharmacological Reviews*, 2010, **62** (4), S. 588-631
- [49] Castillo, PE., et al., „Endocannabinoid signaling and synaptic function". *Neuron*, 2012, **76** (1), S. 70-81

- [50] Brust, CA., Swanson, MA., Bohn, L., „Structural and functional insights into the G protein-coupled receptors: CB1 and CB2", *Biochemical Society Transactions*, 2023, **51** (4), S. 1533-1543
- [51] Galiègue, S., et al., „Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations", *European Journal of Biochemistry*, 1995, **232** (1), S. 54-61
- [52] Bietar, B., Tanner, S., Lehmann, C., „Neuroprotection and Beyond: The Central Role of CB1 and CB2 Receptors in Stroke Recovery. Neuroprotection and Beyond: The Central Role of CB1 and CB2 Receptors in Stroke Recovery", *International Journal of Molecular Science*, 2023, **24** (23)
- [53] Wright, KL., Duncan, M., Sharkey, KA., „Cannabinoid CB2 receptors in the gastrointestinal tract: a regulatory system in states of inflammation", *British Journal of Pharmacology*, 2008, **153** (2), S. 263-270, 2008.
- [54] Bie, B., et al., „An overview of the cannabinoid type 2 receptor system and its therapeutic potential", *Current Opinion in Anaesthesiology*, 2018, **31**(4), S. 407-414
- [55] Yoo, EH., Lee, JH., „Cannabinoids and Their Receptors in Skin Diseases", *International Journal of Molecular Science*, 2023, **24** (22)
- [56] López-Cardona, AP., et al., „CB1 cannabinoid receptor drives oocyte maturation and embryo development via PI3K/Akt and MAPK pathways", *FASEB Journal*, 2017, **31** (8), S. 3372-3382
- [57] Velasco, G., Sánchez, C., Guzmán, M., „Anticancer mechanisms of cannabinoids", *Current Oncology*, 2016, **23** (2), S. 23-32
- [58] Carracedo, A., et al., „Cannabinoids induce apoptosis of pancreatic tumor cells via endoplasmic reticulum stress-related genes", *Cancer Research*, 2006, **66** (13) S. 6748-6755
- [59] Ronchi, A. et al., „Endocannabinoid system expression in ovarian epithelial tumors according to the dualistic model of ovarian carcinogenesis" *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 2021, **25** (14), S. 4678-4686
- [60] Lakiotaki E., et al., „Clinical Significance of Cannabinoid Receptors CB1 and CB2 Expression in Human Malignant and Benign Thyroid Lesions", *Biomed Research International*, 2015, Vol. 2015

- [61] Pisanti S., et al., „The endocannabinoid signaling system in cancer" Trends in Pharmacological Sciences, 2013, **34** (5), S. 273-282
- [62] Kovalchuk, O., Kovalchuk I., „Cannabinoids as anticancer therapeutic agents", Cell Cycle, 2020,**19** (9), S. 961-989
- [63] Singh, K., et al., „The Pathophysiology and the Therapeutic Potential of Cannabinoids in Prostate Cancer" Cancers (Basel),2021, **13** (16), S. 1 - 18
- [64] Xu, X., et al., „Overexpression of cannabinoid receptors CB1 and CB2 correlates with improved prognosis of patients with hepatocellular carcinoma", Cancer Genetics and Cytogenetics, 2006,**171** (1), S. 31 - 38,
- [65] Sarfaraz, S., et al., „Cannabinoid receptor as a novel target for the treatment of prostate cancer", Cancer Research, 2005, **65** (5), S. 1635 - 1641
- [66] Narouze, S., et al., „Antinociception mechanisms of action of cannabinoid-based medicine: an overview for anesthesiologists and pain physicians", Regional Anesthesia and Pain Medicine, 2021, **46** (3), S. 240-250
- [67] Zogopoulos, P., et al., „The role of endocannabinoids in pain modulation", Fundamental and Clinical Pharmacology, 2012, **27** (1), S. 64-80
- [68] Giacoppo, S., et al., „Sativex in the management of multiple sclerosis-related spasticity: An overview of the last decade of clinical evaluation", Multiple Sclerosis and Related Disorders, 2012, Vol. 17, S. 22-31
- [69] Legare, CA., Raup-Konsavage, WM., Vrana, KE., „Therapeutic Potential of Cannabis, Cannabidiol, and Cannabinoid-Based Pharmaceuticals", Pharmacology, 2022, **107** (3-4), S. 131–149
- [70] Dariš, B., et al., „Cannabinoids in cancer treatment: Therapeutic potential and legislation", Bosnian Journal of Basic Medical Science, 2019, **19** (1), S. 14-23
- [71] Cherkasova, V., al., „Use of Cannabis and Cannabinoids for Treatment of Cancer", Cancers (Basel), 2022, **14** (20), S. 1 - 43
- [72] Hinz B., Ramer, R., „Cannabinoids as anticancer drugs: current status of preclinical research", British Journal of Cancer, 2022, **127** (1), S. 1 - 13
- [73] Kampa-Schittenhelm, KM., et al., „Dronabinol has preferential antileukemic activity in acute lymphoblastic and myeloid leukemia with lymphoid differentiation patterns", BMC Cancer, 2016, Vol.16:25, S. 1 - 12
- [74] McKallip, R.J., Nagarkatti, M., Nagarkatti, PS., „Delta-9-tetrahydrocannabinol enhances breast cancer growth and metastasis by suppression of the antitumor

- immune response", *The Journal of Immunology*, 2005, **174** (6), S. 3281-3289
- [75] Urso, S.J., et al., „The O-GlcNAc transferase OGT is a conserved and essential regulator of the cellular and organismal response to hypertonic stress", *PLoS Genetics*, 2020, **16** (10), S. 1 - 27
- [76] Zhang, N., et al., „OGT as potential novel target: Structure, function and inhibitors", *Chemico - Biological Interactions*, 2022, Vol. 357
- [77] Lazarus, M.B., et al., „Structure of human O-GlcNAc transferase and its complex with a peptide substrate", *Nature*, 2011, **469** (7331), S. 564-567
- [78] O'Donnell, N., et al., „Ogt-dependent X-chromosome-linked protein glycosylation is a requisite modification in somatic cell function and embryo viability", *Molecular and Cellular Biology*, 2004, **24** (4), S. 1680-1690
- [79] Yang, X., Qian, K., „Protein O-GlcNAcylation: emerging mechanisms and functions", *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2017, **18** (7), S. 452-465
- [80] Chong, P.A., et al., „Exploration of O-GlcNAc transferase glycosylation sites reveals a target sequence compositional bias", *Journal of Biological Chemistry*, 2023, **299** (5), S. 1 - 17
- [81] Sacoman, J.L., et al., „Mitochondrial O-GlcNAc Transferase (mOGT) Regulates Mitochondrial Structure, Function, and Survival in HeLa Cells", *Journal of Biological Chemistry*, 2017, **292** (11), S. 4499-4518
- [82] Chatham, J.C., Zhang, J., Wende, A.R., „Role of O-Linked N-Acetylglucosamine Protein Modification in Cellular (Patho)Physiology", *Physiological Reviews*, 2021, **101** (2), S. 427-493
- [83] Lewis, B.A., Hanover, J.A., „O-GlcNAc and the epigenetic regulation of gene expression", *Journal of Biological Chemistry*, 2014, **289** (50), S. 34440-34448
- [84] Banerjee, P.S., Lagerlöf, O., Hart, G.W., „Roles of O-GlcNAc in chronic diseases of aging", *Molecular Aspects of Medicine*, 2016, Vol. 51, S.1 - 15
- [85] Slawson, C., Hart, G.W., „O-GlcNAc signalling: implications for cancer cell biology", *Nature Reviews Cancer*, 2011, **11** (9), S. 678 - 684
- [86] Sermikli, B.P., Aydogdu, G., Yilmaz, E., „Role of the O-GlcNAc modification on insulin resistance and endoplasmic reticulum stress in 3T3-L1 cells", *Molecular Biology Reports*, 2020, **47** (8), S. 5927-5942
- [87] Wani, W.Y., et al., „O-GlcNAcylation and neurodegeneration", *Brain Research Bulletin*, 2017, Vol. 133, S. 80-87

- [88] Liu, F., et al., „O-GlcNAcylation regulates phosphorylation of tau: a mechanism involved in Alzheimer's disease", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004, **101** (29), S. 10804 - 10809
- [89] Marotta, NP., et al., „O-GlcNAc modification blocks the aggregation and toxicity of the protein α -synuclein associated with Parkinson's disease", *Nature Chemistry*, 2015, **7** (11), S. 913-920
- [90] Zhang, X., et al., „MAPK/ERK signaling pathway-induced hyper-O-GlcNAcylation enhances cancer malignancy", *Molecular and Cellular Biochemistry*, 2015, **410** (1-2), S. 101 - 110
- [91] Sodi, VL., et al., „mTOR/MYC Axis Regulates O-GlcNAc Transferase Expression and O-GlcNAcylation in Breast Cancer", *Molecular Cancer Research*, 2015, **13** (5), S. 923 - 933
- [92] Mi, W., et al., „O-GlcNAcylation is a novel regulator of lung and colon cancer malignancy", *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 2011, **1812** (4), S. 514 - 519
- [93] He, XF., et al., „O-GlcNAcylation in cancer development and immunotherapy", *Cancer Letters*, 2023, Vol. 566
- [94] Kampa-Schittenhelm, KM., et al., „Epigenetic activation of O-linked β -N-acetylglucosamine transferase overrides the differentiation blockage in acute leukemia", *EBioMedicine*, 2020, Vol. 54, S. 1 - 18
- [95] Laemmli UK., „Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4", *Nature*, 1970, **227** (5259), S. 680 - 685 .
- [96] Goldman, A., et al., „Electroblotting from Polyacrylamide Gels", *Current Protocols in Protein Science*, 2015, Vols. 82:10.7.1-10.7.16, S. 1 - 24,
- [97] Ni, D., Xu, P., Gallagher, S., „Immunoblotting and Immunodetection", *Current Protocols in Molecular Biology*, 2016, Vols. 114:10.8.1-10.8.37
- [98] McKinnon KM, „Flow Cytometry: An Overview", *Current Protocols in Immunology*, 2018, Vols. 120:5.1.1-5.1.11, S. 1 - 16
- [99] Elmore S., „Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death", *Toxicology Pathology*, 2007, **35** (4), S. 495 - 516
- [100] Lemke, G., „How macrophages deal with death", *Nature Reviews Immunology*, 2019, **19** (9), S. 441-442
- [101] Grada, A., et al., „Research Techniques Made Simple: Analysis of Collective

- Cell Migration Using the Wound Healing Assay", *Journal of Investigative Dermatology*, 2017, **137** (2), S. 11 - 16
- [102] Moore, CB., „Short Hairpin RNA (shRNA): Design, Delivery, and Assessment of Gene Knockdown", *Methods in Molecular Biology*, Vol. 629, S. 141–158
- [103] Loison I., et al., „O-GlcNAcylation inhibition redirects the response of colon cancer cells to chemotherapy from senescence to apoptosis", *Cell Death and Disease*, 2024, **15** (10)
- [104] Oesch, S., et al., „Cannabinoid receptor 1 is a potential drug target for treatment of translocation-positive rhabdomyosarcoma", *Molecular Cancer Therapeutics*, 2009, **8** (7), S. 1838–1845
- [105] Shah, SA., et al., „Emerging role of cannabinoids and synthetic cannabinoid receptor 1/cannabinoid receptor 2 receptor agonists in cancer treatment and chemotherapy-associated cancer management", *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, 2021, **17** (1), S. 1 - 9
- [106] Sreevalsan, S., et al., „Induction of apoptosis by cannabinoids in prostate and colon cancer cells is phosphatase dependent", *Anticancer Research*, 2011, **31** (11), S. 3799 - 3807
- [107] Staudacker, I., „Vergleichende Wirkung von Cannabidiol (CBD) und Tetrahydrocannabinol (THC) in akuten Leukämien", *Dissertation, Universität Tübingen*, 2021.
- [108] Pagano S., et al., „Biological effects of Cannabidiol on normal human healthy cell populations: Systematic review of the literature", *Biomed Pharmacotherapy*, 2020, **132** (110728)
- [109] Valenti, C., et al., „Biological effects of cannabidiol on human cancer cells: Systematic review of the literature", *Pharmacol Research*, 2022, 181 (106267)
- [110] Vaccani, A., et al., „Cannabidiol inhibits human glioma cell migration through a cannabinoid receptor-independent mechanism", *British Journal of Pharmacology*, 2005, **144** (8), S. 1032 - 1036 , 2005.
- [111] Gamboa, AC., Gronchi, A., Cardona, K., „Soft-tissue sarcoma in adults: An update on the current state of histiotype-specific management in an era of personalized medicine", *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 2020, **70** (3), S. 200-229
- [112] Ma Z., Vocadlo, DJ., Vosseller, K., „Hyper-O-GlcNAcylation is anti-apoptotic

- and maintains constitutive NF- κ B activity in pancreatic cancer cells", *Journal of Biological Chemistry*, 2013, **288** (21), S. 15121 - 15130
- [113] Morales, MM., Pratt, MR., „The post-translational modification O-GlcNAc is a sensor and regulator of metabolism", *Open Biology*, 2024, **14** (10), S. 1 - 11
- [114] Ayodeji, SA., et al., „Hyperglycemia and O-GlcNAc transferase activity drive a cancer stem cell pathway in triple-negative breast cancer", *Cancer Cell International*, 2023, **23** (1), S. 1 - 18
- [115] Ferrer, C., Sodi, VL., Reginato, MJ., „O-GlcNAcylation in Cancer Biology: Linking Metabolism and Signaling", *Journal of Molecular Biology*, 2016, **428** (16), S. 3282-3294
- [116] Lee JB., Pyo, KH., Kim, HR., „Role and Function of O-GlcNAcylation in Cancer", *Cancers (Basel)*, 2021, **13** (21), S. 1 - 15
- [117] Wang, W., Okajima, T., Takeuchi, H., „Significant Roles of Notch O-Glycosylation in Cancer", *Molecules*, 2022, **27** (6), S. 1 - 19
- [118] Zhou F., „Down-regulation of OGT promotes cisplatin resistance by inducing autophagy in ovarian cancer", *Theranostics*, 2018, **8** (19), S. 5200-5212
- [119] Luanpitpong, S., et al., „Hyper-O-GlcNAcylation induces cisplatin resistance via regulation of p53 and c-Myc in human lung carcinoma", *Scientific Reports*, 2017, **7** (1), S. 1 - 13
- [120] Le Minh, G., et al., „On a sugar high: Role of O-GlcNAcylation in cancer", *Journal of Biological Chemistry*, 2023, **299** (11), S. 1 - 17

7 Erklärung zum Eigenanteil

Diese Arbeit wurde in der Medizinische Universitätsklinik in der Abteilung II für Hämatologie, Onkologie, klinische Immunologie und Rheumatologie unter Betreuung von Frau PD Dr. Kerstin Kampa-Schittenhelm durchgeführt.

Die Konzeption der Arbeit erfolgte in Zusammenarbeit durch Frau PD Dr. Kerstin Kampa-Schittenhelm (Leiterin Labor für experimentelle Hämatologie und Onkologie), Herrn Prof. Dr. med. Marcus Schittenhelm und mich selbst.

Sämtliche Versuche wurden nach Einarbeitung durch Frau PD Dr. Kerstin Kampa-Schittenhelm, Frau Lara Häußler und Frau PhD Vasileia Tsintari vollständig und eigenständig von mir durchgeführt.

Ausnahme hiervon ist die Transfektion von HEK293T-Zellen mit OGT knock-down DNA-Plasmiden zur Herstellung des shOGT – Vectors (siehe Methodik 2.2.7.1), welche bereits im Labor für experimentelle Hämatologie und Onkologie etabliert wurden.

Die statistische Auswertung erfolgte nach Beratung am Institut für Klinische Epidemiologie und angewandte Biometrie durch mich.

Ich versichere, das Manuskript selbständig unter Anleitung durch PD Dr. Kerstin Kampa-Schittenhelm verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Stuttgart, den 06.08.2025

8 Veröffentlichungen

1. „Evaluierung des antineoplastischen Effekts von Cannabinoiden auf Sarkomzelllinien“, Braun, S., Tsintari, V., Kampa-Schittenhelm, KM., Posterpräsentation Forschungskolloquium 2020 der Medizinischen Fakultät der Universität Tübingen, 24.01.2020, Tübingen

9 Danksagung

Abschließend möchte ich mich herzlichst bei allen beteiligten Personen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Zunächst möchte ich an erster Stelle ausdrücklich meiner Doktormutter PD. Dr. med. Kerstin Kampa-Schittenhelm für die Bereitstellung des Themas und die Durchführung im Labor für experimentelle Hämatologie und Onkologie danken. Ihr Engagement, fachliche Kompetenz sowie langjähriger Unterstützung hat maßgeblich zum Gelingen dieser Promotion beigetragen. Ihre Expertise in molekulargenetischen Techniken war für die Durchführung der experimentellen Arbeit von außerordentlicher Bedeutung.

Ein weiterer Dank gilt Vasileia Tsintari, die mich im Labor als weitere Betreuerin kontinuierlich und mit großem Engagement unterstützt hat. Ihre Bereitschaft, ihr umfangreiches Wissen zu teilen, hat mir den Zugang zu komplexen Techniken erleichtert. Insgesamt möchte ich mich herzlichst beim gesamten Laborteam unserer Arbeitsgruppe bedanken.

Ferner möchte ich dem „Interdisziplinären Promotionskolleg Medizin IZKF“ des Universitätsklinikums Tübingen danken, die dieses Promotionsprojekt finanziell und wissenschaftlich gefördert und begleitet haben.

Für die kompetente Beratung der statistischen Analysen danke ich Herrn Prof. Dr. Martus, Leiter des Instituts für Klinische Epidemiologie und angewandte Biometrie der Universität Tübingen.

Zudem gilt mein Dank dem Laborteam der AG Salih für die Unterstützung und Bereitstellung des Incu®-Cyte.

Mein von Herzen kommender Dank gilt meiner Familie und meinen Freunden. Ohne Eure unermüdliche Unterstützung, Euer unerschütterliches Vertrauen und Eure stets motivierenden Worte wäre diese Promotion für mich unmöglich gewesen. Diese Arbeit ist nicht nur mein persönlicher Erfolg, sondern auch das Ergebnis Eurer beständigen Fürsorge und Ermutigung.