

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

**Systematische Untersuchung des antileukämischen  
Effekts von Dronabinol bei akuter lymphoblastischer  
und myeloischer Leukämie**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen

vorgelegt von  
Salitzky, Olaf

2017

Dekan:

Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter:

Privatdozent Dr. M. Schittenhelm

2. Berichterstatter:

Professor Dr. P.J. Lang

Tag der Disputation:

02.05.2017

*Für meine Familie*



**Inhaltsverzeichnis**

Inhaltsverzeichnis ..... I

Abkürzungsverzeichnis ..... V

1. Einleitung ..... 1

    1.1. Die Akute myeloische Leukämie ..... 1

        1.1.1. Definition und Epidemiologie ..... 1

        1.1.2. Diagnose, Einteilung und Ätiologie der AML ..... 2

        1.1.3. Molekulare Pathogenese ..... 5

        1.1.4. Prognosefaktoren ..... 7

        1.1.5. Therapieoptionen bei der AML ..... 9

    1.2. Die Akute lymphatische Leukämie ..... 11

        1.2.1. Definition und Epidemiologie ..... 11

        1.2.2. Diagnose und Einteilung der ALL ..... 11

        1.2.3. Ätiologie und Pathogenese ..... 13

        1.2.4. Prognosefaktoren der ALL ..... 14

        1.2.5. Therapieoptionen bei der ALL ..... 15

    1.3. Cannabinoide und das Endocannabinoide System ..... 15

    1.4. Die Cannabinoidrezeptoren und ihre vermittelten Wirkungen ..... 16

    1.5. Fragestellung der Arbeit ..... 17

2. Material ..... 19

    2.1. Verbrauchsmaterialien ..... 19

    2.2. Geräte ..... 19

    2.3. Chemikalien, Reagenzien und Farbstoffe ..... 20

    2.4. Puffer, Lösungen und KITS ..... 21

    2.5. Antikörper, Wachstumsfaktoren, Antagonisten ..... 22

    2.6. THC ..... 23

    2.7. Zelllinien ..... 23

    2.8. Patientenproben ..... 24

3. Methoden ..... 26

    3.1. Zellkultivierung ..... 26

3.2. Zellkryokonservierung und Auftauen .....	26
3.3. Zellzahlbestimmung .....	27
3.4. XTT-Proliferations-Assay .....	27
3.5. Apoptosebestimmung und Immunphänotypisierung mittels FACS-Analyse.....	28
3.5.1. FACS.....	28
3.5.2. Apoptosebestimmung mittels Annexin V/ PI.....	29
3.5.3. Viabilitätsanalyse und Immunphänotypisierung zur Detektion der leukämischen Population.....	30
3.5.4. Immunphänotypisierung zur Analyse der Cannabinoidrezeptorexpression .	31
3.6. Proteinanalyse mittels Western Immunoblot .....	31
3.6.1. Herstellen der Lysate.....	32
3.6.2. Bestimmung der Proteinkonzentration.....	32
3.6.3. SDS-Page Gelelektrophorese .....	32
3.6.4. Western Immunoblot.....	33
3.6.5. Immundetektion .....	34
4. Ergebnisse.....	35
4.1. THC inhibiert zelluläre Proliferation von Leukämiezelllinien myeloischer und lymphatischer Differenzierung .....	35
4.2. Ergebnisse der Apoptosebestimmung mittels FITC-Annexin V/PI Färbung .....	37
4.2.1. Apoptoseinduktion bei der lymphatischen Leukämiezelllinie Jurkat .....	38
4.2.2. THC induziert dosisabhängig Apoptose in der myeloischen Leukämiezelllinie Molm-13.....	41
4.2.3. Dosis- und zeitabhängige Apoptoseinduktion durch THC in der Leukämiezelllinie Molm-14 .....	43
4.2.4. Proapoptotischer Effekt des THC auf die myeloische Leukämiezelllinie K-562.....	45
4.2.5. Die akute myeloische Leukämiezelllinie HL-60 unterliegt einem proapoptotischen Effekt durch THC .....	47
4.2.6. THC induziert Apoptose in der myeloischen Leukämiezelllinie M-07e .....	48
4.2.7. Dosisabhängiger Anstieg der Apoptoserate durch THC bei der myeloischen Leukämiezelllinie MV4-11 .....	50
4.2.8. Dosisabhängige Apoptoseinduktion durch THC bei der Leukämiezelllinie. Kasumi-1 .....	51
4.3. THC induziert Apoptose über den intrinsischen Weg .....	53

---

4.4. THC reduziert den Anteil viabler ex vivo-Blasten .....	54
4.4.1. THC bewirkt eine Verringerung der gemessenen viablen Zellen bei myeloischen ex vivo Blasten.....	56
4.4.2. THC reduziert dosisabhängig die Anzahl viabler Zellen bei den untersuchten ex vivo Blasten ALL Erkrankter .....	57
4.5. Blasten mit lymphatischen Markern zeigen höhere Sensitivität gegenüber THC .....	58
4.6. Die Expression der Cannabinoidrezeptoren CB1 und CB2 korreliert mit der Sensitivität der Zellen gegenüber dem THC.....	61
4.7. Die Wirkung des THC wird sowohl durch den CB1 als auch den CB2 Rezeptor vermittelt.....	63
5. Diskussion .....	66
6. Zusammenfassung .....	73
7. Anhang .....	75
Abbildungsverzeichnis.....	75
Tabellenverzeichnis .....	76
Literaturverzeichnis .....	77
Veröffentlichung .....	86
Erklärung zum Eigenanteil .....	87
Danksagung .....	88



**Abkürzungsverzeichnis**

a.d.	aqua destillata
Abb	Abbildung
Ak	Antikörper
AML	Akute myeloische Leukämie
ALL	Akute lymphoblastische Leukämie
APML	Akute Promyelozyten-Leukämie
ATO	Arsentrioxid
ATRA	all-trans-Retinsäure
Bis	Bis(2-hydroxyethyl)amino
BSA	Bovine serum albumin
CB	Cannabinoid
CD	Cluster of differentiation
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoff-Dioxid
DA	Dalton
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
FAB	Französisch-Amerikanisch-Britische Klassifikation
FACS	fluorescence activated cell sorting
FBS	Fetal bovine serum
FITC	Fluorescein-5-isothiocyanat
FSC	forward scattered
GM-CSF	Granulocyte macrophage colony- stimulating factor
h	Stunde
HCL	Chlorwasserstoff
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1- piperazineethanesulfonic acid
IC50	mittlere inhibitorische Konzentration
k	kilo
LC50	Mittlere letale Konzentration

---

LDS	lithium dodecyl sulfate
M	Molar
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
ml	Milliliter
MLL	Myeloische und lymphatische Leukämie
mM	Millimolar
MOPS	3-(N-morpholino)propanesulfonic acid
μl	Mikroliter
μM	Mikromolar
N/A	Nicht angegeben
NaCl	Natrium-Chlorid
NEAA	Nicht Essentielle Aminosäuren
nm	Nanometer
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
PBS	phosphate buffered saline
PBST	Phosphate Buffered Saline Tween-20
PE	Phycoerythrin
PI	Propidium Jodid
PS	Phosphatidylserin
RPMI (Medium)	Roswell Park Memorial Institute (medium)
SDS	sodium dedecyl sulfate
SSC	Side Scattered
TCEP	tris(2-carboxyethyl)phosphine
THC	Tetrahydrocannabinol
Tris	Tris(hydroxymethyl)methane
U/min	Umdrehung pro Minute
v/v	Volumen/Volumen
WHO	World Health Organization

## **1. Einleitung**

In mehreren Arbeiten und anhand mehrerer Tumormodelle konnte in der Vergangenheit ein antitumoröser Effekt von Dronabinol (THC) gezeigt werden. Allerdings existieren hierzu für die heterogene Gruppe der akuten Leukämien teilweise kontroverse Daten.

Anekdotische Hinweise führten uns zu der Vermutung, dass der THC-Konsum eines an AML erkrankten Patienten dazu beigetragen hat, seine Erkrankung über mehrere Jahre in einem kontrollierbaren Zustand zu halten. Um dieser Vermutung weiter nachzugehen, untersuchten wir in dieser Arbeit systematisch sowohl Leukämiezellreihen in vitro als auch native, leukämische Blasten ex vivo hinsichtlich der antiproliferativen und proapoptotischen Wirkung von THC.

Anhand von Expressionsanalysen der beiden Cannabinoidrezeptoren CB1 und CB2, sowie unter Einsatz entsprechender Inhibitoren, wurde im Weiteren die Spezifität von CB1/2 hinsichtlich der Vermittlung der beobachteten antileukämischen Effekte untersucht.

Unsere Untersuchungen werden eine weiterführende, klinische Evaluierung von THC als ein relativ nebenwirkungsarmes Therapeutikum in der Behandlung einer definierten Kohorte von Leukämie Patienten begründen.

### **1.1. Die Akute myeloische Leukämie**

#### **1.1.1. Definition und Epidemiologie**

Die Akute myeloische Leukämie (AML) ist eine Gruppe von malignen Erkrankungen des myeloischen Teils des hämatopoetischen Systems. Sie ist charakterisiert durch die klonale Expansion von nicht bzw. nicht ausreichend differenzierten, unreifen Zellen der Myelopoese (Blasten) im Knochenmark mit Übergreifen auf extramedulläre Organe und Ausschwemmung ins periphere Blut. Im Verlauf der Erkrankung kommt es zum Verdrängen der physiologischen Blutbildung mit einer damit verbundenen Thrombozytopenie, Anämie und Granulozytopenie [1].

Insgesamt machen Leukämien 2,8% aller Krebsneuerkrankungen aus. Die AML ist die häufigste akute Leukämie im Erwachsenenalter mit einer Inzidenz von 4,6/100 000 pro Jahr bei Männern und 3,0/100 000 Neuerkrankungen pro Jahr bei Frauen. Das Durchschnittsalter bei Diagnosestellung beträgt 65 Jahre und die Inzidenz steigt mit dem Alter an. Von 2000 bis 2003 lag die Inzidenzrate in den USA bei 1,8/100 000 bei Patienten unter 65 Jahren; wohingegen sie bei Patienten älter als 65 Jahren 17,0/100 000 betrug. Während bei Patienten <60 Jahre in den letzten Jahrzehnten erhebliche Fortschritte in Bezug auf Therapie und Überleben erzielt werden konnte, bleibt die Prognose bei älteren Patienten trotz aller Therapieoptimierungsversuche weiter schlecht [2].

Die geringeren Überlebensraten älterer Menschen beruhen hierbei vor allem auf dem überdurchschnittlich häufigen Auftreten von prognostisch schlechten genetischen Veränderungen und der Tatsache, dass auf Grund der Häufung von Komorbiditäten im Alter eine intensive Behandlung nicht toleriert wird [21].

Dies unterstreicht die Notwendigkeit von alternativen Therapiemöglichkeiten vor allem bei älteren, multimorbiden Patienten.

### **1.1.2. Diagnose, Einteilung und Ätiologie der AML**

Die Diagnose erfolgt durch zytomorphologische und immunphänotypische Analysen des Knochenmarks oder dem peripheren Blut durch den Nachweis leukämischer Zellen [3]. Ergänzend hierzu werden zytogenetische und molekularbiologische Mutationsanalysen durchgeführt, die einen immer wichtigeren Stellenwert einnehmen.

Die systematische Einteilung der AML erfolgt durch zwei Klassifikationen. Zum einen die Mitte der 1970er Jahre eingeführte French-British-American (FAB) Klassifikation, die sich vornehmlich auf morphologischen, zytochemischen Befunden der Blasten, sowie auf den unterschiedlichen Anteilen differenzierter myeloischer Zellen stützt [4].

**Tabelle 1:** FAB-Klassifikation der AML

FAB Subtyp	Bezeichnung	Inzidenz [%]
M0	AML mit minimaler Differenzierung	3
M1	AML ohne Ausreifung	15-20
M2	AML mit Ausreifung	25-30
M3	Akute Promyelozyten-Leukämie (APML)	5-10
M4	Akute Myelomonozytäre Leukämie	25-30
M5a	Akute Monoblasten Leukämie	2-10
M5b	Akute Monozyten Leukämie	
M6	Akute Erythroleukämie	3-5
M7	Akute Megakaryoblasten-Leukämie	3-12

Der Fortschritt in der Analyse genetischer und molekularbiologischer Charakteristika spiegelt sich in der revidierten WHO-Klassifikation für hämatologische Neoplasien von 2016 wieder. Diese Klassifikation basiert in großem Maße auf genetischen Merkmalen. [5]

Aufgrund der aktuellen klinischen Entwicklung spielt die FAB-Klassifikation praktisch keine Rolle mehr und wurde von der WHO-Klassifikation abgelöst.

**Tabelle 2:** WHO- Klassifikation akuter myeloischer Leukämien

AML Typ	Subtypen
<b>AML mit wiederkehrenden genetischen Abnormalitäten</b>	AML mit t(8;21)(q22;q22.1);RUNX1-RUNX1T1; AML mit inv(16)(p13.1q22) oder t(16;16)(p13.1;q22);CBFB/MYH11; Akute Promyelozyten-Leukämie mit PML-RARA; AML mit t (9;11)(p21.3;q23.3);MLLT3-KMT2A; AML mit t(6;9)(p23;q34.1);DEK-NUP214; AML mit inv(3)(q21.3;q26.2) oder t(3;3)(q21.3;q26.2);GATA2, MECOM; AML (megakaryoblastisch) mit t(1;22)(p13.3;q13.3); RBM15-MKL1; (provisorisch) AML mit BCR-ABL1

	AML mit mutiertem NPM1 AML mit biallelischen Mutationen von CEBPA (provisorisch) AML mit mutiertem RUNX1
<b>AML mit Myelodysplasie-assoziierten Veränderungen</b>	
<b>Therapie-assoziierte myeloische Neoplasie</b>	
<b>AML nicht anderweitig klassifiziert</b>	Minimal differenzierte AML AML ohne Ausreifung (M0) AML mit Ausreifung (M1) Akute myelomonozytäre Leukämie (M4) Akute monoblastische/monozytäre Leukämie (M5) Akute erythroide Leukämie (M6) Akute megakaryoblastische Leukämie (M7) Akute basophile Leukämie Akute Panmyelose mit Markfibrose
<b>Myeloisches Sarkom</b>	
<b>Myeloische Proliferation bei Down-Syndrom</b>	Transient abnorme Myelopoese AML assoziiert mit Down-Syndrom
<b>Blastisch plasmazytoide Neoplasie der dendritischen Zellen</b>	
<b>Akute Leukämie unklarer Linienzugehörigkeit</b>	Akute undifferenzierte Leukämie Gemischt-phänotypische akute Leukämie mit t(9;22)(q34.1;q11.2);BCR-ABL1 Gemischt-phänotypische akute Leukämie mit t(v;11q23.3);KMT2A rearrangiert; Gemischt-phänotypische akute Leukämie, B/myeloid, nicht anderweitig klassifiziert; Gemischt-phänotypische akute Leukämie, T/myeloid, nicht anderweitig klassifiziert

Trotz der breitgestreuten, multifaktoriellen Genese der AML kann man diese grundsätzlich in eine primäre (de novo AML) und sekundäre Form (s-AML) einteilen; je nachdem ob die ursächlichen Mutationen spontan oder auf Grund von bestimmten Risikofaktoren oder auf dem Boden eines Myelodysplastischen Syndroms (MDS) auftreten. Solche Risikofaktoren sind vor allem Noxen, die die Vorläuferzellen schädigen wie etwa das Benzol [6].

Auch radioaktive Strahlung kann die Entstehung der AML auslösen. Nach den Atombombenabwürfen über Hiroshima und Nagasaki 1945 entwickelten eine Vielzahl der Überlebenden, die einer erhöhten Strahlung ausgesetzt waren, diese Form der Leukämie. Die Inzidenz der AML stieg in den Regionen um das ca. 30fache an [7]. Auch der Reaktorunfall in Tschernobyl 1986 verursachte ein Ansteigen der AML Inzidenz [8].

Eine weitere Untergruppe der sekundären AML bilden die therapieassoziierten AML (t-AML). Hier sind es im Besonderen die Alkylantien wie etwa das Cyclophosphamid oder das Mechlorethin und die Topoisomerase II Inhibitoren z.B. Etoposid, Teniposid, die die Wahrscheinlichkeit an einer AML zu erkranken signifikant erhöhen [9,10]. Kwong et al. weisen in ihrer Studie darauf hin, dass auch das Immunsuppressivum Azathioprin die Entstehung einer sekundären AML fördern kann [11].

Neben diesen Noxen und Zytostatika werden auch genetische Faktoren als Auslöser der AML diskutiert. Beispielsweise ist das RUNX1 Gen bei betroffenen Familienmitgliedern mit autosomal dominanter Thrombozytopenie mutiert. Viele dieser Betroffenen haben eine hohe Prädisposition für die Entwicklung einer AML - als neue, provisorische AML-Entität in der revidierten WHO-Klassifikation für hämatologische Neoplasien von 2016 aufgenommen - im Erwachsenenalter [12]. Allerdings gilt es als gesichert, dass einige genetisch bedingte Erkrankungen mit einem signifikant erhöhten Risiko an einer AML zu erkranken einhergehen. Hierzu zählt beispielsweise das Down Syndrom bei dem die Betroffenen ein bis zu 20-fach erhöhtes Risiko aufweisen [13]. Andere Beispiele sind etwa die Fanconi Anämie [14], die Diamond-Blackfan-Anämie [15] oder die Ataxia teleangiectasia [16].

### **1.1.3. Molekulare Pathogenese**

Die AML, ähnlich anderer Krebsarten, ist das Ergebnis verschiedener genetischer sowie epigenetischer Veränderungen der myeloischen Vorläuferzellen, die letztlich zu einem Proliferations- und Überlebensvorteil bei gleichzeitiger Störung der Differenzierung und Apoptose führen.

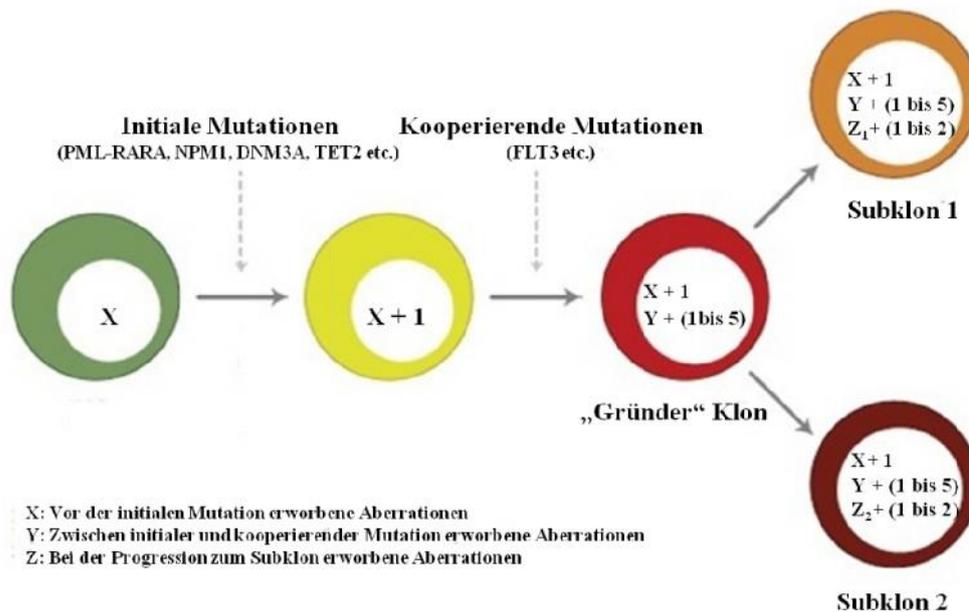
Durch umfangreiche Sequenzierungsverfahren (Whole Genome Sequencing) wurde kürzlich das komplette Genom von 200 AML Erkrankter entschlüsselt. Neben bekannten rekurrenten, zytogenetischen Aberrationen (z.B. t(15;17), t(9;21), t(8;21), inv(16) etc.) sind damit nun praktisch alle relevanten molekularen Mutationen, wie Punktmutationen oder Tandemduplikationen, die in einer chromosomalen Analyse nicht erkannt werden, bekannt [17].

Die Vielzahl der identifizierten, signifikant mutierten Gene lässt sich grob in 9 für die Pathogenese der AML relevante, funktionelle Gruppen gliedern:

- (1) Fusionsgene (z.B. PML-RARA, RUNX1-RUNX1T1 etc.)
- (2) das Nucleophosmin codierende Gen NPM1
- (3) Tumorsuppressorgene (z.B. TP53, WT1 etc.)
- (4) mit der DNA-Methylierung assoziierte Gene (z.B. DNMT3A/B, IDH1/2 etc.)
- (5) für Signalproteine kodierende Gene (z.B. FLT3, KIT, KRAS/NRAS etc.)
- (6) Chromatin-modifizierende Gene (z.B. MLL-PTD, ASXL1 etc.)
- (7) Gene der myeloischen Transkriptionsfaktoren (z.B. RUNX1, CEBPA etc.)
- (8) für Cohesine und (9) das Spliceosom relevante Gene.

Bemerkenswert ist die Tatsache, dass mit durchschnittlich 13 codierenden Mutationen pro Genom bei akuten Leukämien wesentlich weniger molekulargenetische Veränderungen vorzuliegen scheinen als bei den meisten anderen Neoplasien Erwachsener, die weit über 100 molekulare Aberrationen aufweisen können [17]. Die meisten dieser Mutationen haben selbst wahrscheinlich kein eigenes leukämogenes Potential („passenger mutation“) und wurden durch physiologische Alterungsprozesse der hämatopoetischen Progenitorzelle erworben. In nahezu allen untersuchten Proben konnte aber wenigstens eine initiale, leukämogene „driver“ Mutation identifiziert werden. Ein Großteil der zufällig erworbenen Mutationen wird auf Grund des klonalen Wachstums in den Zellen konserviert und führt so zu dem individuellen, genetischen Muster der einzelnen Klone bzw. Subklone [18]. In den meisten Fällen sind dann wahrscheinlich mindestens zwei kooperierende „driver“ Mutationen notwendig um den akuten Leukämieklon zu generieren.

Weitere Aberrationen in den von ihm abstammenden Zellen führen in der Folge zu Subklonen, die zur Progression oder Rezidiv der Erkrankung (z.B. durch Therapierefraktärität einiger Subklone) beitragen können.



**Abb.1 (modifiziert nach [18]): Modell der Leukämogenese der AML**  
 Modell über den Ursprung von initialen, leukämogenen und zusätzlichen, kooperierenden „driver“-Mutationen während der Evolution der AML von der hämatopoetischen Progenitorzelle (grün dargestellt) bis zum AML-dominierenden „Gründer“-Klon (rot dargestellt) respektive den daraus folgenden Subklonen.

#### 1.1.4. Prognosefaktoren

Die Prognosefaktoren lassen sich grob in zwei Gruppen einteilen: **patientenabhängige** und **AML-spezifische** Charakteristika. Die prognostische Bedeutung bezieht sich hierbei auf das Ansprechen auf die Induktionstherapie, das Rezidivrisiko und das Gesamtüberleben.

Einen der wichtigsten **patientenabhängigen** Prognosefaktoren stellt hierbei das Patientenalter dar. Studien zeigen, dass die Prognose mit zunehmendem Alter der Erkrankten schlechter wird, bezogen auf das Ansprechen auf die Therapie und

Gesamtüberleben [21]. Ältere Patienten (definiert als über 60 Jahre) zeigen signifikant niedrigere Remissionsraten und 5-Jahres Überlebensraten [23].

Darüber hinaus zeigen Patienten mit Sekundärleukämien, also entstanden auf dem Boden einer Myelodysplasie oder Myeloproliferativem Syndrom – oder induziert durch Chemotherapeutika im Rahmen eines vorbestehenden Malignoms oder AML geringe Remissions- und Überlebensraten [24].

Den wohl wichtigsten AML-abhängigen Prognosefaktor stellt das molekulare Profil, also aberrante Genexpressionsmuster, dar. Es existieren verschiedene Prognosescores. Der aktuelle Score des Europäischen Leukämienetzwerks ist in Tabelle 3 dargestellt. Die Erkrankten werden hier in vier definierte Risikogruppen eingeteilt: günstig, intermediär I und II und ungünstig [25].

**Tabelle 3:** Risikoklassifikationen der AML

Risikogruppe	Zyto- bzw. molekulargenetische Merkmale
günstig	t(8;21)(q22;q22); RUNX1-RUNX1T1 inv(16)(p13.1;q22) oder t(16;16)(p13.1;q22); CBFβ-MYH11 NPM1 Mutation ohne FLT3-ITD (normaler Karyotyp) CEBPA Mutation (normaler Karyotyp)
intermediär I	NPM1 Mutation und FLT3-ITD (normaler Karyotyp) Wildtyp NPM1 mit FLT3-ITD (normaler Karyotyp) Wildtyp NPM1 ohne FLT3-ITD (normaler Karyotyp)
intermediär II	t(9;11)(p22;q23); MLLT3-MLL Zytogenetische Veränderungen, welche weder günstige noch ungünstige Aberrationen darstellen
ungünstig	inv(3)(q21q26.2) oder t(3;3)(q21;q26.2); RPN1-EVI1 t(6;9)(p23;q34); DEK-NUP214 t(v;11)(v;q23); MLL Fusionstranskripte (außer MLLT3-MLL) -5 oder del(5q); -7; abn(17p); komplexer Karyotyp*

\*definiert durch das Vorliegen mindestens drei zytogenetischer Veränderungen ohne Vorliegen folgender Veränderungen, welche eine gesonderte Klassifikation bewirken: t(15;17), t(8;21), inv(16) oder t(16;16), t(9;11), t(v;11)(v;q23), t(6;9), inv(3) oder t(3;3)

In den vergangenen Jahren wurden erhebliche Fortschritte beim Auffinden genomischer Variationen mit unabhängiger Prognoserelevanz erzielt. Beispielsweise zeigen MLL-partial tandem duplication (MLL-PTD) oder ein positiver Mutationsstatus des WT1 Gens prognostisch ungünstige Auswirkungen [26,27].

Die Bewertung neu identifizierter molekulargenetischer sowie epigenetischer Veränderungen (wie etwa Mutationen des IDH1/2-, TET2-RUNX1 Gens) hinsichtlich ihrer prognostischen Relevanz ist Gegenstand aktueller Forschung.

### 1.1.5. Therapieoptionen bei der AML

Akute Leukämien sind potenziell heilbar. Der Heilungserfolg kann mittels o.g. Prognosefaktoren abgeschätzt werden.

Ziel der Therapie der AML ist das Erreichen einer dauerhaften, kompletten Remission.

**Tabelle 4:** Definition des Therapieansprechens (Auszug aus Table 5 in [25])

Therapieergebnis	Definition
komplette Remission (CR)	< 5 % Blasten im Knochenmark, keine peripheren Blasten, kein extramedullärer Krankheitsnachweis, peripheres Blutbild: Granulozyten > 1000/ $\mu$ l; Thrombozyten > 100000/ $\mu$ l mit Transfusionsunabhängigkeit für Erythrozyten, Granulozyten
Komplette Remission mit inkompletter Regeneration (CRi)	Erfüllung der CR Kriterien außer der Granulozyten (<1000/ $\mu$ l) oder Thrombozyten (<100000/ $\mu$ l)

Die Therapie der Wahl zur Erlangung einer Kuration stellt eine intensive Chemotherapie dar, die ggf. stadienabhängig mit einer allogenen Stammzelltransplantation (SZT) kombiniert werden muss:

Bei der Chemotherapie unterscheidet man zwischen einer Induktions- und einer Konsolidierung/Postremissionstherapie.

Rückgrat der Induktionstherapie stellt eine Cytosin-Arabinosid (Ara-C) und Anthrazyklin haltige Chemotherapie dar (z.B. „3+7“ Schema) [28].

Nach Erreichen einer hämatologischen Remission (CR) muss in aller Regel eine weitere intensive Postremissionschemotherapie angeschlossen werden, da ansonsten mit einem schnellen Rezidiv zu rechnen ist. Ausschlaggebend für die Art der Postremissionstherapie sind das Risikoprofil der AML und der Allgemeinzustand des Patienten [26]. Ggf. ist im Rahmen der Postremissionstherapie stadienabhängig eine SZT sinnvoll.<sup>1</sup> [29].

Fortschritte im Verständnis der molekularen Pathogenese der AML haben in den vergangenen Jahren zur Entwicklung von gezielten, individualisierten Therapiemöglichkeiten geführt [30]. Den prinzipiellen Beweis der erfolgreichen molekular-definierten Therapie erbrachte die Behandlung der - historisch aggressivsten - Subentität der Promyelozytenleukämie mit einem Vitamin A-Derivat (all-trans-Retinsäure, ATRA) und Arsenitrioxid (ATO), was zur Degradation der Leukämie-initiiierenden Translokation (t(15;17)(q22;q12), Zellredifferenzierung und Seneszenz des malignen Stammzellklons führt [31]. Hier konnte in einer kürzlich vorgestellten internationalen Studie zu 100% eine komplette molekulare Remission erzielt werden [32].

Auch epigenetische Therapieansätze wurden in den letzten Jahren auf ihre Wirksamkeit bei hämatologischen Neoplasien untersucht. Die demethylierenden Agentien Azacitidin (Handelsname Vidaza®) und Decitabin (Handelsname Dacogen®) sind für die Behandlung des MDS (Azacitidin) und der AML (Decitabin) zugelassen. Beide Pharmaka inhibieren DNA-Methyltransferasen (DNMTs) und können so Remissionen oder klinische Verbesserungen induzieren. Bei Patienten mit MDS senken sie das Risiko einer Transformation zur AML [33,34].

Ein großer Vorteil epigenetischer Therapien ist, dass sie ein vergleichsweise günstiges Nebenwirkungsprofil besitzen - und speziell ältere und komorbide Patienten haben von dieser Therapiestrategie in den letzten Jahren zunehmend profitiert [35].

---

<sup>1</sup> Bei der allogenen SZT wird ein Stammzellpräparat von einem HLA-identen Familien- oder Fremdspender appliziert, mit dem Ziel der Induktion einer Immunreaktion gegen den leukämogenen Klon (Transplantat bzw. Graft gegen Leukämie Reaktion, GvL)

Diese Therapiestrategie folgt also einem völlig neuen Konzept und ist Gegenstand intensiver klinischer und präklinischer Studien.

## **1.2. Die Akute lymphatische Leukämie**

### **1.2.1. Definition und Epidemiologie**

Die akute lymphatische Leukämie (ALL) beruht auf einer malignen, klonalen Expansion unreifer, lymphatischer Vorläuferzellen aus Knochenmark, Thymus oder lymphatischem Gewebe. Ähnlich wie bei der AML kommt es auch hier zu einer Verdrängung der normalen, intramedullären Hämatopoese. Ebenfalls kann es hier zu einem Übertritt der Blasten ins periphere Blut und in der Folge zur Infiltration peripherer Organe kommen. Die ALL hat eine Gesamtinzidenz von ca. 1,1/100 000 pro Jahr. Sie betrifft sowohl Kinder als auch Erwachsene mit der höchsten Prävalenz zwischen 1 und 5 Jahren [36].

Sie stellt mit ca. 30% die häufigste maligne Erkrankung im Kindesalter dar. Bei Erwachsenen steigt ihre Inzidenz mit dem Alter an. Bezogen auf den Zeitraum von 2009-2013 betrug das durchschnittliche Mortalitätsalter in den USA 54 Jahre. Etwa 15,6 % starben vor dem 20. Lebensjahr, 34,5 % zwischen 20 und 54 Jahren und ca. 49,9% nach dem 54. Lebensjahr [37].

### **1.2.2. Diagnose und Einteilung der ALL**

Neben Anamnese, körperlicher Untersuchung und Differentialblutbild stellt die Analyse des Knochenmarkes den wichtigsten Schritt bei der Diagnostik der ALL dar. Hierzu zählt die Zytomorphologie, Zytochemie, Immunphänotypisierung sowie zyto- und molekulargenetische Untersuchungen auf charakteristische Veränderungen der Blasten [38].

Die Einteilung nach der FAB Klassifikation schlägt eine Untergliederung anhand von morphologischen Merkmalen in drei Kategorien, L1, L2 und L3 vor [4]. Mit Ausnahme der L3 Untergruppe, die typisch für die B-ALL ist, hat diese Einteilung heute keine klinische Bedeutung mehr.

Weitaus wichtigere Unterteilungsmöglichkeiten der ALL bieten die Klassifikationen anhand des Immunphänotyps (Tabelle 5) sowie die von der WHO vorgeschlagene und 2016 überarbeitete Klassifikation für akute Leukämien (Tabelle 6) [5, 39].

**Tabelle 5:** Immunologische Klassifikation der ALL

<b>ALL-Subtyp</b>	<b>Charakteristische Antigenexpression</b>
<b>B-Vorläufer-Zell-ALL</b>	2 von 3 Markern pos.: CD19 und/oder CD79a und/oder CD22; außerdem meist TdT+, HLA-DR+
- pro-B ALL	keine zusätzl. Marker
- Common (c) -ALL	CD10+, cyIgM-
- Prä-B-ALL	cyIgM+, CD10 +/-, SIgM
Reife B-ALL	wie B-Vorläufer, aber zusätzl. SIgM+ (mit kappa- oder lambda-Leichtkettenrestriktion), CD10 +/-, TdT-/(+)
<b>T- Vorläufer-Zell-ALL</b>	cytopl./membr. CD3+; meist TdT+, HLA-DR-CD34-
Frühe T-ALL (pro-und prä-T)	CD7+ (pro-T); CD2+ u./o. CD5+ u./o. CD8+ (prä-T)
Intermediäre (kortikale T-ALL)	CD1a+, CD7+
Reife T-ALL	CD3+, CD1a-
<b>AUL</b>	Unklassifizierbar; unabhängig von HLA-DR, TdT oder CD34 Reaktion; CD45 positiv, ohne Nachweis von B-, T oder myeloischen Antigenen

cy: zytoplasmatisch; SIgM: Oberflächen-(Surface-)Immunglobulin IgM

**Tabelle 6:** WHO Klassifikation der akuten, lymphatischen Leukämien

<b>ALL Typ</b>	<b>Subtypen</b>
<b>Akute Leukämie unklarer Linienzugehörigkeit</b>	Akute undifferenzierte Leukämie Gemischt-phänotypische akute Leukämie mit t(9;22)(q34.1;q11.2);BCR-ABL1 Gemischt-phänotypische akute Leukämie mit

	t(v;11q23.3);KMT2A rearrangiert; Gemischt-phänotypische akute Leukämie, B/myeloid, nicht anderweitig klassifiziert; Gemischt-phänotypische akute Leukämie, T/myeloid, nicht anderweitig klassifiziert
<b>B lymphoblastische Leukämie/Lymphom</b>	B lymphoblastische Leukämie/Lymphom nicht anderweitig spezifiziert
<b>B lymphoblastische Leukämie/Lymphom mit wiederkehrenden genetischen Abnormalitäten</b>	B lymphoblastische Leukämie/Lymphom mit t(9;22)(q34.1;q11.2);BCR-ABL1; B lymphoblastische Leukämie/Lymphom mit t(v;11q23.3); KMTA2 rearrangiert; B lymphoblastische Leukämie/Lymphom mit t(12;21)(p13.2;q22.1);ETV6-RUNX1; B lymphoblastische Leukämie/Lymphom mit Hyperdiploidie (d.h. Vermehrung der Chromosomen); B lymphoblastische Leukämie/Lymphom mit Hypodiploidie (d.h. Verminderung der Chromosomen); B lymphoblastische Leukämie/Lymphom mit t(5;14)(q31.1;q32.3);IL3-IGH; B lymphoblastische Leukämie/Lymphom mit t(1;19)(q23;p13.3) TCF3-PBX1; (provisorisch) B lymphoblastische Leukämie/Lymphom, BCR-ABL1 ähnlich; (provisorisch) B lymphoblastische Leukämie/Lymphom mit iAMP21
<b>T lymphoblastische Leukämie/Lymphom</b>	(provisorisch) Frühe akute T-Vorläuferzell Leukämie
<b>(Provisorisch) Natürliche Killerzell (NK) -Leukämie/Lymphom</b>	

### 1.2.3. Ätiologie und Pathogenese

Die genauen Ursachen für die Entwicklung einer ALL sind bis heute noch nicht vollständig geklärt. Nur ein kleiner Anteil (ca. 5%) ist assoziiert mit erblichen, prädisponierenden genetischen Syndromen, wie etwa dem Down Syndrom oder der Fanconi Anämie [13]. Darüber hinaus zeigen sich Benzol, radioaktive Strahlung sowie

einige therapeutisch eingesetzte Zytostatika, in Analogie zur AML, als potenzielle Risikofaktoren für die Entstehung einer ALL [6,7]. Ein hohes Geburtsgewicht von über 4500g scheint ein weiterer Risikofaktor für die kindliche ALL zu sein [40].

Wie bei der AML führen auch bei der ALL genetische Läsionen in lymphatischen Vorläuferzellen, die vor allem die Proliferation, Differenzierung und Apoptose steuern zu einem Überlebensvorteil bei gleichzeitiger, anormaler Entwicklung dieser Zellen und in der Konsequenz letztlich zur expansiven Vermehrung dieses neoplastischen Klons [41].

#### **1.2.4. Prognosefaktoren der ALL**

Die ALL stellt ein sehr heterogenes Krankheitsbild dar und deshalb ist eine möglichst vollständige klinische, immunologische sowie zytogenetische Charakterisierung der Patienten notwendig um Subgruppen mit unterschiedlicher Prognose hinsichtlich Therapieansprechen und Rezidivwahrscheinlichkeit zu identifizieren.

Das Alter bei Erstdiagnose hat einen starken prognostischen Effekt. Die 5-Jahres-Überlebensrate liegt bei Kindern zwischen einem und neun Jahren bei durchschnittlich 88% wohingegen sie bei Erkrankten über 15 Jahren bei ca. 69 % liegt [42]. Die Therapieeffektivität verschlechtert sich darüber hinaus mit zunehmendem Alter der Erwachsenen, was in erster Linie auf das Vorhandensein von Komorbiditäten, schlechtere Verträglichkeit der Chemotherapie sowie der erhöhten Wahrscheinlichkeit von ungünstigen Prognosefaktoren zurückzuführen ist [43].

Weiterhin haben Patienten mit einer hohen Leukozytenzahl bei Diagnose eine schlechtere Prognose [44]. Darüber hinaus ist das frühe Therapieansprechen ein unabhängiger Prognosefaktor.

Wie bei der AML nehmen insbesondere auch molekulare Aberrationen einen zunehmend großen Stellenwert ein. Gut etabliert und assoziiert mit einer schlechten Prognose sind genetische Veränderungen, die das MLL/AF4 Gen betreffen. Weiter ist insbesondere bei erwachsenen Patienten – v.a. durch die neuen Therapiemöglichkeiten mit Tyrosinkinaseinhibitoren – die Translokation t(9;22)(q34;q11), die zu einem chimären Fusionsprotein von BCR mit ABL1 führt, prognostisch bedeutsam [45,46].

Auf Grund neuer Untersuchungsmethoden, wie etwa der Durchflusszytometrie und Analyse molekularer Gen- und Chromosomenaberrationen, ist es heute möglich eine minimale Resterkrankung (MRD = minimal residual disease) auf einem sehr niedrigen Level zu identifizieren (<0,01% Blasten im Knochenmark). Patienten, die nach Induktionstherapie eine nach diesen Methoden festgestellte Remission erreichen, haben eine weitaus bessere Prognose als Erkrankte mit MRD positiver Resterkrankung nach Induktionstherapie [48,49].

### **1.2.5. Therapieoptionen bei der ALL**

Die Therapie der ALL besteht im Allgemeinen aus einer kombinierten Chemotherapie untergliedert in Induktionstherapie, gefolgt von einer Konsolidierungs- oder Intensivierungstherapie und letztlich einer Erhaltungstherapie. Die Therapieprotokolle strecken sich dabei über viele Monate. Gemäß neuerer Studien können so klinische Remissionen (<5% Blasten) bei ca. 95% der Kinder und zwischen 78 % und 93 % der Erwachsenen erreicht werden [50]. Therapierefraktäre Patienten haben eine sehr ungünstige Prognose.

Auf Grund der hohen Morbiditäts- und Mortalitätsraten wird die Indikation zu einer allogenen SZT in erster Remission nur bei Hochrisikopatienten gestellt. Hierzu zählen Betroffene mit Philadelphia-Chromosom (BCR-ABL1) positiver ALL oder MLL-assoziierten Chromosomenveränderungen, wie t(4;11) [51, 52].

Die Heilungschancen der ALL liegen bei Kindern bei etwa 87%. Trotz intensiver Erforschung neuer Therapieansätze können nur etwa 30 % - 40 % der Erwachsenen von der ALL geheilt werden. Dies ist unter anderem auf den höheren Anteil an Leukämieformen mit Hochrisikoprofil sowie die höheren Morbiditäts- und Mortalitätsraten durch die intensive Therapie zurückzuführen [47].

### **1.3. Cannabinoide und das Endocannabinoide System**

Die therapeutischen Anwendungsmöglichkeiten von Marihuana sind bereits seit mehreren Jahrhunderten bekannt [53]. Die Pflanze Cannabis sativa enthält neben zahlreicher andere chemischer Komponenten circa 60 verschiedene Cannabinoide. Ihr

Hauptbestandteil, das 1964 von Gaoni und Mechoulam strukturell beschriebene Delta9-Tetrahydrocannabinol (THC), ist das Cannabinoid mit der potentesten psychoaktiven Wirkung [54]. Sowohl die Entdeckung der Cannabinoid Rezeptoren als auch die Isolierung von endogenen, körpereigenen Cannabinoid-Agonisten (Endocannabinoiden) Anfang der 1990er Jahre bestätigten das Vorhandensein eines Endocannabinoid-Systems [55]. Zahlreiche Untersuchungen der letzten Jahre gaben Aufschluss über die Rolle dieses Systems bei der Regulierung unterschiedlicher, physiologischer Funktionen wie beispielsweise der Nozizeption oder der Modulation des Immunsystems.

Abgesehen von seiner psychoaktiven Wirkung haben Cannabinoide – bei einem sonst guten Nebenwirkungsprofil – Effekte, die man sich klinisch zu Nutze machen kann [56]. Beispielsweise finden sie auf Grund ihrer antiemetischen und Appetit-induzierenden Wirkung Anwendung bei der Behandlung von AIDS oder Tumorpatienten [57–59]. Weiter konnte gezeigt werden, dass mit THC (5mg/Tag) positive Effekte auf Mobilität, Spastik und Schmerz bei MS-Patienten hat [60]. Darüber hinaus hat THC positive Einflüsse auf chronische Schmerzsyndrome, vor allem bei der gleichzeitigen Gabe von Morphinen [61].

#### **1.4. Die Cannabinoidrezeptoren und ihre vermittelten Wirkungen**

Die Cannabinoide vermitteln ihre Wirkung vorrangig über die G-Protein-gekoppelten Cannabinoidrezeptoren [62]. Bislang wurden zwei Subtypen dieser Rezeptoren entdeckt, der Cannabinoidrezeptor 1 (CB1) und der Cannabinoidrezeptor 2 (CB2).

Der CB1 Rezeptor ist vorrangig im Gehirn lokalisiert, im Hippocampus, Basalganglien, zerebralem Kortex, Amygdala und Kleinhirn [63–65]. Er konnte aber auch, wenn auch in geringerem Ausmaß, in der Milz, dem Uterus, in den Ovarien und in der Prostata identifiziert werden [66]. Im Gegensatz dazu wurde der CB2 Rezeptor zunächst im lymphatischen System beschrieben [62], konnte aber auch in anderen Geweben nachgewiesen werden wie etwa im Gehirn [67], der Haut [68] und im Skelettsystem [69].

Auf Grund neuer Daten verschiedenster Experimente mit CB1 knockout-Mäusen wird über das Vorhandensein zusätzlicher G-Protein gekoppelter Cannabinoid-Rezeptoren spekuliert. Die Behandlung dieser Mäuse mit CB1-Agonisten führte trotz Fehlen des CB1 Rezeptors zu den Cannabinoid-typischen, intrazellulären Veränderungen. Diese Effekte konnten auch mit den spezifischen Antagonisten nicht inhibiert werden [70, 71]. Sowohl CB1 als auch CB2 gehören zur Familie der G-Protein- gekoppelten Rezeptoren. Sie verringern vor allem über G<sub>i</sub>-Proteine die Aktivität der Adenylylcyclase und somit auch die intrazelluläre Konzentration des cAMP (cyclisches Adenosinmonophosphat) [72].

Es konnte gezeigt werden, dass Cannabinoide einen Wachstums-inhibierenden Effekt bei Tumormodellen, Tiermodelle mit eingeschlossen, haben. Hierbei führte die Behandlung entweder von CB1- oder CB2 Rezeptoragonisten bei den unterschiedlichen Tumormodellen zu einer Blockade der Proliferation, Aktivierung der Differenzierung oder Induktion von Apoptose der krankhaft veränderten Zellen und somit zu einem verringerten Tumorwachstum und Metastasierung [67, 73–76].

Beispielsweise konnten Sanchez et al. an einem Mausmodell zeigen, dass die Gabe von CB-Rezeptoragonisten das Wachstum von Glioblastomzellen nahezu vollständig blockieren kann [75].

Antitumoröse Effekte der Cannabinoide ließen sich in der Vergangenheit auch bei Modellen hämatopoetischer Neoplasien nachweisen. Die Behandlung von Mäusen mit einer bestimmten Lymphomentität mit THC führte zu einer signifikanten Reduktion der Tumormasse, steigender Tumorzell-Apoptose und verbesserte die Überlebensrate der Tumor tragenden Mausgruppe [77].

Dies führte zu einer Diskussion über die mögliche Anwendung von Cannabinoiden als Therapeutika bei Tumorerkrankungen [78].

### **1.5. Fragestellung der Arbeit**

Schon frühere Veröffentlichungen zeigen einen proapoptotischen Effekt der Cannabinoidrezeptor Agonisten auf akute Leukämiezellen in vitro [79–81]. Allerdings

basieren diese Studien größtenteils auf der Analyse von Zellen lediglich einer Zelllinie und haben somit limitierte Aussagekraft. Darüber hinaus herrscht keine Einigung über den genauen Mechanismus dieses Effekts (CB1 Rezeptor- oder CB2 Rezeptor-vermittelt) - bzw. wird für CB2 sogar eine gegenteilige Funktion als Onkoprotein beschrieben [82-84].

Ziel dieser Arbeit war es THC systematisch auf antiproliferative bzw. proapoptotische Eigenschaften bei akuten Leukämien hin zu untersuchen.

Darüber hinaus sollte auch der verantwortliche Rezeptor identifiziert werden.

Die bei den Zelllinien in vitro durchgeführten Untersuchungen wurden anschließend ex vivo an nativen, humanen Leukämie Blasten verifiziert. Auch hier wurden sowohl akute myeloische als auch lymphatische Patientenproben untersucht.

Für die Untersuchungen verwendeten wir das natürliche 9-Tetrahydrocannabinol Isomer Dronabinol (im Weiteren als THC bezeichnet), ein potenter Cannabinoidrezeptor (CB1 und CB2) Agonist. Dronabinol ist in den USA unter dem Handelsnamen Marinol® für die Behandlung von Chemotherapie-induzierter Übelkeit und zur Appetitanregung zugelassen.

Expressionsanalysen linienspezifischer Oberflächenmarker ermöglichten schließlich die Identifikation besonders therapiesensibler Entitäten.

Damit liefert diese Arbeit die theoretische Rationale für die klinische Erprobung von THC.

## **2. Material**

### **2.1. Verbrauchsmaterialien**

6-Lochplatten (Corning® CellBIND® 6 well plates)	Corning Incorporated
12- Lochplatten (Corning® CellBIND® 12 well plates)	Corning Incorporated
96- Lochplatten (Corning® CellBIND® 96 well plates)	Corning Incorporated
Elektrophoresegel (Criterion™ XT Precast Gel 10%-Bis-Tris)	Bio-Rad
Elektrophoresegel (Criterion™ XT Precast Gel 8%-Bis-Tris)	Bio-Rad
Eppendorf Tubes® 3810X	Eppendorf
FACS- Röhren (BD Falcon™ Round-Bottom Tubes)	BD Falcon™
Falcon-Röhren (BD Falcon™ Conical Tubes; 15ml, 75ml)	BD Falcon™
Filterpapier (Criterion™ Blotter Filter paper)	Bio-Rad
Handschuhe (unsteril)	Kimberly-Clark
Kryoröhrchen (CryoTube™ Vials)	Thermo Scientific
Kulturflaschen (250ml/75cm <sup>2</sup> )	BD Falcon™
Nitrozellulose Membran (Protran BA83)	Whatman™
Pipetten (verstellbar 10µl,100µl,200µl,1000µl)	Eppendorf
Pipetten (5ml,10ml,25ml,50ml)	BD Falcon™
Pipettenspitzen (10µl,100µl, 1000µl)	Eppendorf
Pipettierhilfe (Pipetboy)	Integra Biosciences

### **2.2. Geräte**

Begasungsbrutschrank (HERACell 240i CO <sub>2</sub> )	Thermo Scientific
FACSCalibur	Becton Dickinson
Gelelektrophoresekammer (Criterion™ Cell)	Bio-Rad
Heizblock (neo Block 1)	neoLab
Mikroskop (Diavert)	Leitz
Neubauer Zählkammer	Biochrom
Odyssey®	LI-COR®

Sicherheitswerkbank (HERAsafe)	Heraeus Instruments
Spannungsgerät (PowerPac™ HC)	Bio-Rad
Transferkammer (Criterion™ Blotter)	Bio-Rad
Vortex Mixer	neoLab
Wasserbad	Köttermann
Zentrifugen:	
Varifuge 3.0RS	Heraeus Instruments
Centrifuge 5415R	Eppendorf

### **2.3. Chemikalien, Reagenzien und Farbstoffe**

Bradford-Reagenz (Bio-Rad Protein Assay)	Bio-Rad
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Finnzymes
Ethanol (min 96%, vergällt mit 1% Methylethylketon)	Merck Millipore
Fetales Kälberserum (fetal bovine serum FBS)	Thermo Scientific HyClone®
Fluoresceinisothiocyanat (FITC) -Annexin V	Becton Dickinson
Glycin	Bio-Rad
Methanol (min. 99%)	Merck Millipore
Natrium-Pyruvat	Life – Technologies, GIBCO®
Nicht-essentielle Aminosäuren (NEAA)	Biochrom
Penicillin/Streptomycin (10000µg/ml)	Biochrom
Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™ Standards	Bio-Rad
Propidium-Jodid	Invitrogen
Rinder-Serumalbumin (bovine serum albumin BSA)	Carl Roth
TRIS (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan)	Sigma-Aldrich
Trypanblau 0,4%	Invitrogen
Tween® 20 (Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat)	Carl Roth
XT Reducing Agent (30% TCEP, 10% NaCl in H <sub>2</sub> O)	Bio-Rad

**2.4. Puffer, Lösungen und KITS**

<u>10x Annexin V Binding Buffer</u>	Becton Dickinson
0,1M Hepes (ph7,4)	
1,4M NaCl	
25mM CaCl <sub>2</sub>	
<u>20x MOPS Running Buffer</u>	Bio-Rad
30% MOPS	
30% Bis-Tris	
2% Natriumdodecylsulfat	
in H <sub>2</sub> O	
<u>Cell Proliferation Kit II XTT</u>	AppliChem
XTT Reagenz	
Elektronenkopplungsreagenz	
<u>Dulbecco`s PBS</u>	PAA Laboratories
137mM NaCl	
8,1mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	
2,7mM KCl	
1,5mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	
pH 7,4	
<u>Lysepuffer pro ml</u>	Sigma-Aldrich
911µl RIPA buffer	
150 mM NaCl	
1.0% IGEPAL® CA-630	
0.5% (v/v) Natrium - Deoxycholsäure	
0.1% (v/v) SDS	
50 mM Tris, pH 8.0	
50µl -Glycerophosphat (50mM)	
10µl Phosphatase-Inhibitor Cocktail 1	

Bromo-Levamisol-Oxalat  
Cantharidin  
Microcystin in DMSO  
10µl Phosphatase-Inhibitor Cocktail 2  
Natrium- Orthovanadat  
Natriummolybdat  
Natriumtartrat  
Imidazole  
10µl Natrium-Pyrophosphat (2mM)  
5µl Natrium- Orthovanadat (1mM)  
1µl Aprotinin (10mg/ml)  
1µl Leupeptin (10mM)  
1µl Pepstatin (1mg/ml)  
1µl Pefabloc® SC (4-(2-Aminoethyl)-benzensulfonylfluorid)

Transferpuffer

25mM Tris  
192mM Glycin  
20% (v/v) Methanol  
pH 8,3

XT Sample Buffer

40% Glycerin  
10% LDS  
20% Tris-HCl  
in H<sub>2</sub>O

Bio-Rad

**2.5. Antikörper, Wachstumsfaktoren, Antagonisten**

-Tubulin Antikörper (Maus)  
Anti-CD34 Antikörper (PE)

Cell Signaling Tech.  
Becton Dickinson

Anti-CD45 Antikörper (FITC)	Becton Dickinson
Humaner Cannabinoid-Rezeptor1 Antikörper (Ziege)	Sigma-Aldrich
Humaner Cannabinoid-Rezeptor2 Antikörper (Ziege)	Sigma-Aldrich
Humaner Cannabinoid-Rezeptor1 Antikörper (Hase)	Cell Signaling Tech.
Humaner Cannabinoid-Rezeptor2 Antikörper (Hase)	Cell Signaling Tech.
CB1 Rezeptorantagonist LY 320135	Sigma-Aldrich
CB2 inverser Agonist: JTE-907	Sigma-Aldrich
Cleaved Caspase 3 Antikörper (Hase)	Cell Signaling Tech.
Cleaved Caspase 9 Antikörper (Hase)	Cell Signaling Tech.
Goat Anti-Rabbit IgG H&L (FITC)	Cell Signaling Tech.
Humaner GM-CSF	Cell Signaling
IRDye®-conjugated donkey anti-rabbit/goat/mouse IgG	LI-COR®
SimulTest™ Control 1/1 (IgG <sub>1</sub> – FITC + IgG <sub>1</sub> – PE)	Becton Dickinson

## **2.6. THC**

Dronabinol ( 9-Tetrahydrocannabinol, THC), gelöst in Methanol, wurde von THC Pharm. (Frankfurt/Main, Deutschland) bezogen.

Dies geschah mit der Erlaubnis der Bundesopiumstelle des Bundesinstitutes für Arzneimittel und Medizinprodukte (BtM Nummer 4582772).

## **2.7. Zelllinien**

**Tabelle 7:** Überblick über die verwendeten Zelllinien

Zelllinie	Zelltyp und Zelleigenschaften	Referenz / Bezug
Kasumi-1	humane akute myeloische Leukämie (FAB M2) mit t(8;21) Translokation	[85] / DSMZ*
HL-60	humane akute myeloische Leukämie (FAB M2)	[86] / DSMZ
K-562	humane chronische myeloische Leukämie	[87] / Dr. Lopez, Oregon

	in Blastenkrisen	Health and Science University, Portland, OR
MV4-11	humane akute myeloische Leukämie (FAB M5) mit Translokation t(4;11) und FLT3 internen Tandemduplikation	[88] / DSMZ
M-07e	humane akute myeloische Leukämie (FAB M7), hGM-CSF abhängig	[89] / Dr. Heinrich, Oregon Health and Science University, Portland, OR
Molm-13	humane akute myeloische Leukämie (FAB M5a), sekundäre AML aus MDS, Schwesterzelllinie von Molm-14	[90] / Dr. Heinrich, Oregon Health and Science University, Portland, OR
Molm-14	humane akute myeloische Leukämie (FAB M5a), sekundäre AML aus MDS, Schwesterzelllinie von Molm-13	[90] / Dr. Heinrich, Oregon Health and Science University, Portland, OR
Jurkat	humane akute T-Zell Leukämie	[91] / DSMZ

\* Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen

## **2.8. Patientenproben**

Es wurden Knochenmarkaspirate oder Proben aus peripherem Blut von insgesamt 26 Patienten mit Erstdiagnose einer akuten Leukämie, jeweils 13 mit myeloischer und 13 mit lymphatischer Differenzierung, asserviert.

Das schriftliche Einverständnis der Patienten für die Konservierung von Zellmaterial zur Verwendung für wissenschaftliche Zwecke wurde individuell eingeholt. Ein positives Votum der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät Tübingen zu vorliegendem Projekt liegt vor (Projektnummer 405/2006BO2).

**Tabelle 8:** Überblick über die untersuchten Patientenproben

<b>Patientenkürzel</b>	<b>/</b>	<b>Alter</b>	<b>Entität</b>
M1		71	Sekundäre AML aus MDS
M2		50	AML (FLT3-ITD pos.)
M3		85	AML (nicht anderweitig klassifiziert)
M4		73	Promyelozytenleukämie (APML)
M5		73	AML (FLT3-ITD pos.)
M6		38	AML (FLT3-ITD pos.)
M7		62	undifferenzierte AML (M0)
M8		41	AML (FLT3-ITD pos.)
M9		N/A	AML (nicht anderweitig klassifiziert)
M10		21	AML (FLT3-ITD pos.)
M11		64	Sekundäre AML aus MDS
M12		N/A	undifferenzierte AML (M0)
M13		33	Core Binding Factor AML (inv(16))

L1		32	common B-ALL (bcr-abl pos.)
L2		50	Prä B-ALL
L3		21	common B-ALL
L4		22	Prä-B-ALL
L5		20	common B-ALL
L6		45	T-ALL (kortikal)
L7		64	common B-ALL (bcr-abl pos.)
L8		24	Prä B-ALL
L9		24	common B-ALL
L10		19	common B-ALL
L11		32	T-ALL (kortikal)
L12		31	common B-ALL (bcr-abl pos.)
L13		61	Prä B-ALL

## **3. Methoden**

### **3.1. Zellkultivierung**

Alle Zelllinien wurden in 10ml RPMI 1640-Kulturmedium nach Zugabe von 10% (v/v) FBS (fetales Kälberserum), 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin (10000 $\mu$ g/ml), 1% (v/v) Natrium-Pyruvat und 1% NEAA (nicht-essentielle Aminosäuren) in einem Brutschrank (bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O gesättigt) kultiviert.

Die Zelllinie M-07e ist Wachstumsfaktor abhängig – und wurde entsprechend mit 10ng/ml humanem Granulozyten-Makrophagen stimulierenden Faktor (GM-CSF) kultiviert. HL-60 wurde in Vollkulturmedium (RPMI 1640 Kulturmedium plus aller oben genannter Zusätze) mit 20% FBS kultiviert.

Unter optischer und mikroskopischer Kontrolle wurden die Zellkulturen täglich überwacht. Spätestens bei Gelbverfärbung des Mediums, als Indikator für eine beginnende suboptimale Versorgung der Zellen mit allen Nährstoffen durch Überwachung in der Kulturflasche, wurde ein Split vorgenommen, d.h. die Zellzahl pro Flasche im Verhältnis 1:10 reduziert und die Kultur mit frischem Vollkulturmedium versorgt.

Die Patientenproben wurden in 5ml DMEM Kulturmedium nach Zugabe von 10% (v/v) FBS, 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin (10000 $\mu$ g/ml), 1% (v/v) Natrium-Pyruvat sowie 1% NEAA ebenfalls in einem Brutschrank bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und H<sub>2</sub>O gesättigt kultiviert.

### **3.2. Zellkryokonservierung und Auftauen**

Kryokonservierung: Die Zellsuspension wurde zunächst bei 1200 U/min für 5 min zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Zellpellet mit 1ml Konservierungsmedium (50% RPMI 1650 Kulturmedium, 40% FBS, 10% DMSO) resuspendiert. Nach Überführung der Suspension in ein Kryoröhrchen wurde dieses in einem Kryokonservierungscontainer langsam über 24h auf -80°C abgekühlt. Die Lagerung erfolgte im -80°C Gefrierschrank.

Auftauen und in Kultur nehmen der Zellen: Um die eingefrorenen Zellen wieder zu kultivieren wurden diese zügig in einem 37°C warmen Wasserbad aufgetaut und anschließend in Kulturmedium überführt.

### 3.3. Zellzahlbestimmung

Hierfür wurden 10µl Zellsuspension mit 10µl Methylenblau und 80µl PBS homogenisiert. 10 µl dieser Suspension wurden mittels Neubauer-Zählkammer unter einem Lichtmikroskop ausgezählt (Die Zählung beschränkte sich dabei auf die viablen Zellen, d.h. Zellen, die nicht durch Methylenblau angefärbt wurden). Die Gesamtzellkonzentration errechnete sich wie folgt:

$(\text{Zahl der gezählten Zellen in den vier äußersten großen Quadranten} / 4) = \text{Zellanzahl} \times 10^5 / \text{ml}$ . Hierbei wurde die Verdünnung der Zellsuspension berücksichtigt.

### 3.4. XTT-Proliferations-Assay

Für die Quantifizierung der Proliferation der Zelllinien wurde das XTT-basierte kolorimetrische Messverfahren „Cell Proliferation Kit II“ verwendet. Der Test beruht auf der Umwandlung des gelben Tetrazoliumsals XTT (Natrium 3'-[1-(phenylaminocarbonyl)-3,4-tetrazolium]-bis(4-methoxy-6-nitro)-benzen Schwefelsäurehydrat) in orange-rotes Formazan: Nur lebende Zellen sind in der Lage XTT mit Hilfe ihrer mitochondrialen Dehydrogenasen in Formazan umzusetzen [92]. Das so entstehende Reaktionsprodukt ist wasserlöslich und kann mit einem ELISA-Plattenlesegerät direkt quantifiziert werden.

So dient die Absorption des Formazan als ein Maß für die Stoffwechselaktivität und Proliferationsleistung einer Zellsuspension.

Das Testkit enthält das XTT-Färbereagenz und ein Elektronenkopplungsreagenz (1,25 mM N-Methyl-dibenzopyrazin Methylsulfat, PMS in PBS).

Zur Durchführung des Assays wurden je 30 000 Zellen der zu untersuchenden Zelllinie analysiert. Die Zellsuspension wurde in 100µl Medium pro Well in eine 96-Lochplatte appliziert und mit THC als Konzentrationsverdünnungsreihe versetzt. Jeder Ansatz wurde in Triplikaten durchgeführt.

Nach 24h bzw. 48h Inkubation im Brutschrank (37°C, 5% CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O gesättigt) wurden jedem Ansatz 50µl XTT-Färbereagenz und 1µl Elektronenkopplungsreagenz zugefügt und abermals für 4h im Brutschrank inkubiert. Die anschließende Messung der Absorption erfolgte dann bei 490 nm mit Hilfe eines ELISA Plattenlesegerätes.

### **3.5. Apoptosebestimmung und Immunphänotypisierung mittels FACS-Analyse**

#### **3.5.1. FACS**

Die Durchflusszytometrie oder FACS (fluorescence activated cell sorting) ist eine Methode Zellpopulationen zu analysieren, zu identifizieren und gegebenenfalls auch zu sortieren. Hierbei macht man sich unterschiedliche Zelleigenschaften wie Größe, Granularität oder die Expression verschiedener Antigene zu Nutze. Die in Lösung befindlichen Zellen werden so angesaugt, dass sie in einem sehr dünnen Strahl durch die Messzelle geführt werden. So wird gewährleistet, dass jede Zelle einzeln den Messbereich des Lasers passiert. Das Licht des Lasers wird an jeder Zelle gestreut und durch zwei Detektoren (in der Regel Photomultiplier um das Lichtsignal zu verstärken) gemessen. Das in Richtung des ursprünglichen Strahls gemessene Vorwärtsstreulicht („forward scattered“ , FSC) gibt Auskünfte über die Größe der Zelle. Das senkrecht dazu gemessene Seitwärtsstreulicht („Side Scattered“ , SSC) gibt Hinweise auf die innere Beschaffenheit der Zelle, wie etwa Granularität.

Darüber hinaus kann auch Fluoreszenzlicht gemessen werden. Hierzu verwendet man Fluoreszenzfarbstoffe, die an Zellstrukturen binden, wie etwa Propidiumiodid. Es besteht aber auch die Möglichkeit Antikörper gegen unterschiedliche Zielstrukturen der Zelle mit einem fluoreszierenden Farbstoff zu koppeln und sie somit sichtbar zu machen. Die Antikörper richten sich hierbei meist gegen bestimmte Oberflächenantigene der Zelle, wie etwa den „Cluster of differentiation“ (CD). Jeder Fluoreszenzfarbstoff besitzt ein für ihn charakteristisches Absorptions- und Emissionsmaximum [93].

Durch die so gewonnenen Informationen bezüglich Größe, Granularität und das Vorhandensein verschiedener Oberflächenantigene können einzelne Zellpopulationen gegeneinander abgegrenzt werden.

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Analysen wurden den Zellen meist zwei Parameter zugeordnet und diese in einem zweiachsigen Punktdiagramm („dot plots“) dargestellt. Jeder Achse wird ein Parameter zugeordnet und ein Punkt entspricht je einer gemessenen Zelle.

### **3.5.2. Apoptosebestimmung mittels Annexin V/ PI**

Zur Bestimmung der Apoptoserate der Zellen wurde ein FITC-gekoppeltes Annexin V/ Propidiumiodid Testverfahren (AnnexinV/PI) verwendet.

Apoptose ist ein aktiver, physiologischer Prozess, der einem zelleigenen Mechanismus folgt und letztlich zum programmierten Zelltod führt. Dieser Apoptoseablauf ist charakterisiert durch unterschiedliche morphologische Veränderungen, wie etwa dem Verlust der Membranasymmetrie und –integrität sowie der Kondensation von Zytoplasma und Zellkern. Der Verlust der Membranasymmetrie ist eine der ersten Veränderungen. Bei apoptotischen Zellen wird das Membranphospholipid Phosphatidylserin (PS) von der Innenseite auf die Außenseite der Zellmembran transloziert und so der Zellumgebung präsentiert. In dieser Form dient PS als ein Signal für die Erkennung und Vernichtung der apoptotischen Zellen durch Makrophagen [94].

Annexin V ist ein  $\text{Ca}^{2+}$  abhängiges Phospholipid-bindendes Protein und lagert sich mit einer hohen Affinität an das exponierte PS an. Wird Annexin V mit einem fluoreszierenden Farbstoff, etwa FITC, gekoppelt, kann man mit Hilfe der Durchflusszytometrie die PS präsentierenden Zellen erfassen. FITC hat ein Absorptionsmaximum von 488nm und ein Emissionsmaximum von 518nm.

Der Farbstoff PI ist normalerweise nicht in der Lage die Zellmembran zu passieren. Verliert sie aber im weiteren Verlauf der Apoptose ihre Integrität kann PI die perforierte Membran durchdringen und sich durch Interkalierung an die DNA der Zellen binden. Das in der DNA interkalierte PI hat ein Absorptionsmaximum von 535nm und ein Emissionsmaximum von 617 nm.

Durch gleichzeitige Färbung der Zellen mit beiden Farbstoffen lassen sich unterschiedliche Zustände der Zellen unterscheiden:

- Lebende Zellen: FITC Annexin V negativ und PI negativ
- frühapoptotische Zellen: FITC Annexin positiv und PI negativ
- spätapoptotische/tote Zellen: FITC Annexin positiv und PI positiv

Im experimentellen Ansatz wurden die Zellen in 6-well-Platten mit unterschiedlichen Konzentrationen THC und Methanol versetzt. Nach Inkubation (Brutschrank bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O gesättigt) über 24-72h erfolgt die Analyse mittels FACS Durchflusszytometrie. Hierfür wurden die Zellsuspensionen in FACS Röhrchen überführt und bei 1200 U/min, 20°C 5 min zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes wurde das Pellet mit PBS gewaschen. Hierfür wurde das Zellpellet in 1ml PBS resuspendiert und nochmals zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in 100µl 1x Annexin V Binding Buffer gelöst. Nach Zugabe von 2µl FITC Annexin V und 5µl PI zur Suspension wurden die Zellen 15 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Zur Analyse wurde das Gemisch in weiteren 300µl Annexin V Binding Buffer verdünnt und innerhalb von 60 min mittels FACS gemessen.

### **3.5.3. Viabilitätsanalyse und Immunphänotypisierung zur Detektion der leukämischen Population**

Auf Grund des hohen Anteils toter/apoptotischer Zellen in neu gewonnenen und kultivierten Zellen, verwendeten wir einen von unserer Arbeitsgruppe kürzlich etablierten Durchflusszytometrie-basierten Assay zur Analyse der Reduktion viabler Blasten in einem FSC/SSC dotplot Diagramm als Maß für den antileukämischen Effekt des THC auf ex vivo Blasten [95]. Die Viabilität der zu analysierenden Population wurde in einem Annexin V/PI Assay verifiziert. Zur genauen Identifizierung der leukämischen Blastenpopulation in den Patientenproben wurden die Zellen mit FITC gekoppeltem anti-CD45 Antikörper sowie mit PE (Phycoerythrin) gekoppeltem anti-CD34 Antikörper gefärbt:

Das CD34-Antigen ist ein membranständiges Protein mit einem Molekulargewicht von 116 kD. Es wird in unreifen hämatopoetischen Stammzellen gebildet und mit zunehmender Reifung verschwindet die Expression von CD34. CD34 ist ein typischer Marker zur Charakterisierung myeloischer wie lymphatischer leukämischer Blasten [96].

Das CD45-Antigen wird auf allen hämatopoetischen Zellen exprimiert - außer Erythrozyten und Thrombozyten - und wird daher auch als Pan-Leukozytenmarker bezeichnet. Bei leukämischen Blasten zeigt sich eine typische Population mit geringer Expression (CD45<sup>low</sup>). Diese veränderte Expressionsrate kann genutzt werden um normale, unreife Leukozyten von den leukämischen Blasten abzugrenzen [97].

Für unsere Analysen wurden die zu analysierenden Zellproben in FACS Röhrchen überführt und bei 1200 U/min, 20°C 5min zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurde das Pellet mit PBS gewaschen und dann in 90µl PBS resuspendiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 5µl FITC anti-CD45 Antikörper und 5µl PE anti-CD34 Antikörper. Als Negativkontrolle diente die Färbung mit einem unspezifischen Immunglobulinagens (Simultest™ Control 1/ ).

Die Proben wurden 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert, im Anschluss nochmals zentrifugiert und in PBS gewaschen. Zuletzt wurde das Zellpellet in 300µl PBS resuspendiert und die FACS Analyse innerhalb von 60 min durchgeführt.

#### **3.5.4. Immunphänotypisierung zur Analyse der Cannabinoidrezeptorexpression**

Die humanen CB1 und CB2 Rezeptorantikörper (Hase, Cell Signaling Technology) wurden jeweils mit einem polyklonalen, fluoreszierenden sekundären anti-rabbit IgG H&L (FITC) Antikörper gemäß den Herstellerangaben konjugiert (ebenfalls Cell Signaling Technology). Anschließend wurden die Rezeptorexpressionsraten durchflusszytometrisch bestimmt.

#### **3.6. Proteinanalyse mittels Western Immunoblot**

Die Proteinanalyse wurde mit Hilfe des Western Blotting Verfahrens durchgeführt. Hierfür verwendeten wir ein BioRad Criterion® System (Proteinauftrennung mittels SDS-Page in 3-8% oder 10% Polyacrylamid Gel, und Fixierung der Proteine durch Elektroblothing auf eine Nitrozellulosemembran).

### **3.6.1. Herstellen der Lysate**

Die Zellsuspensionen wurden in FACS Tubes überführt und bei 20°C und 1200 U/min 5 min abzentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes wurden die Zellen mit kaltem 1x PBS gewaschen und nochmals zentrifugiert.

Das Zellpellet wurde dann in 100µl-150µl eiskaltem Lysepuffer resuspendiert und in Eppendorfgefäße gegeben. Danach erfolgte die Inkubation für 15 min auf Eis, wobei die Zellsuspensionen alle 5min gevortext wurden. Der Zelldebris wurde mittels Zentrifugation auf höchster Stufe (20 G) abgetrennt. Der die Proteine enthaltende Überstand wurde für die weiteren Analysen bei -20°C asserviert.

### **3.6.2. Bestimmung der Proteinkonzentration**

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde die Methode nach Bradford verwendet. Das Messverfahren verwendet eine saure Lösung des Farbstoffes Coomassie® Brilliant Blue G-250. Der Farbstoff bindet vorwiegend an basische und aromatische Gruppen der Proteine und sein Absorptionsmaximum verschiebt sich nach Bindung an die Proteine von 465nm zu 595nm. Die Absorption des Farbstoffes korreliert direkt mit der Menge des in der zu messenden Lösung enthaltenen Proteins [98]. Durch den Vergleich der zu analysierenden Lösung mit Standard-Proteinlösungen bekannter Konzentration, lässt sich die genaue Proteinmenge bestimmen.

### **3.6.3. SDS-Page Gelelektrophorese**

Um die Proteine aufzutrennen und anschließend analysieren zu können wurde die Natrium-Dodecylsulfat-Polyarylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) verwendet. Das negativ geladene Detergenz SDS bindet an hydrophobe Seitenketten der Proteine und überdeckt so ihre Eigenladungen. Pro 1g Protein binden ca. 1,4g SDS, sodass die Proteinmoleküle ein konstantes Ladungs-zu Masse Verhältnis aufweisen. Durch das SDS werden weitere Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Proteinen verhindert. Die zusätzliche Denaturierung mittels Aufkochen bewirkt ein Entfalten der Proteinmoleküle zu gestreckten Polypeptidketten und diese wandern so auf Grund ihrer negativen Ladungen im elektrischen Feld in Richtung Anode. Zusätzlich können durch

Hinzufügen des Reduktionsmittels TCEP (Bestandteil des verwendeten XT-Reducing-Agent) die Disulfidbrücken der Proteinmoleküle gelöst werden. So wird es möglich sie nach ihrer Kettenlänge und somit Molekülmasse aufzutrennen. Kleinere Peptidketten werden von der porösen Polyacrylamidmatrix nicht so stark zurückgehalten wie größere und wandern weiter [99].

Gleiche Proteinmengen wurden in je 30µl Probenpuffer (5µl XT-Reducing-Agent, 25µl XT Sample Buffer) für 5min bei 95°C im Heizblock denaturiert.

Der Aufbau der Elektrophoresekammer sowie das Einsetzen des XT Criterion Precast Gels erfolgte laut Herstellerangaben (BioRad). Anschließend wurde die Pufferkammer mit 1x XT MOPS-Elektrophorese Laufpuffer gefüllt. Nach Einfügen von 75-200 µg Protein/Probe in die dafür vorgesehenen Taschen erfolgte die Auftrennung der Proteine bei 200 V über 60 min. Zur Identifikation der Proteingröße wurde parallel ein Proteingrößenmarker im Gel mitgeführt.

#### **3.6.4. Western Immunoblot**

Um spezifische Proteine nach der Auftrennung durch die SDS-PAGE (Natrium-Dodecylsulfat-Polyarylamid-Gelelektrophorese) zu quantifizieren, werden sie auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und dort fixiert (sog. Western Blot). Durch markierte Antikörper können spezifische Proteine anschließend analysiert werden. Da das SDS weiterhin an die Proteine gebunden ist kann der Transfer vom Gel auf die Membran, ähnlich der Auftrennung, in einem elektrischen Feld erfolgen [100,101].

Der Transfer erfolgt mit Hilfe einer „wet-blotting“ Apparatur (Criterion™ Blotter, BioRad): Zur Vorbereitung wurde das Gel zusammen mit der Nitrozellulosemembran zwischen je einer Lage Filterpapier und einer Lage Faserpapier in eine Blot-Kassette (BioRad) gelegt und für ca. 10 min in Transferpuffer inkubiert. Zur Vermeidung von Luftblasen wurden die einzelnen Schichten während des Aufbaus mit einem 50ml-Falcon-Röhrchen ausgewalzt.

Der Aufbau der Transferkammer, das Einsetzen des Eisblockes, des magnetischen Rührstabes sowie der Blot-Kassette erfolgte laut Herstellerangaben (BioRad).

Nach Auffüllen der Kammer mit kaltem Transferpuffer wurde der Proteintransfer vom Gel auf die Nitrozellulosemembran für 30min bei 100V und 4°C durchgeführt.

### 3.6.5. Immundetektion

Für die Detektion bestimmter Proteine verwendet man spezifische Antikörper, die mit Hilfe ihrer Antigenbindestellen an den jeweiligen Oberflächenstrukturen der Zielproteine binden. Um die gebundenen Primärantikörper sichtbar zu machen, verwendet man z.B. fluoreszierende Sekundärantikörper. Diese sind gegen Spezies-spezifische Anteile der Primärantikörper gerichtet und können nach Bindung an diese visualisiert werden.

Werden zwei Primär-Antikörper unterschiedlicher Spezies (z.B. Maus und Hase) und Spezifität mit den entsprechenden Sekundär-Antikörper mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen eingesetzt, können zwei unterschiedliche Proteine auf einer Membran detektiert werden [102]. Um freie Bindungsstellen abzusättigen wurde die Nitrozellulosemembran nach dem Transfervorgang für 60min mit sog. Blockierungspuffer (10% BSA in 1x PBS plus 0,25% (v/v) Tween 20) bei Raumtemperatur behandelt. Danach erfolgte die Inkubation mit den jeweiligen Primärantikörpern (Humaner Cannabinoidrezeptor 1 und 2, Ziege sowie Aktivierte Caspase 3 und 9 Antikörper, Hase) (1:1000 in Blockierungspuffer verdünnt) für eine Stunde oder über Nacht bei 4°C nach Hersteller Vorgaben. Die Behandlung der Nitrozellulosemembranen erfolgte unter Verwendung eines Schwenktisches. Als Ladekontrolle wurde die Membran zusätzlich mit Antikörper gegen  $\alpha$ -Tubulin (Maus) behandelt (1:1000 in Blockierungspuffer verdünnt, Inkubation über 60min). Anschließend wurde die Membran viermal jeweils 10min mit PBS/T (1xPBS plus 0,25% (v/v) Tween 20) gewaschen. Danach wurde die Membran mit den für die Primärantikörper spezifischen, sekundären Antikörper (IRDye® conjugated anti-rabbit/goat/mouse IgG jeweils 1:10000 in PBS/T verdünnt) im Dunkeln für 30 min inkubiert und nochmals viermal für je 10min mit PBS/T gewaschen. Zur Visualisierung der Proteine wurde ein LI-COR Odyssey® System (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE) eingesetzt.

## **4. Ergebnisse**

### **4.1. THC inhibiert zelluläre Proliferation von Leukämiezelllinien myeloischer und lymphatischer Differenzierung**

In Analogie zu früheren Veröffentlichungen [79-81] benutzten wir die T-Zell-Leukämieinie Jurkat, um den zytotoxischen Effekt des THC auf akute Leukämiezelllinien zu untersuchen. Die Zellen wurden mit ansteigenden THC Konzentrationen über 72h behandelt und anschließend der Anteil proliferativer Zellen (im Verhältnis zu einer unbehandelten Kontrolle) mit Hilfe des XTT-Assay ermittelt.

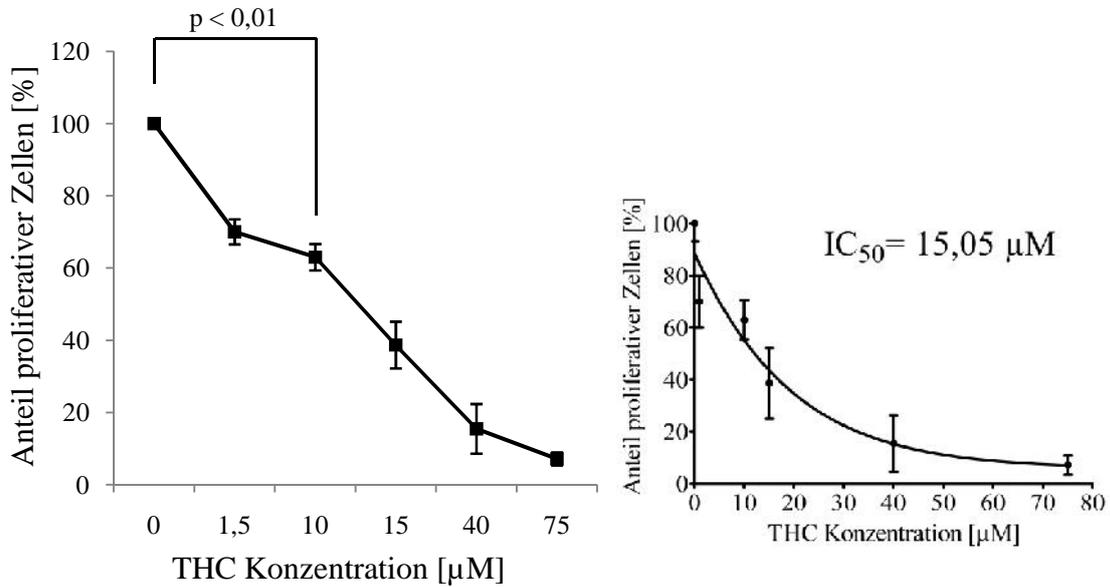
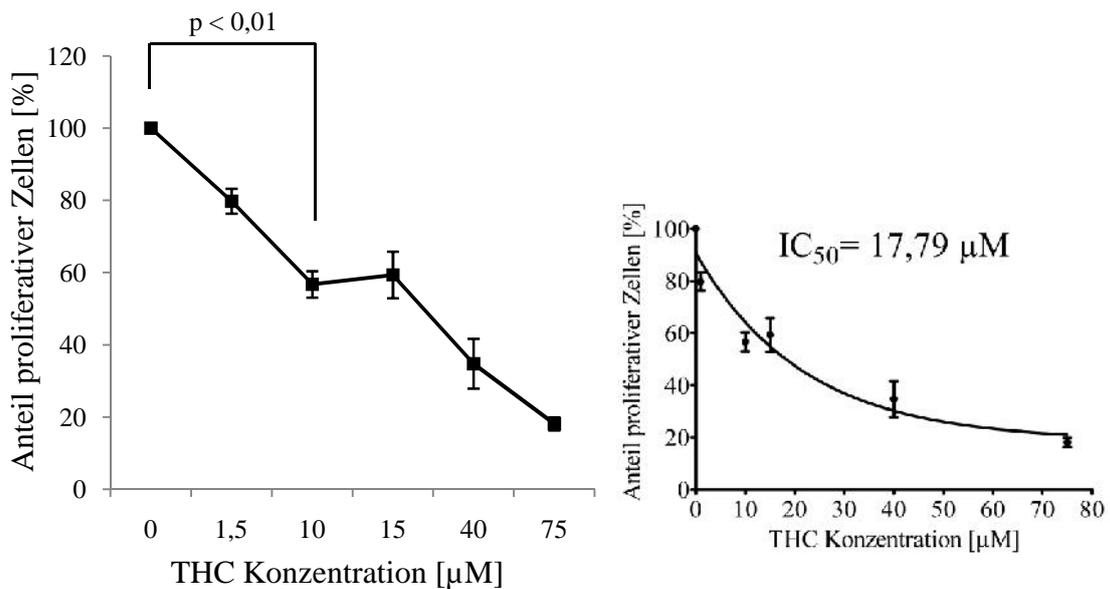
Wie bereits in 3.4. ausgeführt sind nur lebende, stoffwechselaktive Zellen in der Lage das XTT in ein wasserlösliches Formazansalz zu metabolisieren, das in dieser Form direkt messbar ist und so als Maß für die zelluläre Proliferation dient. Die Berechnung der Signifikanzen erfolgte mit Hilfe des Student's t-Test.

Es zeigte sich eine signifikante Inhibition der zellulären Proliferation durch das THC. So konnte nach der Behandlung mit 10  $\mu\text{M}$  THC ein Anteil proliferativer Zellen von  $62,99\% \pm 7,56\%$  ( $p < 0,01$ ) und mit 40  $\mu\text{M}$  THC von  $15,44\% \pm 10,8\%$  ( $p < 0,001$ ) gemessen werden bei einer  $\text{IC}_{50}$  von ca. 15  $\mu\text{M}$ .

Um herauszufinden, ob sich diese Resultate auch auf andere akute Leukämiezellreihen übertragen lassen, testeten wir die akute myeloische Leukämiezelllinie Molm-13.

Auch hier zeigte sich ein ähnlicher, antiproliferativer Effekt. So lag der Anteil proliferativer Zellen nach der Behandlung mit 10  $\mu\text{M}$  THC bei  $56,73\% \pm 3,64\%$  ( $p < 0,01$ ) und mit 40  $\mu\text{M}$  THC bei  $34,76\% \pm 6,88\%$  ( $p < 0,001$ ). Die  $\text{IC}_{50}$  betrug hier ca. 18  $\mu\text{M}$ .

Eine ausführlichere Charakterisierung der einzelnen Zelllinien findet sich unter 2.7.

**Jurkat****Molm-13****Abb. 2: Der antiproliferative Effekt des THC auf Jurkat und Molm-13 Zellen**

Dargestellt sind die Ergebnisse der photometrischen Aktivitätsmessung (XTT Assay) nach Inkubation mit steigender THC Dosis über 72 h bei der ALL Zelllinie Jurkat und der AML-Zelllinie Molm-13 als prozentuale Anteile der unbehandelten Kontrolle und deren Standardabweichungen sowie die dazugehörigen, jeweils rechnerisch ermittelten Dosis-Wirkungskurven.

#### **4.2. Ergebnisse der Apoptosebestimmung mittels FITC-Annexin V/PI Färbung**

Da die behandelten Zelllinien bei höherer Dosierung zytologische Zeichen der Zytotoxizität bzw. Apoptose aufwiesen (pyknotische Kerne mit Chromatinkondensation sowie Kernfragmentierung), überprüften wir in einem weiteren Schritt ob THC den programmierten Zelltod (Apoptose) zu induzieren vermag.

Hierfür wurden die Zelllinien Jurkat und Molm-13 (im weiteren Verlauf auch Molm-14, Kasumi-1, HL-60, K-562, MV4-11 und M-07e) mit Hilfe eines Annexin V/PI- basierten Assay auf eine mögliche Apoptoseinduktion durch THC – in Abhängigkeit von Behandlungsdosis und -dauer – hin untersucht.

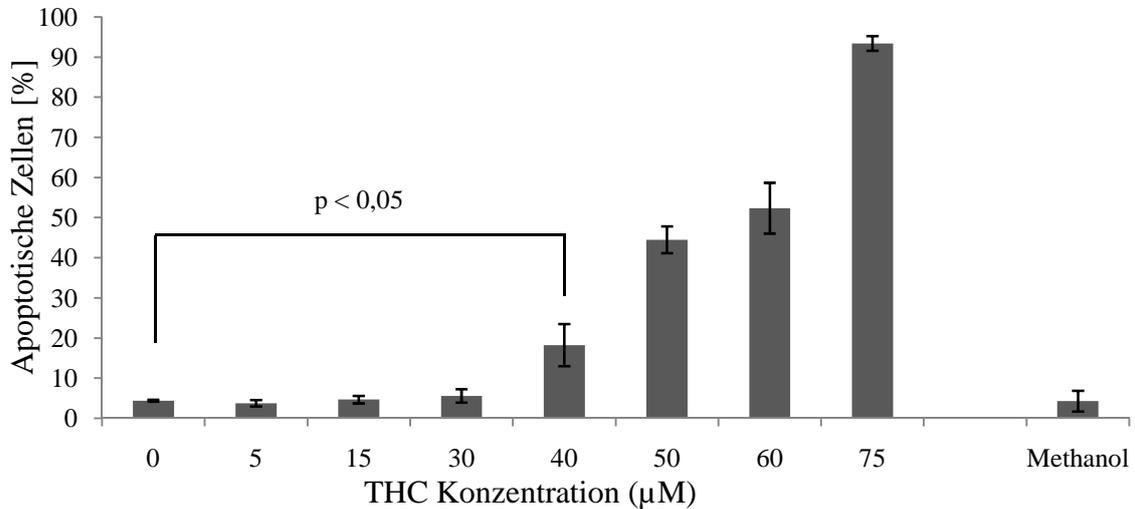
Wie in 3.5.2. genauer beschrieben, gelingt es mit Hilfe des Annexin V/PI Assay durch Simultanfärbung der Zellen den Anteil apoptotischer Zellen zu bestimmen. Man macht sich hierbei das unterschiedliche Färbungsverhalten der in Apoptose befindlichen Zellen zu Nutze:

- Lebende Zellen: FITC Annexin V negativ und PI negativ
- frühapoptotische Zellen: FITC Annexin positiv und PI negativ
- spätapoptotische Zellen: FITC Annexin positiv und PI positiv

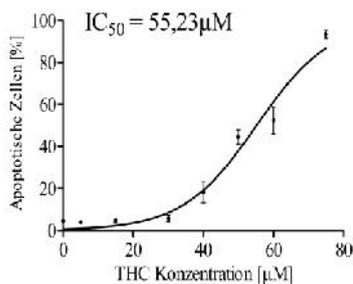
Die Berechnung der Signifikanzen erfolgte mit Hilfe des Student's t-Test.

### 4.2.1. Apoptoseinduktion bei der lymphatischen Leukämiezelllinie Jurkat

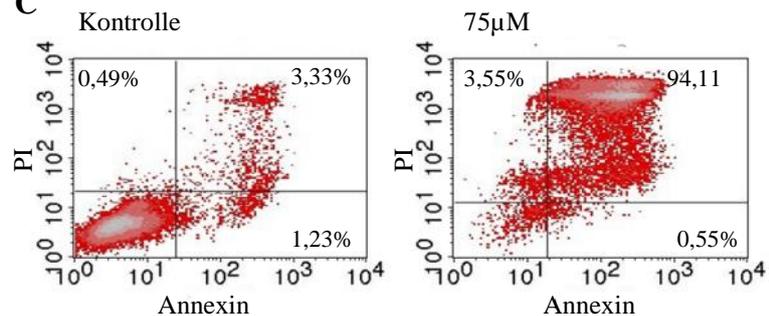
**A**



**B**

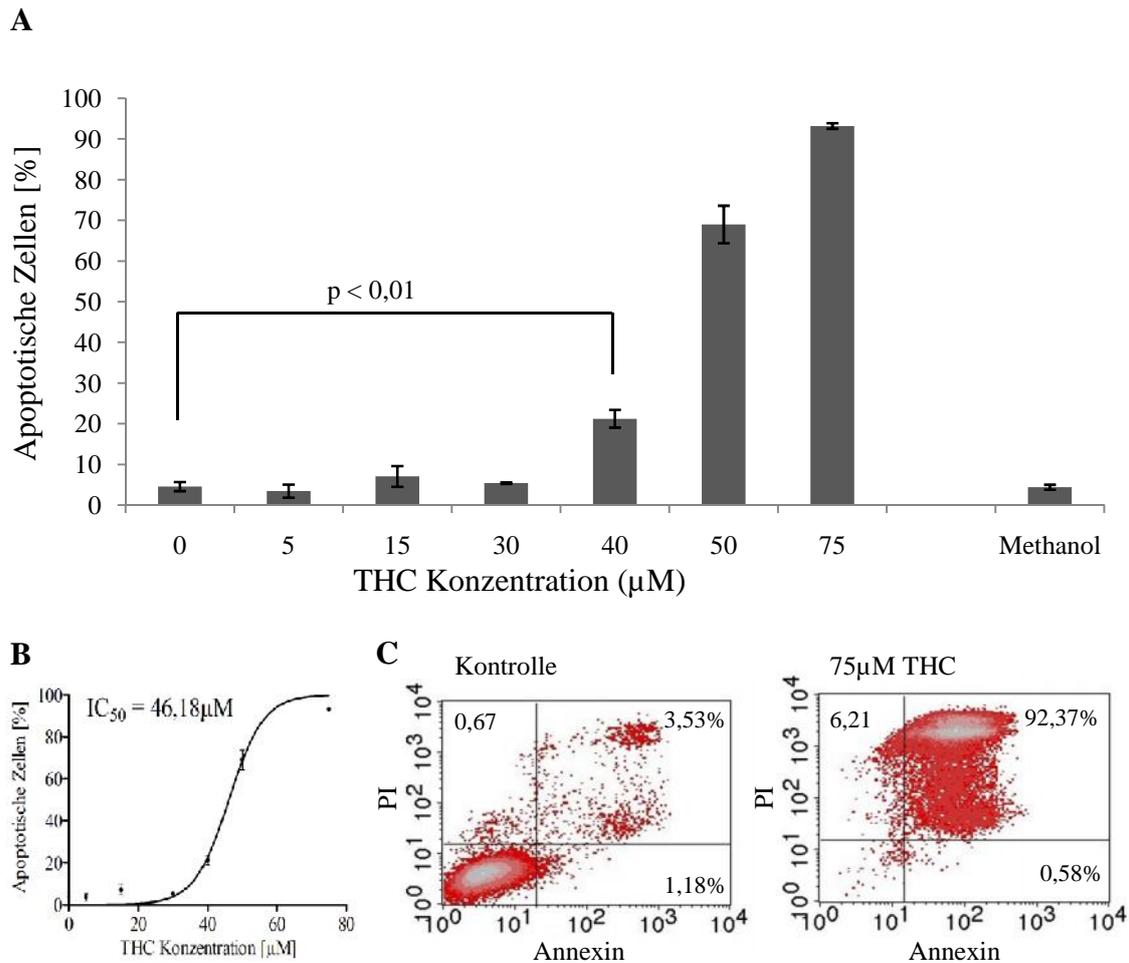


**C**



#### Abb. 3: Dosisabhängige Apoptoseinduktion bei der Jurkat-Zelllinie nach 24 Stunden

Die Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen THC sowie der Trägerlösung Methanol in der höchsten applizierten Dosis über 24 h inkubiert. Anschließend erfolgte die durchflusszytometrische Bestimmung der Apoptoserate mittels Annexin V/PI – Färbung. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte von drei durchgeführten Experimenten mit den jeweiligen Standardabweichungen (A), die Dosis-Effekt-Kurve mit der errechneten  $IC_{50}$  (B) sowie zwei exemplarische Dotplot-Diagramme eines Experimentes (C).



**Abb. 4: Dosisabhängige Apoptoseinduktion bei der Jurkat-Zelllinie nach 48 Stunden**

Die Jurkat Zellen wurden über einen Zeitraum von 48 h mit steigenden Konzentrationen THC sowie mit der Trägerlösung in der höchsten applizierten Dosis behandelt. Die Apoptoserate wurde mit Hilfe des Annexin V/PI Testverfahrens durchflusszytometrisch bestimmt. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte von drei durchgeführten Experimenten mit den jeweiligen Standardabweichungen (A), die Dosis-Effekt-Kurve mit der errechneten  $IC_{50}$  (B) sowie zwei exemplarische Dotplot-Diagramme eines Experimentes (C).

Die Jurkat-Zelllinie wurde über 24 h bzw. 48 h mit steigender THC-Konzentration (5 µM, 15 µM, 30 µM, 40 µM, 50 µM und 75 µM, über 24 h zusätzlich mit 60 µM) in einem Begasungsbrutschrank bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Um mögliche proapoptotische Effekte der Trägerlösung ausschließen zu können, wurden die Zellen zusätzlich jeweils mit der Menge Methanol behandelt, die der 75 µM THC-Dosis entsprach.

Anschließend wurden sie mit dem FITC Annexin V/ Propidiumiodid – Verfahren gefärbt. Die Apoptoserate wurde dann mit Hilfe des Durchflusszytometers bestimmt.

Hierbei zeigte sich bei der Behandlung über 24 h ein konzentrationsabhängiger Anstieg der Apoptoserate. Bei der unbehandelten Kontrolle konnten  $4,41 \% \pm 0,24$  apoptotische Zellen gemessen werden.

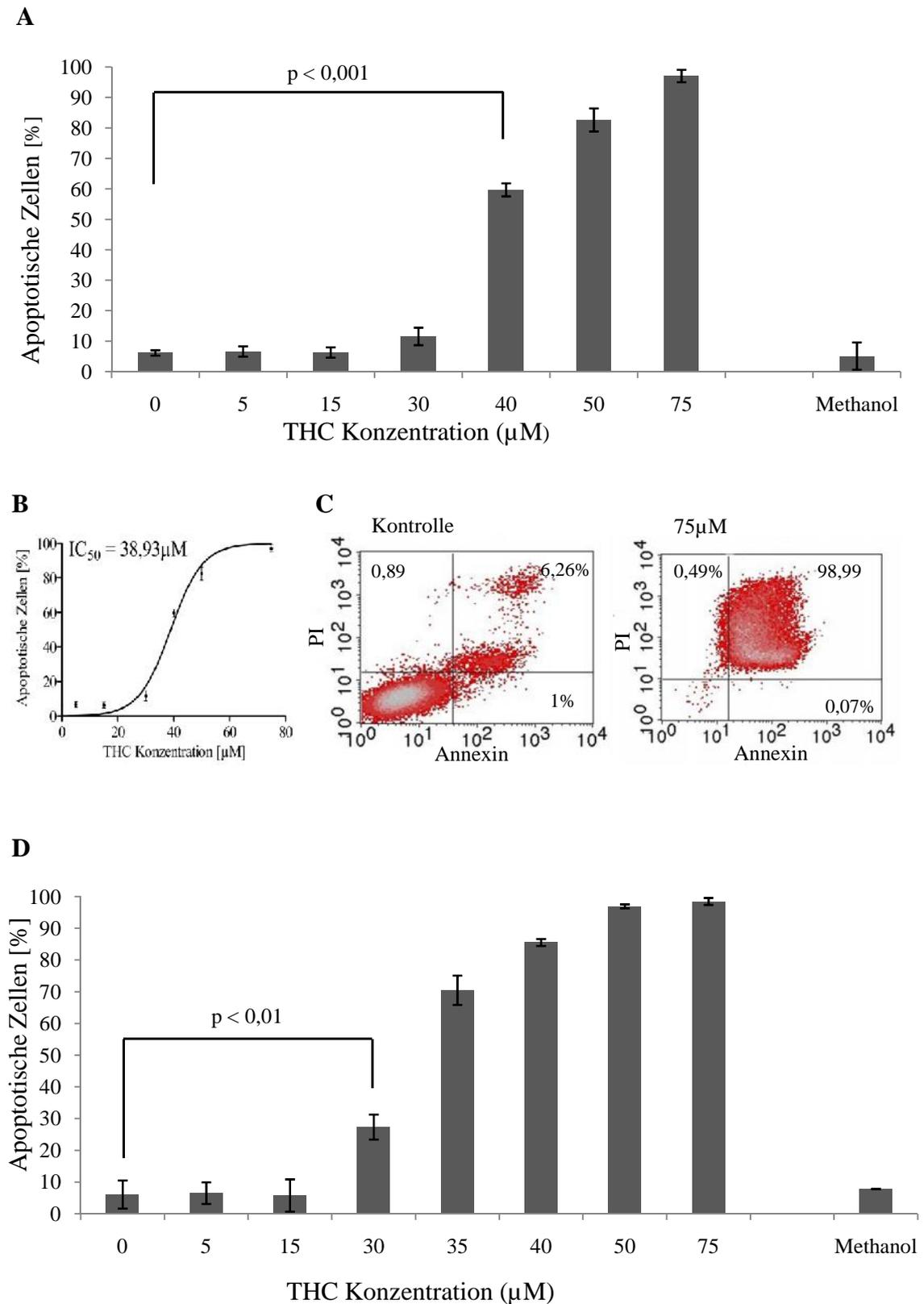
Nach Gabe von  $40 \mu\text{M}$  THC stieg die Apoptoserate signifikant auf  $18,24 \% \pm 5,25$  ( $p < 0,05$ ), nach  $50 \mu\text{M}$  auf  $44,47 \% \pm 3,34$  ( $p < 0,01$ ), nach  $60 \mu\text{M}$  auf  $52,35 \% \pm 6,31$  ( $p < 0,01$ ) und nach  $75 \mu\text{M}$  auf  $93,38 \% \pm 1,83$  ( $p < 0,01$ ) an.

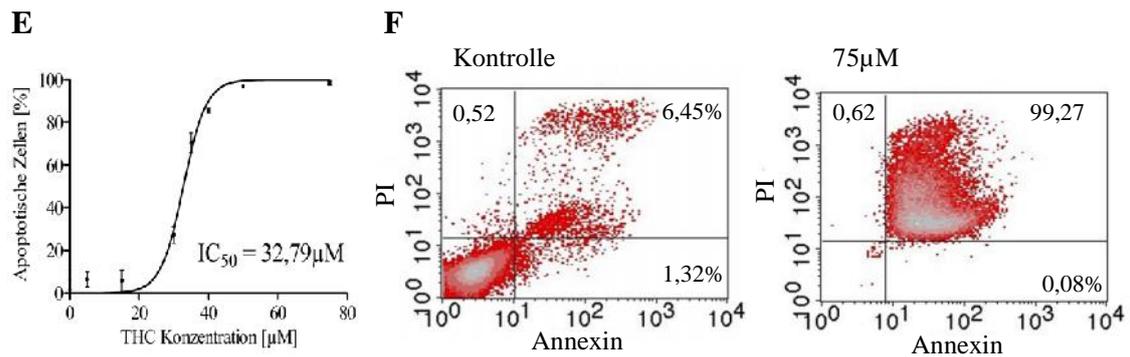
Ähnlich verhielt es sich bei der Behandlung über 48 h. Hier stieg der Anteil apoptotischer Zellen signifikant von  $4,56 \% \pm 1,12$  bei den unbehandelten Zellen auf  $21,23 \% \pm 2,18$  ( $p < 0,01$ ) nach Gabe von  $40 \mu\text{M}$  THC und auf  $93,13 \% \pm 0,68$  ( $p < 0,001$ ) nach Inkubation mit  $75 \mu\text{M}$  THC. Vor allem die Behandlung mit  $50 \mu\text{M}$  THC zeigte eine signifikant höhere Apoptoserate der Jurkat Zellen nach 48h Inkubation im Vergleich zur Behandlung über 24 h ( $69 \% \pm 4,6$  vs.  $44,47 \% \pm 3,34$ ;  $p < 0,01$ ).

Dies spiegelt sich auch im Vergleich der errechneten  $\text{IC}_{50}$  wieder. Diese beträgt für die 24h-Behandlung  $55,23 \mu\text{M}$  und fällt für die Inkubation über 48 h mit  $46,18 \mu\text{M}$  geringer aus.

Die Behandlung mit Methanol führte weder über 24 h noch über 48 h zu einer Steigerung der Apoptoserate ( $4,28 \% \pm 2,59$  bzw.  $4 \% \pm 0,61$ ) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Demnach können falsch positive Werte durch einen eventuell proapoptischen Effekt der Trägerlösung ausgeschlossen werden.

#### 4.2.2. THC induziert dosisabhängig Apoptose in der myeloischen Leukämiezelllinie Molm-13





**Abb. 5: THC induziert dosisabhängig Apoptose in Molm-13 Zellen nach 24 h und 48 h**

Molm-13 Zellen wurden jeweils über 24 und 48 Stunden mit steigender THC Konzentration sowie der Trägerlösung inkubiert. Der Anteil der apoptotischen Zellen wurde anschließend durchflusszytometrisch bestimmt.

Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte von je drei durchgeführten Experimenten mit den jeweiligen Standardabweichungen für die Inkubation der Zellen über 24 h (A) und 48 h (D), die Dosis-Effekt-Kurve mit der errechneten  $IC_{50}$  (B und E) sowie je zwei exemplarische Dotplot-Diagramme eines Experimentes über 24h (C) und 48 h (F).

Mit ansteigender THC Konzentration zeigte sich bei den Molm-13 Zellen sowohl über einen Inkubationszeitraum von 24 als auch über 48 Stunden ein Anstieg der Apoptoserate.

Nach 24 h konnte ab einer Konzentration von 40 µM THC ein signifikanter Anstieg der Apoptose im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe festgestellt werden ( $59,7 \% \pm 2,12$  vs.  $6,19 \% \pm 0,85$ ;  $p < 0,001$ ). Eine Erhöhung der THC Dosis ließ den Anteil apoptotischer Zellen weiter ansteigen, bei 50 µM THC auf  $82,64 \% \pm 3,79$  ( $p < 0,001$ ) und bei 75 µM auf durchschnittlich  $97,06 \% \pm 2,03$  ( $p < 0,001$ ).

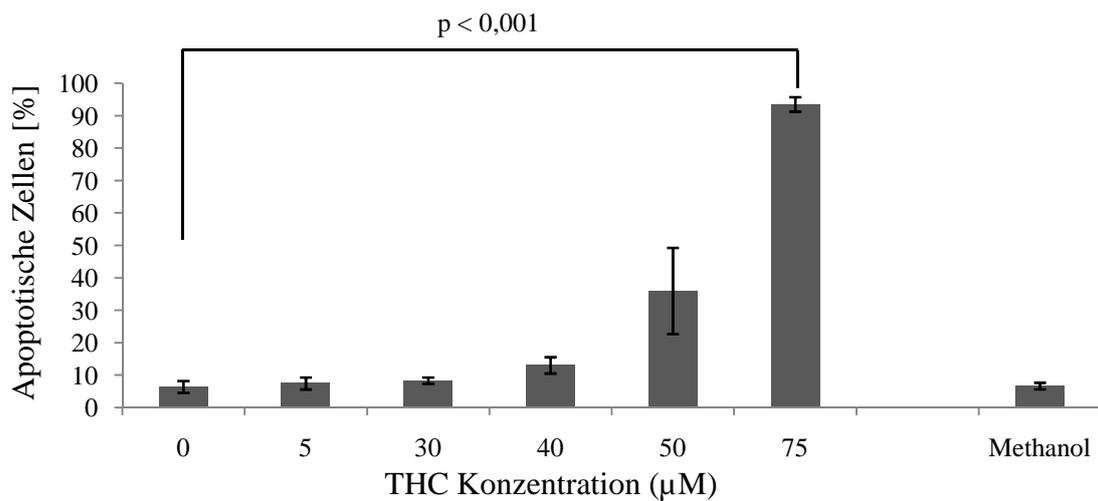
Eine 24 Stunden längere Behandlung der Molm-13 Zellen mit THC zeigte bereits bei 30 µM THC eine signifikante Erhöhung der Apoptoserate im Vergleich zur Kontrolle ( $27,28 \% \pm 3,95$  vs.  $6,01 \% \pm 4,42$ ;  $p < 0,01$ ). Steigerte man die THC Dosis um weitere 5µM auf 35µM, wurden bei  $70,42 \% \pm 4,46$  ( $p < 0,001$ ) der Zellen Apoptose induziert. Ab einer Konzentration von 50 µM zeigte sich ein Anteil apoptotischer Zellen von ca. 95 %.

Die mittlere inhibitorische Konzentration des THC bei der Molm-13 Zelllinie betrug bei Inkubation über 24 h 38,93  $\mu\text{M}$  und bei 48 stündiger Behandlung 32,79  $\mu\text{M}$ . Auch bei dieser getesteten Zelllinie konnte kein proapoptotischer Effekt des Methanols nachgewiesen werden.

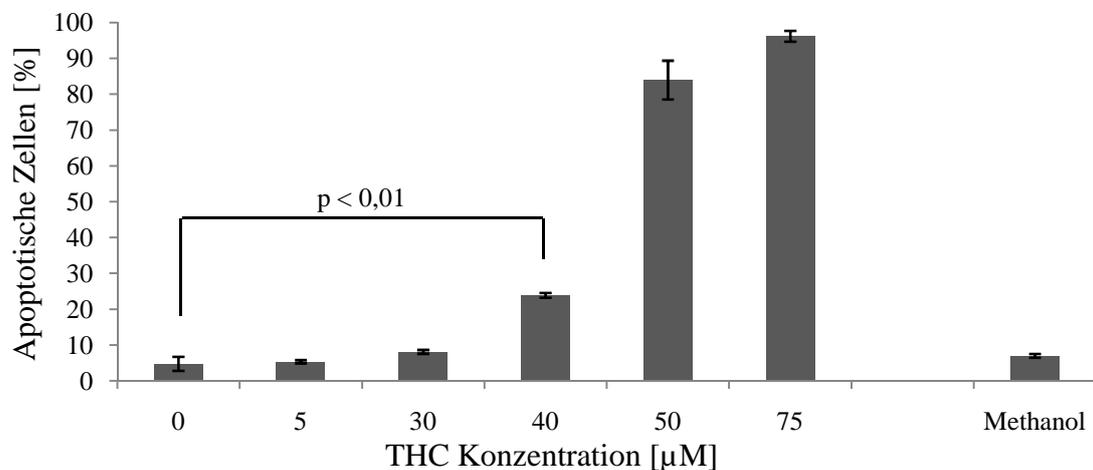
Da sich bei beiden Zelllinien Hinweise auf eine THC bedingte Apoptoseinduktion fanden, weiteten wir unsere Untersuchung auf die Zelllinien Molm-14, Kasumi-1, HL-60, K-562, MV4-11 und M-07e aus.

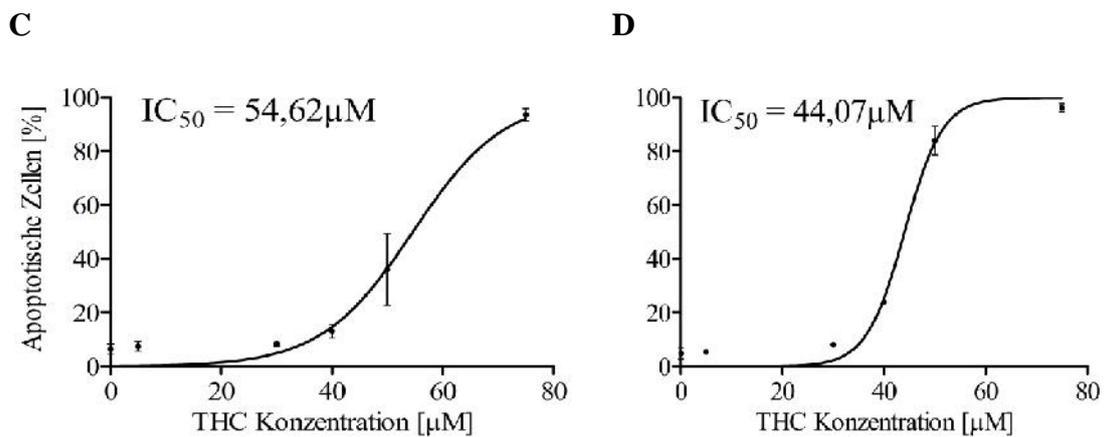
#### 4.2.3. Dosis- und zeitabhängige Apoptoseinduktion durch THC in der Leukämiezelllinie Molm-14

**A**



**B**





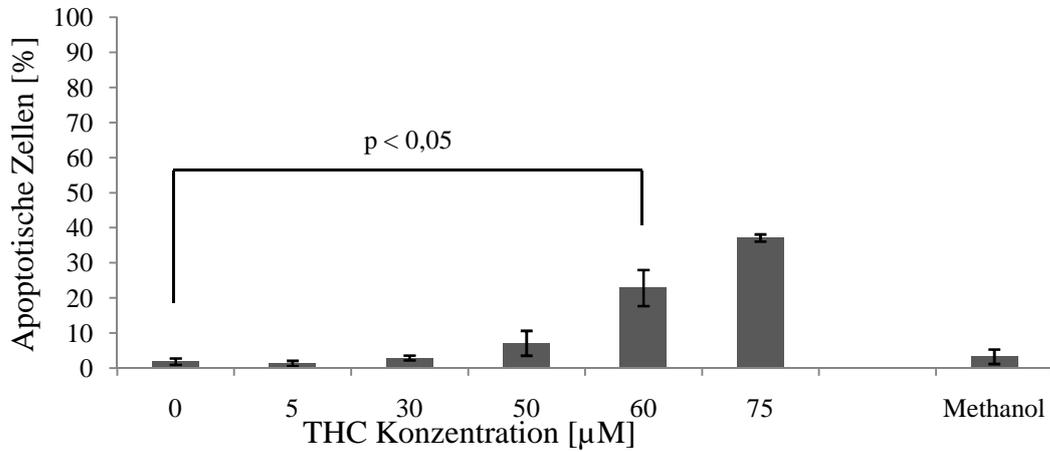
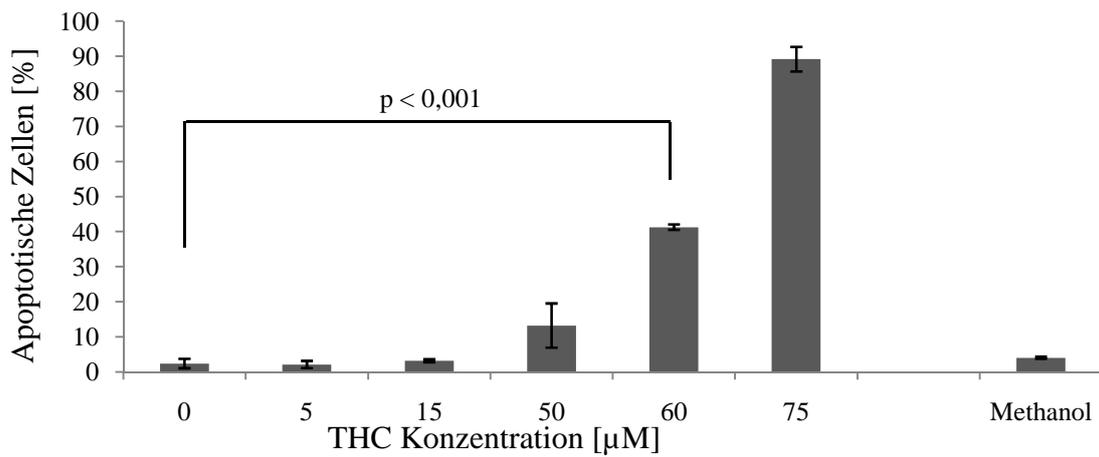
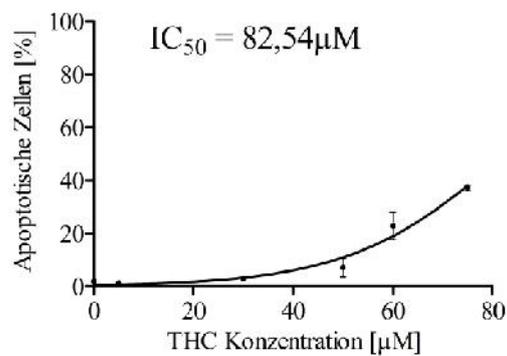
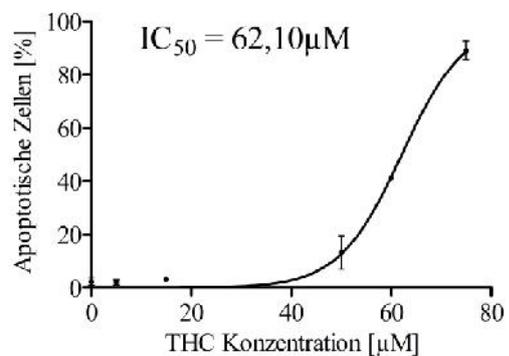
**Abb. 6: Dosis- und zeitabhängige Apoptoseinduktion durch THC in der Leukämiezelllinie Molm-14**

Die Inkubation der Zellen mit THC erfolgte über 24 h und 48 h. Dargestellt sind die Mittelwerte der Apoptosebestimmung mittels Annexin V/PI Assay aus drei Experimenten und deren Standardabweichungen (A 24h und B 48h) sowie die dazugehörigen Dosis-Wirkungskurven jeweils für einen Inkubationszeitraum von 24h (C) und 48 h (D).

Wie die Dosis-Wirkungskurven in der Abbildung 6 zeigen, induziert THC konzentrations- und wirkdauerabhängig Apoptose in der akuten myeloischen Leukämie-Zelllinie Molm-14. Die durchflusszytometrischen Untersuchungen zeigen nach einer Inkubation von 24 Stunden einen konzentrationsabhängigen Anstieg der Apoptoserate bis auf  $93,54 \% \pm 2,26$  ( $p < 0,001$ ) bei Behandlung mit  $75 \mu\text{M}$  THC mit einer mittleren inhibitorischen Konzentration von  $54,62 \mu\text{M}$ .

Nach 48 Stunden kam es bereits bei einer THC Dosis von  $50 \mu\text{M}$  zu einem Anteil apoptotischer Zellen von  $83,9 \% \pm 5,4$  ( $p < 0,001$ ) und bei maximaler Dosierung ( $75 \mu\text{M}$ ) von  $96,16 \% \pm 1,53$  ( $p < 0,001$ ). Die  $\text{IC}_{50}$  stellte sich mit  $44,07 \mu\text{M}$  dementsprechend kleiner dar.

#### 4.2.4. Proapoptotischer Effekt des THC auf die myeloische Leukämiezelllinie K-562

**A****B****C****D**

**Abb. 7: Dosis- und zeitabhängige Apoptoseinduktion durch THC in der Leukämiezelllinie K-562**

Es erfolgte eine Inkubation der K-562 Zellen über 24 und 48 Stunden mit steigender THC Konzentration und eine anschließende durchflusszytometrische Apoptosebestimmung. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte von drei durchgeführten Experimenten mit der jeweiligen Standardabweichung für die Inkubation der Zellen über 24 h (A) und 48 h (B), sowie die dazugehörigen Dosis-Effekt-Kurven.(A/C und B/D)

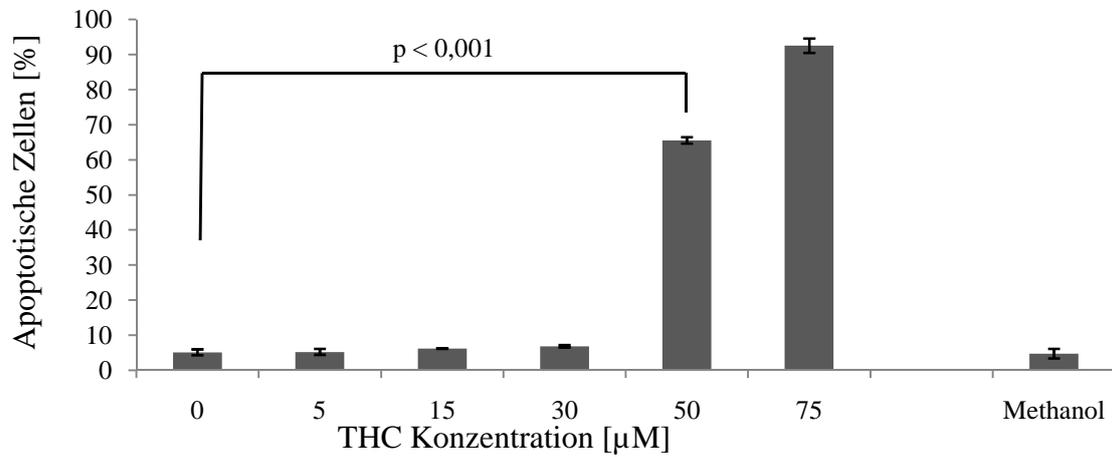
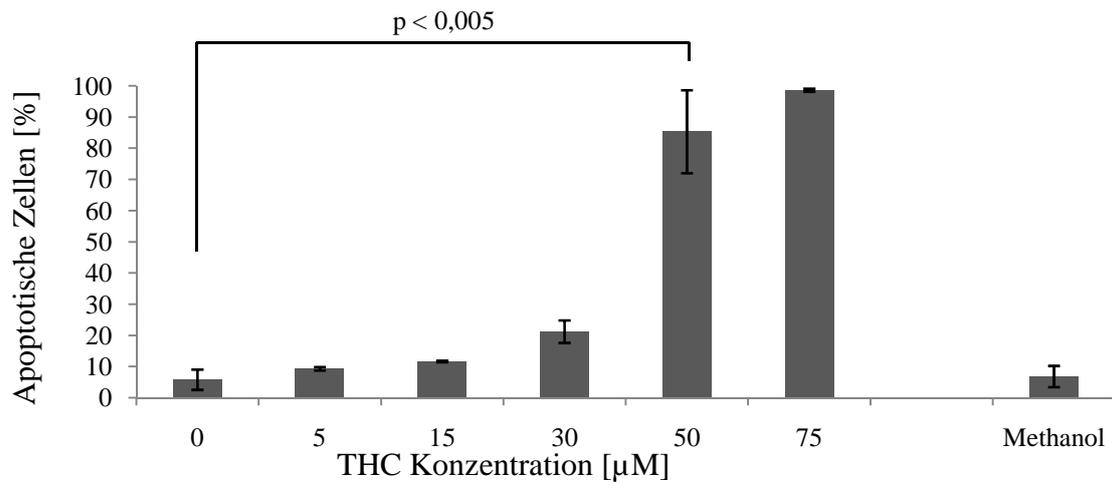
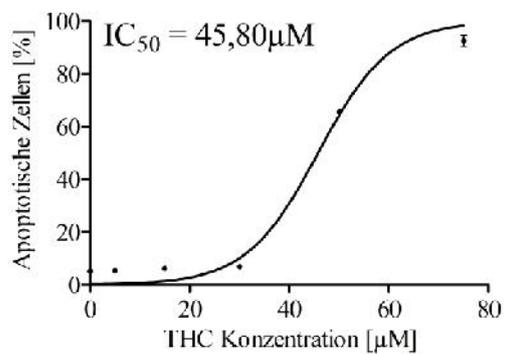
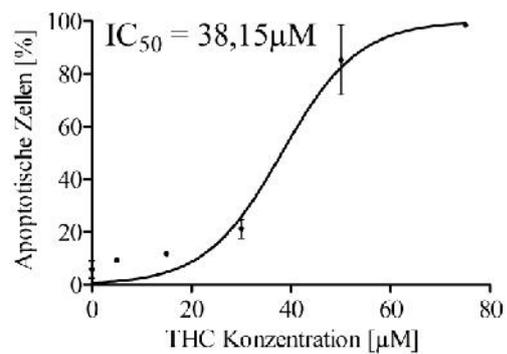
Bei der Behandlung der Zelllinie K-562, gewonnen aus einem Patienten mit chronisch myeloischer Leukämie in Blastenkrise, mit THC zeigten sich große Unterschiede zwischen den beiden Inkubationszeiträumen.

Nach 24 Stunden konnte bei der maximal getesteten Konzentration von 75  $\mu\text{M}$  THC eine Apoptoseinduktion bei insgesamt 37,1 %  $\pm$  1,02 ( $p < 0,05$ ) der Zellen festgestellt werden.

Nach 48 Stunden betrug der Anteil apoptotischer Zellen bei 60  $\mu\text{M}$  THC bereits 41,25 %  $\pm$  0,77 ( $p < 0,001$ ) und lag bei 75  $\mu\text{M}$  THC mit 89,14%  $\pm$  3,49 ( $p < 0,001$ ) deutlich über dem nach 24 h gemessenen Wert.

Der Unterschied zwischen beiden Behandlungszeiträumen zeigt sich auch in den errechneten mittleren inhibitorischen Konzentrationen. Nach 48 h lag sie bei 62,10  $\mu\text{M}$  und nach 24 h mit rechnerisch 82,54  $\mu\text{M}$  oberhalb der maximal untersuchten THC Konzentration.

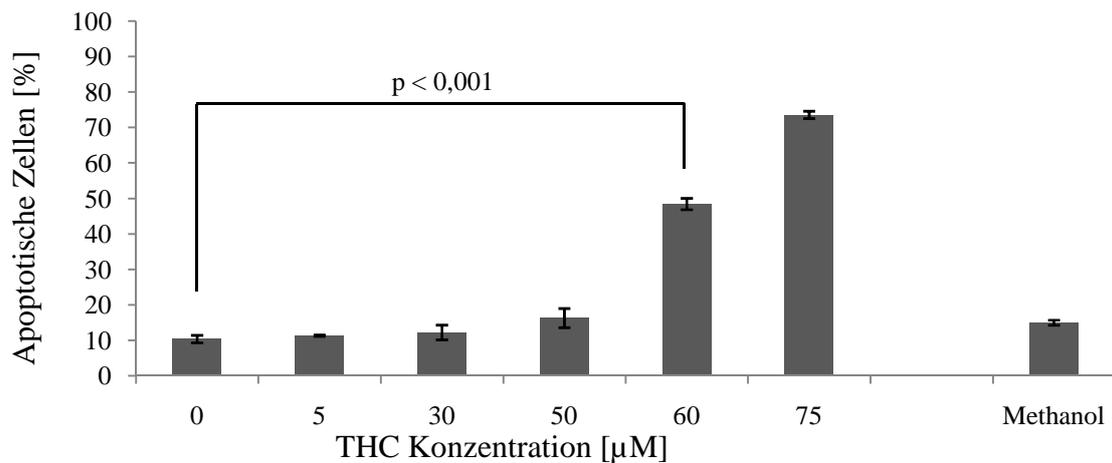
#### 4.2.5. Die akute myeloische Leukämiezelllinie HL-60 unterliegt einem proapoptotischen Effekt durch THC

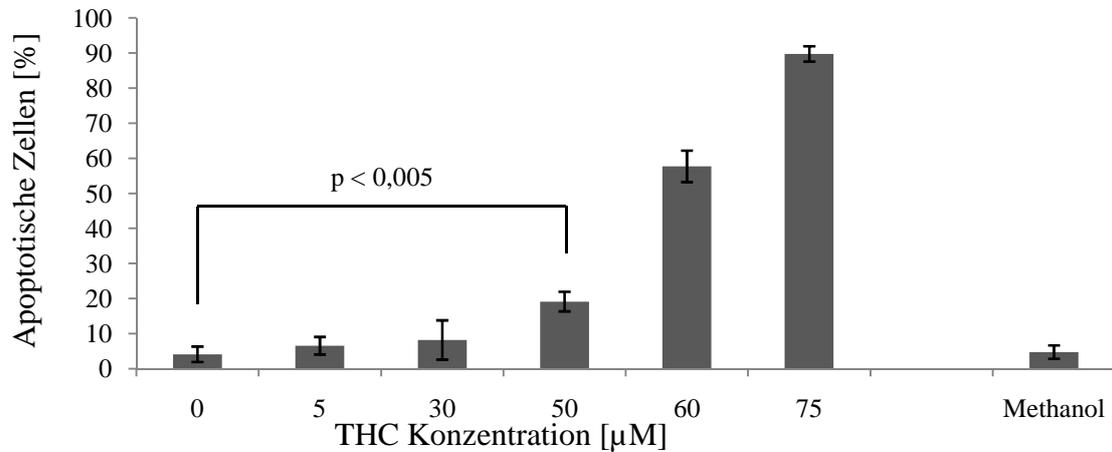
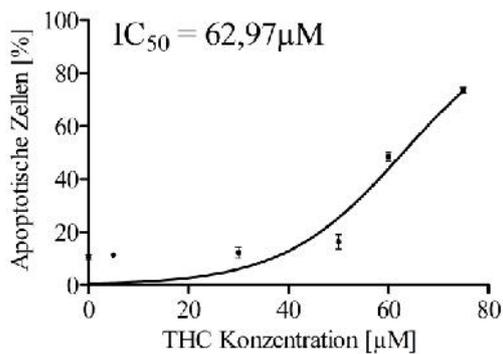
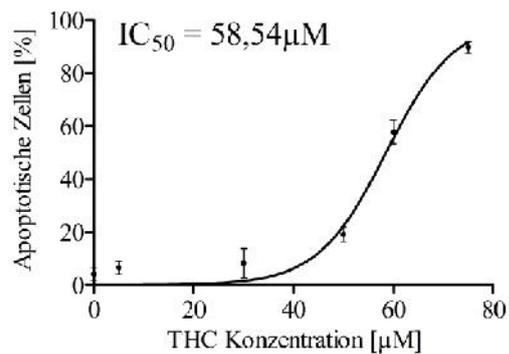
**A****B****C****D**

**Abb. 8: THC induziert Apoptose in der Leukämiezelllinie HL-60**

Die HL-60 Zellen wurden über 24 h und 48 h mit steigender THC Konzentration und der Trägerlösung in der höchsten applizierten Dosis inkubiert. Anschließend wurde der Anteil apoptotischer Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte aus drei Experimenten mit Standardabweichung (A) für 24h und (B) für 48h sowie die Dosis-Effekt Kurven je für einen Inkubationszeitraum von 24 h (C) und 48 h (D).

THC induziert signifikant Apoptose in der humanen akuten myeloischen Zelllinie HL-60. In den oben aufgeführten Grafiken zeigt sich sowohl nach 24 h als auch nach 48 h ein signifikant erhöhter Anteil apoptotischer Zellen bei der Behandlung mit 75  $\mu\text{M}$  THC (92,5 %;  $p < 0,001$  nach 24 h und 98,6 %;  $p < 0,001$  nach 48 h). Die  $\text{IC}_{50}$  Werte betragen 45,8  $\mu\text{M}$  nach 24 stündiger Behandlung und 38,15  $\mu\text{M}$  nach 48 h.

**4.2.6. THC induziert Apoptose in der myeloischen Leukämiezelllinie M-07e****A**

**B****C****D****Abb. 9: Proapoptotischer Effekt des THC bei der AML Zelllinie M-07e**

Dargestellt sind die Ergebnisse der Apoptosemessung nach 24- (A) und 48 stündiger (B) Behandlung der M-07e Zellen mit ansteigender THC Konzentration und Methanol in der höchsten applizierten Dosis als Mittelwerte aus drei Experimenten und den dazugehörigen Dosis-Effekt Kurven für 24h (C) und 48h (D).

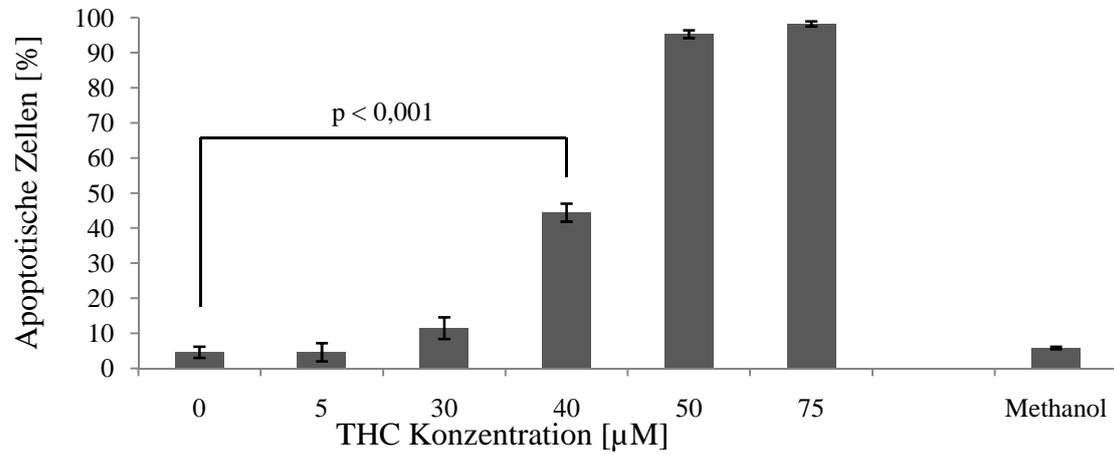
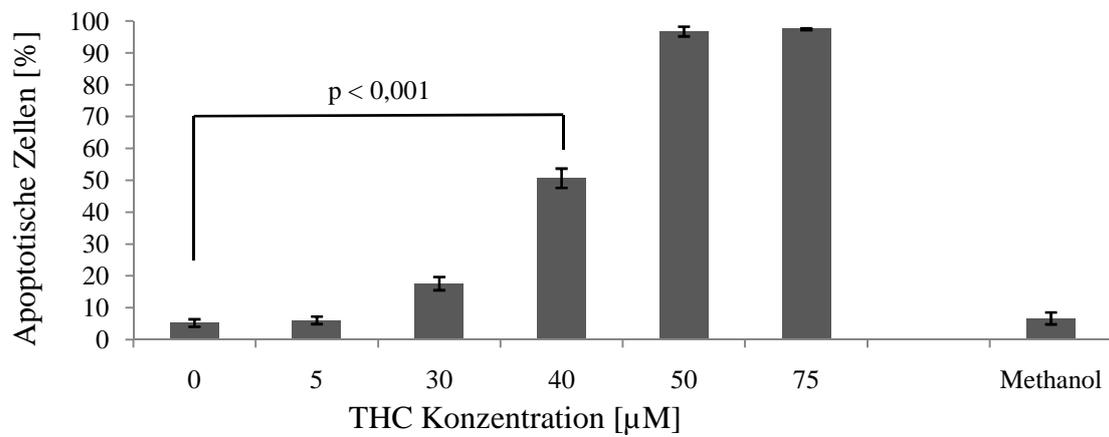
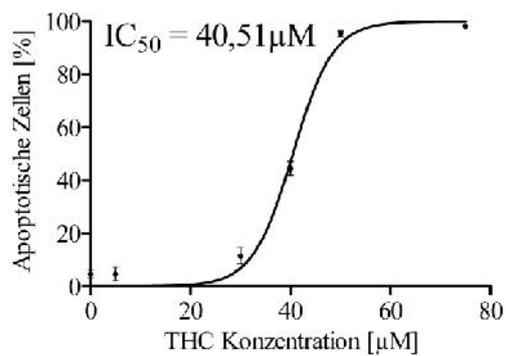
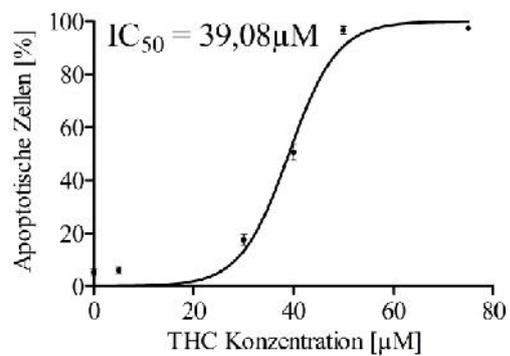
In der Abbildung 9 ist der proapoptotische Effekt des THC auf die akute myeloische Leukämiezelllinie M-07e dargestellt.

Nach einem Zeitraum von 24 h konnte bei der maximal untersuchten THC Dosis von 75 µM ein Anteil von 73,59 % ± 1,04 (p < 0,001) apoptotischer Zellen gemessen werden.

Nach 48 h betrug dieser bei gleicher THC Konzentration 89,75 % ± 2,18 (p < 0,001).

Die IC<sub>50</sub> Werte für beide Versuchszeiträume liegen mit 62,97 µM für 24 h und 58,54 µM nach 48 h relativ nah beieinander.

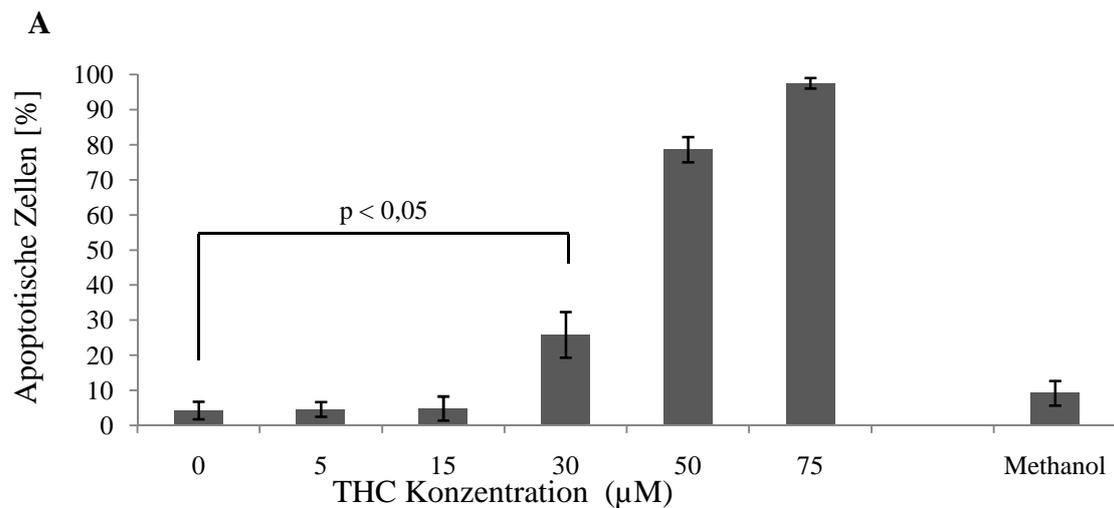
#### 4.2.7. Dosisabhängiger Anstieg der Apoptoserate durch THC bei der myeloischen Leukämiezelllinie MV4-11

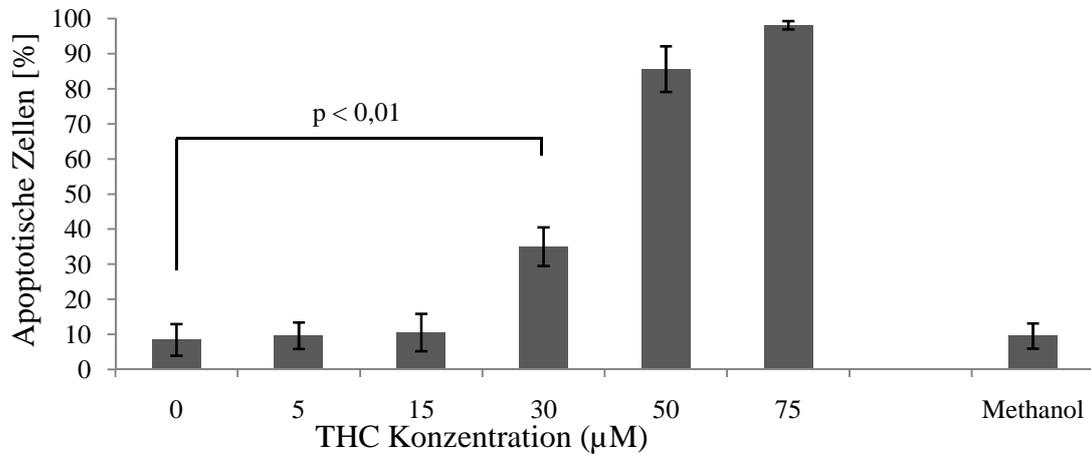
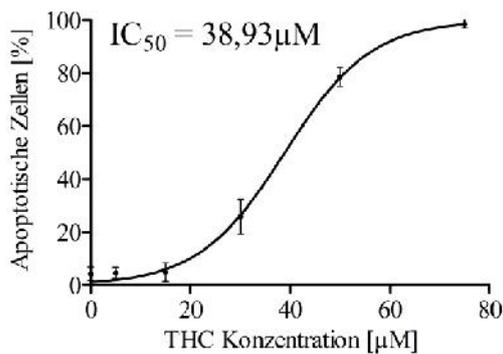
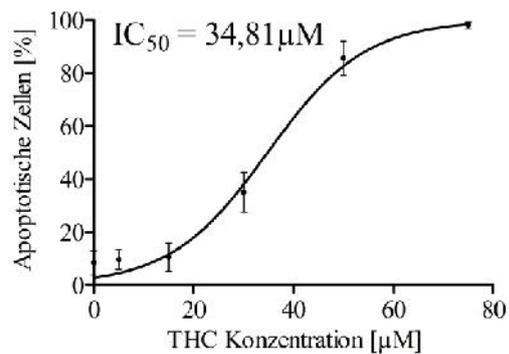
**A****B****C****D**

**Abb. 10: Die AML Zelllinie MV4-11 unterliegt einem positiv apoptotischen Effekt durch THC**

Zu sehen sind die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Apoptosemessung als Mittelwerte von drei Experimenten und den Standardabweichungen für 24h (A) und 48h (B) sowie die dazugehörige Dosis-Effektkurven nach 24- (C) bzw. 48 stündiger Behandlung (D).

Sowohl nach 24 h als auch nach 48 h zeigt sich bei der akuten myeloischen Zelllinie MV 4-11 ein signifikanter Anstieg der apoptotischen Zellen bis auf ca. 95% bei 50  $\mu\text{M}$  THC. Eine längere Inkubationsdauer als 24 h Stunden konnte die Apoptoserate nicht signifikant beeinflussen, was die fast identischen  $\text{IC}_{50}$  Werte nach 24 h (40,51  $\mu\text{M}$ ) und 48 h (39,08  $\mu\text{M}$ ) zeigen.

**4.2.8. Dosisabhängige Apoptoseinduktion durch THC bei der Leukämiezelllinie****Kasumi-1**

**B****C****D**

**Abb. 11: Dosisabhängiger Anstieg der Apoptoserate bei der Zelllinie Kasumi-1 unter THC Behandlung**

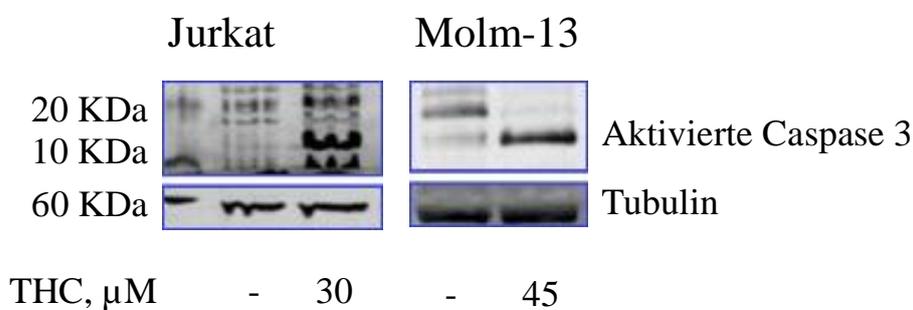
Kasumi-1 Zellen wurden 24h und 48h mit steigender THC Dosis behandelt und danach wurde die Apoptoserate bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei Experimenten zusammen mit deren Standardabweichungen für 24h (A) und 48h (B) sowie die dazugehörigen Dosis-Effektcurven ebenfalls für 24 h (C) und 48h (D).

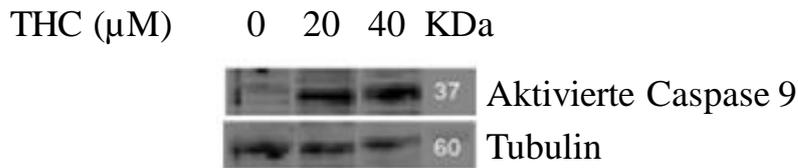
Nach 24 h Behandlung mit ansteigenden THC Konzentrationen zeigte sich bei den Kasumi-1 Zellen, gewonnen aus einem Patienten mit akuter myeloischer Leukämie, eine errechnete  $IC_{50}$  von  $38,93 \mu\text{M}$  mit einem maximalen Anteil apoptotischer Zellen von  $97,56\% \pm 1,5$  ( $p < 0,001$ ) bei  $75 \mu\text{M}$  THC. Bei einer längeren Inkubationsdauer von insgesamt 48 h betrug die  $IC_{50}$   $34,81 \mu\text{M}$  bei einem maximalen Anteil apoptotischer Zellen von  $98,1\% \pm 1,2$  ( $p < 0,001$ ) bei  $75 \mu\text{M}$  THC.

### 4.3. THC induziert Apoptose über den intrinsischen Weg

Eine zentrale Rolle bei der Apoptose spielen die so genannten Caspasen. Caspasen sind proteolytische Enzyme, so genannte Proteasen, mit einem Zystein im aktiven Zentrum und spalten ihre Zielproteine an bestimmten Aspartatresten. Die Caspasen selbst werden als inaktive Procaspasen synthetisiert und durch proteolytische Spaltung aktiviert. Die Caspasen können über einen membranständigen Rezeptor-vermittelten – extrinsischen – oder einen mitochondrial vermittelten – intrinsischen – Signaltransduktionsweg aktiviert werden. Je nach unterschiedlichem Signalweg werden verschiedene Initiatorcaspasen (u.a. Caspase 8 und 9) aktiviert, die letztlich über eine komplexe Kette an Aktivierungsvorgängen die gleichen Effektorcaspasen (u.a. Caspase 3) aktivieren und in einem gemeinsamen Endweg die Apoptose initiieren [103]. Die Caspase 9 als Initiatorcaspase sowie die Caspase 3 als gemeinsame Effektorcaspase führen hierbei zentrale Funktionen des intrinsischen, mitochondrial vermittelten Apoptoseweges aus [104].

Wie Lombard et al. zeigten, wird die Apoptose induzierende Wirkung des THC in Zellen der Jurkat-Zelllinie über den intrinsischen Weg vermittelt [79]. Auch wir konnten dies bestätigen. Wie Abbildung 12 zeigt, führt die Behandlung der Jurkat Zellen mit THC zu einer Aktivierung der Caspase 9 und 3 und somit über den intrinsischen Weg zur Induktion der Apoptose bei diesen Zellen. Darüber hinaus konnte die Aktivierung der Caspase 3 für die Zellreihe Molm-13 ebenfalls bestätigt werden.



Jurkat**Abb.12: THC induziert die Apoptose über den intrinsischen Weg**

Western Immunoblot-Analyse der aktivierten Caspase 3 für Jurkat und Molm-13 Zellen nach Behandlung mit THC, sowie der aktivierten Caspase 9 für Jurkat Zellen. Tubulin dient als Ladungskontrolle.

**4.4. THC reduziert den Anteil viabler ex vivo-Blasten**

Die oben beschriebenen Ergebnisse demonstrieren einen antiproliferativen und proapoptischen Effekt von THC auf Leukämiezellen.

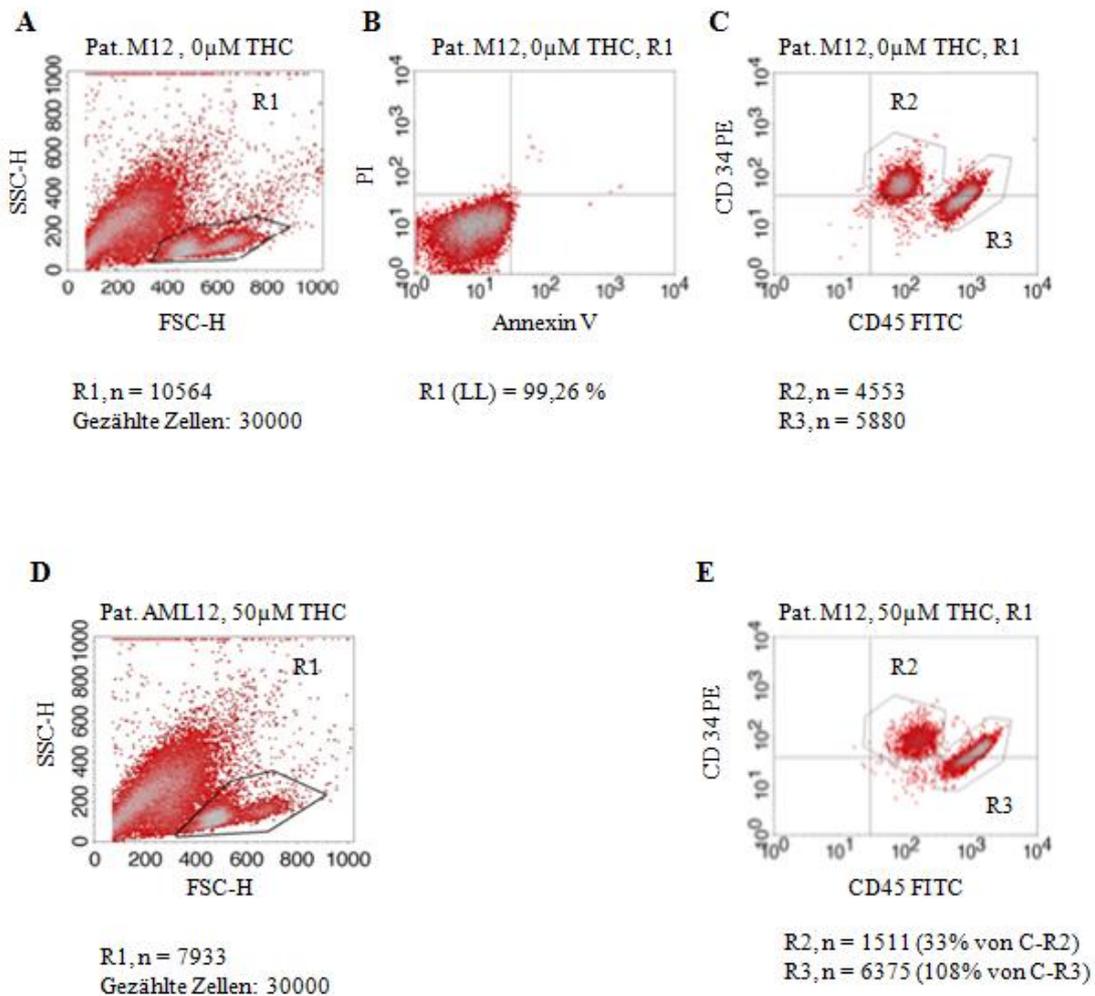
Im Weiteren sollte festgestellt werden, ob sich diese Ergebnisse auch auf native Leukämiezellen übertragen lassen. Hierfür verwendeten wir extrahierte Blasten von Patienten mit akuter myeloischer oder lymphatischer Leukämie und behandelten diese ex vivo mit THC in einer Dosis, die mit  $50\mu\text{M}$  in etwa der  $\text{IC}_{50}$  von Jurkat entspricht.

Auf Grund der schwierigen Kulturbedingung von nativen Blasten ex vivo mit einem häufig bereits erhöhten Anteil apoptotischer Zellen war der Annexin V- basierte Apoptoseassay nicht praktikabel. Daher analysierten wir die Reduktion viabler Blasten mittels Durchflusszytometrie in einem FSC/SSC dotplot Diagramm als Maß für den antileukämischen Effekt des THC auf ex vivo Blasten [95]. Zur Bestätigung der Viabilität der Kolonie wurde parallel ein Annexin V/PI Assay mit den unbehandelten Zellen durchgeführt. Die viable Zellpopulation wurde durch Negativität sowohl für Annexin V als auch PI definiert und entsprechend markiert.

Darüber hinaus diente eine Immunphäotypisierung (FITC-CD45 AK/ PE-CD 34 AK) der Verifizierung des leukämischen Charakters der Zellen. Wie in 3.5.3. beschrieben findet sich eine physiologische CD34-Expression auf lymphatischen und myeloischen Progenitoren im Knochenmark in einem Bereich von unter 5% und ist in diesem

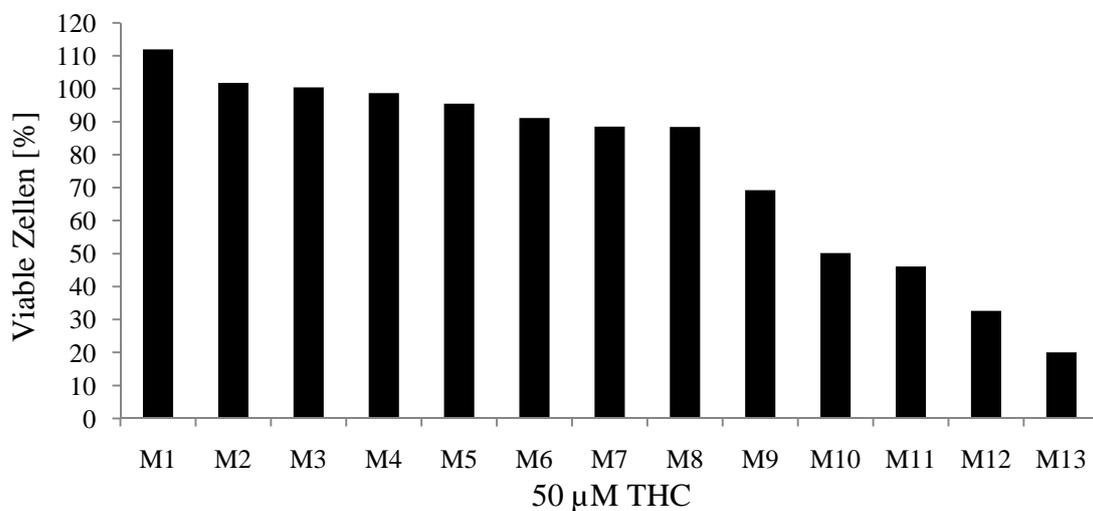
Rahmen Marker leukämischer Zellen. Das CD45-Antigen dient als Pan-Leukozytenmarker. Leukämiezellen zeigen typischerweise eher niedrigere Expressionsdichten für CD45.

Insgesamt wurden auf diese Art und Weise 26 Patientenproben untersucht, 13 AML- und 13 ALL-Proben. (Nähere Informationen zu den einzelnen Proben finden sich in 2.8.) Der Anteil viabler, leukämischer ex-vivo Blasten wurde nach ihrer Behandlung mit 50  $\mu$ M THC über 48 Stunden im Vergleich zur unbehandelten Probe gemessen. Eine exemplarische Darstellung der durchflusszytometrischen Analyse einer Patientenprobe zeigt Abbildung 13.



**Abb. 13: Exemplarische Darstellung der durchflusszytometrischen Analyse eines Patienten**  
 (A) Auswahl der Blastenpopulation R1 anhand des FSC/SSC Dichtediagrammes. (B) Verifizierung der Viabilität der Zellen durch einen Annexin V/PI Assay, (C) sowie des leukämischen Charakters anhand der FITC CD45/PE CD34 Expressionsanalyse. (D und E) Reduktion der viablen Zellen unter 50 $\mu$ M THC.

#### 4.4.1. THC bewirkt eine Verringerung der gemessenen viablen Zellen bei myeloischen ex vivo Blasten

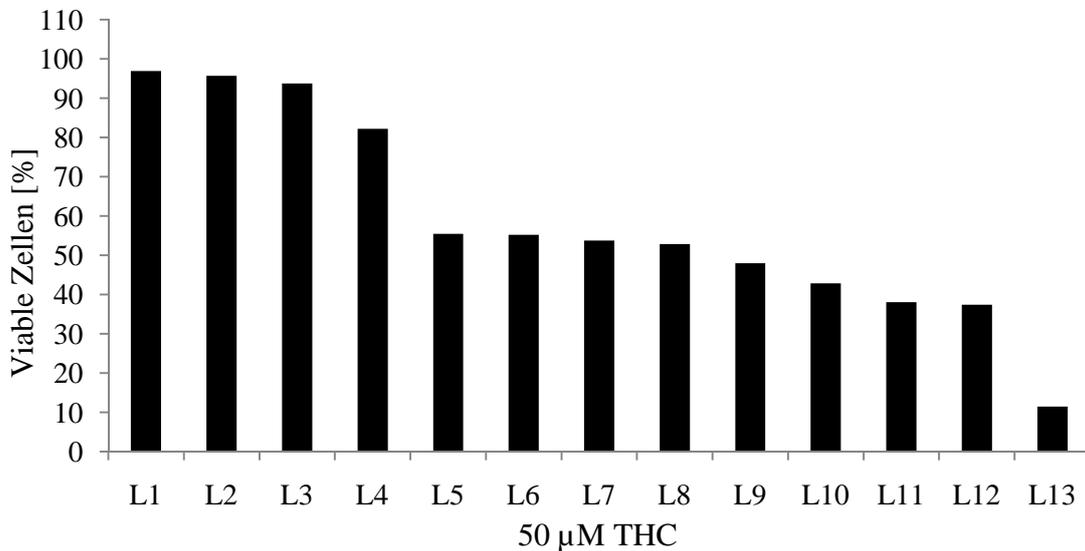


**Abb. 14: THC reduziert die Anzahl viabler Zellen bei einem Teil der getesteten myeloischen ex vivo Blasten**

Dargestellt sind jeweils die Menge viabler Zellen als prozentualer Anteil zur unbehandelten Kontrolle nach 48 stündiger Inkubation mit 50 $\mu$ M THC.

Wie Abbildung 14 zeigt, konnten bei 4 der insgesamt 13 getesteten Proben (ca. 31%) von an AML erkrankten Patienten eine Reduktion der viablen Zellen um min. 50 % im Vergleich zum Ausgangswert beobachtet werden.

#### 4.4.2. THC reduziert dosisabhängig die Anzahl viabler Zellen bei den untersuchten ex vivo Blasten ALL Erkrankter



**Abb. 15: THC bewirkt eine Verringerung der gemessenen viablen Zellen bei einem Großteil der getesteten Proben ALL Erkrankter.**

Die Anzahl viabler Zellen nach Behandlung mit 50µM THC ist als prozentualer Anteil der unbehandelten Kontrolle dargestellt.

Native Blasten von 13 Patienten mit akuter lymphatischer Leukämie wurden für 48 h mit 50µM THC inkubiert. Wie in Abbildung 15 zu sehen, konnten bei 9 von ihnen eine Reduktion viabler Zellen gemessen werden. Die Anzahl an untersuchten Zellen fiel hierbei um ca. 50 % und mehr bei den Proben L5 bis L13 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ab.

Insgesamt zeigten sich Blasten mit lymphatischer Differenzierung sensitiver gegenüber dem THC mit 9/13 (ca. 69%) Proben mit einer Reduktion der viablen Zellen von min. 50%. Im Vergleich dazu zeigten wie oben beschrieben nur 4/13 (ca. 31%) der Blasten mit myeloischer Differenzierung eine Reduktion der viablen Zellen von >50%.

#### **4.5. Blasten mit lymphatischen Markern zeigen höhere Sensitivität gegenüber THC**

Wie in 4.4. demonstriert, zeigten sich vor allem die Blasten mit lymphatischer Differenzierung sensitiv gegenüber dem THC. Allerdings gab es auch eine kleinere Untergruppe der myeloischen Blasten, bei der es unter dem Einfluss des THC zu einer nachweisbaren Reduktion der viablen Zellen kam.

Um einen möglichen Zusammenhang zwischen Phänotyp und Sensitivität hinsichtlich des antiproliferativen bzw. proapoptotischen Effektes durch THC der untersuchten Zelllinien und nativen Blasten zu eruieren, untersuchten wir diese (und im Weiteren auch die verwendeten Zelllinien) im Nachhinein auf ihre exprimierten Antigene.

**Tabelle 9:** Phänotyp aller untersuchten Zellmodelle (Aberrante Antigene sind einzeln genannt)

Patienten- kürzel / Zell - linie	Phänotyp			Viablen Zellen [%] bei 50µM THC
	Antigenklassen			
	T-Zell	B-Zell	Myeloische	
M1	N/A	N/A	+	100
M2	-	-	+	100
M3	(CD3+)	-	+	100
M4	-	-	+	98,74
M5	-	-	+	95,53
M6	-	CD19+	+	91,1
M7	-	-	+	88,52
M8	-	-	+	88,42
M9	N/A	N/A	+	69,21
M10	CD7+ CD56+	-	+	50,14
M11	CD7+	-	+	46,15

	CD5+			
M12	CD7+ CD5+	-	+	32,61
M13	CD7+ CD5+	-	+	20
L1	-	+	-	96,93
L2	-	+	CD33+ CD13+	95,68
L3	-	+	CD33+	93,73
L4	-	+	-	82,2
L5	-	+	-	55,41
L6	+	CD79+	-	55,24
L7	-	+	-	53,74
L8	-	+	CD33+ CD13+	52,87
L9	-	+	-	48
L10	-	+	-	42,86
L11	+	-	-	38,02
L12	-	+	CD33+ CD13+	37,42
L13	CD56+ CD1a+	+	CD13+	11,5
K-562	-	-	+	87
M-07e	-	-	+	81
HL-60	CD4+	-	+	15
Kasumi-1	CD4+	-	+	14
MV4-11	CD4+	-	+	3
Molm-14	CD4+	-	+	18
Molm-13	CD4+	-	+	3

Jurkat	+	-	-	31
--------	---	---	---	----

Wie in Tabelle 9 ersichtlich, exprimieren diejenigen Zelllinien und nativen Blasten mit myeloischer Differenzierung, bei denen ein starker antiproliferativer bzw. proapoptotischer Effekt des THC gezeigt werden konnte, aberrant lymphatische Marker. Interessanterweise exprimieren sowohl die myeloischen Blasten als auch die Zelllinien mit höherer Sensitivität gegenüber dem THC aberrant T-Zell Antigene.

Allerdings ergab sich bei den von uns getesteten Zellmodellen mit lymphatischer Differenzierung kein Zusammenhang zwischen B- und T-Zell Antigenklasse und Sensitivität gegenüber dem THC.

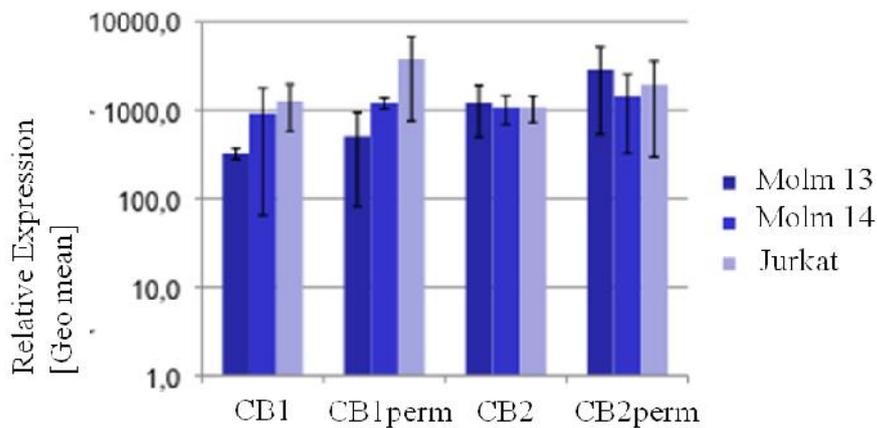
AML Kohorten mit aberranter Expression von B-Zell Antigenen könnten entsprechend ähnlich sensitiv auf das THC ansprechen. In unserer Testkohorte zeigte die einzige Probe mit aberranter B-Zell Antigenexpression (CD19, M6) allerdings keine signifikante Sensitivität gegenüber dem THC, was aber der geringen Anzahl getesteter Proben geschuldet sein kann und weiterer Verifizierung bedarf.

#### 4.6. Die Expression der Cannabinoidrezeptoren CB1 und CB2 korreliert mit der Sensitivität der Zellen gegenüber dem THC

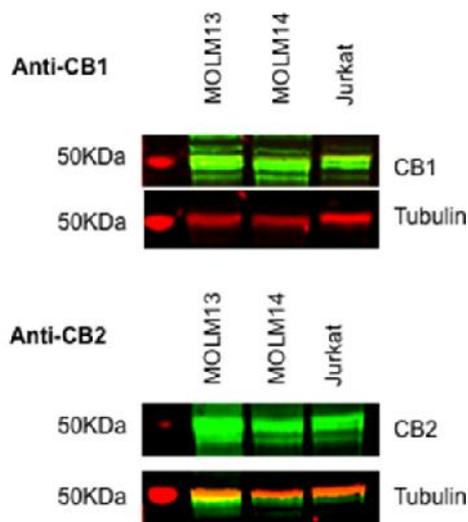
Um einen möglichen Zusammenhang zwischen dem Ansprechen unserer getesteten Zellmodelle auf das THC (hinsichtlich Apoptose bzw. Reduktion der viablen Zellen) und der Expression der bekannten Cannabinoidrezeptoren CB1 und CB2 herzustellen, untersuchten wir die Expression der Rezeptoren bei den von uns untersuchten Patientenproben mit Hilfe eines durchflusszytometrischen Assay.

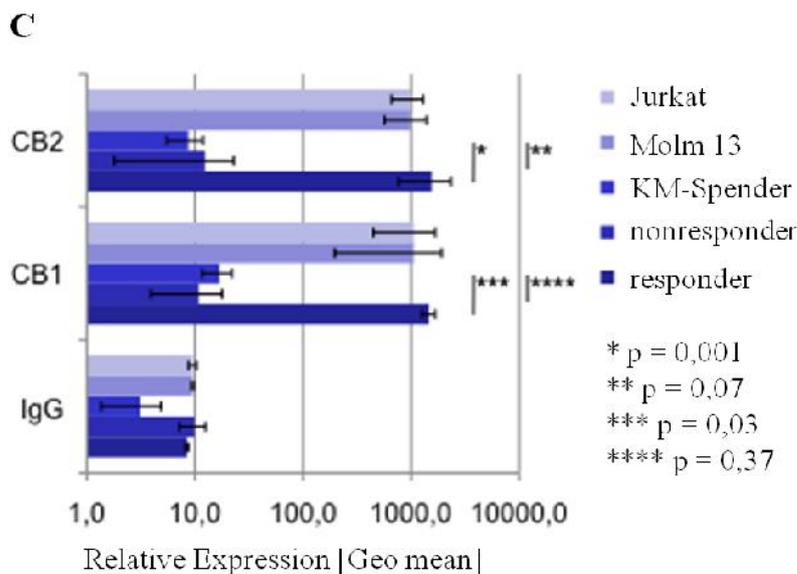
Die Spezifität der verwendeten Antikörper wurde in einem Western-Immunblot und mittels durchflusszytometrischer Analyse an den Zelllinien Jurkat, Molm-13 und Molm-14 validiert. (Abbildung 16 A und B)

**A**



**B**





**Abb. 16: Expression der Cannabinoidrezeptoren CB1 und CB2 in leukämischen Zellen**

(A) Durchflusszytometrische Analyse der intrazellulären (CB1/2 perm) und extrazellulären CB – Rezeptorexpression für Molm-13/14 und Jurkat. (B) Western Immunoblot-Analyse der Cannabinoidrezeptoren CB1 und CB2 für Jurkat und Molm-13/14. Die Majorisoform des CB1-Rezeptors (1a long) hat ein Molekulargewicht von 52 KDa. Der CB2-Rezeptor etwa von 40-50 KDa. (C) Dargestellt ist die extrazelluläre CB1/CB2-Rezeptor Expression von nativen leukämischen Blasten (n=12) und gesunden Knochenmarkspendern (KM-Spender; n=10) sowie von den Jurkat und Molm-13 Zelllinien; jeweils mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Die responder/nonresponder Kohorte (n=4, resp. n=8) beinhaltet Patientenproben mit (responder) bzw. ohne (nonresponder) signifikantes Ansprechen auf das THC ex-vivo. (\*-\*\*\*\*) Die statistische Signifikanz wurde mittels Student's t-test ermittelt.

Bei insgesamt 4 der 12 getesteten Patientenproben zeigte sich eine deutlich erhöhte Expression der Cannabinoidrezeptoren. Interessanterweise zeigte sich bei allen eine Erhöhung sowohl für den CB1 als auch den CB2-Rezeptor. Bei den anderen 8 getesteten ex-vivo Blasten sowie den vergleichsweise untersuchten, gesunden Knochenmarkspendern fanden sich keine erhöhten Expressionslevel der beiden Cannabinoidrezeptoren.

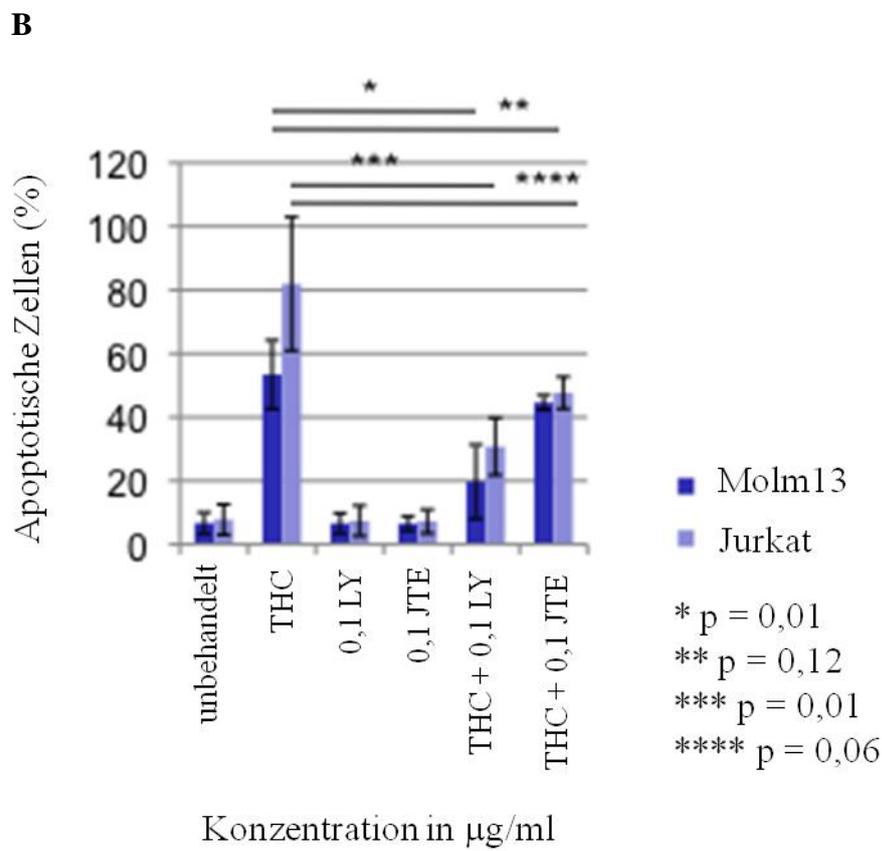
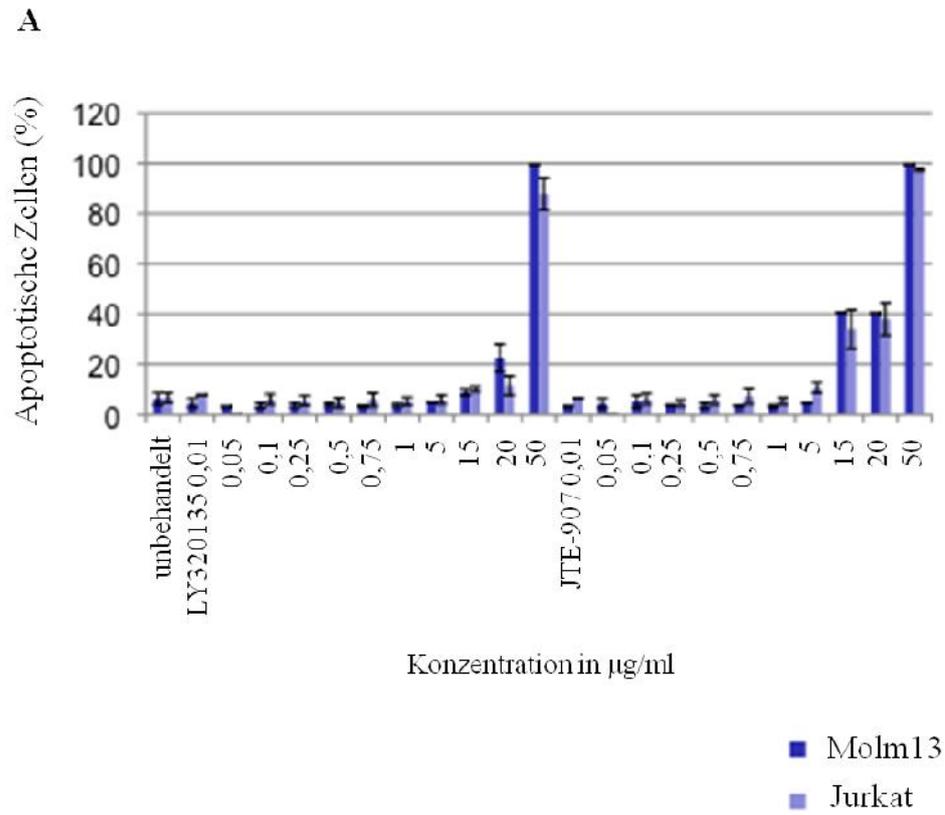
Auffallend war die positive Korrelation zwischen erhöhtem Expressionslevel der Cannabinoidrezeptoren und dem Ansprechen auf das THC (als responder bezeichnet; definiert durch eine Apoptoserate von min. 20% nach Behandlung mit 50µM THC über 48 h) und charakterisiert so eine erhöhte Expression der Rezeptoren als wichtige Voraussetzung für den proapoptotischen bzw. antileukämischen Effekt des THC.

#### **4.7. Die Wirkung des THC wird sowohl durch den CB1 als auch den CB2 Rezeptor vermittelt**

Da die Expression beider Cannabinoidrezeptoren in den getesteten Zellreihen entweder erhöht (in der Gruppe der responder) oder erniedrigt war (bei der Gruppe der nonresponder), untersuchten wir im Weiteren ob der proapoptotische Effekt des THC durch einen der beiden Rezeptoren im Speziellen vermittelt wird. Hierfür untersuchten wir die Zelllinien Jurkat und Molm-13 hinsichtlich Apoptoseinduktion durch THC jeweils in Kombination mit einem CB1- und CB2 Rezeptorantagonisten/ inversen Agonisten. LY 320135 ist ein selektiver CB1-Rezeptorantagonist mit einer ca. 70-fach höheren Affinität zum CB1-Rezeptor als zum CB2-Rezeptor [105]. JTE-907 ist ein hoch selektiver CB2 inverser Agonist, bindet also an den CB2 Rezeptor und setzt seine Aktivität herab und führt so zu einem negativen Effekt [106].

Initial wurden die Zellreihen mit ansteigenden Dosen LY320135 und JTE-907 ohne THC behandelt, um jeweils die optimale Konzentration ohne intrinsischen, zytotoxischen Effekt zu ermitteln.

Anschließend wurden die Zellen entweder mit LY320136 oder JTE-907 in einer subtoxischen Dosis von 0,1 µg/ml über 12 h behandelt und daraufhin mit den ungefähren  $IC_{50}$  Konzentration THC über weitere 48 h bei 37°C im Begasungsbrutschrank inkubiert. Der jeweilige proapoptotische Effekt wurde mittels AnnexinV/PI Färbung bestimmt.



**Abb. 17: THC vermittelt seine Wirkung sowohl über den CB1- als auch den CB2-Rezeptor**

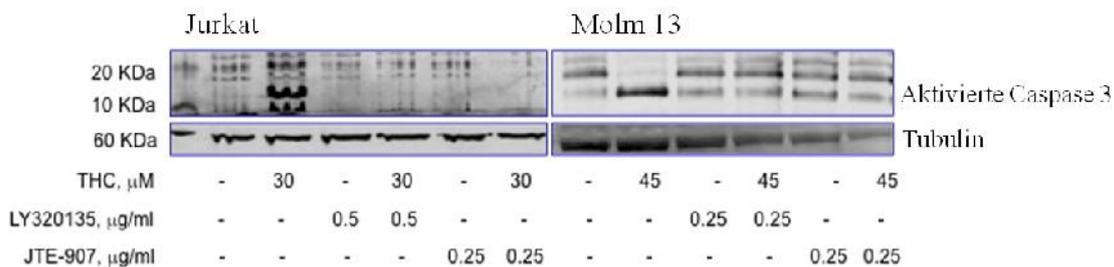
(A) zeigt den Anteil apoptotischer Zellen der Jurkat und Molm-13 Reihe nach Behandlung mit den jeweiligen Rezeptorantagonisten respektive inversen Agonisten in aufsteigender Konzentration.

(B) stellt den Anteil apoptotischer Zellen der Jurkat und Molm-13 Reihe nach Inkubation mit THC (30  $\mu$ M bei Jurkat und 45  $\mu$ M bei Molm-13) mit oder ohne Vorbehandlung mit dem jeweiligen Rezeptorantagonisten/inversen Agonisten dar.

Wie die Abbildung 17 zeigt, führten beide Inhibitoren sowohl bei der Jurkat als auch der Molm-13 Zelllinie zu einer Aufhebung des proapoptischen Effektes durch das THC. Für den CB1 Inhibitor LY320136 konnten für beide Zelllinien statistisch signifikante Werte ermittelt werden. Für den CB2 Inhibitor JTE 903 wurden statistisch signifikante Werte nur knapp verfehlt.

Um dennoch zeigen zu können, dass beide Rezeptorinhibitoren den proapoptischen Effekt des THC verhindern, wurden die Zellen auf ihren Gehalt an aktivierter Caspase 3 hin untersucht. Aktivierte Caspase 3 fungiert in diesem Versuch in ihrer Rolle als zentrale Effektorcaspase der Apoptose als Indikator für einen bereits aktivierten Apoptosevorgang.

In Abbildung 18 ist dargestellt, dass die Behandlung sowohl der Jurkat als auch der Molm-13 Zellen mit den Rezeptorinhibitoren zu keiner nachweisbaren Aktivierung der Caspase 3 und somit auch zu keiner aktiven Apoptose führt.

**Abb. 18: Der proapoptische Effekt des THC ist CB1 und CB2 vermittelt**

Western Immunoblot-Analyse der aktivierten Caspase 3 für Jurkat und Molm-13 Zellen nach Behandlung mit THC mit und ohne jeweiligen CB1 und CB2 Rezeptorinhibitor. Tubulin dient als Ladungskontrolle.

## **5. Diskussion**

Die Behandlungserfolge der akuten Leukämien im Erwachsenenalter, vor allem bei Älteren, sind trotz intensiver Forschung weiterhin nicht zufriedenstellend. Eine große Rolle hierbei spielen krankheitsspezifische Limitationen wie etwa komplexe Karyotypen. Aber auch die wachsende Zahl von Komorbiditäten im Alter schränkt die Behandlungsalternativen zusätzlich ein und verhindert etwa aggressive, potentiell kurative Therapien. In diesen Situationen beschränkt sich die Therapie meist auf symptomatische Zytoreduktion oder best supportive care.

Unsere Ergebnisse präsentieren einen neuen Therapieansatz für Dronabinol, der sich effektiv für eine bestimmte Leukämie-Patientengruppe anhand in vitro und ex vivo Untersuchungen gezeigt hat.

Cannabinoide können heute bei Tumorpatienten vor allem palliativ in der Symptomlinderung von Schmerzsyndromen, Übelkeit und Erbrechen sowie der Appetitanregung eine Rolle spielen [107].

In den letzten Jahren konnte allerdings auch ein direkter antitumoröser Effekt dieser Cannabinoide an mehreren Tumormodellen in vitro sowie in vivo gezeigt werden.

Für THC, als Hauptkomponente der Pflanze *Cannabis sativa*, konnte ein antiproliferativer Effekt auf Zellen des Mamma- und Prostatakarzinom, sowie Glioblastom und Lymphomen in vitro und in vivo nachgewiesen werden [77,108-110].

Im Gegensatz dazu gibt es aber auch Untersuchungen an Zelllinien von Mamma- und Bronchialkarzinomen, die einen Proliferations- steigenden Effekt von THC auf diese Tumorzellen zeigen [111,112].

Für ein myeloisches Leukämiemodell wurde der periphere Cannabinoid Rezeptor 2 in seiner Wirkung gar als Onkogen charakterisiert [82,113].

Nichtsdestotrotz sind der Gebrauch und die Erforschung der Cannabinoide aus rechtlichen Gründen in vielen Ländern weiterhin stark reglementiert und klinisch wirksame Dosierungen genau wie weitere Tumorentitäten, die von ihnen profitieren könnten sind kaum erforscht.

Als Ergebnisse unserer Arbeit an in vitro Zellmodellen sowie ex vivo Blasten zeigte sich A) ein antiproliferativer sowie proapoptotischer Effekt von THC auf die untersuchten Zellen. B) Dieser Effekt zeigte sich vor allem in Zellmodellen mit lymphatischer Differenzierung oder denjenigen myeloischen Zellmodellen mit aberranter Expression lymphatischer Marker.

C) Der proapoptotische Effekt wird sowohl über den CB1 als auch den CB2 Rezeptor vermittelt. Die Expression dieser Cannabinoidrezeptoren ist eine Voraussetzung für die Wirksamkeit von THC. D) Die antitumoröse Wirkung im Allgemeinen ist dosisabhängig und in vivo erreichbar.

Bei Jurkat und Molm-13 führte THC zu einem konzentrationsabhängigen, signifikanten Rückgang der proliferativen Zellen mit einer  $IC_{50}$  von ca. 18  $\mu M$  bei Molm-13 und ca. 15  $\mu M$  bei Jurkat jeweils nach einer Inkubationszeit von 72 Stunden.

Bei allen untersuchten Zelllinien konnte darüber hinaus eine Apoptoseinduktion durch das THC nachgewiesen werden, wobei die  $IC_{50}$  zwischen den Zelllinien variierten, wie die Tabelle 10 zeigt. Falsch positive Werte, welche durch eine zusätzliche apoptotische Wirkung der verwendeten Trägerlösung Methanol entstanden, konnten hierbei nach Auswertung der Ergebnisse vernachlässigt werden.

**Tabelle 10:**  $IC_{50}$  Werte der untersuchten Zelllinien nach THC Behandlung

Zelllinie	$IC_{50}$ bei 24h Inkubation [ $\mu M$ ]	$IC_{50}$ bei 48h Inkubation [ $\mu M$ ]
Jurkat	55,23	46,18
Molm-13	38,93	32,79
Molm-14	54,62	44,07
K-562	82,54	62,10
HL-60	45,80	38,15
M-07e	62,97	58,54
MV4-11	40,51	39,08
Kasumi-1	38,93	34,81

Unsere Ergebnisse stehen in Einklang mit Arbeiten anderer Forschungsgruppen, welche ebenfalls eine Induktion der Apoptose bei Leukämiezellen unter Verwendung von THC nachgewiesen haben [114,115].

So konnten McKallip et. al 2002 erstmals anhand von in vitro Versuchen mit den akuten lymphoblastischen Leukämiezelllinien Jurkat, Molt-4 und Sup-T1 ein Anstieg der Apoptose nach Gabe von THC in Konzentrationen von über 10 $\mu$ M feststellen. Interessanterweise konnte die Apoptose-induzierende THC Dosis durch die Verwendung von Serum freiem Kultivierungsmedium auf unter 5 $\mu$ M gesenkt werden und liegt damit weit unter der von uns festgestellten Dosis [77].

Hier ist eine direkte Bindung von THC an Serumproteinen anzuschuldigen, was die Konzentration und damit Effektivität des freien THC signifikant reduziert und eine Dosisanpassung notwendig macht [116,117]. Eigene Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe mit unabhängigen, investigativen Medikamenten zeigen diesen Effekt ebenfalls eindrücklich [118].

Aufgrund adverser Effekte einer FBS-Reduktion im Kulturmedium auf den Zellzyklus (u.U. wird ein Zellzyklusarrest induziert) [119] haben wir uns entgegen der gängigen Praxis für eine höhere (zudem physiologischere) FBS Konzentration im Kulturmedium entschieden. Die Vergleichbarkeit der Daten ist also eingeschränkt und muss in diesem Kontext erfolgen. Die tatsächlich klinisch effektive Dosierung muss letztlich in vivo eruiert werden.

In einer anderen Studie konnte bei der HL-60 Zelllinie, gewonnen aus einem Patienten mit akuter myeloischer Leukämie, eine IC<sub>50</sub> von 21,1  $\mu$ M THC nach 48h Inkubation gemessen werden. Hier lag der Anteil apoptotischer Zellen nach 6-stündiger Behandlung mit 60 $\mu$ M THC und Serum-haltigem Kultivierungsmedium (10% FBS) bei ca. 40% und deckt sich so in etwa mit unseren Ergebnissen [120]. Zu erwähnen wäre weiterhin, dass in den oben genannten Studien die Apoptoseinduktion bereits nach wenigen Stunden messbar war, was die eher geringen Unterschiede der IC<sub>50</sub> Konzentrationen innerhalb der einzelnen von uns getesteten Zelllinien nach 24- bzw. 48-stündiger Behandlung erklärt.

Trotz zahlreicher Studien über die antitumoröse Wirkung des THC in der Vergangenheit, bleibt der genaue Wirkmechanismus weiter unklar. Unsere Ergebnisse zeigen die antiproliferative und proapoptotische Wirkung des THC in einer definierten Gruppe von Zellmodellen und ex vivo Blasten Leukämie Erkrankter. Die Beobachtung, dass vor allem Zelllinien und Patientenblasten mit lymphatischer Differenzierung bzw. myeloische Zellen mit aberranter Expression lymphatischer Marker sensitiv gegenüber dem THC waren, könnte dazu beitragen, eine neue, definierte Patientengruppe zu identifizieren die von THC profitieren könnte und so neue Therapieoptionen eröffnen. Darüber hinaus könnte diese von uns gezeigte Linienabhängigkeit die teils kontroversen Ergebnisse hinsichtlich der Wirksamkeit des THC gegenüber akuten Leukämiezellmodellen in der Vergangenheit teilweise erklären.

Zur genauen Verifizierung unserer Ergebnisse hinsichtlich dieser Linienabhängigkeit bedarf es zukünftig sicher weitreichendere Studien an größeren Patientengruppen.

Ein weiterer, bisher nicht vollständig verstandener Aspekt stellt die Rolle der beiden bisher identifizierten Cannabinoidrezeptoren, CB 1 und CB2, bei der Wirkweise der Cannabinoide dar.

Beide Rezeptoren konnten in unterschiedlichen Konzentrationen in Tumormodellen nachgewiesen werden was den Schluss nahe legt, dass sie bei dem antiproliferativen bzw. proapoptotischen Effekt von THC eine Rolle zu spielen scheinen. Unterschiedliche Studien mit spezifischen CB1- bzw. CB2 Agonisten bzw. Antagonisten zeigen allerdings Unklarheiten hinsichtlich Rezeptorfunktionalität und THC Effizienz auf und kommen teilweise zu erheblich unterschiedlichen Ergebnissen.

Z.B. zeigten McKallip et al. 2002, dass verschiedene humane Leukämiezelllinien, darunter Jurkat und Molt-4, den CB 2, nicht aber den CB 1 Rezeptor exprimieren und darüber hinaus der Apoptose-induzierende Effekt durch den CB2 Antagonisten SR144528 aufgehoben werden konnte. Interessanterweise gelang dies für eine Zelllinie (T-Zelllymphom) allerdings auch durch den CB1 Rezeptor-Antagonisten SR141715A [77].

Powles et. al. 2005 kamen etwa zu dem Schluss, dass die von ihnen ermittelten zytotoxischen Effekte des THC auf 3 getestete akute Leukämiezelllinien (CEM, HL 60,

HEL-92) von keinem der beiden bekannten Cannabinoidrezeptoren vermittelt sind [120].

Zu einem ähnlichen Ergebnis gelangte auch die Forschungsgruppe um Ruiz et.al. 1999. Hier konnte die vorher durch THC signifikant gesteigerte Apoptoserate bei humanen Prostatazellen (PC-3) durch die Verwendung von spezifischen CB1- bzw. CB2 Rezeptor-Agonisten nicht bestätigt werden und es wurde ein Rezeptor-unabhängiger Wirkmechanismus des THC vermutet [121].

Weitere zum Teil gegensätzliche Ergebnisse in der Rezeptoranalyse führten zu einer Spekulation über weitere Cannabinoid Rezeptor Untergruppen. Erste Beweise für diese Vermutung lieferten in der Vergangenheit vor allem Untersuchungen zu den Rezeptoren GPR55 und TRPV1 obwohl beide auf Grund von teilweise kontroversen Untersuchungsergebnissen noch nicht endgültig als eigenständige Cannabinoid Rezeptoren gelten können [122].

Unsere Ergebnisse zeigen die Vermittlung des antiproliferativen bzw. proapoptotischen Effektes des THC über beide Cannabinoidrezeptoren. Gestützt werden unsere Ergebnisse an in vitro Zellmodellen vor allem durch die Tatsache, dass alle von uns sensitiv gegenüber dem THC getesteten Patientenproben eine hohe Expression beider Cannabinoidrezeptoren zeigten, wohingegen die Gruppe der nonresponder diese beiden relevanten Rezeptoren in einem nur geringen Maß exprimieren. Wir glauben daher einen neuen Ansatzpunkt in der Identifikation einer definierten Patientenkohorte gefunden zu haben, die von THC profitieren kann. Wichtig ist hierbei auch die Tatsache, dass die untersuchten, gesunden Knochenmarkspender eine ähnlich niedrige CB1/CB2 Expression zeigten und hilft dabei die notwendigen Dosen von Dronabinol im klinischen Kontext zu erforschen.

Auf Grund des sehr moderaten Nebenwirkungsprofils von Dronabinol (vgl. Fachinformation von Marinol®, z.B. [125]) können klinisch effektive Dosen in vivo erreicht werden. Es ist davon auszugehen, dass die individuell tolerablen Dosierungen im klinischen Umfeld stark variieren. Vorstellbar hierbei wäre eine schrittweise Aufdosierung, beginnend mit einer sub-effektiv geringen Dosis, um eine gewisse Toleranzentwicklung gegenüber den bekannten psychoaktiven Nebenwirkungen zu generieren. In diesem Zusammenhang hatten wir die Möglichkeit Plasma eines älteren

Patienten zu gewinnen, der auf Grund einer Tumor-assoziierten Kachexie mit Dronabinol behandelt wurde. Dieses wurde zur Kultivierung von Jurkatzellen genutzt und hierfür von 2 Tropfen schrittweise auf 6 Tropfen - ohne relevante Medikamentennebenwirkungen - gesteigert werden. Zum Zeitpunkt der Untersuchung stand der Patient unter keiner weiteren antitumorösen oder zytoreduktiven Therapie. Aus dem Plasma konnten Jurkat Zellen gewonnen und kultiviert werden und ein inhibitorischer Effekt des THC auf diese Tumorzellen mittels Apoptoseassay nachgewiesen werden [123]. Diese Beobachtung unterstreicht unsere Vermutung eines antileukämischen Effektes des Dronabinol in vivo.

Auf Grund der eher geringen Dichte der Cannabinoidrezeptoren in den respiratorischen und kardiovaskulären Kontrollregionen des Gehirns, sind ernste, lebensbedrohliche THC Intoxikationen selten dokumentiert. Die LC50 Werte sind allerdings nur ungenau definiert (die letale Dosis von männlichen Ratten lag bei oraler Applikation bei 1270 mg/kg; vgl. <http://toxnet.nlm.nih.gov>) und Dosis limitierende, relevante Nebenwirkungen - falls vorhanden - ergeben sich am ehesten durch eine THC-induzierte Hypotonie und Bradykardie [63,77].

In diesem Zusammenhang sollte erwähnt werden, dass gesundes Gewebe in der Regel deutlich geringere Cannabinoidrezeptordichten aufweist als malignes Gewebe (vgl. unsere Ergebnisse zur Rezeptorexpression). Insgesamt legen diese Ergebnisse den Schluss nahe, dass therapeutisch relevante und gleichzeitig gut tolerable Dosen von Dronabinol im klinischen Kontext erreicht werden können.

Neue Erkenntnisse in der Pathogenese akuter Leukämien haben in der Vergangenheit zu einer Reihe von neuen Therapieoptionen geführt. Insbesondere zielgerichtete auf molekulargenetischer aber auch epigenetischer Ebene wirksame Medikamente konnten erste vielversprechende Ergebnisse liefern. Trotz alledem ist die Prognose akuter Leukämien, insbesondere von Patienten in höherem Lebensalter, nach mehreren Rezidiven, nach erfolgloser Stammzelltransplantation oder von Patienten mit Komorbiditäten weiterhin schlecht. Der klinische Einsatz von Cannabinoiden als verhältnismäßig nebenwirkungsarme Agenzien könnte sich speziell für diese Patientengruppe anbieten.

In diesem Zusammenhang steht ein Fallbericht aus dem Jahr 2013. Hier konnte bei einer 14-jährigen Patienten mit einer BCR-ABL positiven ALL im fortgeschrittenen, palliativen Kontext durch die Verabreichung von THC in Form von Harzextrakten eine dosisabhängige Krankheitskontrolle erreicht werden [124].

Interessanterweise deckt sich dieser Fall mit dem von uns identifizierten Patientenkollektiv mit wahrscheinlicher Sensitivität gegenüber THC.

Die von uns erhobenen Daten demonstrieren, dass Dronabinol in ausgewählten Fällen im klinischen Alltag als Therapieoption erwogen werden sollte. Darüber hinaus zeigen sie aber auch die Notwendigkeit der Etablierung umfangreicherer diagnostischer Kriterien wie das CB1/2 Expressionsmuster oder z.B. das Vorhandensein lymphatischer Marker.

Obwohl kein zentraler Punkt unserer Arbeit- sollte erwähnt werden, dass die Therapie mit Dronabinol in den erwähnten Fällen neben dem antitumorösen Effekt auch weitere positive Nebeneffekte haben kann wie etwa Appetitanregung, Schmerzlinderung oder Verbesserung der Grundstimmung. Diese möglichen positiven Nebenaspekte der Therapie sollten im Einzelfall ebenfalls bei der Entscheidungsfindung bedacht werden.

### **Fazit**

Wir konnten eine vielversprechende Daten gewinnen, die für die weitere Evaluierung von Cannabinoiden - wie etwa Dronabinol - als Therapeutika bei bestimmten, definierten Patientenkollektiven sprechen. Unsere Ergebnisse liefern die Rationale für zukünftige, weiterführende klinische Studien an definierten Patientenkohorten.

## **6. Zusammenfassung**

Die klinische Anwendung von Cannabinoiden, wie etwa dem Dronabinol, finden aktuell vorrangig Verwendung in der Behandlung von komplexen Schmerzsymptomen oder dienen der Linderung von Übelkeit und Erbrechen vor allem bei Palliativpatienten.

Darüber hinaus existieren aber auch Studien, die einen möglichen direkten antitumorösen Effekt des THC auf maligne Zellen unterschiedlicher Tumorentitäten aufzeigen. Allerdings ist die Datenlage speziell für die akuten Leukämien uneinheitlich. So konnten einige Gruppen in ihren Arbeiten diesen möglichen antitumorösen Effekt des THC auch auf akute Leukämiezellen bestätigen. Wohingegen andere Studien teils zu gegensätzlichen Ergebnissen gelangen und das THC als potentiell Onkogen charakterisieren. Die teilweise überraschend gute Krankheitskontrolle eines Patienten mit einer undifferenzierten Leukämie hat uns letztlich dazu bewogen weiterführende Untersuchungen hinsichtlich der Wirkungsweise des THC auf akute Leukämiezellen anzustellen.

Hierfür testeten wir unterschiedliche Zelllinien und native Blasten akuter Leukämien mit myeloischer und lymphatischer Differenzierung hinsichtlich des antileukämischen Effektes von THC *in vitro* und *ex vivo*. Ein XTT-basierter Assay diene hierbei zur initialen Überprüfung eines möglichen antiproliferativen Effektes; durchflusszytometrische Untersuchungen mittels Annexin V/PI Färbung zur Evaluierung der Apoptoseinduktion durch THC.

Darüberhinaus erfolgten Expressionsanalysen der beiden Cannabinoidrezeptoren CB1 und CB2 mittels Western Blot Verfahren und FACS Analysen. Zur Evaluierung der Rezeptorspezifität des antileukämischen Effektes wurden spezielle Rezeptorantagonisten an ausgewählten Zelllinien getestet.

Es zeigten sich deutliche Hinweise auf einen antiproliferativen und proapoptotischen Effekt des THC in einer definierten Gruppe der von uns untersuchten Zellmodelle - vor allem bei Leukämiezellen mit lymphatischer Differenzierung und denjenigen myeloischen Zellen mit aberrant exprimierten lymphatischen Markern.

Die Apoptose wurde hierbei durch beide Cannabinoidrezeptoren vermittelt und die Vorbehandlung mit den jeweiligen Rezeptorinhibitoren (CB1 und CB2) führte hierbei zu einer Aufhebung des antitumorösen Effektes durch THC. Die Expression beider Rezeptoren zeigte sich dabei als prädiktiver Marker für das Therapieansprechen.

Die Behandlungsergebnisse der akuten Leukämien sind trotz zahlreicher Studien - vor allem bei älteren, komorbiden Patienten und denjenigen mit einem ungünstigen krankheitsspezifischen Risikoprofil - weiterhin schlecht.

Unsere Daten unterstützen die klinische Evaluierung von THC als insgesamt nebenwirkungsarmes Therapeutikum in der Behandlung einer genau definierten Gruppe an Leukämie Erkrankter.

## **7. Anhang**

### **Abbildungsverzeichnis**

Abb. 1	Modell der Leukämogenese der AML.....	7
Abb. 2	Der antiproliferative Effekt des THC auf Jurkat und Molm-13 Zellen .....	36
Abb. 3	Dosisabhängige Apoptoseinduktion bei der Jurkat-Zelllinie nach 24 Stunden.....	38
Abb. 4	Dosisabhängige Apoptoseinduktion bei der Jurkat-Zelllinie nach 48 Stunden.....	39
Abb. 5	THC induziert dosisabhängig Apoptose in Molm-13 Zellen nach 24 h und 48 h.....	41
Abb. 6	Dosis- und zeitabhängige Apoptoseinduktion durch THC in der Leukämiezelllinie Molm-14 .....	43
Abb.7	Dosis- und zeitabhängige Apoptoseinduktion durch THC in der Leukämiezelllinie K-562 .....	45
Abb. 8	THC induziert Apoptose in der Leukämiezelllinie HL-60 .....	47
Abb. 9	Proapoptotischer Effekt des THC bei der AML Zelllinie M-07e....	48
Abb. 10	Die AML Zelllinie MV4-11 unterliegt einem positiv apoptotischen Effekt durch THC .....	50
Abb. 11	Dosisabhängiger Anstieg der Apoptoserate bei der Zelllinie Kasumi unter THC Behandlung.....	51
Abb.12	THC induziert die Apoptose über den intrinsischen Weg .....	53
Abb. 13	Exemplarische Darstellung der durchflusszytometrischen Analyse eines Patienten .....	55
Abb. 14	THC reduziert die Anzahl viabler Zellen bei einem Teil der getesteten myeloischen Blasten.....	56
Abb. 15	THC bewirkt eine Verringerung der gemessenen viablen Zellen bei einem Großteil der getesteten Proben ALL Erkrankter .....	57
Abb. 16	Expression der Cannabinoidrezeptoren CB1 und CB2 in leukämischen Zellen .....	61
Abb. 17	THC vermittelt seine Wirkung sowohl über den CB1- als auch den CB2-Rezeptor .....	64
Abb. 18	Der proapoptotische Effekt des THC ist CB1 und CB2 vermittelt..	65

**Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1	FAB-Klassifikation der AML.....	3
Tabelle 2	WHO- Klassifikation akuter myeloischer Leukämien.....	3
Tabelle 3	Risikoklassifikationen der AML.....	8
Tabelle 4	Definition des Therapieansprechens .....	9
Tabelle 5	Immunologische Klassifikation der ALL .....	12
Tabelle 6	WHO Klassifikation der akuten, lymphatischen Leukämien .....	12
Tabelle 7	Überblick über die verwendeten Zelllinien.....	23
Tabelle 8	Überblick über die untersuchten Patientenproben .....	25
Tabelle 9	Phänotyp aller untersuchten Zellmodelle.....	58
Tabelle 10	IC <sub>50</sub> Werte der untersuchten Zelllinien nach THC Behandlung .....	67

**Literaturverzeichnis**

- 1 Löwenberg B, Downing JR, Burnett A: Acute myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* 1999, 341:1051–62.
- 2 Deschler B, Lübbert M: Acute myeloid leukemia: epidemiology and etiology. *Cancer.* 2006, 107:2099-107.
- 3 Barnard DR, Kalousek DK, Wiersma SR, Lange BJ, Benjamin DR, Arthur DC et al.: Morphologic, immunologic, and cytogenetic classification of acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome in childhood: a report from the Childrens Cancer Group. *Leukemia* 1996, 10:5–12.
- 4 Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR et al.: Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br. J. Haematol* 1976, 33:451–58.
- 5 Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM et al.: The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* 2016, 127:2391-405.
- 6 Khalade A, Jaakkola MS, Pukkala E, Jaakkola JJK: Exposure to benzene at work and the risk of leukemia: a systematic review and meta-analysis. *Environ Health* 2010, 9:31.
- 7 Ishimaru T, Otake M, Ishimaru M: Dose-response relationship of neutrons and gamma rays to leukemia incidence among atomic bomb survivors in Hiroshima and Nagasaki by type of leukemia, 1950--1971. *Radiat. Res* 1979, 77:377–94.
- 8 Mole RH: Radiation from Chernobyl and the risk of leukaemia. *Leukemia* 1991, 5:443–44.
- 9 Pui CH, Relling MV: Topoisomerase II inhibitor-related acute myeloid leukaemia. *Br. J. Haematol* 2000, 109:13–23.
- 10 Davies SM: Therapy-related leukemia associated with alkylating agents. *Med. Pediatr. Oncol* 2001, 36:536–40.
- 11 Kwong Y: Azathioprine: association with therapy-related myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia. *J. Rheumatol* 2010, 37:485–90.
- 12 Ganly P, Walker LC, Morris CM: Familial mutations of the transcription factor RUNX1 (AML1, CBFA2) predispose to acute myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma* 2004, 45:1-10.
- 13 Xavier AC, Ge Y, Taub JW: Down syndrome and malignancies: a unique clinical relationship: a paper from the 2008 william beaumont hospital symposium on molecular pathology. *J Mol Diagn* 2009, 11:371–80.
- 14 Bagby GC, Alter BP: Fanconi anemia. *Semin. Hematol* 2006, 43:147–56.
- 15 Freedman MH: Diamond-Blackfan anaemia. *Baillieres Best Pract. Res. Clin. Haematol* 2000, 13:391–406.
- 16 Taylor AM: Chromosome instability syndromes. *Best Pract Res Clin Haematol* 2001, 14:631–44.

- 17 Cancer Genome Atlas Research Network: Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* 2013, 368:2059-74.
- 18 Welch JS, Ley TJ, Link DC, Miller CA, Larson DE, Koboldt DC et al.: The origin and evolution of mutations in acute myeloid leukemia. *Cell.* 2012, 150:264-78.
- 19 Galm O, Herman JG, Baylin SB: The fundamental role of epigenetics in hematopoietic malignancies. *Blood Rev.* 2006, 20:1-13.
- 20 Yan XJ, Xu J, Gu ZH, Pan CM, Lu G, Shen Y et al.: Exome sequencing identifies somatic mutations of DNA methyltransferase gene DNMT3A in acute monocytic leukemia. *Nat Genet.* 2011, 43:309-15.
- 21 Appelbaum FR, Gundacker H, Head DR, Slovak ML, Willman CL, Godwin JE, Anderson JE, Petersdorf SH: Age and acute myeloid leukemia. *Blood* 2006, 107:3481-85.
- 22 Figueroa ME, Abdel-Wahab O, Lu C, Ward PS, Patel J, Shih A et al.: Leukemic IDH1 and IDH2 mutations result in a hypermethylation phenotype, disrupt TET2 function, and impair hematopoietic differentiation. *Cancer Cell.* 2010, 18:553-67.
- 23 Giles FJ, Borthakur G, Ravandi F, Faderl S, Verstovsek S, Thomas D et al.: The haematopoietic cell transplantation comorbidity index score is predictive of early death and survival in patients over 60 years of age receiving induction therapy for acute myeloid leukaemia. *Br. J. Haematol.* 2007, 136:624-27.
- 24 Kern W, Haferlach T, Schnittger S, Hiddemann W, Schoch C: Prognosis in therapy-related acute myeloid leukemia and impact of karyotype. *J. Clin. Oncol* 2004, 22:2510-11.
- 25 Döhner H, Estey EH, Amadori S, Appelbaum FR, Büchner T, Burnett AK et al.: Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood.* 2010, 115:453-74.
- 26 Schlenk RF, Döhner K, Krauter J, Fröhling S, Corbacioglu A, Bullinger L et al.: Mutations and treatment outcome in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* 2008, 358:1909-18.
- 27 Virappane P, Gale R, Hills R, Kakkas I, Summers K, Stevens J et al.: Mutation of the Wilms' tumor 1 gene is a poor prognostic factor associated with chemotherapy resistance in normal karyotype acute myeloid leukemia: the United Kingdom Medical Research Council Adult Leukaemia Working Party. *J Clin Oncol.* 2008, 26:5429-35.
- 28 Yates JW, Wallace HJ, JR, Ellison RR, Holland JF: Cytosine arabinoside (NSC-63878) and daunorubicin (NSC-83142) therapy in acute nonlymphocytic leukemia. *Cancer Chemother Rep* 1973, 57:485-88.
- 29 Löwenberg B, Griffin JD, Tallman MS: Acute myeloid leukemia and acute promyelocytic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2003:82-101.

- 30 Daver N, Cortes J: Molecular targeted therapy in acute myeloid leukemia. *Hematology* 2012, 17 Suppl 1:S59-62.
- 31 Nasr R, Guillemain MC, Ferhi O, Soilhi H, Peres L, Berthier C et al: Eradication of acute promyelocytic leukemia-initiating cells through PML-RARA degradation. *Nat Med.* 2008, 14:1333-42.
- 32 Lo-Coco F, Avvisati G, Vignetti M, Thiede C, Orlando SM, Iacobelli S et al.: Retinoic acid and arsenic trioxide for acute promyelocytic leukemia. *N. Engl. J. Med.* 2013 Jul, 369:111-21.
- 33 Keating GM: Azacitidine: a review of its use in the management of myelodysplastic syndromes/acute myeloid leukaemia. *Drugs.* 2012 , 72:1111-36.
- 34 Kantarjian H, Issa JP, Rosenfeld CS, Bennett JM, Albitar M, DiPersio J et al.: Decitabine improves patient outcomes in myelodysplastic syndromes: results of a phase III randomized study. *Cancer.* 2006, 106:1794-803.
- 35 Yoo CB, Jones PA: Epigenetic therapy of cancer: past, present and future. *Nat Rev Drug Discov.* 2006, 5:37-50.
- 36 <http://www.kompetenznetz-leukaemie.de/content/aerzte/all/epidemiologie/> [Zugriff 10.05.2016]
- 37 <http://seer.cancer.gov/statfacts/html/aly1.html> [Zugriff 10.05.2016]
- 38 Pui CH, Campana D, Evans WE: Childhood acute lymphoblastic leukaemia--current status and future perspectives. *Lancet Oncol.* 2001, 2:597-607.
- 39 Bene MC, Castoldi G, Knapp W, Ludwig WD, Matutes E, Orfao A, van't Veer MB: Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). *Leukemia* 1995, 9:1783-86.
- 40 Hjalgrim LL, Westergaard T, Rostgaard K, Schmiegelow K, Melbye M, Hjalgrim H, Engels EA: Birth weight as a risk factor for childhood leukemia: a meta-analysis of 18 epidemiologic studies. *Am. J. Epidemiol.* 2003, 158:724-35.
- 41 Notta F, Mullighan CG, Wang JC, Poepl A, Doulatov S, Phillips LA et al.: Evolution of human BCR-ABL1 lymphoblastic leukaemia-initiating cells. *Nature.* 2011, 469:362-7.
- 42 Pui C, Sandlund JT, Pei D, Campana D, Rivera GK, Ribeiro RC et al.: Improved outcome for children with acute lymphoblastic leukemia: results of Total Therapy Study XIIIB at St Jude Children's Research Hospital. *Blood* 2004, 104:2690-96.
- 43 Larson RA: Management of acute lymphoblastic leukemia in older patients. *Semin. Hematol.* 2006, 43:126-33.
- 44 Landau H, Lamanna N: Clinical manifestations and treatment of newly diagnosed acute lymphoblastic leukemia in adults. *Curr Hematol Malig Rep* 2006, 1:171-79.
- 45 Pui CH, Robison LL, Look AT: Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet.* 2008, 371:1030-43.
- 46 Towatari M, Yanada M, Usui N, Takeuchi J, Sugiura I, Takeuchi M et al.:

- Combination of intensive chemotherapy and imatinib can rapidly induce high-quality complete remission for a majority of patients with newly diagnosed BCR-ABL-positive acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2004, 104:3507-12.
- 47 Holleman A, Cheok MH, den Boer ML, Yang W, Veerman AJP, Kazemier KM et al.: Gene-expression patterns in drug-resistant acute lymphoblastic leukemia cells and response to treatment. *N. Engl. J. Med.* 2004, 351:533-42.
- 48 Brüggemann M, Raff T, Flohr T, Gökbuget N, Nakao M, Droese J et al.: Clinical significance of minimal residual disease quantification in adult patients with standard-risk acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2006, 107:1116-23.
- 49 Panzer-Grümayer ER, Schneider M, Panzer S, Fasching K, Gadner H: Rapid molecular response during early induction chemotherapy predicts a good outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2000, 95:790-94.
- 50 Pui C, Evans WE: Treatment of acute lymphoblastic leukemia. *N. Engl. J. Med.* 2006, 354:166-78.
- 51 Schrauder A, Reiter A, Gadner H, Niethammer D, Klingebiel T, Kremens B et al.: Superiority of allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation compared with chemotherapy alone in high-risk childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia: results from ALL-BFM 90 and 95. *J. Clin. Oncol.* 2006, 24:5742-49.
- 52 Vey N, Thomas X, Picard C, Kovascovicz T, Charin C, Cayuela JM et al.: Allogeneic stem cell transplantation improves the outcome of adults with t(1;19)/E2A-PBX1 and t(4;11)/MLL-AF4 positive B-cell acute lymphoblastic leukemia: results of the prospective multicenter LALA-94 study. *Leukemia* 2006, 20:2155-61.
- 53 Vincent BJ, McQuiston DJ, Einhorn LH, Nagy CM, Brames MJ: Review of cannabinoids and their antiemetic effectiveness. *Drugs* 1983, 25 Suppl 1:52-62.
- 54 Gaoni Y, Mechoulam R: Isolation, Structure, and Partial Synthesis of an Active Constituent of Hashish. *J. Am. Chem. Soc.* 1964, 86:1646-47.
- 55 Devane WA, Hanus L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, Griffin G et al.: Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science* 1992, 258:1946-49.
- 56 Grant I, Gonzalez R, Carey CL, Natarajan L, Wolfson T: Non-acute (residual) neurocognitive effects of cannabis use: a meta-analytic study. *J Int Neuropsychol Soc* 2003, 9:679-89.
- 57 Penta JS, Poster DS, Bruno S, Macdonald JS: Clinical trials with antiemetic agents in cancer patients receiving chemotherapy. *J Clin Pharmacol* 1981, 21:11S-22S.
- 58 Beal JE, Olson R, Laubenstein L, Morales JO, Bellman P, Yangco B et al.: Dronabinol as a treatment for anorexia associated with weight loss in patients with AIDS. *J Pain Symptom Manage* 1995, 10:89-97.
- 59 Plasse TF, Gorter RW, Krasnow SH, Lane M, Shepard KV, Wadleigh RG: Recent clinical experience with dronabinol. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 1991, 40:695-700.

- 60 Zajicek JP, Sanders HP, Wright DE, Vickery PJ, Ingram WM, Reilly SM et al.: Cannabinoids in multiple sclerosis (CAMS) study: safety and efficacy data for 12 months follow up. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatr.* 2005, 76:1664–69.
- 61 Naef M, Curatolo M, Petersen-Felix S, Arendt-Nielsen L, Zbinden A, Brenneisen R: The analgesic effect of oral delta-9-tetrahydrocannabinol (THC), morphine, and a THC-morphine combination in healthy subjects under experimental pain conditions. *Pain* 2003, 105:79–88.
- 62 Munro S, Thomas KL, Abu-Shaar M: Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature* 1993, 365:61–65.
- 63 Herkenham M, Lynn AB, Little MD, Johnson MR, Melvin LS, Costa BR de et al.: Cannabinoid receptor localization in brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1990, 87:1932–36.
- 64 Glass M, Dragunow M, Faull RL: Cannabinoid receptors in the human brain: a detailed anatomical and quantitative autoradiographic study in the fetal, neonatal and adult human brain. *Neuroscience* 1997, 77:299–318.
- 65 Tsou K, Brown S, Sañudo-Peña MC, Mackie K, Walker JM: Immunohistochemical distribution of cannabinoid CB1 receptors in the rat central nervous system. *Neuroscience* 1998, 83:393–411.
- 66 Galiègue S, Mary S, Marchand J, Dussosoy D, Carrière D, Carayon P et al.: Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations. *Eur. J. Biochem.* 1995, 232:54–61.
- 67 Galve-Roperh I, Sánchez C, Cortés ML, Gómez del Pulgar T, Izquierdo M, Guzmán M: Anti-tumoral action of cannabinoids: involvement of sustained ceramide accumulation and extracellular signal-regulated kinase activation. *Nat. Med.* 2000, 6:313–19.
- 68 Casanova ML, Blázquez C, Martínez-Palacio J, Villanueva C, Fernández-Aceñero MJ, Huffman JW, Jorcano JL, Guzmán M: Inhibition of skin tumor growth and angiogenesis in vivo by activation of cannabinoid receptors. *J. Clin. Invest.* 2003, 111:43–50.
- 69 Ofek O, Karsak M, Leclerc N, Fogel M, Frenkel B, Wright K et al.: Peripheral cannabinoid receptor, CB2, regulates bone mass. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2006, 103:696–701.
- 70 Breivogel CS, Griffin G, Di Marzo V, Martin BR: Evidence for a new G protein-coupled cannabinoid receptor in mouse brain. *Mol. Pharmacol.* 2001, 60:155–63.
- 71 Sagan S, Venance L, Torrens Y, Cordier J, Glowinski J, Giaume C: Anandamide and WIN 55212-2 inhibit cyclic AMP formation through G-protein-coupled receptors distinct from CB1 cannabinoid receptors in cultured astrocytes. *Eur. J. Neurosci.* 1999, 11:691–99.
- 72 Howlett AC, Fleming RM: Cannabinoid inhibition of adenylate cyclase. Pharmacology of the response in neuroblastoma cell membranes. *Mol. Pharmacol.* 1984, 26:532–38.

- 73 Ligresti A, Bisogno T, Matias I, Petrocellis L de, Cascio MG, Cosenza V et al.: Possible endocannabinoid control of colorectal cancer growth. *Gastroenterology* 2003, 125:677–87.
- 74 Petersen G, Moesgaard B, Schmid PC, Schmid HHO, Broholm H, Kosteljanetz M et al.: Endocannabinoid metabolism in human glioblastomas and meningiomas compared to human non-tumour brain tissue. *J. Neurochem.* 2005, 93:299–309.
- 75 Sánchez C, Ceballos ML de, Gomez del Pulgar T, Rueda D, Corbacho C, Velasco G et al.: Inhibition of glioma growth in vivo by selective activation of the CB(2) cannabinoid receptor. *Cancer Res.* 2001, 61:5784–89.
- 76 Portella G, Laezza C, Laccetti P, Petrocellis L de, Di Marzo V, Bifulco M: Inhibitory effects of cannabinoid CB1 receptor stimulation on tumor growth and metastatic spreading: actions on signals involved in angiogenesis and metastasis. *FASEB J.* 2003, 17:1771–73.
- 77 McKallip RJ, Lombard C, Fisher M, Martin BR, Ryu S, Grant S et al.: Targeting CB2 cannabinoid receptors as a novel therapy to treat malignant lymphoblastic disease. *Blood.* 2002, 100:627–34.
- 78 Guzmán M: Cannabinoids: potential anticancer agents. *Nat. Rev. Cancer* 2003, 3:745–55.
- 79 Lombard C, Nagarkatti M, Nagarkatti PS: Targeting cannabinoid receptors to treat leukemia: role of cross-talk between extrinsic and intrinsic pathways in Delta9-tetrahydrocannabinol (THC)-induced apoptosis of Jurkat cells. *Leuk. Res.* 2005, 29:915–22.
- 80 Herrera B, Carracedo A, Diez-Zaera M, Guzmán M, Velasco G: p38 MAPK is involved in CB2 receptor-induced apoptosis of human leukaemia cells. *FEBS Lett.* 2005, 579:5084–88.
- 81 Sancho R, La Vega L de, Appendino G, Di Marzo V, Macho A, Munoz E: The CB1/VR1 agonist arvanil induces apoptosis through an FADD/caspase-8-dependent pathway. *Br. J. Pharmacol.* 2003, 140:1035–44.
- 82 Alberich Jordà M, Rayman N, Tas M, Verbakel SE, Battista N, van Lom K et al.: The peripheral cannabinoid receptor Cb2, frequently expressed on AML blasts, either induces a neutrophilic differentiation block or confers abnormal migration properties in a ligand-dependent manner. *Blood* 2004, 104:526–34.
- 83 Valk P, Verbakel S, Vankan Y, Hol S, Mancham S, Ploemacher R et al.: Anandamide, a natural ligand for the peripheral cannabinoid receptor is a novel synergistic growth factor for hematopoietic cells. *Blood* 1997, 90:1448–57.
- 84 Valk PJ, Delwel R: The peripheral cannabinoid receptor, Cb2, in retrovirally-induced leukemic transformation and normal hematopoiesis. *Leuk. Lymphoma* 1998, 32:29–43.
- 85 Asou H, Tashiro S, Hamamoto K, Otsuji A, Kita K, Kamada N: Establishment of a human acute myeloid leukemia cell line (Kasumi-1) with 8;21 chromosome translocation. *Blood* 1991, 77:2031–36.

- 86 Dalton WT, Ahearn MJ, McCredie KB, Freireich EJ, Stass SA, Trujillo JM: HL-60 cell line was derived from a patient with FAB-M2 and not FAB-M3. *Blood* 1988, 71:242–47.
- 87 Lozzio CB, Lozzio BB: Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome. *Blood* 1975, 45:321–34.
- 88 Lange B, Valtieri M, Santoli D, Caracciolo D, Mavilio F, Gemperlein I et al.: Growth factor requirements of childhood acute leukemia: establishment of GM-CSF-dependent cell lines. *Blood* 1987, 70:192–99.
- 89 Avanzi GC, Brizzi MF, Giannotti J, Ciarletta A, Yang YC, Pegoraro L, Clark SC: M-07e human leukemic factor-dependent cell line provides a rapid and sensitive bioassay for the human cytokines GM-CSF and IL-3. *J. Cell. Physiol* 1990, 145:458–64.
- 90 Yokota S, Kiyoi H, Nakao M, Iwai T, Misawa S, Okuda T et al.: Internal tandem duplication of the FLT3 gene is preferentially seen in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome among various hematological malignancies. A study on a large series of patients and cell lines. *Leukemia* 1997, 11:1605–09.
- 91 Gillis S, Watson J: Biochemical and biological characterization of lymphocyte regulatory molecules. V. Identification of an interleukin 2-producing human leukemia T cell line. *J. Exp. Med* 1980, 152:1709–19.
- 92 Scudiero DA, Shoemaker RH, Paull KD, Monks A, Tierney S, Nofziger TH: Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Res* 1988, 48:4827–33.
- 93 Julius MH, Masuda T, Herzenberg LA: Demonstration that antigen-binding cells are precursors of antibody-producing cells after purification with a fluorescence-activated cell sorter. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1972, 69:1934–8.
- 94 Koopman G, Reutelingsperger CP, Kuijten GA, Keehnen RM, Pals ST, van Oers MH: Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood* 1994, 84:1415–20.
- 95 Kampa-Schittenhelm KM, Heinrich MC, Akmut F, Döhner H, Döhner K, Schittenhelm MM: Quizartinib (AC220) is a potent second generation class III tyrosine kinase inhibitor that displays a distinct inhibition profile against mutant-FLT3, -PDGFRA and -KIT isoforms. *Mol Cancer.* 2013, 12:19.
- 96 Basso G, Buldini B, Zen L de, Orfao A: New methodologic approaches for immunophenotyping acute leukemias. *Haematologica* 2001, 86:675–92.
- 97 Lacombe F, Durrieu F, Briais A, Dumain P, Belloc F, Bascans E, Reiffers J, Boisseau MR, Bernard P: Flow cytometry CD45 gating for immunophenotyping of acute myeloid leukemia. *Leukemia* 1997, 11:1878–86.
- 98 Bradford MM: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem* 1976, 72:248–54.
- 99 Laemmli UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970, 227:680–5.

- 100 Goldman A, Ursitti JA, Mozdzanowski J, Speicher DW: Electroblothing from Polyacrylamide Gels. *Curr Protoc Protein Sci.* 2015, 82:10.7.1-16.
- 101 Towbin H, Staehelin T, Gordon J: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1979, 76:4350-4.
- 102 Ni D, Xu P, Gallagher S: Immunoblotting and Immunodetection. *Curr Protoc Mol Biol.* 2016, 114:10.8.1-10.8.37.
- 103 Yuan J, Shaham S, Ledoux S, Ellis HM, Horvitz HR: The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *Cell.* 1993, 75:641-52.
- 104 Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES et al.: Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell.* 1997, 91:479-89.
- 105 Felder CC, Joyce KE, Briley EM, Glass M, Mackie KP, Fahey KJ et al.: LY320135, a novel cannabinoid CB1 receptor antagonist, unmasks coupling of the CB1 receptor to stimulation of cAMP accumulation. *J Pharmacol Exp Ther.* 1998, 284:291-7.
- 106 Iwamura H, Suzuki H, Ueda Y, Kaya T, Inaba T: In vitro and in vivo pharmacological characterization of JTE-907, a novel selective ligand for cannabinoid CB2 receptor. *J Pharmacol Exp Ther.* 2001, 296:420-5.
- 107 Pisanti S, Malfitano AM, Grimaldi C, Santoro A, Gazzero P, Laezza C et al.: Use of cannabinoid receptor agonists in cancer therapy as palliative and curative agents. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2009, 23:117-31.
- 108 McAllister SD, Christian RT, Horowitz MP, Garcia A, Desprez PY: Cannabidiol as a novel inhibitor of Id-1 gene expression in aggressive breast cancer cells. *Mol Cancer Ther.* 2007, 6:2921-7.
- 109 Ramos JA, Bianco FJ: The role of cannabinoids in prostate cancer: Basic science perspective and potential clinical applications. *Indian J Urol.* 2012, 28:9-14.
- 110 McAllister SD, Chan C, Taft RJ, Luu T, Abood ME, Moore DH et al.: Cannabinoids selectively inhibit proliferation and induce death of cultured human glioblastoma multiforme cells. *J Neurooncol.* 2005, 74:31-40.
- 111 McKallip RJ, Nagarkatti M, Nagarkatti PS: Delta-9-tetrahydrocannabinol enhances breast cancer growth and metastasis by suppression of the antitumor immune response. *J Immunol.* 2005, 174:3281-9.
- 112 Hart S, Fischer OM, Ullrich A: Cannabinoids induce cancer cell proliferation via tumor necrosis factor alpha-converting enzyme (TACE/ADAM17)-mediated transactivation of the epidermal growth factor receptor. *Cancer Res.* 2004, 64:1943-50.
- 113 Jorda MA, Rayman N, Valk P, De Wee E, Delwel R: Identification, characterization, and function of a novel oncogene: the peripheral cannabinoid receptor Cb2. *Ann N Y Acad Sci.* 2003, 996:10-6.

- 114 Jia W, Hegde VL, Singh NP, Sisco D, Grant S, Nagarkatti M et al.: Delta9-tetrahydrocannabinol-induced apoptosis in Jurkat leukemia T cells is regulated by translocation of Bad to mitochondria. *Mol Cancer Res.* 2006, 4:549-62.
- 115 Herrera B, Carracedo A, Diez-Zaera M, Gómez del Pulgar T, Guzmán M, Velasco G: The CB2 cannabinoid receptor signals apoptosis via ceramide-dependent activation of the mitochondrial intrinsic pathway. *Exp Cell Res.* 2006, 312:2121-31.
- 116 Zheng ZM, Specter S, Friedman H: Serum proteins affect the inhibition by delta-tetrahydrocannabinol of tumor necrosis factor alpha production by mouse macrophages. *Adv Exp Med Biol.* 1993, 335:89-93.
- 117 Jacobsson SO, Rongård E, Stridh M, Tiger G, Fowler CJ: Serum-dependent effects of tamoxifen and cannabinoids upon C6 glioma cell viability. *Biochem Pharmacol.* 2000, 60:1807-13.
- 118 Kampa-Schittenhelm KM, Heinrich MC, Akmut F, Rasp KH, Illing B, Döhner H et al.: Cell cycle-dependent activity of the novel dual PI3K-MTORC1/2 inhibitor NVP-BGT226 in acute leukemia. *Mol Cancer.* 2013, 12:46.
- 119 Mueller S, Schittenhelm M, Honecker F, Malenke E, Lauber K, Wesselborg S et al.: Cell-cycle progression and response of germ cell tumors to cisplatin in vitro. *Int J Oncol.* 2006, 29:471-9.
- 120 Powles T, te Poele R, Shamash J, Chaplin T, Propper D, Joel S et al.: Cannabis-induced cytotoxicity in leukemic cell lines: the role of the cannabinoid receptors and the MAPK pathway. *Blood.* 2005, 105:1214-21.
- 121 Ruiz L, Miguel A, Díaz-Laviada I: Delta9-tetrahydrocannabinol induces apoptosis in human prostate PC-3 cells via a receptor-independent mechanism. *FEBS Lett.* 1999, 458:400-4.
- 122 Pertwee RG, Howlett AC, Abood ME, Alexander SP, Di Marzo V, Elphick MR et al.: International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXIX. Cannabinoid receptors and their ligands: beyond CB<sub>1</sub> and CB<sub>2</sub>. *Pharmacol Rev.* 2010, 62:588-631.
- 123 Kampa-Schittenhelm KM, Salitzky O, Akmut F, Illing B, Kanz L, Salih HR et al.: Dronabinol has preferential antileukemic activity in acute lymphoblastic and myeloid leukemia with lymphoid differentiation patterns. *BMC Cancer.* 2016, 16:25.
- 124 Singh Y, Bali C: Cannabis extract treatment for terminal acute lymphoblastic leukemia with a Philadelphia chromosome mutation. *Case Rep Oncol.* 2013, 6:585-92.
- 125 <http://www.fda.gov/ohrms/dockets/dockets/05n0479/05N-0479-emc0004-04.pdf> [Zugriff: 16.05.2016]

**Veröffentlichung**

Kampa-Schittenhelm KM, Salitzky O, Akmut F, Illing B, Kanz L, Salih HR et al.:  
Dronabinol has preferential antileukemic activity in acute lymphoblastic and myeloid  
leukemia with lymphoid differentiation patterns. BMC Cancer. 2016,16:25.

### **Erklärung zum Eigenanteil**

Der Verfasser dieser Dissertationsschrift hat folgende Arbeiten durchgeführt:

- Durchführung und Auswertung der Versuche, die in den Abbildungen 3-11 sowie 13-15 dargestellt sind
- Auswertung der Versuche, die in der Abbildung 2 dargestellt sind
- Analyse der Daten, die in der Tabelle 9 wiedergegeben sind

Er war an der Konzeption des Projektes beteiligt und hat das Manuskript selbstständig erstellt.

Frau Dr. Kerstin Kampa-Schittenhelm hat das Projekt konzipiert, die Arbeit betreut und das Manuskript korrigiert. Sie hat die Versuche, die in den Abbildungen 12 sowie 16-18 dargestellt sind, durchgeführt und ausgewertet. Darüber hinaus sind die Versuche aus Abbildung 2 von ihr durchgeführt worden.

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

### **Danksagung**

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

Bei Frau Katharina-Henriette Rasp, Frau Figen Akmut sowie Frau Dr. rer. nat. Barbara Illing möchte ich mich für die tatkräftige Unterstützung sowie die stets freundliche Hilfestellung während der Durchführung der Versuche bedanken.