

**Einfluss von Cannabinoiden auf die Proliferation humaner
Glioblastomzellen *via* GPR55-Rezeptor und GPR55-assoziiertes
Signalwege**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

der Naturwissenschaftlichen Fakultät I

-Biowissenschaften-

der Martin-Luther-Universität

Halle-Wittenberg,

vorgelegt

von Herrn Marc Richard Kolbe

geboren am 13. Juni 1995 in Magdeburg

1. Gutachter: Herr apl. Prof. Dr. rer. nat. Ralph Golbik
2. Gutachter: Herr Prof. Dr. med. Faramarz Dehghani
3. Gutachterin: Frau Prof. Dr. rer. nat. Meliha Karsak

Tag der öffentlichen Verteidigung: 19.03.2024

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	V
Abbildungsverzeichnis	VIII
Tabellenverzeichnis	XI
1 Einleitung	1
1.1 Cannabinoide und das humane Endocannabinoidsystem	2
1.2 Das therapeutische Potential der Cannabinoide THC und CBD für die Behandlung von Tumorerkrankungen am Beispiel des Glioblastoms.....	6
1.2.1 Das Glioblastom	6
1.2.2 Wirkung von THC und CBD auf Glioblastome	8
1.2.3 Veränderungen des ECSs im Glioblastom.....	9
1.2.4 Intrazelluläre Mechanismen von THC und CBD in Tumorzellen.....	10
1.3 Diversität molekularer Targets von THC und CBD	11
1.4 GPR55 - als „dritter“ CB-Rezeptor?.....	13
1.4.1 Struktur und endogener Ligand	13
1.4.2 Vorkommen und (patho-)physiologische Funktionen	14
1.4.3 GPR55-vermittelte Signalkaskaden.....	15
1.4.4 Pharmakologie und weitere Liganden	17
1.5 Zielstellung	18
2 Materialien	21
2.1 Tumorzellen.....	21
2.2 Humane Gewebeproben.....	21
2.3 Chemikalien und Reagenzien	21
2.4 Medium, Puffer und Lösungen	23
2.5 Antikörper.....	24
2.6 Größenstandards	25
2.7 Kits.....	25
2.8 Oligonukleotide	25
2.9 Geräte.....	26
2.10 Verbrauchsmaterialien.....	27
2.11 Software.....	27
3 Methoden	28
3.1 Kultivierung primärer Glioblastomzellen.....	28
3.1.1 Subkultivierung.....	28
3.1.2 Zellzahlbestimmung.....	28
3.2 Stimulationsexperimente	29
3.2.1 Fixierung.....	31
3.3 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium Bromid (MTT)-Viabilitäts-	

Assay	31
3.4 Impedanz-basierte Messung der Proliferation mittels iCELLigence™-Systems	32
3.5 Klonogener Wachstumsassay	35
3.6 Durchflusszytometrie	35
3.7 RNA-Extraktion	36
3.8 RNA-Quantifizierung	37
3.9 DNase-Verdau	37
3.10 cDNA-Synthese mittels reverser Transkription	37
3.11 cDNA-Amplifikation (<i>real-time</i> quantitative PCR)	38
3.12 DNA-Gelelektrophorese	39
3.13 Western Blot	39
3.13.1 Probenaufarbeitung aus Zellextrakten	39
3.13.2 SDS-PAGE	39
3.13.3 Proteintransfer	40
3.13.4 Immundetektion	40
3.14 Immunzytochemie	41
3.14.1 DAB-Färbung	41
3.14.2 Immunfluoreszenz	44
3.15 Statistik	44
4 Ergebnisse	45
4.1 Umfassende Charakterisierung humaner Glioblastomzellen hinsichtlich der Expression von klassischen und nicht-klassischen Elementen des ECSs	45
4.1.1 Rezeptoren	45
4.1.2 Ionotrope Rezeptoren	48
4.1.3 Enzyme	49
4.2 Analyse der Rezeptorabhängigkeit der THC-vermittelten Abnahme Ki67 ⁺ Nuklei	51
4.2.1 Beteiligung der klassischen CB-Rezeptoren CB ₁ und CB ₂	51
4.2.2 Beteiligung des orphanen CB-Rezeptors GPR18	52
4.2.3 Beteiligung des orphanen CB-Rezeptors GPR55	53
4.3 Analyse der Beteiligung GPR55-assoziiierter Signalkaskaden an der THC- und LPI-vermittelten Abnahme Ki67 ⁺ Nuklei	57
4.3.1 G-Proteine	57
4.3.2 RhoA-ROCK-Signalweg	61
4.3.3 PLC-IP3-Signalweg	62
4.3.4 Beteiligung von Calcineurin	65
4.3.5 Beteiligung von NFAT	67
4.4 Untersuchungen zur funktionellen Bedeutung eines reduzierten Anteils Ki67 ⁺ Nuklei nach THC und LPI Stimulation auf die Proliferation	73

4.4.1 Einfluss von THC, LPI und CBD auf das kollektive Wachstum.....	73
4.4.2 Einfluss von THC, LPI und CBD auf das klonogene Wachstum	77
4.4.3 Einfluss von THC, LPI und CBD auf die Verteilung der Zellzyklusphasen	78
4.4.4 Einfluss von THC und LPI auf die Transition von der G ₀ -Phase in die Proliferation.....	79
5 Diskussion	81
5.1 Die CB ₁ /CB ₂ -unabhängige Wirkung von THC und CBD auf die Anzahl Ki67 ⁺ Nuklei	81
5.2 Die GPR18-unabhängige Wirkung von THC auf die Anzahl Ki67 ⁺ Nuklei	83
5.3 Die GPR55-abhängige Reduktion Ki67 ⁺ Nuklei nach THC und LPI Stimulation.....	84
5.4 Die Zelltyp-spezifische Wirkung von THC und LPI.....	87
5.5 Die Zelltyp-abhängige Kopplung von Gα _q und/oder Gα _{12/13} an GPR55 sowie die Rolle von Gβγ unter Berücksichtigung der Beteiligung der PLC-IP3- und RhoA- ROCK-Signalwege	89
5.6 Die Zelltyp-abhängige Beteiligung von Calcineurin und die Rolle von NFAT	93
5.7 Die funktionelle Bedeutung eines reduzierten Anteils Ki67 ⁺ Nuklei unter Berücksichtigung zugrundeliegender Signalwege	96
5.8 Die GPR55-unabhängige Reduktion des kollektiven und klonogenen Wachstums nach CBD Behandlung	100
6 Zusammenfassung	102
7 Literaturverzeichnis	104
Supplement	124
Eidesstattliche Erklärung	135
Danksagung	136
Curriculum Vitae	137
Publikationen	138

Abkürzungsverzeichnis

2-AG	2-Arachidonylglycerol
2-APB	2-Aminoethoxydiphenyl borate
5-HT3A	<i>5-hydroxytryptamine receptor 3A</i>
AA	Arachidonsäure
AC	Adenylat Zykklase, <i>adenylate cyclase</i>
ACEA	Arachidonyl-2'-chloroethylamid; CB ₁ -Agonist
AEA	Anandamid, N-Arachidonylethanolamin
AKT	Proteinkinase B
AM281	1-(2,4-Dichlorphenyl)-5-(4-iodphenyl)-4-methyl-N-4-morpholinyl-1H-pyrazol-3-carboxamid; CB ₁ -Antagonist
AM630	6-Iodo-2-methyl-1-[2-(4-morpholinyl)ethyl]-1 <i>H</i> -indol-3-yl](4-methoxyphenyl)methanon, CB ₂ -Antagonist
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BCA	Bicinchoninsäure, <i>Bicinchoninic Acid</i>
BHS	Blut-Hirn-Schranke
BSA	Rinderserumalbumin
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat, <i>cyclic adenosinemonophosphate</i>
CaMK	Ca ²⁺ /Calmodulin-abhängige Proteinkinase
CB	Cannabinoid
CBD	Cannabidiol
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CD 133	prominin-1, Glykoprotein
Cdc42	<i>cell division control protein 42</i>
CHOP	C/EBP-homologe Protein
CID16020046	4-[4-(3-hydroxyphenyl)-3-(4-methylphenyl)-6-oxo-1,4-dihydropyrrolo[3,4-d]pyrazol-5-yl]benzoic acid, GPR55 Antagonist
CREB	<i>cAMP response element binding protein</i>
CRTC	<i>CREB-regulated transcriptional co-activators</i>
CsA	Cyclosporin A
CTL	Kontrolle
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DAG	Diaglycerol
DAGL	Diaglycerol-Lipase
DMEM	Dulbecco's modifiziertes Eagle's Medium, <i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPBS	Dulbecco's Phosphat-gepufferte Saline, <i>Dulbecco's phosphate buffered saline</i>
EC	Endocannabinoid
ECS	Endocannabinoidsystem
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor, <i>Epidermal growth factor</i>
ELK-1	<i>ETS-Like-1</i>

ER	endoplasmatisches Retikulum
ERK	<i>Extracellular-signal Regulated Kinases 1/2</i>
FAAH	Fettsäureamid-Hydrolase
FK506	(3 <i>S</i> ,4 <i>R</i> ,5 <i>S</i> ,8 <i>R</i> ,9 <i>E</i> ,12 <i>S</i> ,14 <i>S</i> ,15 <i>R</i> ,16 <i>S</i> ,18 <i>R</i> ,19 <i>R</i> ,26 <i>aS</i>)- 5,6,8,11,12,13,14,15,16,17,18,19,24,25,26,26 <i>a</i> -Hexadecahydro-5,19- dihydroxy-3-[(1 <i>E</i>)-2-[(1 <i>R</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>R</i>)-4-hydroxy-3-methoxycyclohexyl]-1- methylethenyl]-14,16-dimethoxy-4,10,12,18-tetramethyl-8-(2-propen-1-yl)- 15,19-epoxy-3 <i>H</i> -pyrido[2,1- <i>c</i>][1,4]oxaazacyclotricosine- 1,7,20,21(4 <i>H</i> ,23 <i>H</i>)tetrone
FKS	fetales Kälberserum, <i>fetal bovine serum</i>
FKBP	FK-Bindeprotein
FSK	Forskolin
GABA	γ -Amino-Buttersäure
Gallein	3',4',5',6'-TetrahydroxySpiro[isobenzofuran-1(3 <i>H</i>),9'-(9 <i>H</i>)xanthen]-3-one
GBM	Glioblastom
GFAP	Saueres Gliafaserprotein
GPCR	G-Protein gekoppelten Rezeptoren
GPR55	<i>G protein-coupled receptor 55</i>
G-Protein	Guaninnukleotid-bindendes Protein
GSC	<i>Glioblastoma stem-like cells</i>
GSK3 β	Glykogensynthase-Kinase 3 beta
HEK293	<i>Human embryonic kidney 293</i>
HIF1 α	<i>Hypoxia-inducible factors 1 alpha</i>
HRP	Meerrettichperoxidase, <i>horseradish peroxidase</i>
Id1	DNA-binding protein inhibitor ID-1
IDH	Isocitratdehydrogenase
IP3	Inositoltriphosphate
JNK	c-Jun N-terminale Kinasen
JWH133	(6 <i>aR</i> ,10 <i>aR</i>)-3-(1,1-Dimethylbutyl)-6 <i>a</i> ,7,10,10 <i>a</i> -tetrahydro-6,6,9-trimethyl- 6 <i>H</i> -dibenzo[<i>b,d</i>]pyran, CB ₂ -Agonist
LPI	L- α -lysophosphatidylinositol
MAGL	Monoacylglycerol-Lipase
MAPK	Mitogen aktivierte Proteinkinase
MEF-2	<i>Myocyte Enhancer Factor-2</i>
MGMT	O ⁶ -Methylguanin-DNA Methyltransferase
MMP	Matrix Metalloproteinase
mTORC1	<i>Mammalian Target of Rapamycin Complex 1</i>
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium Bromid
NaGly	N-Arachidonylglyzin
NAPE-PLD	N-Arachidonylphosphatidylethanolamin-Phospholipase D
NFAT	<i>nuclear factor of activated T cells</i>
NF- κ B	<i>Nuclear Factor κ-Light-Chain-Enhancer of Activated B Cells</i>
NGS	Ziegen Serum, <i>normal goat serum</i>
O-1918	1,3-Dimethoxy-5-methyl-2-[(1 <i>R</i> ,6 <i>R</i>)-3-methyl-6-(1-methylethenyl)-2- cyclohexen-1-yl]benzene, GPR18-Antagonist

PAA	Polyacrylamid
PBS	Phosphat-gepufferte Saline, <i>phosphate buffered saline</i>
PE	Phosphatidylethanolamin
PFA	Paraformaldehyd
PI	Propidiumiodid
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PIP2	<i>phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate</i>
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PLA1/2	Phospholipase A1/2
PLC	Phospholipase C
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
POLR2A	RNA-Polymerase II RPB1
PPAR	Peroxisom Proliferator Aktivierter Rezeptor
PTEN	Phosphat- und Tensin homologs
PTX	Pertussis toxin
PUMA	<i>p53 upregulated modulator of apoptosis</i>
Rac1	<i>Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1</i>
RhoA	<i>Ras homolog gene family member A</i>
ROCK	<i>RhoA associated protein-kinase</i>
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
SDS	Natriumdodecylsulfat, <i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
SEM	Standard error of the mean
siRNA	<i>Small interfering RNA</i>
SOV	Natriumorthovanadat, <i>Sodium Orthovanadate</i>
Sox2	<i>SRY (sex determining region Y)-box 2</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TERT	<i>Telomerase reverse transcriptase</i>
TFEB	Transkriptionsfaktor EB
THC	Δ^9 -Tetrahydrocannabinol
TRB3	<i>Tribbles Homolog 3</i>
TRPV1/2	<i>Transient Receptor Potential Cation Channel Subfamily V Member 1/2</i>
U73122	1-[6-[[(17β) -3-Methoxyestra-1,3,5(10)-trien-17-yl]amino]hexyl]-1 <i>H</i> -pyrrole-2,5-dione
U73343	1-[6-[[(17β) -3-Methoxyestra-1,3,5(10)-trien-17-yl]amino]hexyl]-2,5-pyrrolidinedione
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
WHO	Weltgesundheitsorganisation, <i>world health organization</i>
Y-27632	<i>trans-4-[(1<i>R</i>)-1-Aminoethyl]-<i>N</i>-4-pyridinylcyclohexancarboxamide dihydrochloride</i>
ZNS	Zentrales Nervensystem

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Cannabinoide.	2
Abbildung 2: Funktion, Verteilung und Komponenten des humanen Endocannabinoid-systems.	4
Abbildung 3: Histomolekulare Klassifikation der häufigsten diffusen oligodendroglialen und astrozytären Gliome im Erwachsenenalter gemäß WHO Klassifikation 2021.	7
Abbildung 4: GPR55-vermittelte Signalwege.....	16
Abbildung 5: Einfluss der Phytocannabinoide THC und CBD auf die Anzahl Ki67 ⁺ Nuklei primärer humaner Glioblastomzellen.	19
Abbildung 6: Behandlungsschema zur Bestimmung der Anzahl Ki67 ⁺ Nuklei nach THC und LPI Stimulation in Anwesenheit verschiedener Antagonisten und Inhibitoren zur Aufklärung der Rezeptorabhängigkeit und Rezeptor-assoziiierter Signalkaskaden.	30
Abbildung 7: Behandlungsschema zur Bestimmung der Anzahl Ki67 ⁺ Nuklei nach Serum-induzierter Transition G ₀ -arretierter Zellen in die Proliferation in Anwesenheit von THC und LPI.	31
Abbildung 8: Zusammensetzung und schematische Darstellung des Impedanz-basierten iCELLigence™-Systems zur Analyse der Proliferation.	33
Abbildung 9: Bestimmung der Phasenverteilung des Zellzyklus von <i>GBM #4</i> und <i>GBM #10</i> mittels Durchflusszytometrie.....	36
Abbildung 10: Analyse der Anzahl Ki67 ⁺ Nuklei.....	44
Abbildung 11: Nachweis klassischer und nicht-klassischer CB-Rezeptoren auf Transkript- und Proteinebene in humanen Glioblastomzellen.	48
Abbildung 12: Nachweis der mRNA von nicht-klassischen ionotropen CB-Rezeptoren.....	48
Abbildung 13: Nachweis von Enzymen des ECSs auf Transkript- und Proteinebene.....	50
Abbildung 14: Einfluss von AM281 (CB ₁) und AM630 (CB ₂) auf die Anzahl Ki67 ⁺ Nuklei in THC-behandelten Glioblastomzellen.	51
Abbildung 15: Einfluss von O-1918 (GPR18) auf die Anzahl Ki67 ⁺ Nuklei in THC-behandelten Glioblastomzellen.	52
Abbildung 16: Einfluss von CID (GPR55) auf die Anzahl Ki67 ⁺ Nuklei in THC-behandelten Glioblastomzellen.	54
Abbildung 17: Einfluss von LPI auf die Anzahl Ki67 ⁺ Nuklei.....	56
Abbildung 18: Nachweis der Transkripte von verschiedenen G α -Untereinheiten.	57
Abbildung 19: Einfluss von Pertussis Toxin (PTX, G $\alpha_{o/i}$ -Inhibitor) auf die Anzahl Ki67 ⁺ Nuklei in THC- und LPI-behandelten Glioblastomzellen.....	59

Abbildung 20: Einfluss von Gallein (G β γ -Inhibitor) auf die Anzahl Ki67 ⁺ Nuklei in THC- und LPI-behandelten Glioblastomzellen.	60
Abbildung 21: Einfluss von Y-27632 (ROCK-Inhibitor) auf die Anzahl Ki67 ⁺ Nuklei in THC- und LPI-behandelten Glioblastomzellen.....	61
Abbildung 22: Einfluss von U73122 (PLC-Inhibitor) und U73343 (inaktive Form von U73122) auf die Anzahl Ki67 ⁺ Nuklei in THC- und LPI-behandelten Glioblastomzellen.	63
Abbildung 23: Einfluss von 2-APB (Inhibitor des IP3-sensitiven Rezeptors) auf die Anzahl Ki67 ⁺ Nuklei in THC- und LPI-behandelten Glioblastomzellen.....	64
Abbildung 24: Einfluss von Cyclosporin A (CsA) und Tacrolimus (FK506) (Calcineurin-Inhibitoren) auf die Anzahl Ki67 ⁺ Nuklei in THC- und LPI- behandelten Glioblastomzellen.....	66
Abbildung 25: Einfluss von THC und LPI auf die subzelluläre Lokalisation von NFAT1 und NFAT2 nach 30 min.....	68
Abbildung 26: Einfluss von THC und LPI auf die subzelluläre Lokalisation von NFAT3 und NFAT4 nach 30 min.....	69
Abbildung 27: Calcineurin-abhängige Translokation von NFAT1 in den Nukleus nach Ionomycin Behandlung.	71
Abbildung 28: Subzelluläre Lokalisation von NFAT1-4 nach Calcineurin-Inhibierung.....	72
Abbildung 29: Verlauf der Proliferation von GBM #4 und GBM #10 ohne und nach Zugabe von THC, CBD und LPI mittels iCELLigence™-Systems.....	75
Abbildung 30: Verlauf der Proliferation von Glioblastomzellen ohne und nach Zugabe von CBD und CID.....	76
Abbildung 31: Einfluss von THC, LPI und CBD auf das klonogene Wachstum von <i>GBM #4</i> und <i>GBM #10</i>	77
Abbildung 32: Verteilung der Phasen des Zellzyklus von <i>GBM #4</i> und <i>GBM #10</i> nach THC, LPI und CBD Gabe.	78
Abbildung 33: Einfluss von THC und LPI auf die Serum-induzierte Transition von G ₀ -arretierten Zellen in die Proliferation nach 24-stündiger Serumfreisetzung.	80
Abbildung 34: Graphische Zusammenfassung der Zelltyp-spezifischen THC- und LPI-vermittelten Reduktion der Anzahl Ki67 ⁺ Nuklei über GPR55 und GPR55-assoziierten Signalwege in humanen Glioblastomzellen.	103

SAbbildung 1: Quantitativer Vergleich der Expression ECS-assoziiierter Gene auf Transkriptebene..... 124

SAbbildung 2: Kontrolle der Antikörper-Spezifität zur Untersuchung der Expression des GPR55-Rezeptors mittels Western Blot..... 125

SAbbildung 3: Anzahl Ki67⁺ Nuklei in *GBM #23*..... 126

SAbbildung 4: Viabilität der Glioblastomzellen nach Behandlung mit den verwendeten Inhibitoren zur Untersuchung GPR55-assoziiierter Signalwege und FSK. 128

SAbbildung 5: NFAT1-4 in *GBM #23*..... 132

SAbbildung 6: Subzelluläre Lokalisation von NFAT1 in *GBM #4* nach verschiedenen Zeitpunkten..... 133

SAbbildung 7: Das kollektive und klonogene Wachstum von *GBM #23*..... 134

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Molekulare Targets von THC und CBD.	12
Tabelle 2: Vergleich der Pharmakologie von Cannabinoiden hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Bindung an den humanen GPR55-Rezeptor in GPR55 stabil-transfizierten HEK293 Zellen unter Verwendung verschiedener Messmethoden.	17
Tabelle 3: Chemikalien und Reagenzien.	21
Tabelle 4: Medium, Puffer und Lösungen.	23
Tabelle 5: Primäre Antikörper.	24
Tabelle 6: Sekundäre Antikörper.	24
Tabelle 7: Größenstandards.	25
Tabelle 8: Kits.	25
Tabelle 9: Oligonukleotide.	25
Tabelle 10: Geräte	26
Tabelle 11: Verbrauchsmaterialien.	27
Tabelle 12: Rezeptor-spezifische Antagonisten und Inhibitoren von Effektoren Rezeptor-assoziierter Signalkaskaden.	29
Tabelle 13: Ablauf der Messung mittels iCELLigence™-Systems.	34
Tabelle 14: Zusammensetzung des Polyacrylamidgel.	40
Tabelle 15: Vergleich der relativen Transkriptmengen von klassischen und nicht-klassischen CB-Rezeptoren.	45
Tabelle 16: Vergleich der relativen Transkriptmengen von nicht-klassischen ionotropen CB-Rezeptoren.	49
Tabelle 17: Vergleich der relativen Transkriptmengen von Enzymen des ECSs	50
Tabelle 18: Vergleich der relativen Transkriptmengen von verschiedenen Gα-Untereinheiten (Gα-UE).	58

STabelle 1: Exakte Messwerte und Stichprobengrößen nach Behandlung mit THC in Gegenwart von AM281, AM630, O-1918 und CID. 125

STabelle 2: Exakte Messwerte und Stichprobengrößen nach Behandlung mit THC in aufsteigender Konzentration und in Gegenwart von CID. 126

STabelle 3: Exakte Messwerte und Stichprobengrößen nach Behandlung mit LPI in Gegenwart von CBD und CID. 127

STabelle 4: Exakte Messwerte und Stichprobengrößen nach Behandlung mit THC und LPI. 127

STabelle 5: Exakte Messwerte und Stichprobengrößen nach Behandlung mit THC und LPI in Gegenwart von PTX. 128

STabelle 6: Exakte Messwerte und Stichprobengrößen nach Behandlung mit FSK in aufsteigender Konzentration. 129

STabelle 7: Exakte Messwerte und Stichprobengrößen nach Behandlung mit THC und LPI in Gegenwart von Gallein. 129

STabelle 8: Exakte Messwerte und Stichprobengrößen nach Behandlung mit THC und LPI in Gegenwart von Y-27632. 129

STabelle 9: Exakte Messwerte und Stichprobengrößen nach Behandlung mit THC und LPI in Gegenwart von U73122. 130

STabelle 10: Exakte Messwerte und Stichprobengrößen nach Behandlung mit THC und LPI in Gegenwart von U73343. 130

STabelle 11: Exakte Messwerte und Stichprobengrößen nach Behandlung mit THC und LPI in Gegenwart von 2-APB. 131

STabelle 12: Exakte Messwerte und Stichprobengrößen nach Behandlung mit THC und LPI in Gegenwart von CsA. 131

STabelle 13: Exakte Messwerte und Stichprobengrößen nach Behandlung mit THC und LPI in Gegenwart von FK506. 132

1 Einleitung

„Der Hanf [...] bringt Gesundheit und ist den gesunden Menschen eine heilsame Kost, im Magen leicht und nützlich, weil der den Schleim ein wenig aus dem Magen entfernt und leicht verdaut werden kann, die schlechten Säfte mindert und die guten stärkt. Wer Kopfweg und ein leeres Hirn hat, dem erleichtert der Hanf, wenn er ihn isst, den Kopfschmerz [...]. Ein aus Hanf verfertigtes Tuch, auf Geschwüre und Wunden gelegt, tut gut, weil die Wärme in ihm temperiert ist.“ Hildegard von Bingen

Cannabis, im Volksmund auch Hanf genannt, gehört nach Alkohol und Nikotin zu den weltweit am weitesten verbreiteten Suchtmitteln [1]. Obwohl Cannabis heute mit seiner halluzinogenen Wirkung und dem hohen Suchtpotential in Verbindung gebracht wird und eine ständige Legalisierungsdebatte geführt wird, wird es in der Medizin wegen seiner zahlreichen medizinischen Eigenschaften geschätzt. Das erkannte auch schon im mittelalterlichen Europa die deutsche Äbtissin Hildegard von Bingen, die in ihrer Schrift „Physica“ die Wirkung von Cannabis erläuterte und auf schmerzlindernde und anti-entzündliche Wirkungen aufmerksam machte [2]. Die Geschichte von Cannabis als Arzneimittel reicht bis ins sechste Jahrhundert v. Chr. zurück und beginnt im Nahen Osten und in Asien im alten China und Indien. Cannabis wurde vor allem zur Behandlung von rheumatischen Schmerzen, Obstipationen oder Malaria, aber auch als Anästhetikum in Verbindung mit Wein genutzt [3]. In Westeuropa wurde sie erst im frühen 19. Jahrhundert zur Behandlung von Epilepsie, Tetanus, Rheuma, Migräne, Asthma, Schlaflosigkeit und sexueller Dysfunktionen eingeführt. Die durch Cannabis hervorgerufene Schmerzlinderung stellte der häufigste Grund für dessen medizinische Anwendung dar [3]. Heutzutage wird Cannabis unter anderem zur Behandlung einer Vielzahl von Beschwerden eingesetzt, darunter chronische Schmerzen [4], Übelkeit [5], Depressionen [6] und Neuralgien [7]. Die Wirkung wird durch die in den Pflanzen vorkommenden Substanzen, den sogenannten (phytogenen) Cannabinoiden, vermittelt. Auf deren Basis wurden in den letzten Jahrzehnten mehrere innovative Medikamente entwickelt, die bereits klinisch eingesetzt werden oder sich noch in der klinischen Erprobung zur Behandlung von chronischen Schmerzen [4,7], Epilepsie [8] und Multipler Sklerose [9,10], sowie zur Verwendung als Appetitanreger und Antiemetikum bei HIV/AIDS- und Krebspatienten [5,11] befinden. Cannabinoide stellen daher eine Grundlage für die Entwicklung neuer Arzneimittel dar, um bestehende und/oder meist erfolglose Therapien verschiedener Pathologien zu ergänzen.

1.1 Cannabinoide und das humane Endocannabinoidsystem

Cannabinoide sind lipophile Verbindungen, die je nach ihrer Produktionsquelle in drei Großgruppen eingeteilt werden können: Phytocannabinoide, Endocannabinoide und synthetische Cannabinoide (Abbildung 1).

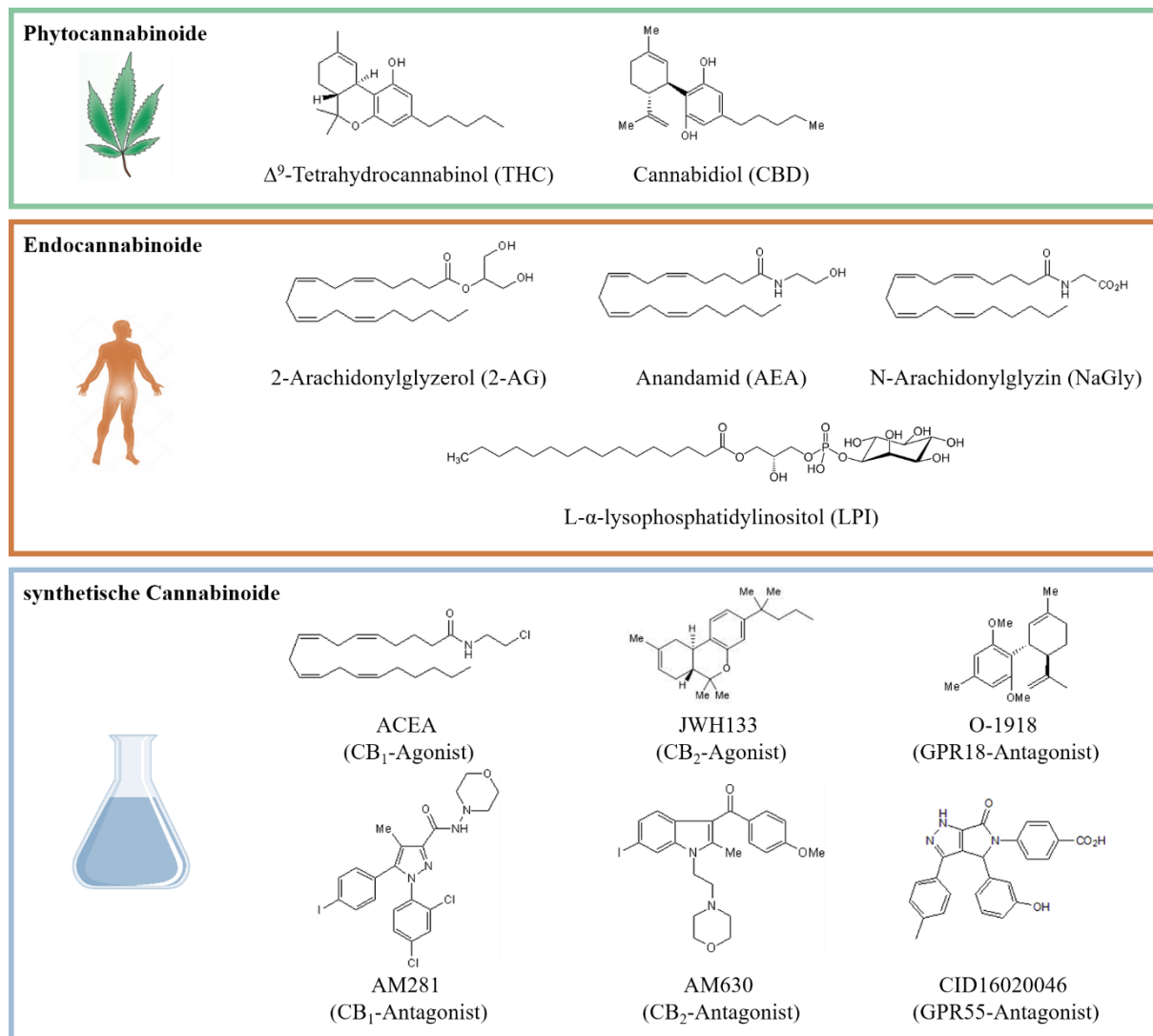


Abbildung 1: Cannabinoide. Je nach ihrer Ursprungsquelle werden Cannabinoide unterteilt in Phyto-, Endo- und synthetische Cannabinoide. Zu den bekanntesten Vertretern der Phytocannabinoide, die in der Cannabispflanze vorkommen, zählen Δ^9 -Tetrahydrocannabinol (THC) und Cannabidiol (CBD). Zu der Klasse der Endocannabinoiden, die vom Körper eigen synthetisiert werden, gehören 2-Arachidonylglycerol (2-AG) und Anandamid (AEA) (CB₁/CB₂-Liganden), sowie N-Arachidonylglyzin (NaGly) (GPR18-Ligand) und L- α -lysophosphatidylinositol (LPI, GPR55-Ligand). Es gibt eine Vielzahl synthetisch hergestellter Cannabinoide, die durch eine hohe Selektivität zu klassischen und orphanen Cannabinoid-Rezeptoren gekennzeichnet sind, darunter ACEA (CB₁-Agonist), JWH133 (CB₂-Agonist), AM281 (CB₁-Antagonist), AM630 (CB₂-Antagonist); O-1918 (GPR18-Antagonist) und CID16020046 (GPR55-Antagonist).

Phytocannabinoide sind eine Familie von über 100 Verbindungen der Cannabispflanze, die im Allgemeinen für ihre psychogene und euphorisierende Wirkung bekannt ist [12]. Diesen gemeinsam ist eine trizyklische Struktur bestehend aus einem Phenolring mit einer Pentylgruppe, einem zentralen Pyranring und einem einfach ungesättigten Cyclohexylring [13].

Von den zahlreichen Phytocannabinoiden sind Δ^9 -Tetrahydrocannabinol (THC, Abbildung 1) und Cannabidiol (CBD, Abbildung 1) die am häufigsten Beschriebenen. Blüten und Blätter sind zwar reich an Cannabinoiden (auch als Gras bekannt), aber die harzigen Sekrete, die in den Drüsentrichomen produziert werden, ergeben ein Produkt mit einer höheren THC-Konzentration (auch bekannt als Haschisch). Die erstmalige Isolierung und die Strukturaufklärung von THC gelang im Jahr 1964 [14]. CBD hingegen konnte zwar bereits 1940 isoliert werden [15], seine Struktur aber wurde erst etwa zwei Jahrzehnte später aufgeklärt [14]. THC und CBD werden in carboxylierter Form biosynthetisiert und werden durch Licht- und Temperatureinwirkung in ihre pharmakologisch aktive Form umgewandelt [16].

Aufgrund der lipophilen Eigenschaften der Phytocannabinoide ging man lange davon aus, dass sie ihre Wirkung unspezifisch und ohne Rezeptorbeteiligung durch eine Veränderung der Zellmembranfluidität ausüben. Heute weiß man, dass die pharmakologischen Wirkungen von THC und CBD auf Interaktionen mit klassischen und nicht-klassischen Cannabinoid-spezifischen Rezeptoren (siehe Abschnitt 1.3) basieren. Die Klassischen werden im Allgemeinen als Cannabinoid (CB)-Rezeptoren bezeichnet und kommen im gesamten menschlichen Körper vor (Abbildung 2). Bislang wurden zwei CB-Rezeptoren kloniert: CB₁ [17] und CB₂ [18]. Beide Rezeptoren sind Membranproteine mit sieben Transmembrandomänen der Familie der *Rhodopsin-like receptors Class A* und sind in der Regel mit inhibitorischen G-Proteinen der Klasse $G\alpha_{o/i}$ gekoppelt [19]. Alternativ können CB₁ und CB₂ Zelltyp-spezifisch an $G\alpha_s$ [20,21], $G\alpha_q$ [22] oder $G\alpha_{12/13}$ [23] gekoppelt sein. CB₁-Rezeptoren sind vor allem im zentralen Nervensystem (ZNS), aber auch in peripheren Nervenenden und nicht-neuronalen Geweben wie Gebärmutter, Prostata, Hoden, Magen, dem Gefäßendothel und Skelettsystem lokalisiert (Abbildung 2) [24]. Die Verteilung von CB₂-Rezeptoren ist hingegen auf Zellen und in Geweben des Immunsystems beschränkt [18]. Es gibt jedoch Hinweise, dass CB₂-Rezeptoren auch im ZNS vorhanden sind (allerdings nur in Gliazellen) und insbesondere bei Entzündungen eine Rolle spielen [25,26].

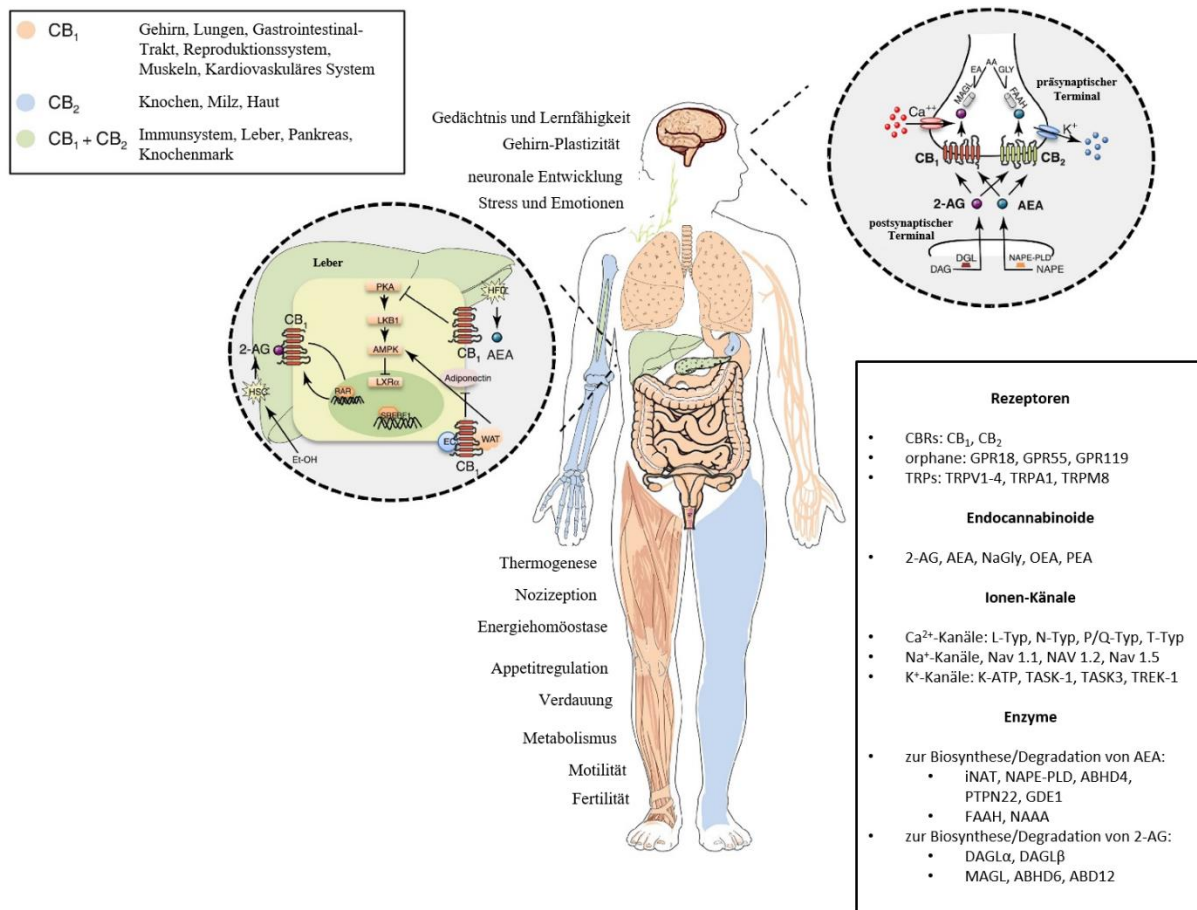


Abbildung 2: Funktion, Verteilung und Komponenten des humanen Endocannabinoidsystems. Im Nervensystem agieren Endocannabinoide als retrograde Botenstoffe, die an präsynaptischen CB-Rezeptoren wirken und die Neurotransmission sowohl exzitatorischer als auch inhibitorischer Neuronen hemmen. Die Synthese erfolgt *de novo* aus Lipidvorläufern von der postsynaptischen Zelle und die Sekretion in den synaptischen Spalt. Der konsekutive Abbau wird in der Präsynapse realisiert. CB₁ Cannabinoid-Rezeptor 1, CB₂ Cannabinoid-Rezeptor 2, MAGL Monoacylglycerin-Lipase, DAGL Diacylglycerol-Lipase, 2-AG 2-Arachidonylglycerol, AEA Anandamid, NAPE N-Acylphosphatidylethanolamin, NAPE-PLD NAPE-spezifische Phospholipase D, PKA Proteinkinase A, LKB1 liver kinase B1, AMPK AMP-abhängige Kinase, LXR Leber X Rezeptor, RAR retinoic acid receptor, SREBF1 sterol regulatory element binding transcription factor 1, WAT white adipose tissue, EA Ethanolamin, AA Arachidonsäure, GLY Glyceroltriphosphat, FAAH Fettsäureamid-Hydrolase, TRP transient receptor potential channels, TRPV TRP vanilloid, TRPA TRP ANKTM1, TRPM TRP Melastatin, NaGly N-Arachidonoylglyzin, OEA Oleoylethanolamid, PEA Palmitoylethanolamid, K-ATP ATP-sensitiver Kaliumkanal, TASK-1 potassium channel subfamily K member 3, TASK 3 synonym von potassium two pore domain channel subfamily K member 9, TREK-1 synonym von potassium two pore domain channel subfamily K member 2, iNAT N-Acyltransferase, ABHD4 Abhydrolase Domain Containing 4, PTPN22 Protein-Tyrosin-Phosphatase-Nichtrezeptor Typ 22, GDE1 Glycerophosphodiester Phosphodiesterase 1, NAAA N-Acylethanolaminesäureamidase, ABHD6 Alpha/Beta-Hydrolase Domäne 6, ABD12 Abhydrolase Domain containing 12, modifiziert nach [24]

Die Klonierung von spezifischen CB-Rezeptoren führte zur Identifizierung intrinsischer Liganden wie Anandamid (AEA) [27] und 2-Arachidonylglycerol (2-AG) [28,29], die gemeinhin als Endocannabinoide (EC) bezeichnet werden (Abbildung 1). ECs bestehen in der Regel aus Amiden und Estern langkettiger Fettsäuren. Im Speziellen sind es Derivate der Arachidonsäure, die *on demand* und *de novo* in Folge physiologischer und pathologischer Stimuli, wie beispielsweise der neuronalen Depolarisation (Abbildung 2) oder der Exposition mit bakteriellen Lipopolysacchariden, gebildet werden [24]. Dadurch entfällt die Notwendigkeit der Vesikelspeicherung, wie sie üblicherweise bei Neurotransmittern oder Neuropeptiden gefunden wird [30]. Die Synthese erfolgt aus Komponenten der

Lipiddoppelschicht durch die N-Arachidonylphosphatidylethanolamin-Phospholipase D (NAPE-PLD) bzw. Diacylglycerol-Lipase (DAGL), während der konsekutive Abbau durch die Membran-assoziierte Fettsäureamid-Hydrolase (FAAH) bzw. Monoacylglycerol-Lipase (MAGL) katalysiert wird [31,32]. Die zelluläre Ausschüttung und Wiederaufnahme der ECs erfolgt rapide durch bisher ungeklärte Mechanismen. Es wird vermutet, dass Diffusion, Endozytose oder Transporterproteine dafür verantwortlich sind [33]. Zusammengefasst bilden die CB-Rezeptoren, die endogenen Liganden und die Enzyme für deren Synthese, Degradation und Transport das sogenannte Endocannabinoidsystem (ECS).

Neben den ECs werden synthetische Cannabinoide aufgrund ihrer meist hohen Selektivität zu CB₁, CB₂ oder anderen Rezeptoren als pharmakologische Hilfsmittel für Rezeptorbindungs- bzw. Rezeptor-Wirkungsstudien und für die Aufklärung Rezeptor-vermittelter Signalwege genutzt. Synthetische Cannabinoide stellen daher bezüglich ihres Funktionsprofils und ihrer chemischen Struktur die vielfältigste Gruppe von Cannabinoiden dar. Anhand ihrer chemischen Struktur lassen sie sich in klassische Cannabinoide mit chemischer Ähnlichkeit zu THC und CBD (Benzopyranderivate/Analoga von Phytocannabinoiden), nicht-klassische Cannabinoide (bi- und trizyklische Analoga von Phytocannabinoiden ohne Pyranring), Aminoalkylindole (strukturell unterschiedlich zu Phyto- und Endocannabinoiden, AM630) und Eikosanoide (Abkömmlinge von mehrfach ungesättigten Fettsäuren, Endocannabinoide, ACEA und JWH133) klassifizieren [34]. Mit Hilfe endogener und synthetischer Cannabinoide gelang es in den letzten Jahren ein besseres Verständnis zur physiologischen und pathophysiologischen Rolle des ECSs aufzubauen. Eine essentielle Funktion übernimmt es beispielsweise bei der Regulation des Nerven-, Immun-, Respirations-, kardiovaskulären und Reproduktionssystems (Abbildung 2) [24]. Dies erklärt die vielfältigen Wirkungen, die sich nach einer THC-Exposition bei gesunden Probanden manifestieren. Die Inhalation oder oraler Aufnahme von THC wird am häufigsten mit den psychoaktiven Wirkungen von Cannabis wie psychotische Symptome, veränderte Wahrnehmung, erhöhte Angst und kognitiven Defiziten in Verbindung gebracht [35]. In diesem Zusammenhang führt die Aktivierung des CB₁-Rezeptors – nicht die des CB₂-Rezeptors – zu den bekannten psychotropen Effekten von THC [35]. THC hat neuroprotektive, krampflösende, schmerzlindernde (gegen neuropathische und chronische Schmerzen) und anti-inflammatorische Eigenschaften [36]. Im Gegensatz zu THC weist CBD keine psychotropen Effekte auf [37]. Stattdessen führte eine gleichzeitige Verabreichung von CBD mit THC zu einer Reduzierung der unerwünschten psychotropen und kardiovaskulären Effekte von THC [37]. Für CBD allein haben mehrere klinische Studien über krampflösende, neuroprotektive, anti-oxidative, anti-inflammatorische, analgetische und anti-emetische

Eigenschaften berichtet [36]. Tatsächlich gibt es bereits einige Medikamente auf THC- und CBD-Basis, die in vielen europäischen Ländern zugelassen sind. Nabiximol (Sativex®) (seit 2011 in Deutschland zugelassen), eine 1:1-Mischung aus THC und CBD, wird zur Linderung von Muskelspastiken und neuropathischen Schmerzen bei Multipler Sklerose [38,39] eingesetzt. Die synthetischen THC-Analoga Dronabinol (Marinol®) und Nabilon (Cesamet®) finden Anwendung zur Kontrolle von Erbrechen und Übelkeit bei Tumorpatienten, die nicht auf die herkömmlichen Antiemetika ansprechen [39].

1.2 Das therapeutische Potential der Cannabinoide THC und CBD für die Behandlung von Tumorerkrankungen am Beispiel des Glioblastoms

Tumorerkrankungen stellen nach kardiovaskulären Erkrankungen die zweithäufigste Todesursache dar [40,41]. Die Inzidenz der Tumorerkrankungen ist in den letzten Jahrzehnten aufgrund des Wachstums und der Alterung der Weltbevölkerung, sowie einer Veränderung in Prävalenz und Verteilung von Risikofaktoren gestiegen. Zu den Risikofaktoren zählen genetische Prädispositionen und persönliche Umstände (Rauchen, Übergewicht, körperliche Inaktivität), sowie chemische (aromatische Amine, Alkylierungsmittel), physikalische (UV-Licht, Röntgenstrahlung, radioaktive Strahlung) oder biologische Quellen (diverse Viren und Bakterien) [41,42]. Tumore können in nahezu jedem Organ und System (Immun-, Blut- und Lymphsystem) im menschlichen Körper auftreten, wobei Tumorerkrankungen der Lunge und Brust weltweit am häufigsten vorkommen [40,41]. Im Gegensatz dazu sind Primärtumore des ZNS mit einer jährlichen Inzidenz von 24/100.000 Erwachsenen relativ selten [43].

1.2.1 Das Glioblastom

Das Glioblastom gilt als der maligneste Primärtumor des ZNS bei Erwachsenen. Obwohl das Glioblastom mit einer Inzidenzrate von 3,23 Fällen pro 100.000 Individuen als seltener Tumor gilt, macht es 14,3 % aller Hirn- und ZNS-Tumore und 49,1 % aller malignen Tumore aus [43]. Mit einer mittleren Überlebensrate von 8-12 Monaten [43,44] und einer 5-Jahres-Überlebensrate von etwa 4,9 % [45] bleibt die Prognose für die Patienten infaust.

Symptomatisch kann es sich je nach funktioneller Rolle des betroffenen Hirnareals durch fokalen-neurologischen Defiziten (Lähmungserscheinungen, Sprachstörungen, Taubheit und Sehstörungen), Kopfschmerzen, Übelkeit, Erbrechen und Krampfanfällen (in Folge der Erhöhung des intrakraniellen Druckes) äußern [44]. Glioblastome finden sich meist im Frontal- und Temporallappen, während nur wenige im *Cerebellum*, Hirnstamm oder Rückenmark auftreten [46,47]. Der Ursprung von Glioblastomen ist bis heute nicht eindeutig identifiziert.

Es gibt Hinweise, dass sowohl ausdifferenzierte Glia- oder Gliavorläuferzellen als auch undifferenzierte neuronale Stammzellen an der Entstehung beteiligt sein könnten [48,49].

Die Klassifikation von ZNS-Tumoren (WHO CNS5) wird durch die Weltgesundheitsorganisation (WHO) festgelegt, bei der seit 2021 zusätzlich zu histologischen Merkmalen molekulare Parameter in die Definition von Diagnosekategorie und Klassifizierung einfließen (Abbildung 3) [50]. Das Glioblastom zeichnet sich histopathologisch durch eine hohe Zelldichte, zelluläre Polymorphismen, nukleäre Atypien und erhöhte Mitoseraten, sowie durch großflächige Nekrosen mit flankierenden Pseudopalisaden und mikrovaskuläre Proliferate aus [51]. Nach molekulargenetischen Kriterien findet sich ein Wildtyp der Isocitratdehydrogenase (IDH), ein vollständiger Verlust der Heterozygotie des Chromosoms 10, die Amplifikation des EGF (*epidermal growth factor*)-Rezeptors und/oder Mutationen im PTEN-Gen (*Phosphatase and Tensin homolog*, in Folge einer Chromosom 7 Deletion) und im TERT (*Telomerase Reverse Transcriptase*)-Promotor (Abbildung 3) [50].

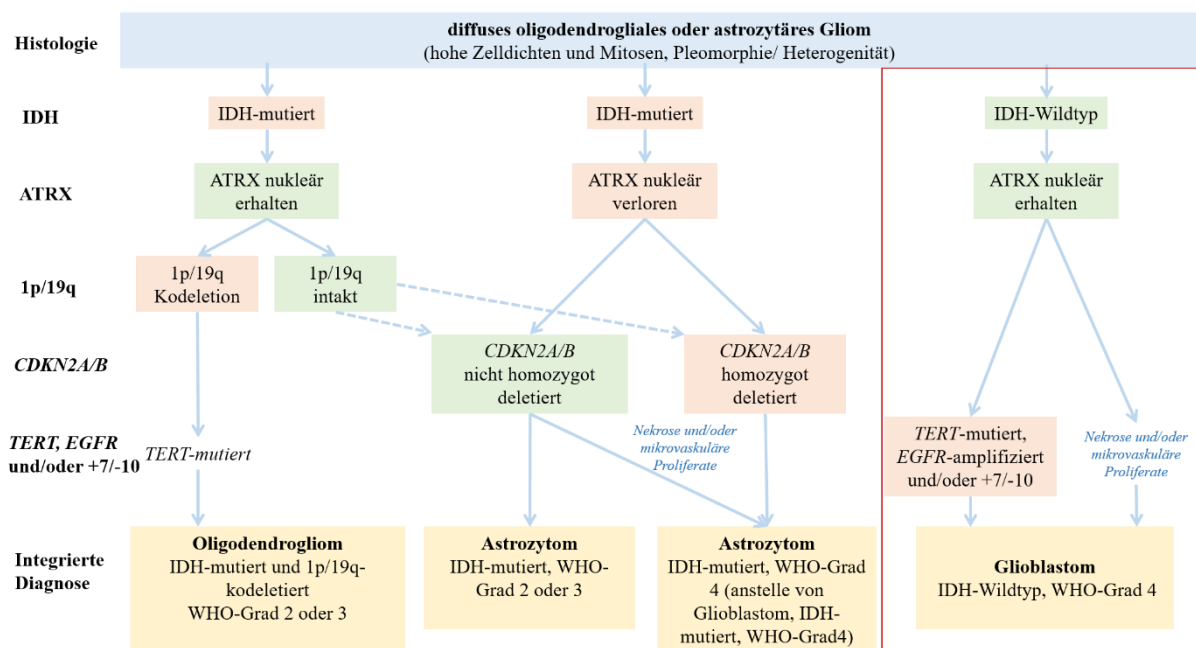


Abbildung 3: Histomolekulare Klassifikation der häufigsten diffusen oligodendroglialen und astrozytären Gliome im Erwachsenenalter gemäß WHO Klassifikation 2021. ATRX *ATP-dependent X-linked helicase*, EGFR *epidermal growth factor receptor*, IDH *Isocitratdehydrogenase*, TERT *Telomerase Reverse Transcriptase*. modifiziert nach [48].

Die Behandlung des Glioblastoms, bestehend aus neurochirurgischer Entfernung und konsekutiver Radiochemotherapie (Bestrahlung und Temozolomid) [52,53], stellt eine große Herausforderung dar. Die Schwierigkeiten bei der Suche nach wirksamen Therapien sind vor allem auf vier Gründe zurückzuführen: die Heterogenität [54,55], die invasiven Eigenschaften [56], die rasante Entwicklung von Resistenzen gegen die gängige Radiochemotherapie [57] und die Blut-Hirn-Schranke (BHS), die von den meisten Medikamenten unüberwindbar ist [58]. Die Tumorerheterogenität umfasst sowohl die intertumorale Heterogenität, welche durch

unterschiedliche genetische Veränderungen und Patienten-spezifische Tumorarchitekturen gekennzeichnet ist, als auch die intratumorale Heterogenität, welche die Diversität der vorhandenen Zell- und Gewebezusammensetzung eines einzelnen Tumors zusammenfasst. Eine genomweite Transkriptomanalyse von hochgradigen Gliomen hat beispielsweise zur Klassifizierung von drei Subtypen von Glioblastomzellen geführt, die prognostische Relevanz aufzeigen [54]. Diese werden als proneuraler, klassischer und mesenchymaler Subtyp bezeichnet, welche anhand genetischer Merkmale bestimmt werden können. Ein Nachteil der Subtypisierung besteht darin, dass die Klassifizierung auf der Analyse eines bestimmten Areals des Tumors beruht. Andere Region des Tumors eines Patienten könnten jedoch infolge der intratumoralen Heterogenität zur Zuordnung zu einem anderen molekularen Subtyp führen [55]. Aufgrund des aggressiven infiltrativen Verhaltens des Glioblastoms ist eine Identifizierung einer diskreten Abgrenzung zwischen dem Tumor und dem normalen Hirnparenchym erschwert und eine vollständige chirurgische Resektion der Tumormasse praktisch unmöglich. Neben der erworbenen Radiochemo-Resistenz trägt dies zur Rezidivierung nur wenige Zentimeter von seiner ursprünglichen Resektionsstelle bei [56] und bestimmt die schlechte Prognose für den Patienten. Aus diesem Grund ist die Suche nach neuen Behandlungsstrategien von essentieller Bedeutung.

1.2.2 Wirkung von THC und CBD auf Glioblastome

Eines der aktuellen Forschungsthemen auf dem Gebiet des ECSs ist die Untersuchung der möglichen Anwendung von Cannabinoiden wie THC und CBD in der Therapie von malignen Tumoren. In zahlreichen präklinischen Studien konnte ein inhibitorisches Wirkpotential von THC und CBD auf die Tumorprogression von Glioblastomen allein, in Kombination miteinander oder anderen Wirkstoffen aufgezeigt werden [59–62]. In *in vitro* und *in vivo* Modelle diverser Tumorentitäten verringern sie das Tumorwachstum, in dem sie die Autophagie [63,64] und Apoptose [65–68] aktivieren und/oder die Tumorzellproliferation [68–70] hemmen. Des Weiteren verhindern sie die Tumorausbreitung, in dem sie die Fähigkeit der Migration [71], der Invasion [72–77], der Metastasierung und der Angiogenese [78,79] herabsetzen. Es ist zu erwähnen, dass für THC auch Hinweise auf pro-tumorale Eigenschaften existieren, wobei die verwendete Konzentration ausschlaggebend scheint. Während die prädominanten anti-tumoralen Effekte bei der Applikation mikromolarer Konzentrationen erzielt wurden, förderte THC in nanomolaren Mengen die Proliferation von Tumorzellen [80]. Nanomolare Mengen werden beispielsweise im Blutserum nach Einnahme von THC durch Rauchen oder Inhalation gefunden [81]. Sowohl die starke Vaskularisierung von Glioblastomen als auch die Lipophilie von THC, die eine nahezu ungehinderte Passage von THC durch die

BHS ermöglicht, macht eine starke Anreicherung von THC im Glioblastom eher wahrscheinlicher.

Im Rahmen einer klinischen Pilotstudie konnte die anti-tumorale Aktivität von THC an Patienten mit einem rezidierten Glioblastom bestätigt werden [82]. Diese Studie wies auf eine verringerte Proliferation und eine erhöhte Apoptoserate im Tumorgewebe von THC-behandelten Patienten hin, was die mittlere Überlebenszeit der Patienten positiv beeinflusste [82]. Laut einer Fallserie von 9 Glioblastom-Patienten, zeigte CBD positive Auswirkungen auf das Überleben (mittleren Überlebenszeit: 24,2 Monaten) [83,84]. Synergistische Effekte hinsichtlich der anti-tumoralen Eigenschaften von THC und CBD wurden in Kombination miteinander [60,85], mit Bestrahlung [59,86] und mit Temozolomid (TMZ) [60–62] beobachtet. In orthotopischen murinen Gliom-Modellen führte die orale oder intraperitoneale Administration äquimolarer Mengen von THC und CBD in Kombination mit TMZ oder Bestrahlung zu einem verminderten Tumorwachstum und erhöhten Überlebensraten [59–62,86]. Daran anknüpfend wurden zwei klinische Studien der Phase I/II an Patienten mit einem *de novo*-diagnostizierten Glioblastom oder mit einem Rezidiv initiiert. Die Ergebnisse an Rezidiv-Patienten zeigten eine deutlich höhere Ein-Jahres-Überlebensrate (83 % (Sativex) vs. 44 % (Placebo)), wenn sie neben einer hohen TMZ-Dosis Sativex (1:1, THC:CBD) statt eines Placebos erhielten [87].

Des Weiteren äußert sich das therapeutische Potential von THC und CBD in der offenbar selektiven Wirkung auf Tumorzellen. Sie beeinflussen zwar das Wachstum von Tumorzellen sowohl *in vitro* als auch *in vivo*, haben aber scheinbar keinerlei negative Effekte auf nicht-transformierte Zellen (Astrozyten) oder auf das flankierende gesunde Gewebe [65–67,88]. Als mögliche Ursache für die differenzierte Sensitivität werden Unterschiede in der Rezeptor-Expression, in der Wirkung auf den Redoxzustand oder in den Rezeptor-gekoppelten Signaltransduktionswege diskutiert.

1.2.3 Veränderungen des ECSs im Glioblastom

Veränderungen im ECS können pathophysiologisch in einer Vielzahl von Erkrankungen, wie neurodegenerativen (Alzheimer [89], Parkinson [90]) und kardiovaskulären Erkrankungen, Adipositas [91], Diabetes mellitus [92] und Tumorerkrankungen beobachtet werden. Untersuchungen haben gezeigt, dass das ECS in Prostatakarzinomen [93], in kolorektalen Karzinomen [94,95], hepatozellulären Karzinomen [96] und in Glioblastomen [97–105] verändert vorkommt.

In Gewebeproben hochgradiger Gliome zeigt sich hinsichtlich der Enzymmaschinerie des ECSs eine erniedrigte Menge und verminderte Aktivität von NAPE-PLD [97,98], was mit einer

reduzierten Konzentration von AEA einhergeht [97,101]. In Folge des geringen Vorkommens von AEA und einer negativen Feedback-Schleife wurden auch eine reduzierte Menge und Aktivität von FAAH gemessen [97,98]. 2-AG hingegen war im Tumorgewebe hochgradiger Gliome erhöht, was auf eine verminderte Expression und Aktivität von MAGL zurückzuführen war, während jene von DAGL α unverändert war [97]. Die Bedeutung dieser Unterschiede für die Tumorprogression und den Patienten bleibt offen und bedarf weiterer Untersuchungen. Es wird jedoch angenommen, dass AEA und 2-AG eine wichtige Rolle in der Regulation der Apoptose und Proliferation von Tumorzellen einnehmen.

Obwohl in Astrozyten lediglich CB₁ vorkommt, exprimieren Glioblastomzellen kommerzieller Zelllinien, Primärkulturen und Tumorproben sowohl funktionellen CB₁ als auch CB₂ in unterschiedlichen Mengen [73,88,105]. Trotz der Expression von CB₂ in Endothelzellen der Blutgefäße und infiltrierenden Mikroglia/Makrophagen häufen sich die Hinweise, dass Glioblastome hohe Proteinmengen von CB₂ aufweisen [97,99,100,103,105]. Eine kürzlich veröffentlichte Studie berichtete sogar über erhöhte CB₂-Mengen nicht nur im Tumorgewebe, sondern vor allem in Tumor-assoziierten Blutgefäßen [100]. Darüber hinaus korrelierte die CB₂-Expression positiv mit dem Malignitätsgrad [99]. Im Gegensatz dazu sind die Ergebnisse hinsichtlich der Expression von CB₁ inkonsistent, da im Vergleich zu niedriggradigen Gliomen oder gesundem Gewebe CB₁ in Glioblastomen entweder in unveränderten [102], verringerten [103] oder sogar erhöhten Mengen vorkommt [97,100,104]. Insgesamt weisen die Befunde auf die Notwendigkeit hin, die molekularen Mechanismen, welche die anti-tumoralen Effekte von Cannabinoiden vermitteln, zu verstehen.

1.2.4 Intrazelluläre Mechanismen von THC und CBD in Tumorzellen

Der wohl am besten charakterisierte Mechanismus von THC auf Tumorzellen ist der THC-induzierte Zelluntergang, welche auf der intrazellulären Akkumulation von *de novo* synthetisiertem Ceramid beruht [63,65,72,106–108]. In der Folge einer stressbedingten Signalkaskade vom ER erfolgt über die erhöhte Expression verschiedener Transkriptionsfaktoren die Aktivierung der *Pseudokinase Tribbles Homologue 3* (TRB3) [63–65,109]. TRB3 trägt zur Inaktivierung von mTORC1 (*mammalian target of rapamycin complex 1*) durch die Inhibierung von AKT (Proteinkinase B) bei, welches ein entscheidender Schritt in der Initiation der Autophagie repräsentiert [63,65,72,109]. Der THC-vermittelten Autophagie schließt sich die Aktivierung des intrinsischen Apoptoseweges an, der durch die Freisetzung von Zytocrom c aus dem Mitochondrium gekennzeichnet ist [107]. Neben der Apoptose beeinflusst THC die Proliferation von Tumorzellen, in dem es die Aktivität und Expression essentieller Zellzyklusregulatoren, wie Zyklin A, E2F1 und p16 herunterreguliert,

dem ein Zellzyklusarrest in der G₀/G₁-Phase folgt [69]. Die anti-angiogenen Eigenschaften von THC werden über verminderte Proteinmengen des *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) vermittelt [78,79], während die Invasion nach THC Applikation über eine verminderte Expression der Metalloproteinase-2 (MMP-2) eingeschränkt wird [72].

Im Gegensatz zu THC sind die molekularen Mechanismen der anti-tumoralen Aktivität von CBD in Tumorzellen noch nicht vollständig entschlüsselt. Der CBD-induzierte Zellzyklus-Arrest (G₀/G₁ oder G₁/S) und seine pro-apoptotische Wirkung lässt sich hauptsächlich durch eine erhöhte Produktion von reaktiven Sauerstoff Spezies (ROS) in Folge einer ER Stressreaktion nach Erhöhung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration erklären [68,110,111]. Im Weiteren erfolgt die Hochregulierung von CHOP (C/EBP-homologes Protein), p53 und PUMA (*p53 Upregulated Modulator of Apoptosis*), was über die Freisetzung von mitochondrialem Zytochrom c in die Aktivierung zahlreicher Effektor-Caspasen wie Caspase-3, -7 und -9 mündet [110,111]. Des Weiteren wurde von einer erhöhten Autophagie-Aktivität nach CBD Stimulation berichtet, die auf einer ROS-abhängigen Inhibierung des PI3K-AKT-mTORC1 Signalweges beruht [67]. Die Invasivität von Tumorzellen hemmt CBD über die reduzierte Expression von Id1 (*DNA-binding protein inhibitor 1*) [76,77] und MMP-9 [75], während die anti-angiogenen Eigenschaften über verminderte Mengen von VEGF und Angiogenin vermittelt werden [75]. Weitere Signalwege, die durch CBD moduliert werden, sind die Phosphorylierung von c-Jun N-terminale Kinasen (JNK1/2) und p38, sowie die Aktivierung [77] oder Inaktivierung von *Extracellular-signal Regulated Kinases 1/2* (ERK1/2) [59,112] und die Runterregulierung des Hypoxie-induzierten Faktor-1 α (HIF1 α) [75].

1.3 Diversität molekularer Targets von THC und CBD

Trotz der beträchtlichen Fortschritte, die in Bezug auf das Verständnis der molekularen Mechanismen, die den anti-tumoralen Wirkungen von THC und CBD zugrunde liegen, gemacht wurden, wurde bisher kein universeller Rezeptor, über den beide Cannabinoide die Viabilität von Tumorzellen beeinflussen, beschrieben. In einigen Fällen wirken Sie über die klassischen CB-Rezeptoren CB₁ und/oder CB₂ [70,113,114], während in anderen Studien von CB₁/CB₂-unabhängigen Mechanismen berichtet wurde [115–117]. Ein entscheidender Faktor, der dieses Phänomen erklären könnte, liegt nicht nur in der Expression und Verteilung der Rezeptoren, sondern auch in der Diversität und Komplexität der molekularen Pharmakologie von THC und CBD begründet (Tabelle 1).

Tabelle 1: Molekulare Targets von THC und CBD. (modifiziert nach [118]).

		THC		CBD	
Target	Verhalten	Ref.	Verhalten	Ref.	
CB ₁	partieller Agonist	[113]	schwacher Antagonist/negativ allosterischer Modulator	[113]	
CB ₂	partieller Agonist	[113]	partieller Agonist/schwacher Antagonist	[113]	
GPR18	Agonist	[117]	Antagonist	[117]	
GPR55	Agonist/ negativer allosterischer Modulator	[116]	Antagonist	[116]	
5HT	1A	-	Agonist	[119]	
	2A	-	schwacher partieller Agonist	[119]	
	3A	Antagonist	[120,121]	Antagonist	[122]
μ- und δ-OPR	allosterischer Modulator	[123]	allosterischer Modulator	[123]	
PPARγ	Agonist	[124]	Agonist	[125]	
TRP Kanäle	TRPV1	-	Agonist	[126]	
	TRPV2	Agonist	[127]	Agonist	[126]
	TRPV3	Agonist	[111,127]	Agonist	[111,127]
	TRPV4	Agonist	[111,127]	Agonist	[111,127]
	TRPA1	Agonist	[126–128]	Agonist	[38, 39,41]
	TRPM8	Antagonist	[127,128]	Antagonist	[127,128]

Es gilt als gesichert, dass THC als ein moderater partieller Agonist von CB₁ und CB₂ agiert [19]. CBD weist hingegen eine geringe Affinität zu CB₁ und CB₂ auf. Dennoch wurde CBD als CB₁ Antagonist beschrieben [129]. Weiterhin konnte beobachtet werden, dass CBD zum einen als negativ-allosterischer Modulator an CB₁ wirkt und nachweislich 2-AG- und THC-induzierte Signale über CB₁ reduzierte [130]. Zum anderen wirkt CBD entweder als partieller Agonist [131] oder als schwacher Antagonist an CB₂ [129]. Weiterhin zeigte sich, dass CBD sich als negativer allosterischer Modulator von THC und 2-AG verhält [130]. Darüber hinaus existieren neben CB₁ und CB₂ noch weitere G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR), wie GPR18 und GPR55, mit denen Cannabinoide interagieren können, die als orphane CB-Rezeptoren klassifiziert werden. GPR18 ist wie CB₁ und CB₂ ein Transmembranprotein der *Rhodopsin-like receptors Class A* Familie und ist gekoppelt an inhibitorischen G-Proteinen [132]. Anhand der Messung der p44/42 MAPK-Aktivierung in stabil transfizierten HEK293 Zellen konnte gezeigt werden, dass THC als Agonist und CBD als Antagonist an GPR18 wirkt [117]. GPR55 als weiterer potentieller Interaktionspartner wird in Abschnitt 1.4 näher erläutert.

Die Transient Rezeptor Potential (TRP)-Superfamilie der Kationenkanäle sind integrale Membranproteine und sind an der Transduktion einer Bandbreite chemischer und mechanischer Reize beteiligt. Sie regulieren über die Modulation des Ca²⁺ Einstroms physiologische Prozesse, wie u.a. Temperaturempfinden, Geruchs-, Geschmacks-, Druck- oder Schmerzwahrnehmung [133]. TRPs umfassen sechs Unterfamilien: "Kanonisch", "Vanilloid" (TRPV), "Melastatin" (TRPM), "Polycystin", "Mucolipin" und "Ankyrin" (TRPA). Für eine Interaktion mit diversen Cannabinoiden wurden folgende TRPs vorgeschlagen: TRPV1, TRPV2, TRPV3, TRPV4, TRPM8 und TRPA1 [118]. Einige dieser TRP-Kanäle stehen sogar derzeit in der Diskussion als "ionotrope CB-Rezeptoren" eingestuft zu werden. THC scheint

zwar keine Interaktion mit TRPV1 (auch bekannt als Capsaicin-Rezeptor) einzugehen, erwies sich jedoch als Agonist von TRPV2, TRPV3, TRPV4 und TRPA1 [111,126–128], sowie als Antagonist von TRPM8 [127,128]. Das pharmakologische Wirkprofil von CBD auf TRP-Kanälen ist dem von THC sehr ähnlich, nur im Unterschied kann CBD auch als Agonist TRPV1 aktivieren [111,126–128]. Gerade TRPV2 kristallisiert sich als ein potentieller Mediator für die anti-tumoralen Eigenschaften von CBD heraus, die sich als TRPV2-abhängige Apoptoseinduktion manifestierten [134].

Außerhalb des ECSs wurde THC auch als Antagonist des Serotonin-Rezeptors 5-HT_{3A} und als allosterischer Modulator der Opioid-Rezeptoren vorgeschlagen [120,121]. Darüber hinaus deuten *in vitro* Studien darauf hin, dass CBD als Agonist des Serotonin-Rezeptors 5-HT_{1A} die serotonerge Neurotransmission beeinflussen kann, was die neuroprotektiven und die Angst- und Depressionslindernden Eigenschaften von CBD erklärt [135,136]. Zudem hat CBD eine regulierende Wirkung auf Opioid-Rezeptoren, die für die betäubende und euphorische Reaktion während des Cannabiskonsums mitverantwortlich sind [123]. Wie THC bindet CBD an nukleären Peroxisom Proliferator Aktivierten Rezeptoren (PPAR), worüber neuroprotektive und anti-inflammatorische Effekte von THC und CBD im Zellkulturmodell von Parkinson [137], Alzheimer [138] oder Ischämien [136] vermittelt werden.

1.4 GPR55 - als „dritter“ CB-Rezeptor?

Unter den orphanen Rezeptoren steht GPR55 seit einigen Jahren vermehrt im Mittelpunkt der Diskussion als mutmaßlich „dritter“ CB-Rezeptor zu wirken, da er für einige CB₁/CB₂-unabhängige Effekte von Cannabinoiden verantwortlich gemacht werden könnte.

1.4.1 Struktur und endogener Ligand

GPR55 wurde erstmals 1999 aus cDNA der humanen fetalen Leber-Milz Bibliothek kloniert und ist auf Chromosomen 2q37 kartiert [139]. GPR55 besteht aus 319 Aminosäuren und bildet ein 37 kDa GPCR mit einem kurzen extrazellulären N-Terminus, 7 Transmembrandomänen und einem kurzen intrazellulären C-Terminus [140]. In der gesamten Aminosäuresequenz existieren zudem zwei mutmaßliche Stellen für N-Glykosylierungen (N5, N171), sowie zahlreiche Phosphorylierungsstellen für Proteinkinase C (PKC) und Proteinkinase A (PKA) [139]. GPR55 zählt zwar wie CB₁ und CB₂ zu den *Rhodopsin-like receptors Class A* Rezeptoren, weist aber eine geringe Aminosäure-Homologie zu CB₁ (13 %) und CB₂ (14 %) auf [140]. Seine größte Homologie teilt er hingegen mit den „*orphan receptors*“ GPR35 (37 %) und GPR92 (30 %), dem Purinrezeptor P2Y₅ (30 %) und dem „*purinoceptor-like orphan receptor*“ GPR23 (29 %) [140,141]. Des Weiteren fehlt GPR55 die übliche Cannabinoid-

Bindetasche, wie sie bei CB₁ und CB₂ vorhanden ist. Während CB₁ und CB₂ starke hydrophobe Ligandenbindungstaschen aufweisen, konnte für GPR55 eine tiefe, vertikale und stark hydratisierte Bindungstasche, die aus vielen hydrophilen Resten besteht, ermittelt werden [142,143]. In Übereinstimmung mit den strukturellen Unterschieden ist der endogen vorkommende Agonist, der bisher für GPR55 beschrieben wurde, ein Lipid, welches mittlerweile zur Klasse der Cannabinoide zählt: Lysophosphatidylinositol (LPI) [144].

Strukturell besteht LPI aus einer Inositol-Kopfgruppe und einer Glycerineinheit (Abbildung 1). LPI wird von Lipasen der Phospholipase A (PLA)-Familie, PLA1 und PLA2, synthetisiert [145]. Während PLA1 Fettsäuren an der *sn1*-Position von Glycerophospholipiden hydrolysiert, katalysiert PLA2 die Hydrolyse von Fettsäuren an der *sn2*-Position [146]. Dadurch entstehen neben unveresterten („freien“) Fettsäuren 2-Acyl- (PLA1) bzw. 1-Acylphospholipide (PLA2). Aus der Hydrolyse von Phosphoinositid durch PLA2 wird neben 1-Acyl-LPI auch die Eikosanoid- und Prostaglandin-Vorstufe Arachidonsäure freigesetzt [145]. In der vorliegenden Arbeit wurde 1-Acyl-LPI verwendet (Abbildung 1).

1.4.2 Vorkommen und (patho-)physiologische Funktionen

GPR55 ist innerhalb des ZNS in vielen Bereichen des Gehirns (*Hippocampus*, *Caudatus*, *Striatum*, *Cerebellum*, *Hypothalamus* und *Cortex*), aber auch auf Gliazellen und Neuronen von Spinalganglien lokalisiert [116,139,147–149]. Außerhalb des ZNS konnte GPR55 in Geweben von Lunge, Pankreas, Leber, Milz und Darm identifiziert werden [150–153].

Aufgrund seines ubiquitären Vorkommens scheint GPR55 an der Steuerung einer Vielzahl physiologischer Funktionen involviert zu sein. So spielt GPR55 eine wesentliche Rolle bei der Modulation von entzündlichen und neuropathischen Schmerzen, da er die Erregbarkeit der Spinalganglien durch die Erhöhung des intrazellulären Ca²⁺-Spiegels und der Inhibierung des K⁺ Stroms reguliert [147]. Darüber hinaus reagierten GPR55-defiziente-Mäuse resistent gegenüber entzündlichen und neuropathischen Stimuli [148]. Des Weiteren wird GPR55 eine Beteiligung bei neuro-inflammatorischen Prozessen zugeschrieben, was durch Untersuchungen der transkriptionellen Regulation von GPR55 in Abhängigkeit des Aktivierungszustandes von Mikrogliazellen belegt wurde [149]. Auch sind neuroprotektive Effekte von GPR55 bei exzitatorischer Schädigung von Neuronen des *Hippocampus* adulter Ratten bekannt [154]. GPR55 ist am Knochenstoffwechsel beteiligt und induziert insbesondere die Knochenresorption [155]. Andere Studien deuten auf eine zusätzliche Rolle von GPR55 bei der Modulation der Gefäßfunktion hin [156–158]. Es gibt Hinweise, dass GPR55 zur Stoffwechselregulation und Energiehomöostase beiträgt [159–161]. Durch den Nachweis von GPR55 in Insulin-sekretierenden β-Zellen der Langerhans-Inseln des Pankreas wird GPR55

eine Beteiligung an der Insulinsekretion beigemessen [162–166]. Des Weiteren wurde über Korrelationen zwischen dem Körpergewicht und der GPR55-Expression im viszeralem und subkutanen Fettgewebe berichtet [167].

Interessanterweise korreliert die Expression von GPR55 mit der Aggressivität verschiedener Tumorentitäten. Gewebeproben von hochgradigen Brust-, Bauchspeicheldrüsen- und Hirntumoren enthielten erhöhte Transkriptmengen im Vergleich zu Gewebe aus niedriggradigen Tumoren [168]. Auch ein geringeres Überleben von Glioblastompatienten korrelierte mit einer erhöhten GPR55-Expression [168]. Unterstützt wird dieser Zusammenhang durch den Nachweis erhöhter LPI-Konzentrationen im Plasma von Patientinnen mit Ovarialkarzinomen im Vergleich zu gesunden Patientinnen [169]. Von entscheidender Bedeutung für Tumorzellen scheint GPR55 für die Regulation der Proliferation zu sein. Eine Reduzierung von GPR55 führte in kultivierten Eierstock-, Prostata-, Darm-, Brusttumor- und Glioblastomzellen [168,170,171] zu einer verringerten Proliferation, während eine artifizielle Überexpression die Proliferation förderte [168]. Ein ähnlicher Effekt konnte auch *in vivo* unter Verwendung eines Xenotransplantationsmodell des Glioblastoms erzielt werden, bei der die Anzahl proliferierender Zellen in den Tumoren durch einen GPR55 *Knockdown* reduziert und das Tumorstadium gehemmt wurde [168]. Jüngste Beobachtungen lassen außerdem vermuten, dass LPI hinsichtlich der Proliferation in Tumorzellen eine autokrine Funktion einnehmen könnte [168,172]. Neben der Proliferation reguliert GPR55 auch die Migration, Invasion und Polarisation von Tumorzellen [173,174].

1.4.3 GPR55-vermittelte Signalkaskaden

Im Gegensatz zu CB₁ und CB₂ ist GPR55 an Gα_{12/13} [116,147,175–177] oder Gα_q-Proteine [147] gekoppelt, was mit einer Aktivierung von *Ras homolog gene family member A* (RhoA) und der nachgeschalteten *Rho associated coiled coil containing protein kinase* (ROCK), der Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) oder der Phospholipase C (PLC) einhergeht [147,151,163,172,176,177]. Die direkt [147] oder indirekt über PI3K [178] und RhoA/ROCK [176] aktivierte PLC hydrolysiert Membran-gebundenes Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) zu Diacylglycerin (DAG) und Inositoltriphosphat (IP₃), welche als *second messenger* agieren. IP₃ wiederum induziert über einen IP₃-sensitiven Rezeptor auf der Membran des ERs eine oszillierende Freisetzung von Ca²⁺-Ionen [163,176]. Durch die Komplexierung mit dem Kalzium-bindenden Calmodulin aktivieren Ca²⁺-Ionen die Phosphatase Calcineurin. Calcineurin bewirkt durch eine Dephosphorylierungsreaktion eine Kerntranslokation und Aktivierung des Transkriptionsfaktors *Nuclear factor of activated T-cells* (NFAT) [175,176]. Zusammen mit DAG können Ca²⁺-Ionen auch PKC und schließlich die RAF/MEK/ERK-

Kaskade aktivieren, was mit der Aktivierung der Transkriptionsfaktoren 3'-5'-cyclic adenosine monophosphate response binding protein (CREB) und nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF-κB) einhergeht [163,166,176]. Des Weiteren sind in Zusammenhang mit einer GPR55-Stimulation die Aktivierung von cell division control protein 42 (Cdc42) und Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 (Rac1) [151], die Phosphorylierung von p38 mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK) [152] und von Proteinkinase B (Akt) [166,172] beschrieben. Die GPR55-vermittelten Signalkaskaden sind zusammengefasst in Abbildung 4 dargestellt.

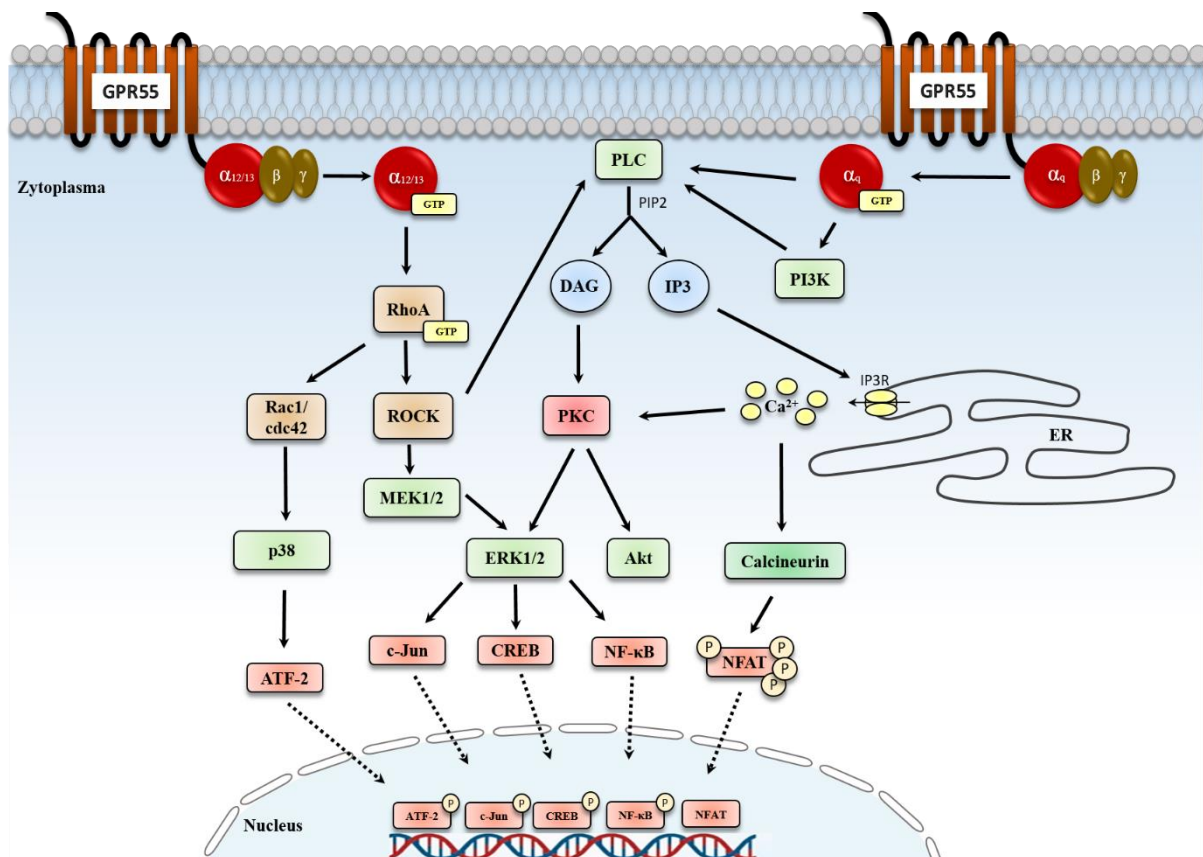


Abbildung 4: GPR55-vermittelte Signalwege. Die Aktivierung von GPR55 folgt physiologisch durch die Interaktion mit dem endogenen Liganden LPI. GPR55 ist einerseits an $G\alpha_{12/13}$ -Proteine gekoppelt, dessen Aktivierung mit der RhoA-Aktivierung einhergeht. Dies wiederum führt zur Aktivierung der Kinasen ROCK, Rac1 und cdc42, die in der Lage sind konsekutiv verschiedene MAPKs, wie MEK1/2, ERK1/2 oder p38 zu aktivieren, um die Translokation von Transkriptionsfaktoren wie CREB, c-Jun und ATF2 durch deren Phosphorylierung zu fördern. Andererseits bindet GPR55 auch $G\alpha_q$ -Proteine, die PLC direkt oder indirekt über PI3K stimulieren und die Bildung von IP3 und DAG induzieren. IP3 führt über die Bindung an IP3-sensitiven Rezeptoren des endoplasmatischen Retikulums (ER) zur Freisetzung von Ca^{2+} und somit zu einem Anstieg von zytosolischen Ca^{2+} . Zytosolische Ca^{2+} aktivieren Ca^{2+} -abhängige Enzyme, wie Calcineurin, welche die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFAT durch dessen Dephosphorylierung forciert. DAG hingegen führt zur Aktivierung des PKC Signalweges. Akt Proteinkinase B; ATF-2 activating transcription factor 2; cdc42 cell division control protein 42; c-Jun cellular Jun; CREB 3'-5'-cyclic adenosine monophosphate response binding protein; DAG diacylglycerine; ER endoplasmatisches Retikulum; ERK1/2 extracellular signal-regulated kinases1/2; GTP Guanosin triphosphat; IP3 Inositoltriphosphat; IP3R IP3-sensitive receptore; LPI Lysophosphatidylinositol, MEK1/2 mitogen-activated protein kinase kinase 1/2; NFAT nuclear factor of activated T-cells; NF-κB nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells; PI3K Phosphoinositid 3-kinase; PIP2 Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat; PKC Proteinkinase C; PLC Phospholipase C; p38 p38 mitogen-activated protein kinase; Rac1 Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1; RhoA Ras homolog gene family member A; ROCK Rho associated coiled coil containing protein kinase

1.4.4 Pharmakologie und weitere Liganden

LPI gilt als der potenteste endogene Ligand von GPR55. Zudem sind *off-target* Effekte einiger CB₁- und CB₂-Liganden auf die Aktivierung von GPR55 zurückzuführen (Tabelle 2).

Unter Verwendung eines heterologen Expressionssystems, bei dem der humane GPR55-Rezeptor stabil in HEK293 Zellen artifiziell exprimiert wurde, wurden in mehreren Studien neben LPI eine Reihe von natürlichen und synthetischen Cannabinoiden auf ihre potenzielle Bindung und Aktivierung von GPR55 untersucht, wobei konträre Ergebnisse erzielt wurden (Tabelle 2).

Tabelle 2: Vergleich der Pharmakologie von Cannabinoiden hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Bindung an den humanen GPR55-Rezeptor in GPR55 stabil-transfizierten HEK293 Zellen unter Verwendung verschiedener Messmethoden. (modifiziert nach [179])

Substanz	Aktivität an GPR55	Messung	Ref.
Endocannabinoide			
AEA	kein Effekt (1 μ M)	ERK-Phosphorylierung	[144]
	Agonist (EC ₅₀ = 18 nM)	[35S]GTP γ S Assay	[151]
	Agonist (1 μ M)	RhoA-Aktivierung	[151]
	Agonist (5 μ M)	Ca ²⁺ -Freisetzung	[147]
	kein Effekt (3-30 μ M)	Ca ²⁺ -Freisetzung	[176]
	kein Effekt (30 μ M)	ERK-Phosphorylierung, Rezeptor-Internalisierung	[180]
	kein Effekt	β -Arrestin-Aktivierung	[181]
2-AG	kein Effekt (1 μ M)	ERK-Phosphorylierung	[144]
	Agonist (EC ₅₀ = 3 nM)	[35S]GTP γ S Assay	[151]
	kein Effekt (3-30 μ M)	Ca ²⁺ -Freisetzung	[176]
	kein Effekt	β -Arrestin-Aktivierung	[181]
	kein Effekt (30 μ M)	ERK-Phosphorylierung, Rezeptor-Internalisierung	[180]
LPI	Agonist (EC ₅₀ = 200 nM)	ERK-Phosphorylierung	[144]
	Agonist (1 μ M)	Ca ²⁺ -Freisetzung, NFAT-Aktivierung, RhoA-Aktivierung	[176]
	Agonist (EC ₅₀ = 3,6 μ M)	β -Arrestin-Aktivierung	[181]
	Agonist (1 μ M)	Rezeptor-Internalisierung	[176]
	Agonist (3 μ M)	β -Arrestin-Aktivierung	[180]
Phytocannabinoide			
CBD	Antagonist (IC ₅₀ = 445 nM)	[35S]GTP γ S Assay	[151]
	kein Effekt	β -Arrestin-Aktivierung	[181]
	kein Effekt (3 μ M)	Ca ²⁺ -Freisetzung	[147]
	Antagonist (10 μ M)	RhoA Aktivierung (LPI-induziert)	[151]
	Antagonist (3 μ M)	ERK-Phosphorylierung (LPI-induziert)	[182]
THC	Agonist (EC ₅₀ = 8 nM)	[35S]GTP γ S Assay	[151]
	Agonist (5 μ M)	Ca ²⁺ -Freisetzung, Inhibierung von K-Kanäle	[147]
	kein Effekt (1 μ M)	ERK-Phosphorylierung	[144]
	kein Effekt (5 μ M)	ERK-Phosphorylierung	[147]
	kein Effekt (30 μ M)	Rezeptor-Internalisierung	[180]
synthetische Cannabinoide			
Abnormal-CBD	Agonist (EC ₅₀ = 2,5 nM)	[35S]GTP γ S Assay	[183]
	kein Effekt (3 μ M)	Ca ²⁺ -Freisetzung	[147]
	kein Effekt	β -Arrestin-Aktivierung	[181]
O-1602	Agonist (EC ₅₀ = 1,4 nM)	[35S]GTP γ S Assay	[183]
	Agonist (EC ₅₀ = 13 nM)	[35S]GTP γ S Assay	[151]

	Agonist (1 μ M)	RhoA-Aktivierung	[151]
	kein Effekt (10 μ M)	Ca ²⁺ -Freisetzung, ERK Phosphorylierung	[144]
	kein Effekt	β -Arrestin-Aktivierung	[181]
SR141716A	Antagonist (2 μ M)	Ca ²⁺ -Freisetzung	[147]
	kein Effekt (1 μ M)	ERK-Phosphorylierung	[144]
	Agonist (EC ₅₀ = 10,9 μ M)	β -Arrestin-Aktivierung	[181]
	Agonist (30 μ M)	Rezeptor-Internalisierung	[180]
AM251	Agonist (EC ₅₀ = 39 nM)	[35S]GTP γ S Assay	[151]
	Agonist (3 μ M)	Ca ²⁺ -Freisetzung	[176]
	Agonist (30 μ M)	Rezeptor-Internalisierung	[180]
	kein Effekt	β -Arrestin-Aktivierung	[181]
JWH015	Agonist (3 μ M)	Ca ²⁺ -Freisetzung, RhoA-Aktivierung	[147]
	kein Effekt (5 μ M)	ERK-Phosphorylierung	[147]

In Zellsystemen, die natürlicherweise GPR55 exprimierten, konnten GPR55-abhängige Mechanismen einiger Cannabinoide nachgewiesen werden. Eine Stimulation von Neuronen der Spinalganglien mit THC, JWH015 oder LPI führte zu einer GPR55-abhängigen Erhöhung der intrazellulären Ca²⁺ Menge, was in Anwesenheit von SR141716A antagonisiert wurde [147]. Abnormal-CBD und O-1602 zeigten in pankreatischen β -Zelllinien über GPR55 einerseits einen protektiven Effekt auf den Prozess der ER-Stress-induzierten Apoptose [162] und andererseits eine Erhöhung der Glukose-induzierten Insulinsekretion [163]. In Cholangiokarzinomzellen wurde durch AEA und O-1602 die Proliferation GPR55-abhängig reduziert [184]. Für die vermeintlichen GPR55-Antagonisten CBD und SR141716A konnten in PC3 Zellen antagonisierende Wirkungen auf die Freisetzung von Ca²⁺-Ionen nach LPI Applikation beobachtet werden [172].

Auch wenn die Einordnung von GPR55 als klassischer CB-Rezeptor noch diskutiert wird, zeigen die Vielzahl an Studien, dass Cannabinoid-Interaktionen mit GPR55 relevant sind und bei der Bewertung neuartiger Cannabinoid-Therapeutika berücksichtigt werden müssen.

1.5 Zielstellung

Das Glioblastom ist aufgrund seines infiltrativen und rapiden Wachstumsverhaltens und der Therapie-bedingten Resistenzentwicklung immer noch schwierig zu therapieren. Präklinische und erste klinische Studien belegen das therapeutische Potential von Cannabinoide vor allem für THC und CBD als ergänzende Pharmakotherapie für die Behandlung von Tumorerkrankungen eingesetzt zu werden [60,83,84]. Die Wirksamkeit von THC und CBD wird maßgeblich durch die Interaktion mit meist auf der Membran-lokalisierten Rezeptoren bestimmt [118]. Aufgrund ihrer komplexen Pharmakologie und der Vielzahl möglicher Target-Rezeptoren fällt eine Vorhersage und Interpretation THC- und CBD-vermittelter Effekte auf Tumorzellen auf Grundlage der Rezeptor-Expression schwer. Aus diesem Grund gilt es zu

verstehen, welche Rezeptoren notwendig sind und welche Rezeptor-assoziierten Signalwege aktiviert werden, um Tumor-individuelle Reaktionen auf Cannabinoide erklären und schließlich als Therapieoption nutzen zu können. Während THC meist über CB₁ und/ oder CB₂ agiert, bleibt der beteiligte Rezeptor für CBD-vermittelte Effekte häufig ungeklärt. Es ist bekannt, dass THC und CBD bei simultaner Applikation durch die Aktivierung verschiedener Rezeptoren synergistisch anti-tumorale Wirkungen entfalten [85,86]. Entgegen dieser These konnte in Vorversuchen dieser Arbeit eine inhibierende Wirkung von CBD auf THC-vermittelte Effekte festgestellt werden [185], wobei der Einfluss von THC und CBD auf die Anzahl Ki67⁺ Nuklei von Zellen primär gewonnener humaner Glioblastome bestimmt wurde (Abbildung 5). Es zeigte sich, dass THC den Anteil Ki67⁺ Nuklei Zelltyp-abhängig verringerte, CBD hingegen unwirksam blieb. In Kombination mit CBD wurden THC Effekte signifikant aufgehoben (Abbildung 5).

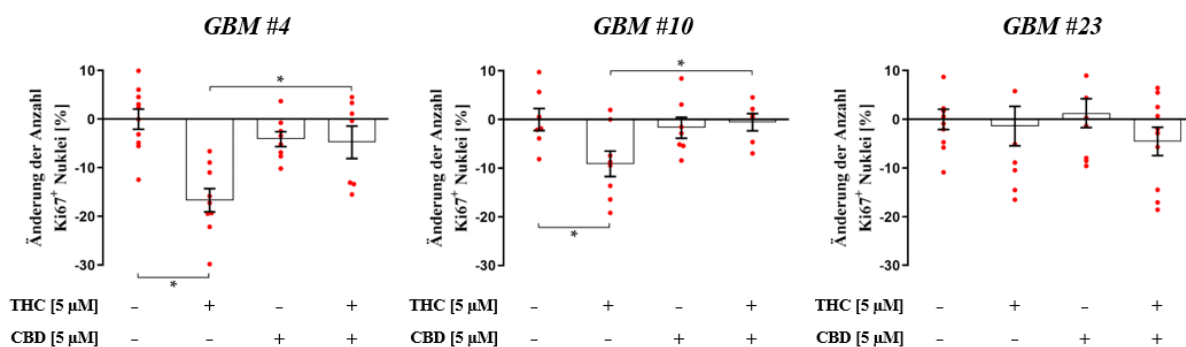


Abbildung 5: Einfluss der Phytocannabinoide THC und CBD auf die Anzahl Ki67⁺ Nuklei primärer humaner Glioblastomzellen. THC reduzierte signifikant nach 24 h die Anzahl Ki67⁺ Nuklei in *GBM #4* und *GBM #10*. Die Effekte von THC wurden in Anwesenheit von CBD signifikant aufgehoben. Effekte einer Einzelstimulation von CBD waren nach 24 h nicht nachweisbar. In *GBM #23* blieben THC und CBD unwirksam. Die Daten repräsentieren Mittelwerte ± SEM von N=3 unabhängigen Experimenten, die in Doppelbestimmung durchgeführt wurden. Signifikanz (*) wurde für p<0,05 gewählt. (modifiziert nach [185])

Ziel der vorliegenden Arbeit war es anknüpfend aufzuklären, welcher Rezeptor an der THC-vermittelten Abnahme der Anzahl Ki67⁺ Nuklei beteiligt ist. Hierfür sollte zunächst eine umfassende Charakterisierung der Zellen hinsichtlich der Expression von klassischen (CB₁ und CB₂) und nicht-klassischen CB-Rezeptoren (GPR18, GPR55 und ionotrope Rezeptoren) erfolgen. Anschließend sollte mit Hilfe Rezeptor-spezifischer Agonisten und Antagonisten der CB₁, CB₂, GPR18 und GPR55 Rezeptoren der Frage nachgegangen werden, welcher Rezeptor hauptsächlich für die Abnahme der Anzahl Ki67⁺ Nuklei verantwortlich ist. Des Weiteren sollten die beteiligten molekularen Mechanismen hinter den THC-medierten Effekte untersucht werden. Da in der vorliegenden Arbeit eine GPR55-Anhängigkeit postuliert wurde, wurden GPR55-assoziierte Signalkaskaden durch pharmakologische Hemmung

korrespondierender Effektoren analysiert. Abschließend sollte der Einfluss von THC auf die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFAT mittels Immunfluoreszenz-basierter Färbemethoden evaluiert werden.

Da Ki67 allgemein als Marker zur Bestimmung der Proliferationsfähigkeit gilt [186], sollte weiterhin die funktionelle Bedeutung eines reduzierten Anteils Ki67⁺ Nuklei auf die Proliferation ermittelt werden. Hierbei kamen verschiedene Methoden zum Einsatz, mit deren Hilfe das kollektive und das klonogene Wachstumsverhalten der Zellen nach Cannabinoid Gabe betrachtet werden sollte.

2 Materialien

2.1 Tumorzellen

Für die vorliegende Arbeit wurden primäre humane Zellen verwendet, die aus dem Operationsmaterial der Klinik und Poliklinik für Neurochirurgie des Universitätsklinikums der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg zur Verfügung gestellt wurden. Die Studie wurde in Übereinstimmung mit der Deklaration von Helsinki durchgeführt und von der lokalen Ethikkommission der Universität Halle-Wittenberg genehmigt (Projektnummer: 2015-144). Alle Patienten gaben eine schriftliche Einverständniserklärung ab. Die Etablierung der primären Glioblastomzellen *GBM #4*, *#10* und *#23* erfolgte am Institut für Anatomie und Zellbiologie durch Dr. Urszula Hohmann, Dr. Tim Hohmann und Chalid Ghadban. Die Zellen wachsen adhärent als *Monolayer* und wurden bereits in früheren Arbeiten der Arbeitsgruppe hinsichtlich der Expression der CB-Rezeptoren und des Einflusses einiger Cannabinoide charakterisiert [185,187,188]. Des Weiteren wurden für die Zellen ein IDH-Wildtyp und ein methylierter MGMT-Promotor festgestellt [185,188]. Sie wiesen außerdem eine positive Immunreaktivität gegen GFAP auf und waren Iba-1 negativ [187,188]. Der Nachweis von Transkripten von Stammzell-spezifischen Genen, wie *Nestin*, *Musashi-1*, *Sox2* und *CD44* erfolgte ebenfalls in früheren Arbeiten [185].

2.2 Humane Gewebeproben

Die verwendeten Extrakte humaner Gewebeproben (*Cerebellum*, *Ganglion trigeminale*, temporaler *Cortex* und *Hippocampus*) wurden *post mortem* von Körperspendern des Instituts für Anatomie und Zellbiologie gewonnen. Alle Körperspender gaben vor ihrem Tod eine schriftliche Einverständniserklärung ab.

2.3 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 3: Chemikalien und Reagenzien.

Chemikalie	Firma
2-Aminoethoxydiphenylboran (2-APB)	Tocris Cookson Ltd., Bristol
2-Propanol (Isopropanol)	Sigma-Aldrich, Steinheim
3,3 Diaminobenzidin (DAB)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Agarose	Peqlab, Erlangen
AM281	Tocris Cookson Ltd., Bristol
AM630	Tocris Cookson Ltd., Bristol
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Bromphenolblau	AppliChem GmbH, Darmstadt
BSA (Rinderserumalbumin)	Sigma-Aldrich, Steinheim

Cannabidiol (CBD)	Tocris Cookson Ltd., Bristol
Chloroform	Sigma-Aldrich, Steinheim
CID 16020046	Tocris Cookson Ltd., Bristol
Cyclosporin A (CsA)	Tocris Cookson Ltd., Bristol
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) 4.5 g/l Glukose	Gibco™, Lifetechnologies™, Carlsbad, Kalifornien
Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (DPBS)	Gibco™, Lifetechnologies™, Carlsbad, Kalifornien
Entellan®	Merck KGaA, Darmstadt
Ethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Merck KGaA, Darmstadt
EvaGreen™ DNA-binding Dye	Biotium, Hayward, Kalifornien
ExtrAvidin®-Peroxidase	Sigma-Aldrich, Steinheim
FK506 Monohydrat (Tacrolimus)	Sigma-Aldrich, Steinheim
FKS (fetales Kälberserum)	Gibco™, Lifetechnologies™, Carlsbad, Kalifornien
Forskolin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Gallein	Tocris Cookson Ltd., Bristol
GelRed™ DNA stain	Biotium, Hayward, Kalifornien
Glyzerol	AppliChem GmbH, Darmstadt
Glyzin	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
HCl (Salzsäure)	Merck KGaA, Darmstadt
Ionomycin	Merck KGaA, Darmstadt
KH ₂ PO ₄ (Kaliumdehydrogenphosphat)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Luminata™ Classico Western HRP Substrate	Merck KGaA, Darmstadt
Lysophosphatidylinositol (LPI)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Mayers Hämalaun	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Mercaptoethanol	AppliChem GmbH, Darmstadt
Methanol	Sigma-Aldrich, Steinheim
MTT ((3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromid)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Na ₂ HPO ₄ (Natriumhydrogenphosphat)	Merck KGaA, Darmstadt
NaCl (Natriumchlorid)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
NaOH (Natriumhydroxid)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Natriumacetat	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Natriumorthovanadat (SOV)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Normal Goat Serum (NGS, Ziegenserum)	Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, Pennsylvania, USA
Nuklease-freies Wasser	Promega, Madison, Wisconsin, USA
O-1918	Tocris Cookson Ltd., Bristol
Paraformaldehyd	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Penicillin/ Streptomycin	Gibco™, Lifetechnologies™, Carlsbad, Kalifornien
Pertussis Toxin (PTX)	Tocris Cookson Ltd., Bristol

Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Polyacrylamid	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Ponceau S	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Roti®-Block 10x Konzentrat	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Rotiphorese® Gel 30	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Saccharose	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Sulfosalicylsäure	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Tetrahydrocannabinol (THC)	THC pharm GmbH
Thapsigargin	Tocris Cookson Ltd., Bristol
Trichloressigsäure	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Tris	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Triton X100	AppliChem GmbH, Darmstadt
Trizol-Reagenz (peqGOLD TriFast™)	Peqlab, Erlangen
Trypsin/EDTA	Merck KGaA, Darmstadt
Tween 20	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
U73122	Cayman Chemical, Ann Arbor
U73343	Tocris Cookson Ltd., Bristol
Wasserstoffperoxid 30	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Y-27632 dihydrochlorid	Tocris Cookson Ltd., Bristol

2.4 Medium, Puffer und Lösungen

Tabelle 4: Medium, Puffer und Lösungen.

Method	Medium/Puffer/Lösungen	Zusammensetzung
Zellkultur	DMEM-Kulturmedium	89 ml DMEM 4,5 g/l Glukose, 10 ml fetales Kälberseum (FKS), 1 ml Penicillin/Streptomycin, pH = 7,4
DNA-Gelelektrophorese	10x MOPS-Puffer (1 l)	800 ml DEPC-Wasser, 41,8 g MOPS, pH = 7,0 16,6 ml 3 M Natriumacetat, 20 ml 0,5 M EDTA, pH = 8,0
	Blue Juice	87 % (v/v) Glycerin, 0,05 % (w/v) Bromphenolblau, 0,25 M EDTA
Western Blot	Trenngelpuffer	45,43 g Tris, 1 g SDS, 250 ml Aqua dest., pH = 8,8
	Sammelgelpuffer	15,13 g Tris, 250 ml Aqua dest., pH = 6,8
	4x Laemmlipuffer	3,2 ml Sammelgelpuffer, 1,5 ml Aqua dest., 4 ml Glycerol, 1 ml 10 % (w/v) SDS, 280 µl Mercaptoethanol
	10x Elektrophoresepuffer	30 g Tris, 144 g Gylzin, 100 ml 10 % (w/v) SDS, 1000 ml Aqua dst.
	Transferpuffer	2,9 g Glyzin, 5,8 g Tris, 0,37 g SDS, 200 ml Methanol, 800 ml Aqua dest.
	10x TBS (<i>Tris-buffered saline</i>)	60,5 g Tris, 87,6 g NaCl, 1000 ml Aqua dest., pH = 8,0
	1x TBST	100 ml 10x TBS, 900 ml Aqua dest., 3 ml Tween 2
	Pocau S (1 l)	15 g Ponceau S, 30 g Trichloressigsäure, 30 g Sulfosalicylsäure

Immunzytochemie	1x Blockpuffer	100 ml Roti-Block 10x Konzentrat, 900 ml 1x TBST
	0,2 M Phosphatpuffer (1 l)	22,72 g Na ₂ HPO ₄ , 5,44 g K ₂ PO ₄ , 1000 ml Aqua dest., pH = 7,4
	0,02 M PBS (1 l)	9 g NaCl, 0,54 g KH ₂ PO ₄ , 2,27 g Na ₂ HPO ₄ , 1000 ml Aqua dest., pH = 7,4
	0,05 M Tris-Puffer (1 l)	6,06 g Tris, 1000 ml Aqua dest., pH = 7,4
	3 % (w/v) PFA-Lösung (1 l)	40 g PFA, 500 ml Aqua dest. 500 ml 0,2 M Phosphatpuffer, pH = 7,4
	0,03 % (v/v) Triton/PBS-Puffer	1000 ml 0,02 M PBS, 3 ml Triton X100

2.5 Antikörper

Tabelle 5: Primäre Antikörper.

Antikörper	Spezies	Verdünnung		Firma
		WB	IF/IHC	
Anti-Aktin	Maus	1:5.000	-	Cell Signaling, Danvers, MA
Anti-CB ₁	Kaninchen	1:200	1:200	Cayman Chemical, Ann Arbor
Anti-CB ₂	Kaninchen	1:200	1:200	Alomone Labs, Jerusalem
Anti-DAGL α	Kaninchen	1:2.000	-	Thermo Scientific, Dreieich
Anti-DAGL β	Kaninchen	1:1.000	-	Frontier Institute Co.Ltd., Hokkaido, Japan
Anti-FAAH	Kaninchen	1:1.000	-	Cell Signaling, Danvers, MA
Anti-GPR18	Kaninchen	-	1:300	Ken Mackie
Anti-GPR55	Kaninchen	1:1.000	1:200	Cayman Chemical, Ann Arbor
Anti-Ki67	Kaninchen	-	1:200	DCS-Innovative Diagnostik Systeme
Anti-MAGL	Kaninchen	1:1.000	-	Cell Signaling, Danvers, MA
Anti-NAPE-PLD	Kaninchen	1:1.000	-	Cell Signaling, Danvers, MA
Anti-NFAT1	Kaninchen	-	1:200	Cell Signaling, Danvers, MA
Anti-NFAT2	Kaninchen	-	1:200	Thermo Scientific, Dreieich
Anti-NFAT3	Kaninchen	-	1:200	Thermo Scientific, Dreieich
Anti-NFAT4	Kaninchen	-	1:200	Thermo Scientific, Dreieich

Tabelle 6: Sekundäre Antikörper.

Antikörper	Spezies	Verdünnung		Firma
		WB	IF/IHC	
Anti-Kaninchen Alexa 488	Ziege	-	1:200	Thermo Scientific, Dreieich
Anti-Kaninchen, Biotin konjugiert	Ziege	-	1:100	Sigma-Aldrich, Steinheim
Anti-Kaninchen, HRP konjugiert	Ziege	1:20.000	-	Vector Laboratories, Burlingame, Kalifornien,
Anti-Maus HRP konjugiert	Pferd	1:10.000	-	Vector Laboratories, Burlingame, Kalifornien,

2.6 Größenstandards

Tabelle 7: Größenstandards.

Methode	Bezeichnung	Firma	Verdünnung
Western Blot			
Primärmarker	Precision Plus Protein™ WesternC™ Standards	Bio-Rad	-
Sekundärmarker	Precision Protein TM StrepTactin-HRP Conjugate	Bio-Rad	1:10.000
DNA-Gelelektrophorese	BenchTop 100bp DNA Ladder	Promega	-

2.7 Kits

Tabelle 8: Kits.

Kit	Firma
DNA-free™-Kit	Thermo Fisher Scientific Waltham, Massachusetts
Pierce® BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific Waltham, Massachusetts
RevertAid RT Reverse Transcription Kit	Thermo Fisher Scientific Waltham, Massachusetts

2.8 Oligonukleotide

Tabelle 9: Oligonukleotide.

Gen	Primersequenz (5'→3')	Orientierung	Genbank-Nummer	T _a °C	Größe
<i>ACTB</i>	ACTCCTACGTGGGCGACGAGG	sense	NM_001101	60	389 bp
	CAGGTCCAGACGCAGGATGGC	antisense			
<i>CNR1</i>	GCATCCAAGGAAGGGATGTA	sense	NM_033181	60	250 bp
	CCGTTGTGTGTCTCATCCAC	antisense			
<i>CNR2</i>	GCTCCTCATCTGTTGGTTCC	sense	NM_001841	60	208 bp
	TGACCATGGAGTTGATGAGGC	antisense			
<i>DAGLα</i>	AGAATGTCACCCTCGGAATG	sense	NM_006133	60	158 bp
	GGTTGTAGGTCCGCAGGTTA	antisense			
<i>FAAH</i>	TCAAGGAGTGCTTCACCTACAAG	sense	NM_001441	60	164 bp
	GTCATAGCTGAACATGGACTGTG	antisense			
<i>GNAI2</i>	GAGCTCTGCAGGTGTGGATT	sense	NM_007353	60	226 bp
	GAAGATGGGAGAGCCGTCTG	antisense			
<i>GNAI3</i>	CGTCGAGAATTTCAACTGGGTG	sense	NM_006572	60	121 bp
	CTTTGGTGGGTCTTCTGGCA	antisense			
<i>GNAI1</i>	GCTGAAGATGAAGAAATGAACCGAA	sense	NM_002069	60	481 bp
	GTCCCAGATGCATTTGCCTT	antisense			
<i>GNAI2</i>	CAGGCAGCTATTTGCACTGTC	sense	NM_002070	60	168 bp
	AGGTCGTTCAAGGTAGTAGGC	antisense			
<i>GNAI3</i>	AGTTTCCGTGGTGTGAGTGA	sense	NM_006496	60	184 bp
	GATTCTCCAGCACCGAGTAGC	antisense			

<i>GNAO1</i>	TGGTGATAAGGAGAGAAAGGCTG	sense	NM_020988	60	168 bp
	TCGTTGAGCTGATACTCCCCG	antisense			
<i>GNAQ</i>	TGAGACAATAAGGCTCATGC	sense	NM_002072	60	226 bp
	TCTTGTGCGTAGGCAGGT	antisense			
<i>GNASL</i>	GAGCAACAGCGATGGTGAGA	sense	NM_000516	60	342 bp
	TGATCGCTCGGCACATAGTC	antisense			
<i>GNASS</i>	GCAGAAGGACAAGCAGGTCTA	sense	NM_080426	60	141 bp
	TTGGTTGCCTTCTCACTGTCTC	antisense			
<i>GPR119</i>	AATCCCCATGTTCCAGCAGA	sense	NM_178471	60	172 bp
	GAGAGCTTTGAAGTCGCTGG	antisense			
<i>GPR18</i>	CCACCAAGAAGAGAACCAC	sense	NM_005292	60	596 bp
	GAAGGGCATAAAGCAGACG	antisense			
<i>GPR55</i>	GGTGCTCTCCCTCCCATT	sense	NM_005683	60	172 bp
	GCTCACCAGTAGCGGGTAAC	antisense			
<i>MAGL</i>	ATCACCATTCCCCAAATTGA	sense	NM_007283	60	204 bp
	GATGTACCAGCCCTTCTGGA	antisense			
<i>NAPE-PLD</i>	TCACGGATCCCATCTTTAGC	sense	NM_198990	60	243 bp
	TCTCACAGCCACATTTTTGC	antisense			
<i>POLR2A</i>	CTTGCCCCGTGCCATGCAGA	sense	NM_000937	60	83 bp
	TCGCACCCGGCCTTCCTTG	antisense			
<i>TRPA1</i>	ATGAATAATGGGAAAGCCAC	sense	NM_007332	58	107 bp
	TTCTCCACTGGGTCTATTTG	antisense			
<i>TRPM8</i>	TGAGGAACAGAAGGAATGAC	sense	NM_024080	58	90 bp
	CGCTTTCACTGTAAGACAAG	antisense			
<i>TRPV1</i>	CGAGAGACGCAACATGGCCC	sense	NM_080704	60	131 bp
	ACAGGGCAGTTCACCGAAG	antisense			
<i>TRPV2</i>	ACAGATGACTATTACCGAGG	sense	NM_016113	58	167 bp
	GGTAGCTCACCGAAATAAAAAG	antisense			
<i>TRPV3</i>	GAGATCCTGAAGTACATCCTC	sense	NM_145068	58	168 bp
	GTTGTAGACAGTGATTTCCAG	antisense			
<i>TRPV4</i>	ACTTCATCTACTCTGTCCTG	sense	NM_021625	58	119 bp
	GAAGTAAAGGGCATTTCATCC	antisense			

2.9 Geräte

Tabelle 10: Geräte

Gerät	Firma
Brutschrank Binder	Binder GmbH, Tuttlingen
Countess™ 3	Thermo Scientific, Dreieich
Detektionsgerät (Western Blot) Fusion FX7	Peqlab, Erlangen
Gel-Dokumentationsgerät (PCR)	LTF Labortechnik, Wasserburg (Bodensee)
Gelelektrophoresekammer (PCR)	Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf

Gelkammer (SDS-PAGE) Tetra Cell	Mini-PROTEAN®	Bio-Rad Laboratories, Hercules, Kalifornien
iCELLigence™-System		ACEA Biosciences, Inc., San Diego, Kalifornien
Konfokales Laserscanning Mikroskop TCS SPE		Leica Microsystem, Mannheim
MACSQuant® Analyzer10		Miltenyi Biotec, Göttingen
Mikroskop Leica DMI8		Leica Microsystem, Mannheim
Precellys® 24 Homogenisator		Peqlab, Erlangen
Sicherheitswerkbank HERAsafe™		Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts
Synergy™ Mx Microplate Reader		BioTek Instruments, Winooski, Vermont
Thermocycler Rotor-Gene™ 6000		Corbett Research, Sydney
ThermoShaker TSC		Biometra, Göttingen
Trans-Blot® Turbo™ Blotting System		Bio-Rad Laboratories, Hercules, Kalifornien
Zentrifuge Biofuge™ Primo		Heraeus, Hanau
Zentrifuge Fresco™ 21		Heraeus, Hanau
7900HT Fast Real-Time PCR System		Applied Biosystems™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts

2.10 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 11: Verbrauchsmaterialien.

Verbrauchsmaterialien	Firma
Amersham™ Protran™ 0,45 µm NC	GE Healthcare, Little Chalfont, Großbritannien
Cellstar®96 Well Zellkultur Mikroplatten	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster
Cellstar®24 Well Zellkultur Mikroplatten	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster
Cellstar® 6 Well Zellkultur Mikroplatten	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster
Cellstar® Zellkulturflasche	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster
Deckgläser	Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH, Sandheim
Filterpapier	Carl Roth GmbH+ Co. KG, Karlsruhe
Objektträger	StarFrost®, Deutschland
Parafilm M®	Bemis Company, Inc., Neenah
PCR-Reaktionsgefäße	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
Rotilabo®-Blottingpapier 0,35 mm	Carl Roth GmbH+ Co. KG, Karlsruhe
Vakuumfilter	Sarstedt, Newton, USA

2.11 Software

FlowJo Version 10
 FusionCapt Advance Solo 4 16.12
 GraphPad Prism® 9
 ImageJ
 Leica Application Suite X
 Microsoft Office Paket
 NDP.view 2
 Rotor-Gene 6000 Series Software 1.7
 RTCA Data Analysis Software 1.0
 Zotero

3 Methoden

3.1 Kultivierung primärer Glioblastomzellen

Alle verwendeten primären Glioblastomzellen wurden als subkonfluente adhärenente *Monolayer*-Kultur in *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM)-Kulturmedium (4,5 g/l Glukose), welches mit 10 % (v/v) hitzeinaktiviertem fetalem Kälberserum (FKS) und 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin-Lösung supplementiert wurde, kultiviert. Die Kultivierung erfolgte in Zellkulturflaschen mit einer Wachstumsfläche von 75 cm² bei 37 °C in einer Atmosphäre mit 5 % (v/v) CO₂. Das Medium wurde alle zwei bis drei Tage erneuert. Die Zellen wurden alternierend bei einer Konfluenz von ca. 90 % passagiert.

3.1.1 Subkultivierung

Für die Subkultivierung wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit 5 ml steriler Phosphat-gepufferter Salzlösung (DPBS, *Dulbecco's Balanced Salt Solution*) gewaschen, um Mediumrückstände vollständig zu entfernen. Zur enzymatischen Ablösung der Zellen von der Plastikoberfläche wurden 2 ml Trypsin/EDTA Lösung gleichmäßig auf den Zellen verteilt und bei 37 °C für 5 min inkubiert. Nachfolgend wurde die Reaktion durch Zugabe des serumhaltigen Kulturmediums gestoppt. Verbliebende Zellen wurden durch mehrmaliges Pipettieren vom Boden der Kulturflasche gelöst. Die Zellsuspension wurde bei 800 g für 5 min zentrifugiert. In der Zwischenzeit wurden 9-10 ml Kulturmedium in neue 75 cm² Zellkulturflaschen vorgelegt. Das Zellpellet wurde in 1 ml Kulturmedium resuspendiert und auf die vorbereiteten Zellkulturflaschen in der gewünschten Dichte verteilt oder für nachfolgende Experimente verwendet.

3.1.2 Zellzahlbestimmung

Die Zellzahl für nachfolgende Experimente wurde entweder klassisch mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer oder automatisch am Countess™ 3 bestimmt. Für die verschiedenen Experimente wurden die Zellen in 6-, 24- und 96-Lochplatten ausplattiert. In Vorbereitung der Färbungen wurde in die Vertiefungen der 24-Lochplatten je ein Deckgläschen gelegt. Das berechnete Volumen für die gewünschte Zellzahl wurde schließlich in die Vertiefungen der ausgewählten Lochplatten pipettiert. Die Kavitäten wurden mit 200 µl (96-Lochplatten), 1 ml (24-Lochplatten) oder 2 ml (6-Lochplatten) Kulturmedium entsprechend des durchgeführten Experiments aufgefüllt.

3.2 Stimulationsexperimente

Die Stimulationen der Zellen mit 5 μM THC, 5 μM CBD und 1 μM LPI (Abbildung 6), sowie mit Forskolin erfolgte im Allgemeinen etwa 24 h, nachdem die Zellen (10.000 Zellen/Loch in 24-Lochplatten) ausplattiert wurden. Des Weiteren wurden Kombinationsbehandlungen mit THC, CBD und LPI durchgeführt (Abbildung 6). Es erfolgte eine 15-minütige Präinkubation von CBD vor Zugabe von LPI, sowie eine 15-minütige Präinkubation von THC vor Zugabe von LPI und *vice versa* (Abbildung 6). Die Substanzen wurden mit frischem serumhaltigen Medium auf die Zellen gegeben. Parallel wurden unbehandelte Zellen als Kontrollgruppe mitgeführt. Wenn nicht anders angegeben betrug die Inkubationsdauer bis zur Fixierung 24 h. Um eine vollständige Blockierung der untersuchten Rezeptoren zu gewährleisten, wurden die Zellen vor Zugabe von THC oder LPI für 15 min mit Rezeptor-spezifischen Antagonisten präinkubiert (Abbildung 6, Tabelle 12). Für die Analyse der Rezeptor-assoziierten Signalkaskaden wurden verschiedene Inhibitoren verwendet. Die Dauer der Präinkubation vor Zugabe von THC oder LPI wurde in Abhängigkeit des verwendeten Inhibitors gewählt (Abbildung 6, Tabelle 12).

Tabelle 12: Rezeptor-spezifische Antagonisten und Inhibitoren von Effektoren Rezeptor-assoziiierter Signalkaskaden.

Substanz	Targets	Verhalten	Lösungsmittel	Konzentrationen	Präinkubationszeit
AM281	CB ₁	Antagonist	DMSO	1 μM	15 min
AM630	CB ₂	Antagonist	DMSO	1 μM	15 min
CID16020046	GPR55	Antagonist	DMSO	1 μM ; 5 μM ; 10 μM	15 min
O-1918	GPR18	Antagonist	DMSO	30 μM	15 min
Pertussis Toxin (PTX)	G _{o/i} -Protein	Inhibitor	H ₂ O	100 ng/ml	18 h
Gallein	G $\beta\gamma$ -UE	Inhibitor	DMSO	1 μM ; 10 μM	15 min
Y-27632	ROCK	Inhibitor	H ₂ O	10 μM ; 30 μM ; 50 μM	1 h
U73122	PLC	Inhibitor	DMSO	0,1 μM ; 1 μM	15 min
U73343	-	Analogon von U73122	DMSO	0,1 μM	15 min
2-APB	IP3-Rezeptor	Antagonist	DMSO	10 μM ; 50 μM ; 100 μM	30 min
Cyclosporin A (CsA)	Calcineurin	Inhibitor	DMSO	0,1 μM ; 0,5 μM ; 1 μM ; 5 μM ; 10 μM	1 h
FK506	Calcineurin	Inhibitor	DMSO	0,5 μM ; 1 μM ; 5 μM ; 10 μM	1,5 h

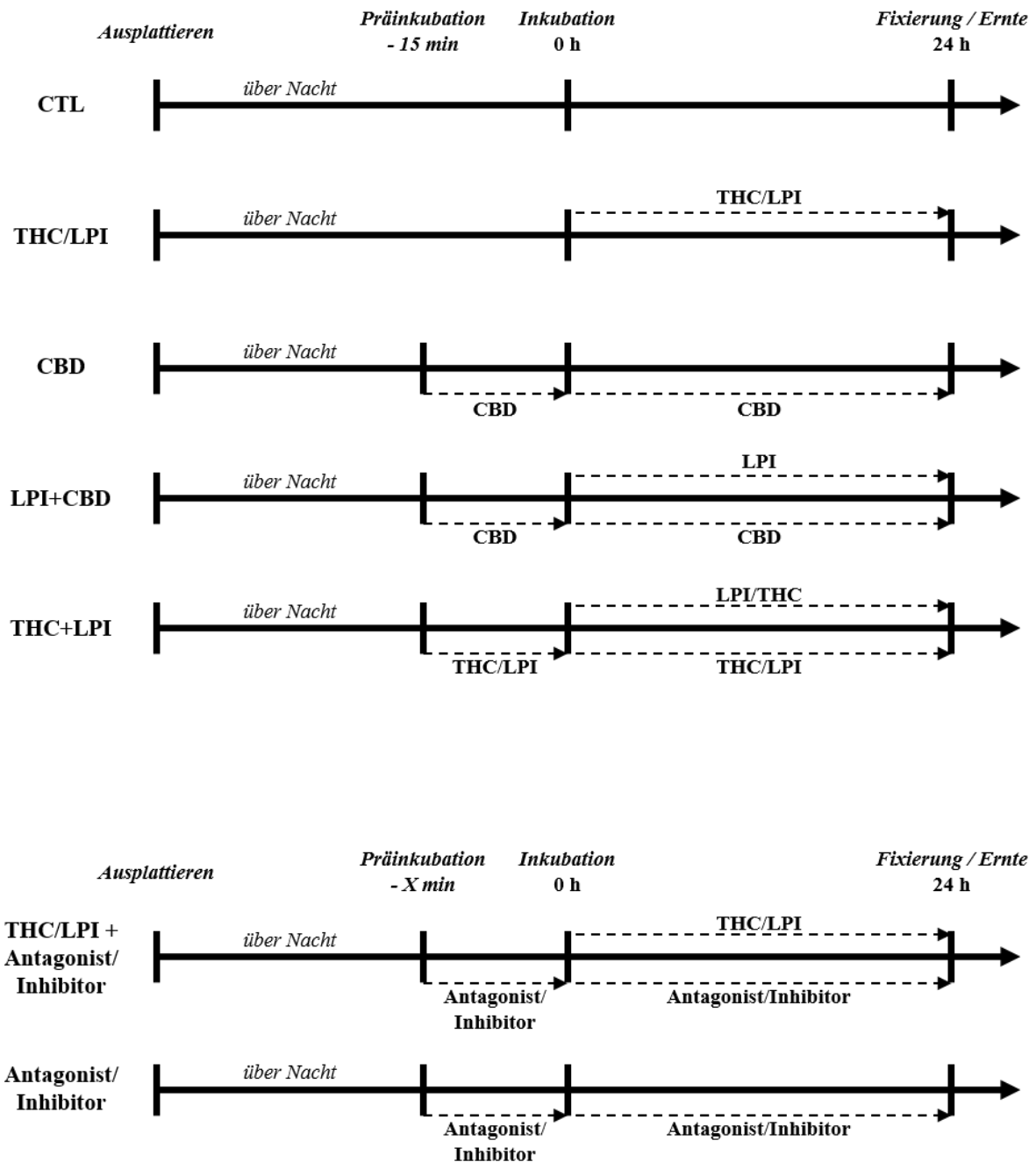


Abbildung 6: Behandlungsschema zur Bestimmung der Anzahl Ki67⁺ Nuklei nach THC und LPI Stimulation in Anwesenheit verschiedener Antagonisten und Inhibitoren zur Aufklärung der Rezeptorabhängigkeit und Rezeptor-assoziiierter Signalkaskaden.

Für die Analyse der Wirkung von THC und LPI auf die G₀-Proliferation-Transition wurde ein G₀-Arrest erzeugt, indem die Zellen für 24 h serumfrei gesetzt wurden (Abbildung 7). Danach erfolgte die Zugabe von 5 µM THC oder 1 µM LPI mit frischem serumhaltigen Kulturmedium für weitere 24 h. Die erneute Zugabe von Serum diente zur reversiblen Aktivierung der

Proliferation. Der Anteil Ki67⁺ Nuklei wurde sowohl zum Zeitpunkt der Behandlung mit THC oder LPI als auch nach 24 h bestimmt (Abbildung 7).

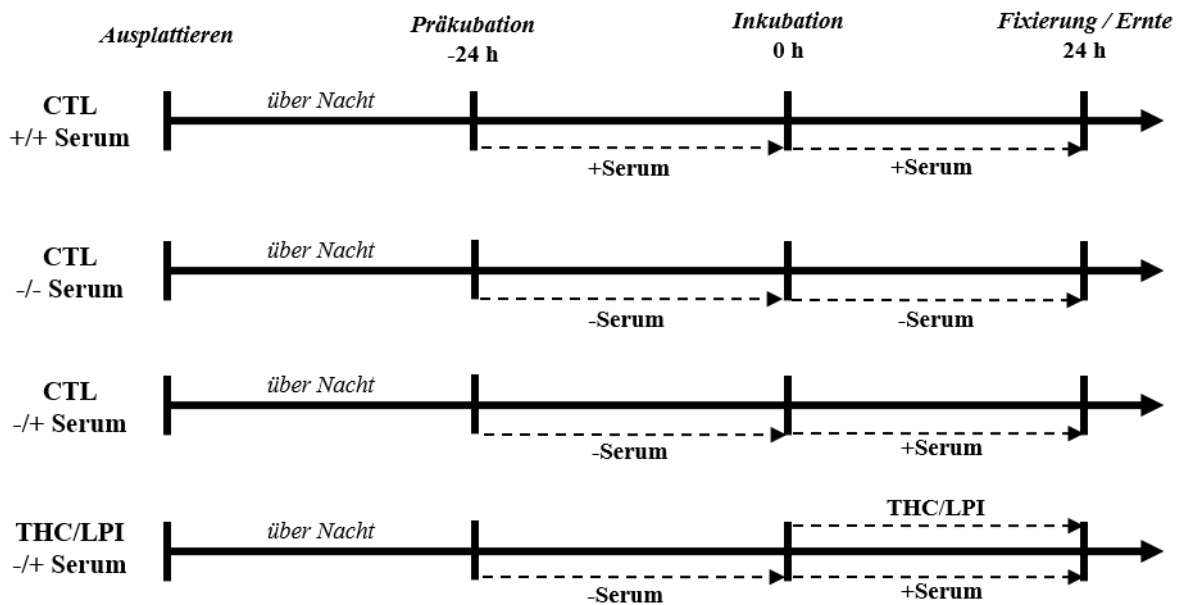


Abbildung 7: Behandlungsschema zur Bestimmung der Anzahl Ki67⁺ Nuklei nach Serum-induzierter Transition G₀-arretierter Zellen in die Proliferation in Anwesenheit von THC und LPI.

3.2.1 Fixierung

Für die Fixierung wurde das Medium durch ca. 0,5 ml 4 %ige (w/v) Paraformaldehyd-Lösung (PFA) ersetzt. Nach einer 10-minütigen Inkubation wurde die PFA-Lösung entfernt und durch 1 ml 0,02 M PBS ausgetauscht. Zur weiteren Lagerung der fixierten Zellen wurden die Platten mit Parafilm M® abgedichtet und bis zur Färbung bei 4 °C gelagert.

3.3 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium Bromid (MTT)-Viabilitäts-Assay

Zur Bestimmung der Zytotoxizität verwendeter Inhibitoren zur Analyse beteiligter Signalkaskaden wurde ein MTT-Viabilitäts-Assay durchgeführt. Dieser ist ein quantitativ kolorimetrischer Test, der die Proliferation lebender Zellen durch ihre mitochondriale Stoffwechselaktivität nachweist. Der gelbe Farbstoff MTT wird dabei durch intrazelluläre Succinat-Dehydrogenasen lebender Zellen zu violetterem, wasserunlöslichen Formazan NADH-abhängig reduziert. Die Menge der entstandenen violetten Formazan-Kristalle kann durch Lyse der Zellen mittels DMSO semiquantitativ über photometrische Messmethoden ermittelt werden. Der MTT-Test wurde in 96-Lochplatten durchgeführt. Die Viabilitätsänderung wurde nach 24 h untersucht. Für die Versuche wurden 3.000 Zellen ausplattiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit den jeweiligen Inhibitor-Medium-Lösungen behandelt. Zur

Vorbereitung der eigentlichen Messung wurden 5 mg MTT in 1 ml DPBS gelöst und steril filtriert. 4 h vor Behandlungsende wurden 10 µl der vorbereiteten MTT-Lösung zu den Zellen pipettiert. Für die Zellyse wurde das alte Medium durch 100 µl DMSO ersetzt und für 20 min bei 37 °C inkubiert. Zusätzlich wurden Lösungsmittelkontrollen mitgeführt. Die Extinktion wurde mit Hilfe des Synergy MX-Spektrophotometers bei einer Wellenlänge von 540 nm und 720 nm (Hintergrundabsorption) gemessen.

Der MTT-Assay wurde pro Gruppe in Sechsfachbestimmung mit drei unabhängigen Versuchsreihen durchgeführt. Die Viabilität der Zellen wurde mit Hilfe der gemessenen Absorptionswerte (AW) nach der folgenden Formel bestimmt und auf die unbehandelte Kontrollgruppe normiert:

$$\text{Viabilität [\%]} = \frac{(AW_{\text{behandelt}}^{520 \text{ nm}} - AW_{\text{behandelt}}^{720 \text{ nm}}) - (AW_{\text{blank}}^{520 \text{ nm}} - AW_{\text{blank}}^{720 \text{ nm}})}{(AW_{\text{unbehandelt}}^{520 \text{ nm}} - AW_{\text{unbehandelt}}^{720 \text{ nm}}) - (AW_{\text{blank}}^{520 \text{ nm}} - AW_{\text{blank}}^{720 \text{ nm}})} * 100$$

3.4 Impedanz-basierte Messung der Proliferation mittels iCELLigence™-Systems

Das kollektive und adhäsionsabhängige Proliferationsverhalten der Glioblastomzellen nach Stimulation mit THC, CBD und LPI wurde mit Hilfe des iCELLigence™ *Real Time Cell Analyzer* System in Echtzeit determiniert. Im Vergleich zu den häufig verwendeten Standardendpunktmessungen, wie dem MTT-Assay, ermöglicht dieses System eine kontinuierliche Echtzeitüberwachung der Zellproliferation. Das Prinzip beruht dabei auf einer nicht-invasiven, markierungsfreien und automatischen Messung eines elektrischen Widerstandes, der bioelektrischen Impedanz. Zur Messung wird ein sehr geringer elektrischer Strom (10⁴ Hz) an einer vom Hersteller sogenannten *E-Plate* gelegt, der über das Zellkulturmedium von einer am Boden befindlichen Goldmikroelektrode zur anderen fließt (Abbildung 8). Sobald adhärente Zellen auf den Elektroden, die 70 – 80 % des *well* Bodens bedecken, wachsen, wirken sie als elektrische Isolatoren und beeinflussen so den Fluss des elektrischen Wechselstroms zwischen den Elektroden, sodass eine messbare Impedanzänderung entsteht (Abbildung 8).

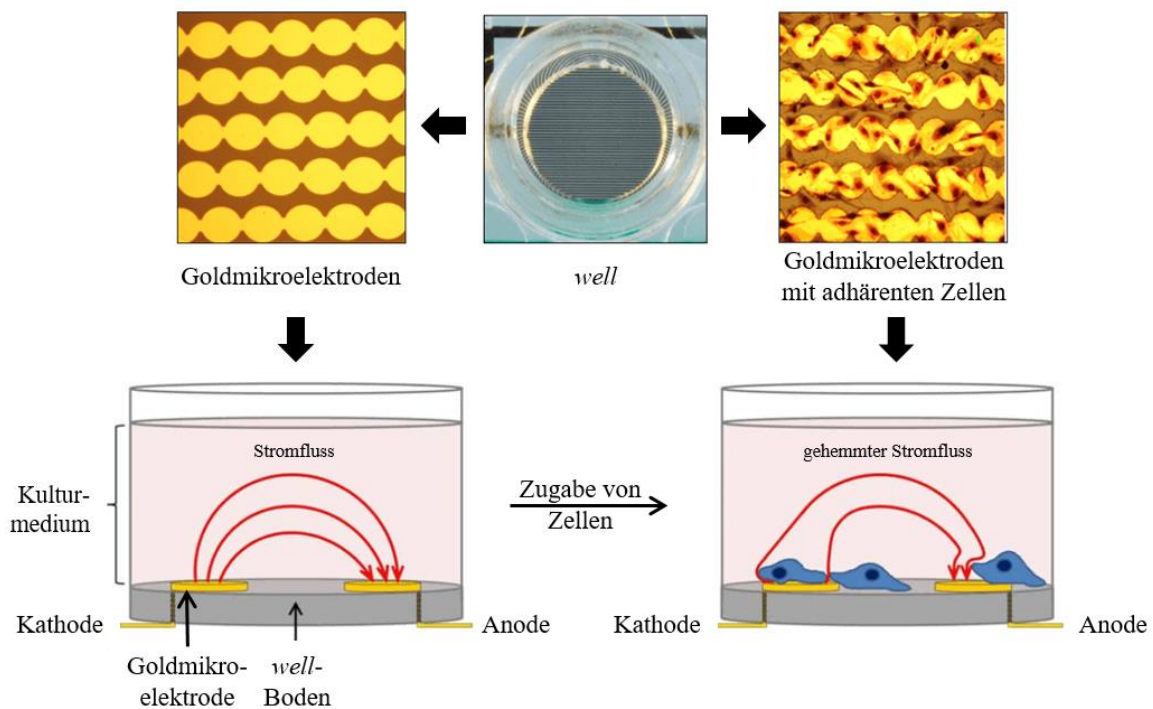


Abbildung 8: Zusammensetzung und schematische Darstellung des Impedanz-basierten iCELLigence™-Systems zur Analyse der Proliferation. Eine Draufsicht einer einzelnen Vertiefung (*well*) einer vom Hersteller sogenannten *E-Plate* wird mit sichtbaren Goldmikroelektroden, die 70-80 % den Boden der Vertiefung bedecken, ohne und mit adhärenen Zellen gezeigt. Die schematische Seitenansicht eines einzelnen *Wells* vor und nach der Zugabe von adhären wachsenden Zellen ist unten abgebildet. In Abwesenheit von Zellen fließt der elektrische Strom ungehindert über das Kulturmedium zwischen den Elektroden. In Anwesenheit von Zellen, die auf den Goldmikroelektroden adhären und wachsen, wird der Elektronenfluss behindert, was zu einer messbaren Veränderung der Impedanz beiträgt. Modifiziert nach <https://www.ols-bio.de/products/live-cell-analysis-system-xcelligence> (26.06.23)

Das Verhalten und die Viabilität der Zellen werden weder durch die Goldmikroelektroden noch durch den angelegten elektrischen Strom beeinträchtigt. Das sich ändernde Impedanzsignal wird als Funktion über die Zeit gemessen und als einheitsloser Zellindex (CI) über

$$CI = \frac{Z_i - Z_0}{15}$$

dargestellt. Wobei Z_i als die gemessene Impedanz zu einem bestimmten Zeitpunkt und Z_0 als die Impedanz der Leerwertmessung zu Beginn des Experiments definiert ist. Neben der angelegten Wechselspannung ist der CI Wert von der Zellgröße, -zahl und -morphologie, sowie von der Adhäsionsstärke der Zellen und der Ionenkonzentration im Kulturmedium abhängig.

Um die Grundimpedanz zu messen und mögliche Verunreinigungen und/oder Beschädigungen der Elektroden auf der *E-Plate* auszuschließen, wurden zu Versuchsbeginn in jeder Vertiefung

eine Leerwertmessung mit 200 µl vorgewärmtem Kulturmedium durchgeführt. Anschließend wurden aufgrund unterschiedlicher Proliferationsraten 25.000 / 18.000 (*GBM #4*), 20.000 (*GBM #10*) oder 5.000 (*GBM #23*) Zellen pro Vertiefung in 400 µl Medium eingesät. Nach 30 min bei Raumtemperatur wurde die Aufzeichnung unter Standard-Kulturbedingungen (37 °C, 5 % (v/v) CO₂) gestartet. Nach 24 h wurde das Medium vorsichtig entnommen und je nach Behandlungsgruppe gegen frisches Kulturmedium bzw. Medium mit den entsprechenden Komponenten getauscht und für weitere 96 h untersucht. Bei der Versuchsreihe der erneuten Zugabe von CBD, wurde nach 24 h erneut ein Mediumwechsel ohne und mit CBD durchgeführt und die Messung für weitere 48 h fortgesetzt. Die Messungen waren in verschiedenen Schritte (fünf bis sieben) unterteilt, die sich durch unterschiedliche Dauern und Messintervalle auszeichneten. Die Schritte des experimentellen Verfahrens wurden vor Beginn jedes Versuchs manuell festgelegt (Tabelle 13).

Tabelle 13: Ablauf der Messung mittels iCELLigence™-Systems.

	Dauer	Anzahl der Messungen (Intervalle)	Messparameter	Besonderheit
Stufe 1	1 min	1 (1 / min)	Leerwert	
Stufe 2	2 h	120 (1 / min)	Zelladhäsion	
Stufe 3	22 h	22 (1 / h)	Proliferation ohne Zusatz	Vollständige Zelladhäsion, erkennbare Fehler der Zellzahl/ <i>well</i>
Stufe 4	2 h	120 (1 / min)	Reaktion auf Stimulus	Abfall des Kurvenverlaufs aufgrund des Mediumwechsels
Stufe 5	94 h	376 (1 / 15 min)	Proliferation und Zellüberleben	
Stufe 5	22 h	22 (1 / h)	Proliferation und Zellüberleben	
Stufe 6	2 h	120 (1 / min)	Reaktion auf Stimulus	Abfall des Kurvenverlaufs aufgrund des Mediumwechsels
Stufe 7	46 h	184 (1 / 15 min)	Proliferation und Zellüberleben	

Um das Wachstum der Glioblastomzellen unter den verschiedenen Bedingungen vergleichen zu können, wurden alle *wells* auf den letzten Messpunkt vor dem Behandlungsbeginn auf 1 normiert. Die Messung der Proliferation mittels des iCELLigence™-Systems wurde pro Gruppe in Doppelbestimmung mit drei unabhängigen Versuchsreihen durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte zu den Zeitpunkten 6 h, 12 h, 24 h und 48 h bzw. 12 h, 24 h, 36 h und 48 h bei erneuter CBD-Zugabe.

3.5 Klonogener Wachstumsassay

Der Einfluss von Cannabinoiden auf das klonogene Wachstum der Zellen wurde mit Hilfe des Koloniebildungstests untersucht. Es wurden 250 (*GBM #4*) oder 500 (*GBM #10*) Zellen pro Vertiefung einer 6-Lochplatte ausplattiert. Am nächsten Tag erfolgte die Behandlung mit 5 μM THC, 5 μM CBD oder 1 μM LPI. Das Medium wurde mit oder ohne Cannabinoide alle 2 Tage erneuert. Nach 8 (*GBM #4*) bzw. 10 (*GBM #10*) Tagen wurden die Zellen fixiert. Die Koloniebildung wurde durch die Färbung mit 0,5 % (w/v) Crystal violett für 30 min bei RT und anschließendem dreimaligem Waschen mit PBS visualisiert.

Die Auswertung erfolgte mittels manueller Auszählung der gebildeten Kolonien. Der Koloniebildungstest wurde pro Gruppe in Doppelbestimmung mit drei unabhängigen Versuchsreihen durchgeführt. Aufgrund der hohen Abweichungen der Ausplattierungseffizienz zwischen den einzelnen Versuchen, wurde die relative Änderung der Anzahl gebildeter Kolonien zur unbehandelten Kontrollgruppe pro Versuch bestimmt und statistisch ausgewertet.

3.6 Durchflusszytometrie

Um eine vergleichbare Zelldichte wie in 3.2 zu erreichen, wurden für die Messung des Zellzyklus mittels Durchflusszytometrie 300.000 Zellen in einer Zellkulturschale mit einer Wachstumsfläche von 53 cm^2 ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit 5 μM THC, 1 μM LPI, 5 μM CBD oder serumfreien Kulturmedium behandelt. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen. Nach 24 h wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit 2 ml Trypsin/EDTA von der Oberfläche abgelöst. Die abgelösten Zellen wurden mit 8 ml frischem Medium aufgenommen und bei 800 g für 5 min zentrifugiert. Anschließend wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und erneut bei 800 g für 5 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 100 μl PBS resuspendiert und anschließend tropfenweisen mit 1 ml 70 % (v/v) Ethanol versetzt. Die Zellen wurden für mind. 2 Tage bei 4 °C fixiert. Zur Bestimmung der Zellzyklusphasen wurden die Zellen mit Propidiumiodid (PI) gefärbt. PI interkaliert in DNA, dessen Fluoreszenz Signal proportional zur DNA-Menge ist. Anhand des DNA-Gehalts lässt sich wiederum eine Differenzierung verschiedener Zellzyklusstadien der Zellen vornehmen. In der G_0/G_1 Phase liegen die Chromosomen als ein Chromatid vor, in der S-Phase kommt es zur Replikation und der DNA Gehalt steigt bis schließlich in der G_2 Phase die Erbinformation als doppeltes Chromatid vorliegt. Für die Färbung wurden die Zellen bei 100 g bei 4 °C für 10 min zentrifugiert und mit PI (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) in 1 ml PBS angefärbt. Da PI sowohl DNA als auch RNA anfärbt, wurden die Zellen zusätzlich mit RNaseA (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) behandelt. Nach 30 min bzw. innerhalb von 24 h wurden die Proben mit dem Durchflusszytometrie-

Analysegerät MACSQuant® Analyzer10 gemessen. Die gemessenen Daten wurden mit der externen Software FlowJo Version 10 analysiert. Für die Analyse der Verteilung der Zellzyklusphasen wurden 10.000 Ereignisse pro Panel innerhalb der P1-Region gemessen (Abbildung 10). Das univariate Dean-Jett-Fox-Modell wurde verwendet, um den Prozentsatz der Zellpopulation in den verschiedenen Phasen des Zellzyklus zu bestimmen.

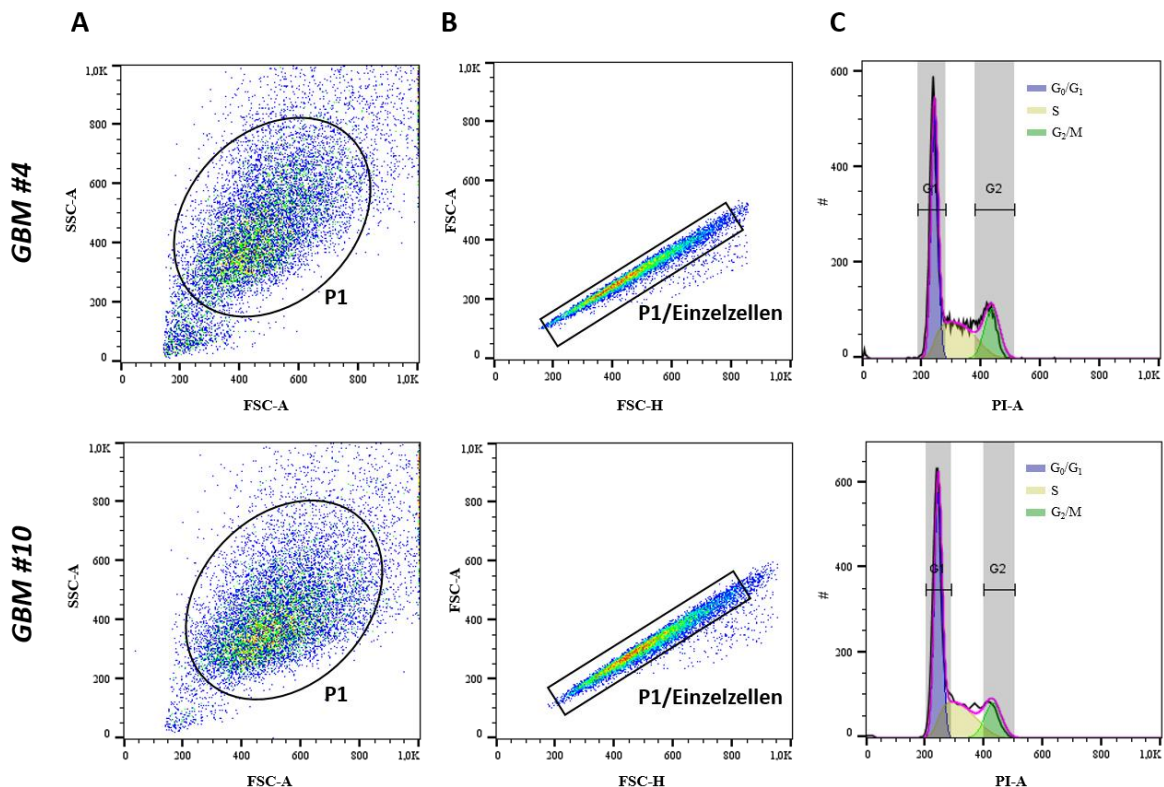


Abbildung 9: Bestimmung der Phasenverteilung des Zellzyklus von GBM #4 und GBM #10 mittels Durchflusszytometrie. A: Die Region P1 wurde so festgelegt, dass Zelldebris von der Analyse ausgeschlossen wurde. B: Unterscheidung von Doubletten und Einzelzellen in einem Dichteplot. C: Repräsentative Darstellung der Zellzyklusverteilung von P1/Einzelzellen als Histogramm anhand des DNA-Gehalts *via* PI. Für die Berechnung der Statistiken mit dem univariaten Dean-Jett-Fox-Modell wurden die Intervalle der Zellzyklusphasen G₁ und G₂ festgelegt. Die einzelnen Zellzyklusphasen sind farblich hervorgehoben.

3.7 RNA-Extraktion

Um die Gesamt-RNA aus den Zellen zu isolieren, wurde die Trizol-Methode angewendet. Der Zellaufschluss erfolgte nach der Zugabe von 500 µl Trizol und 3-5 Keramikkügelchen pro Ansatz im Precellys®-Homogenisator. Nach einer 5-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Proben mit 100 µl Chloroform versetzt, 15 s kräftig geschüttelt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde bei 12.000 g und 4 °C für 15 min zentrifugiert, wobei sich drei Phasen bildeten. Die wässrige, klare, obere Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Durch Zugabe von 250 µl Isopropanol (-20 °C), intensives Mischen und 10-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die RNA gefällt. Anschließend wurde

diese durch Zentrifugation bei 12.000 g und 4 °C für 10 min pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Präzipitat zweimal mit 500 µl 70 % (v/v) Ethanol (-20 °C) gewaschen und erneut für 10 min bei 12.000 g und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde schließlich luftgetrocknet und mit Nuklease-freiem Wasser über Nacht bei 4 °C gelöst.

3.8 RNA-Quantifizierung

Die Konzentration und der Reinheitsgrad der isolierten RNA wurden mittels spektralphotometrischer Messung im Synergy MX-Spektrophotometer bestimmt. Nach Bestimmung des Leerwerts (Nuklease-freies Wasser), wurden 2 µl der Proben auf die Messstellen pipettiert und die Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm gemessen. Die Reinheit der RNA wird aus dem Quotienten der Absorption für beide Wellenlängen berechnet. Dieser sollte für RNA zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Abweichungen lassen auf Verunreinigungen durch z.B. Proteine schließen. Über die Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm lässt sich die Konzentration der isolierten Nukleinsäure in µg/µl ermitteln. Dabei gilt für RNA: eine Absorption von 1 entspricht 40 µg/ml einzelsträngiger RNA. Die Proben wurden anschließend bei -80 °C gelagert.

3.9 DNase-Verdau

Um Kontaminationen durch genomische DNA auszuschließen, wurden 12 µl der RNA-Lösung mit dem Enzym rDNase I (0,24 U) behandelt. Für die DNase-Behandlung wurde das DNA-free™ Kit verwendet, wobei das dazugehörige, vom Hersteller empfohlene Protokoll genutzt wurde.

3.10 cDNA-Synthese mittels reverser Transkription

Um die mit DNase behandelte Gesamt-RNA in cDNA umzuschreiben, wurde das *RevertAid RT Reverse Transcription Kit* genutzt. Für die cDNA-Synthese wurden 1 µg extrahierte RNA mit Nuklease-freiem Wasser auf 11 µl aufgefüllt, mit 1 µl *Random Primer* versetzt und für 5 min bei 65 °C denaturiert. Die Proben wurden auf Eis abgekühlt, für 1 min bei 10.000 g zentrifugiert und mit 8 µl des Mastermix versetzt. Dieser setzte sich wie folgt zusammen:

5x <i>Reaction Buffer</i>	4 µl
RiboLock RNase Inhibitor (20 U/ µl)	1 µl
dNTP Mix (je 10 mM)	2 µl
RevertAidRT (200 U/µL)	1 µl

Nach 5-minütiger Inkubation bei 25 °C erfolgte die Transkriptionsreaktion bei 42 °C für 60 min und wurde anschließend durch Hitzeinaktivierung (70 °C, 5 min) gestoppt. Die synthetisierte

cDNA wurde mit Nuklease-freiem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 100 µl aufgefüllt und bei -20 °C gelagert.

3.11 cDNA-Amplifikation (*real-time quantitative PCR*)

Für die Quantifizierung bestimmter Genabschnitte wurde eine quantitative *real-time* PCR (RT-qPCR) durchgeführt. Diese Methode beruht auf dem Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, kurz: PCR) und ermöglicht durch die Einlagerung eines sequenzspezifischen Fluoreszenzfarbstoffes (EvaGreen™) eine relative oder absolute Quantifizierung der amplifizierten DNA-Fragmente in Echtzeit. Die Messung erfolgte entweder am Thermocycler Rotor-Gene™ 6000 oder am 7900HT Fast Real-Time PCR System. Die Zusammensetzung eines PCR-Ansatzes war wie folgt:

	Rotor-Gene™	7900HT
PCR-Mastermix	10 µl	7,5 µl
<i>Taq</i> -Polymerase (50 U/ml)		
MgCl ₂ (3mM)		
dATP, dGTP, dTTP, dCTP (je 400 µM)		
EvaGreen™ <i>DNA-binding Dye</i> (Biotium)	0,25 µl	0,19 µl
Primer vorwärts	0,5 µl	0,38 µl
Primer rückwärts	0,5 µl	0,38 µl
Nuklease-freies Wasser	4,75 µl	3,56 µl
cDNA	4 µl	2 µl

Es wurde ein Zielgen-spezifischer Mastermix aus allen Komponenten mit Ausnahme der *Template*-DNA hergestellt. Für jedes Zielgen wurde eine Doppelbestimmung vorgenommen. Als Negativkontrolle wurde Nuklease-freies Wasser eingesetzt. Die Amplifikation erfolgte nach dem folgenden Reaktionsschema:

Initiale Denaturierung	95 °C	2 min
Amplifikation (45 Zyklen)		
Denaturierung	94 °C	30 s
Hybridisierung	Primer-spezifisch	30 s
Elongation	72 °C	30-40 s
Detektion	76 °C/80 °C	15 s
Halt (Abkühlung)	40 °C	2 min
Halt (Erwärmung)	50 °C	1 min
Schrittweise Denaturierung (Messung der Schmelzkurven)	50-99 °C	1 °C/min

Die Expression der untersuchten Gene wurde durch RT-qPCR relativ quantifiziert. Die relative Transkriptmenge der Gene wurde in Bezug auf die Transkriptmenge der RNA-Polymerase II RPB1 (*POLR2A*) ermittelt. Dazu wurde der spezifische Ct-Wert (*cycle threshold*) für jedes Gen aus den über das Fluoreszenzsignal gemessenen Amplifikationskurven bestimmt. Dieser gibt die Zykluszahl an, bei der sich das Fluoreszenzsignal erstmals signifikant vom

Hintergrundsignal abhebt. Für den Vergleich der Genexpression wurde anschließend die $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Methode verwendet [189].

3.12 DNA-Gelelektrophorese

Die Produkte der PCR wurden in einem 1,5 % (w/v) Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt, um die Spezifität der verwendeten Primer über die Amplikonlänge zu überprüfen. Zur Herstellung des Agarosegels wurden 4,5 g Agarose mit 300 ml MOPS (1x) bis zum vollständigen Lösen aufgeköcht. Das gießfertige und abgekühlte DNA-Gel wurde mit 15 µl GelRed™ versetzt, einem Fluoreszenzfarbstoff, der in Nukleinsäuren interkaliert. Daraufhin wurde die Agaroselösung in die Gelkammer gegossen und vorhandene Luftblasen entfernt. Zur Verifizierung der Amplikonlänge wurden zusätzlich 3 µl eines Längenstandards aufgetragen, der sich aus *BlueJuice*, 100 bp DNA-Standard und Nuklease-freiem Wasser (1:1:1) zusammensetzte. Die Auftrennung der Proben ihrer Größe nach erfolgte für 2 h bei 110 V und wurde anschließend mittels UV-Licht bei einer Wellenlänge von 365 nm detektiert.

3.13 Western Blot

3.13.1 Probenaufarbeitung aus Zellextrakten

Die in Probenpuffer aufgenommenen Zellen wurden im Precellys®-Homogenisator und mit Hilfe von Keramikkügelchen mechanisch aufgeschlossen, 10 min auf 70 °C erhitzt und zentrifugiert (10.000 g, 10 min, 4 °C). Die in RIPA-Puffer aufgenommenen Proben wurden nach Homogenisierung, 20 min auf Eis inkubiert und 20 min bei 10.000 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die Proteinkonzentration bestimmt, welche mittels Bicinchoninsäure (BCA)-Test erfolgte. In alkalischer Lösung reagieren Cu^{2+} -Ionen mit den Aminosäuren der Proteine, wobei jene zu Cu^+ -Ionen reduziert werden. BCA ermöglicht die quantitative Detektion der gebildeten Cu^+ -Ionen, indem jeweils zwei-Molekülen mit einem reduzierten Cu^+ -Ion einen violetten-Komplex bilden. Die Proteinkonzentration wurde über die Messung der Absorption des Komplexes bei einer Wellenlänge von 562 nm bestimmt. Es wurde nach dem Protokoll des *Pierce BCA Protein Assay Kit* gearbeitet. Die Proben wurden bei -80 °C gelagert.

3.13.2 SDS-PAGE

Die Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht kann mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) erzielt werden. Für eine diskontinuierliche SDS-PAGE nach Laemmli durchlaufen die Proteine zunächst ein

Sammelgel, in dem sie konzentriert werden, bevor sie anschließend in einem Trenngel nach ihrem Molekulargewicht separiert werden (Tabelle 14).

Tabelle 14: Zusammensetzung des Polyacrylamidgel.

Lösungen	Sammelgel	12,5 % (v/v) Trenngel
Aqua dest.	1,525 ml	2,475 ml
Sammelgelpuffer	0,625 ml	--
Trenngelpuffer	--	1,875 ml
30 % (w/v) Polyacrylamid	325 µl	3,125 ml
10 % (w/v) SDS	25 µl	--
10 % (w/v) APS	12,5 µl	22,5 µl
TEMED	2,5 µl	5 µl

Zur Vorbereitung der Auftrennung wurde das entsprechende Volumen mit 20 µg Gesamtprotein 1:1 mit Laemmli-Puffer gemischt, für 5 min bei 95 °C erhitzt und kurz zentrifugiert (10.000 g, 1 min, 4 °C). Anschließend wurden die Proben, sowie 2 µl Größenstandard auf das Gel aufgetragen. Die gelelektrophoretische Auftrennung erfolgte zunächst für 15 min bei 90 V und konsekutiv für 50 min bei 200 V.

3.13.3 Proteintransfer

Die aufgetrennten Proteine aus dem Trenngel wurden anschließend auf eine Nitrozellulosemembran transferiert, um schließlich die Zielproteine detektieren und quantifizieren zu können.

Hierzu wurden zunächst insgesamt sechs Whatman®-Filterpapiere und die zugeschnittene Nitrozellulosemembran in Transferpuffer äquilibriert und anschließend auf die Blot-Apparatur in folgender Reihenfolge positioniert: drei Filterpapiere, Membran, Trenngel und drei Filterpapiere. Luftbläschen, die möglicherweise die Bloteffizienz beeinträchtigen würden, wurden durch Glattrollen entfernt. Das Blotten erfolgte schließlich für 30 min bei 25 V im Trans-Blot® Turbo Transfer™ System. Zur Kontrolle des erfolgreichen Transfers der Proteine wurde die Membran mit PonceauS inkubiert und mit destilliertem Wasser entfärbt.

3.13.4 Immundetektion

Die Membranen wurden zunächst für 10 min in TBST gewaschen. Um unspezifische Proteinbindungsstellen auf den Membranen zu blockieren, wurden diese 30 min mit 1x Roti®-Block inkubiert. Über Nacht wurden die Blotmembranen mit den Verdünnungen der jeweiligen Primärantikörper in der Roti®-Block-Lösung schwenkend inkubiert. Am nächsten Tag wurden weitergehend die Membranen dreimal 10 min mit TBST gewaschen, bevor jene mit dem sekundären Marker und Sekundärantikörper in 1x Roti®-Block inkubiert wurden. Nach 60 min folgte ein fünfmaliges Waschen in TBST. Konsekutiv wurden die Membranen mit 1 ml Luminata Forte™ Western HRP Substrate entwickelt und nach 3 min mit dem Fusion-Fx7-

Detektionssystem detektiert und dokumentiert. Die Membranen wurden anschließend dreimal 10 min gewaschen und 30 min mit 1x Roti®-Block vorbehandelt, bevor sie erneut mit dem Primärantikörper gegen das *housekeeping*-Gen β -Aktin inkubiert wurden.

3.14 Immunzytochemie

3.14.1 DAB-Färbung

In dieser Arbeit erfolgte die Färbung des nukleären Ki67-Antigens nach der indirekten ABC-Methode (*Avidin-Biotinylated-Enzyme Complex*). Zunächst wird ein Primärantikörper verwendet, welcher das Antigen erkennt und spezifisch daran bindet. Dieser wird dann durch einen zweiten biotinylierten Antikörper detektiert, welcher wiederum die Immobilisierung einer mit Avidin fusionierten Meerrettichperoxidase (*horse radish peroxidase*, HRP) ermöglicht. In Anwesenheit von H_2O_2 katalysiert die Peroxidase die Oxidation des chromogenen Stoffes 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) und visualisiert so die Antigen-Antikörper-Komplexe, was durch einen braunen Farbumschlag gekennzeichnet ist.

Um unspezifische Hintergrundfärbungen zu vermeiden, wurde die endogene Peroxidase der fixierten Glioblastomzellen zunächst 10 min mit einem Methanol/ H_2O_2 -Gemisch (10 ml Methanol und 150 μ l 30 % (v/v) H_2O_2) blockiert. Nach dreimaligem Waschen mit 0,02 M PBS/Triton (je 10 min) wurden die Zellen 30 min mit Ziegen Serum (*normal goat serum*, NGS, 1:20 in PBS/Triton) präinkubiert. Zur Vorbereitung des Primärantikörpers, wurde jener in PBS/Triton und 0,5 % (w/v) Rinderserumalbumin (*bovine serum albumin*, BSA) verdünnt. Die Inkubation der Zellen mit dem Primärantikörper erfolgte über Nacht bei Raumtemperatur. Am nächsten Tag wurden die Zellen dreimal 10 min mit PBS/Triton gewaschen, bevor der Sekundärantikörper für 60 min auf die Zellen gegeben wurde. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit PBS/Triton (je 10 min) folgte die Inkubation mit der ExtrAvidin®-Peroxidase für 60 min. Anschließend wurden die Zellen mit PBS/Triton und 0,05 M Tris jeweils 10 min gespült. Für die Farbreaktion wurden die Zellen mit der vorbereiteten DAB-Lösung (0,01 g DAB in 20 ml 0,05 M Tris und 10 μ l H_2O_2) für 4 min inkubiert. Überschüssiges DAB wurde konsekutiv durch 10-minütigem Waschen mit 0,05 M Tris und zweimaligem Spülen mit destilliertem Wasser (5 min) entfernt. Für die Gegenfärbung der Zellkerne wurden die Zellen mit der gebrauchsfertigen Reagenz Mayers Hämalaun 4 min inkubiert, 5 min mit destilliertem Wasser entfärbt und für 30 min mit Leitungswasser entbläut. Im Anschluss wurden die Zellen mit Hilfe einer aufsteigenden Alkoholreihe (70 %; 80 %; 90 %; 96 %; absolut (v/v)) und Xylol entwässert und in Entellan® eingedeckt.

3.14.1.1 Analyse der Anzahl Ki67⁺ Nuklei

Ki67 dient als Marker zur Bestimmung der Proliferationsfähigkeit von Tumorzellen, da es in allen Phasen des Zellzyklus exprimiert wird, nur nicht in der ruhenden G₀-Phase [186].

Die Aufnahmen der immunzytochemischen Färbungen gegen Ki67 erfolgten am Mikroskop Leica DMI8 mit einer 200-fachen Vergrößerung (Abbildung 10A). Jede Behandlungsgruppe umfasste zwei Deckgläschen. Pro Deckgläschen wurden 5 Positionen festgehalten. Anschließend wurde das Verhältnis von Ki67⁺ Nuklei zur Gesamtzellzahl determiniert. Die Differenzierung zwischen Ki67⁺ und Ki67⁻ Nuklei wurde anhand der spezifischen Färbung (Abbildung 10A) und einer selbstgewählten Farbskala (Abbildung 10B) festgelegt. Die angefärbten Nukleoli wurden bei der Interpretation der Ki67-Färbung nicht berücksichtigt, da zum einen der gesamte Nukleus betrachtet werden sollte und zum anderen jene auch in Zellen, die in die G₀-Phase eintreten, oder in bereits G₀-arretierten Zellen nachweisbar sind [190–192]. Die erhaltenen Werte wurden auf die unbehandelte Kontrollgruppe normiert und als prozentuale Änderung graphisch dargestellt. Die basale Anzahl Ki67⁺ Nuklei wird nicht wesentlich von der Zelldichte beeinflusst (Abbildung 10D).

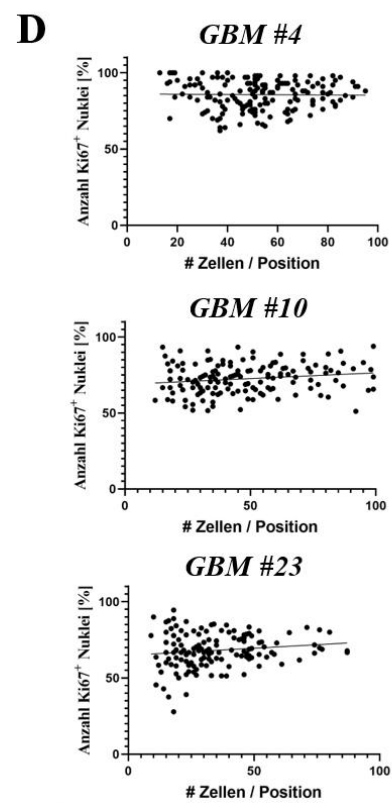
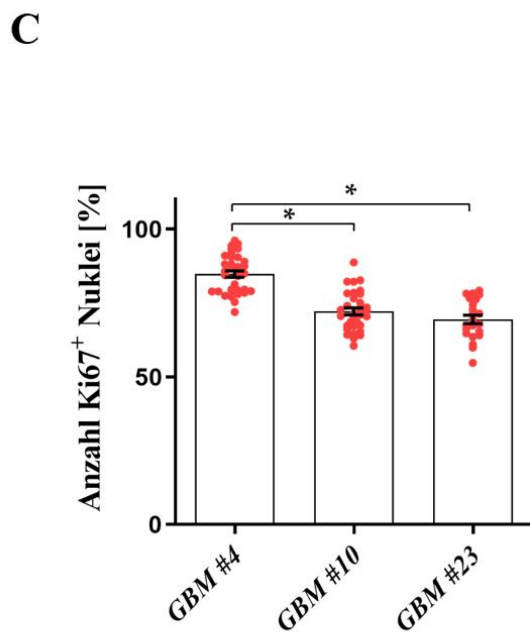
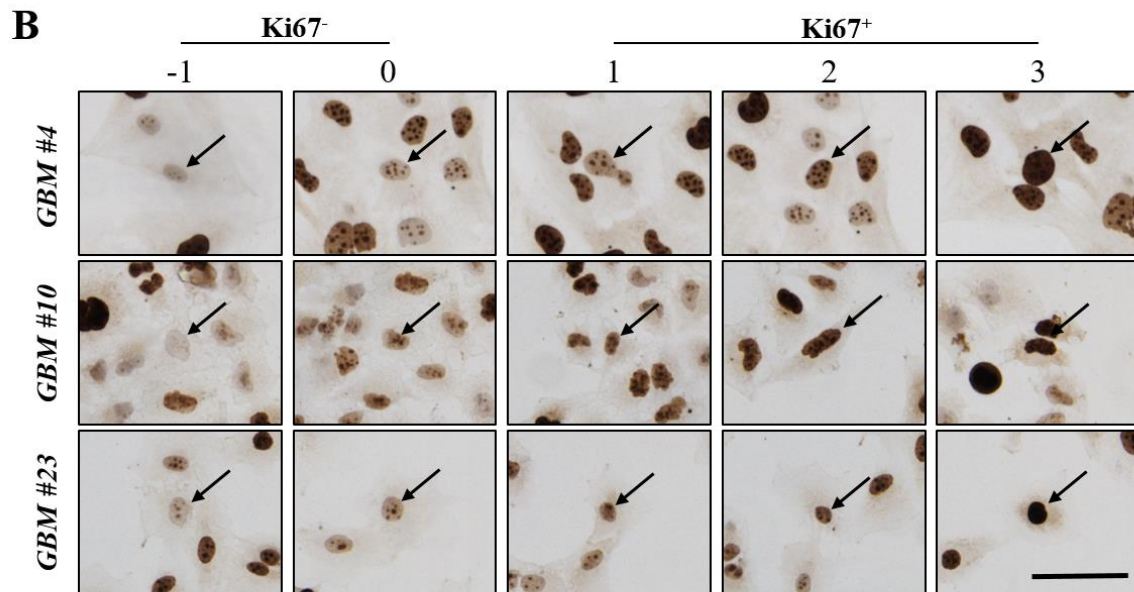
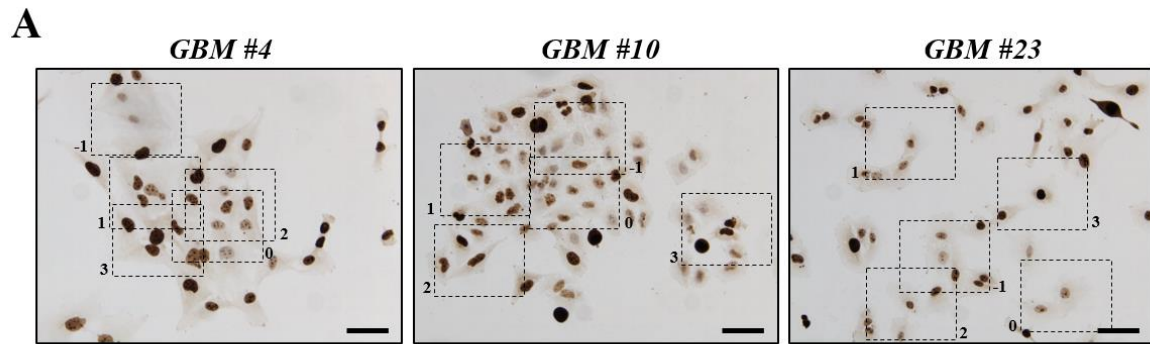


Abbildung 10: Analyse der Anzahl Ki67⁺ Nuklei. A: Repräsentative Färbungen gegen Ki67 von *GBM #4*, *GBM #10* und *GBM #23*. Der Maßstab entspricht 75 μm . B: Farbskala zur Einordnung gefärbter Nuklei in Ki67 negativ (Ki67⁻) und Ki67 positiv (Ki67⁺). Eine blaue bis graue Färbung (-1; 0) wurde als Ki67⁻ eingestuft, während schwach bis stark braun gefärbte Nuklei (1-3) als Ki67⁺ betrachtet wurden. Die angefärbten Nukleoli wurden bei der Interpretation der Ki67-Färbung nicht berücksichtigt. Der Maßstab entspricht 75 μm . C: basaler Anteil Ki67⁺ Nuklei von *GBM #4*, *GBM #10* und *GBM #23*. Die Glioblastomzellen wiesen einen unterschiedlich hohen Anteil Ki67⁺ Nuklei auf. Ihr Anteil war wie folgt: 84,73 % \pm 1,11 % (*GBM #4*, n = 34), 72,12 % \pm 1,18 % (*GBM #10*, n = 32) und 69,42 % \pm 1,44 % (*GBM #23*, n = 22). Die Daten sind Mittelwerte \pm SEM von unbehandelten Kontrollgruppen dieser Arbeit. Signifikanz (*) wurde für $p < 0,05$ gewählt. D: Anteil Ki67⁺ Nuklei in Abhängigkeit der Gesamtzellzahl pro aufgenommene Position von *GBM #4*, *GBM #10* und *GBM #23*. Eine Abhängigkeit der Ki67 Immunoreaktivität von der Zelldichte konnte ausgeschlossen werden.

3.14.2 Immunfluoreszenz

Zur Bestimmung der Lokalisation der Transkriptionsfaktoren NFAT1-4 wurde eine Fluoreszenzfärbung durchgeführt. Die Visualisierung wurde über ein Fluorophor, welcher an den Sekundäntikörper konjugiert ist, realisiert. Nach Fixierung der Zellen wurde zunächst einmalig mit PBS/Triton 10 min gewaschen. Anschließend erfolgte die Präinkubation der Zellen mit NGS (1:20 in PBS/Triton) für 30 min, bevor der Primäntikörper, welcher in 0,5 % (w/v) BSA und PBS/Triton verdünnt wurde, über Nacht bei Raumtemperatur dazugegeben wurde. Die Zellen wurden dreimal 10 min mit PBS/Triton gespült und 60 min mit dem Sekundäntikörper behandelt. Nach dreimaligem Waschen mit PBS/Triton (je 10 min) schloss sich eine 5-minütige Kernfärbung mit DAPI an, wobei überschüssiges DAPI durch 5-minütiges Spülen mit Aqua dest. und 10-minütiges Waschen mit PBS/Triton entfernt wurde. Schließlich wurden die Deckgläschen mit *Fluorescent Mounting Medium* auf Objektträgern befestigt.

Die Aufnahmen der Immunfluoreszenz-Färbungen gegen NFAT1-4 erfolgten am konfokalen Laserscanning Mikroskop TCS SPE bei einer 400-fachen Vergrößerung. Für die Darstellung der Zellkerne mit DAPI wurde ein Laser mit der Anregungswellenlänge von 405 nm (Emission: $\Delta\lambda = 415\text{-}480$ nm) und von NFAT1-4 ein Laser mit der Anregungswellenlänge von 488 nm (Emission: $\Delta\lambda = 500\text{-}570$ nm).

3.15 Statistik

Die Ergebnisse sind angegeben als arithmetischer Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) aus n Werten und N Experimenten (STabelle 1-13). Der Vergleich der Mittelwerte erfolgte unter Verwendung des Student's t-Tests für ungepaarte Datensätze mit vergleichbarer Standardabweichung und des einseitigen ANOVA mit Tukey-Posttest mittels GraphPad Prism9. Ein signifikanter Unterschied wurde mit * oder # gekennzeichnet, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,05$ betrug.

4 Ergebnisse

4.1 Umfassende Charakterisierung humaner Glioblastomzellen hinsichtlich der Expression von klassischen und nicht-klassischen Elementen des ECSs

4.1.1 Rezeptoren

Um den Rezeptor, über den THC die Anzahl Ki67⁺ Nuklei beeinflusste, identifizieren zu können, wurde zunächst analysiert, ob klassische (CB₁ und CB₂) und nicht-klassische (GPR18, GPR55 und GPR119) CB-Rezeptoren in *GBM #4*, *GBM #10* und *GBM #23* exprimiert wurden. Mittels quantitativer RT-PCR und anschließender Gelelektrophorese konnte der spezifische Nachweis der oben genannten Rezeptoren auf Transkriptebeine in den untersuchten Glioblastomzellen erbracht werden (Abbildung 12A). Die quantitative Analyse zeigte eine deutlich erhöhte Transkriptmenge von *GPR18* im Vergleich zu *CNR1* (CB₁), *CNR2* (CB₂) und *GPR55* in den untersuchten Glioblastomzellen (SAbbildung 1A). Während ein annähernd gleiches Verhältnis der *CNR2* und *GPR55*-Transkripte in *GBM #4* und *GBM #10* nachgewiesen wurde, zeigte *GBM #23* eine deutlich höhere *GPR55*-Transkriptmenge im Vergleich zu *CNR2* (SAbbildung 1A). Aus diesem Grund wurde in *GBM #23* auch eine signifikant höhere Transkriptmenge von *GPR55* im Vergleich zur Transkriptmenge in *GBM #4* und *GBM #10* gemessen (Tabelle 15). Auch *CNR1* kommt in signifikant höherer Konzentration in *GBM #23* im Vergleich zu *GBM #4* und *GBM #10* vor (Tabelle 15). *GPR119* wurde nur in sehr geringer Konzentration in den untersuchten Zellen gefunden (Abbildung 12 A).

Tabelle 15: Vergleich der relativen Transkriptmengen von klassischen und nicht-klassischen CB-Rezeptoren. Die Quantifizierung der relativen Transkriptmenge erfolgte mittels *real-time* RT-PCR und der 2^{-ΔΔC_t}-Methode. Die Daten sind als Mittelwert ± SEM (relativ zur Menge in *GBM #4*) mit n=12 dargestellt. * p<0,05 vs. *GBM #4*; # p<0,05 vs. *GBM #10*

	<i>GBM #4</i>	<i>GBM #10</i>	<i>GBM #23</i>
<i>CNR1</i>	1,55 ± 0,46	6,36 ± 1,77*	39,26 ± 4,45*#
<i>CNR2</i>	1,41 ± 0,20	1,08 ± 0,15	0,85 ± 0,18*
<i>GPR18</i>	1,56 ± 0,38	0,67 ± 0,13*	0,58 ± 0,14*
<i>GPR55</i>	1,08 ± 0,12	2,24 ± 0,10*	7,89 ± 0,79*#

In Übereinstimmung mit diesen Daten waren CB₁, CB₂, GPR18 und GPR55 auf Proteinebene in *GBM #4*, *GBM #10* und *GBM #23* nachweisbar, wie in Western Blot-Analysen und/oder immunchemischen Färbungen festgestellt wurde (Abbildung 11B-D). Für GPR119 konnten keine Analysen auf Proteinebene durchgeführt werden, da kein geeigneter Antikörper gegen GPR119 existiert. In Western Blot-Analysen konnte der Nachweis der CB₁- und der CB₂-

Rezeptoren bei einer Größe von jeweils 60 kDa auf Proteinebene in den Glioblastomzellen erbracht werden (Abbildung 11B). Für GPR55 konnte im Western Blot ein Signal bei einer Größe von 40 kDa in allen Zellen detektiert werden, was dem erwarteten Molekulargewicht (37 kDa) von GPR55 annähernd entspricht (Abbildung 11C). Als Kontrollen für die Untersuchung der GPR55-Expression auf Proteinebene dienten humane Gewebeproben des *Hippocampus*, der *Ganglion trigeminale* und des *Cerebellums*, welche *post mortem* gewonnen wurden. Neben den untersuchten Tumorzellen wurden zusätzlich auch die kommerziellen humanen Glioblastomzelllinien U138 und LN229 mitgeführt. Für jene Kontrollen und Zelllinien konnte ein Signal bei ca. 40 kDa detektiert werden (Abbildung 11C). Es ist zu erkennen, dass durch den verwendeten Antikörper weitere Signale unterhalb und oberhalb des 40 kDa Signals generiert wurden (Abbildung 11C). So findet man in den Zellen von *GBM #4*, *GBM #10*, U138 und LN229, sowie in dem Extrakt der *Ganglion trigeminale* eine Bande bei ca. 30 kDa (Abbildung 11C). Ausschließlich in den Gewebeproben wurde zusätzlich ein weiteres Signal knapp über dem 40 kDa Signal detektiert, während die Inkubation mit dem Antikörper für die Zellproben auch ein Signal bei etwa 75 kDa ergab (Abbildung 11C). Das multiple Bandenmuster lässt sich sehr wahrscheinlich mit den Prozessen der Degradation (unterhalb), der posttranslationalen Modifikation und/oder Dimerisierung (oberhalb) von GPR55 erklären. Unspezifische Bindungen des Antikörpers konnten mit Hilfe eines Erkennungssequenz-spezifischen Blockingpeptids ausgeschlossen werden (SAbbildung 2).

Subzellulär waren CB₁, CB₂, GPR18 und GPR55 an der Zellmembran lokalisiert, die durch eine starke Braunfärbung des Zytoplasmas und der Zellmembran mit einem teilweise punktierten Färbemuster und deutlich gefärbten Zellfortsätzen hervorgehoben werden (Abbildung 11D). Insbesondere der Nachweis des CB₂-Rezeptors war durch eine intensivere Immunfärbung in *GBM #23* im Vergleich zu *GBM #4* und *GBM #10* oder zur Immunfärbung der anderen Rezeptoren in den selben Zellen gekennzeichnet (Abbildung 11D).

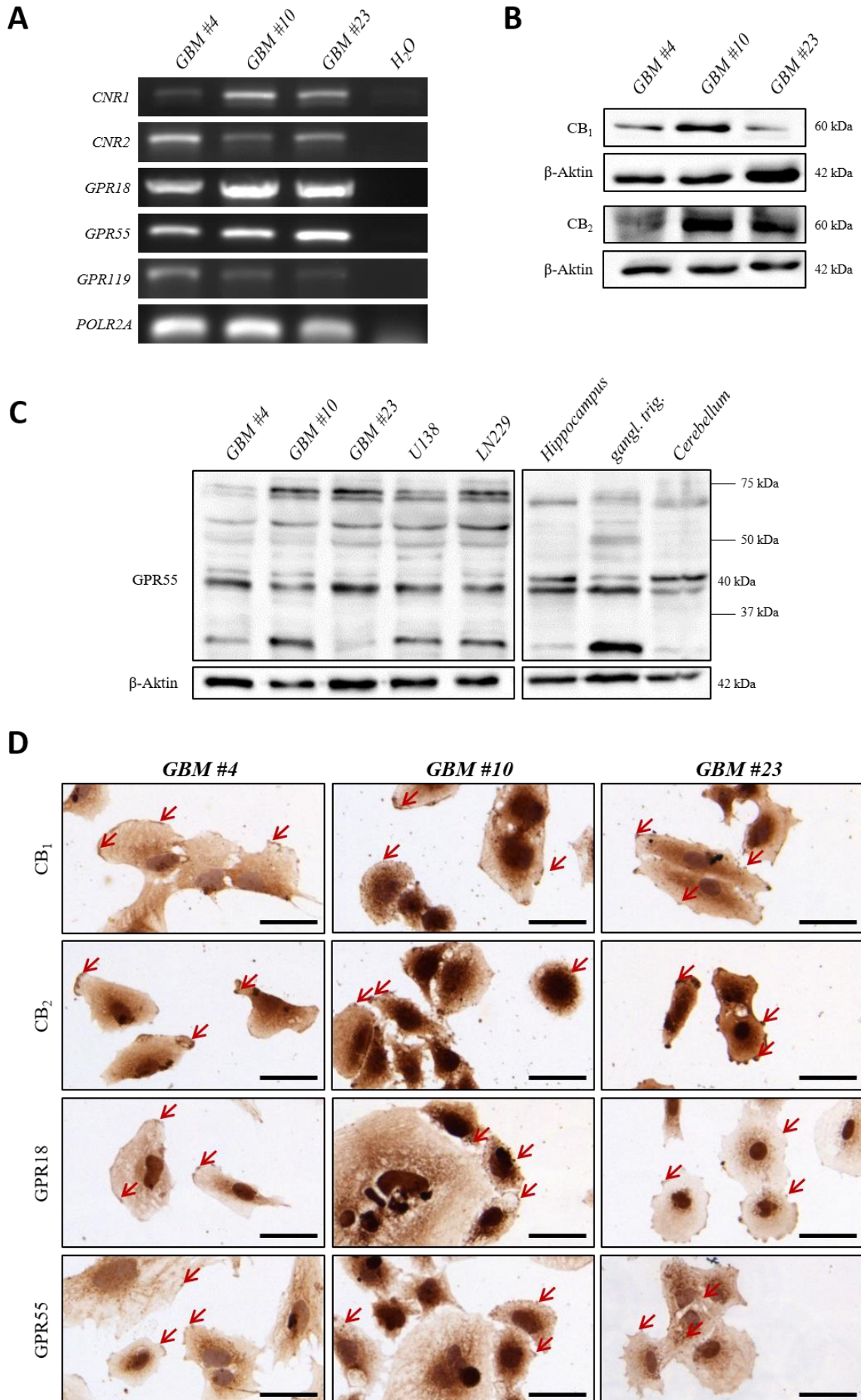


Abbildung 11: Nachweis klassischer und nicht-klassischer CB-Rezeptoren auf Transkript- und Proteinebene in humanen Glioblastomzellen. A: Nachweis der mRNA von klassischen und nicht-klassischen CB-Rezeptoren. Es wurden unbehandelte Zellen von *GBM #4*, *GBM #10* und *GBM #23* hinsichtlich der Transkriptmenge von *CNR1*, *CNR2*, *GPR18*, *GPR55*, und *GPR119* mittels quantitativer RT-PCR analysiert. In allen untersuchten Glioblastomzellen konnte ein PCR-Produkt der genannten Gene nach gelelektrophoretischer Auftrennung nachgewiesen werden. Als internes Referenzgen diente die RNA-Polymerase II RPB1 (*POLR2A*). B-C: Repräsentative Western Blots zur Untersuchung von CB₁, CB₂ (B) und GPR55 (C). Sowohl CB₁ als auch CB₂ mit einem Molekulargewicht von ca. 60 kDa konnten in unbehandelten *GBM #4*, *GBM #10* und *GBM #23* nachgewiesen werden. Zusätzlich wurde die GPR55 Expression auch in den humanen Glioblastomzelllinien U138 und LN229, sowie in Extrakten von humanen Gewebeproben des *Hippocampus*, der *Ganglion trigeminale* und des *Cerebellums* untersucht. Für GPR55 wurde ein multiples Bandenmuster generiert. Neben der erwarteten Molekulargröße von ca. 37 kDa konnten zwei weitere Banden oberhalb (ca. 42 kDa und ca. 75 kDa) und eine Bande unterhalb (20 kDa) detektiert werden. Als interne Ladekontrolle diente β -Aktin mit einer Größe von 42 kDa. D: Repräsentative Aufnahmen der immunchemischen Färbungen gegen CB₁, CB₂, GPR18 und GPR55 unbehandelter Glioblastomzellen. Die Färbungen zeigen das Vorkommen von CB₁, CB₂, GPR18 und GPR55 auf der Zelloberfläche von *GBM #4*, *GBM #10* und *GBM #23* (rote Pfeile). Die Zellkerne wurden mit Hämatoxylin gegengefärbt. Der Maßstab entspricht 50 μ m.

4.1.2 Ionotrope Rezeptoren

Neben GPCRs können Cannabinoide wie THC und CBD auch ionotrope Rezeptoren, insbesondere Ionenkanäle der Familie der TRP-Kanäle, ansteuern. Bislang wurde berichtet, dass sechs Formen von TRP-Kanälen die Aktivität von THC und CBD beeinflussen: TRPV1, TRPV2, TRPV3, TRPV4, TRPM8 und TRPA1 [118]. Aus diesem Grund wurde im nachfolgenden die Expression genannter TRP-Kanäle in den Glioblastomzellen mittels quantitativer RT-PCR analysiert. Die Analyse ergab, dass die genannten Ionenkanäle auf Transkriptebeine in den unbehandelten Glioblastomzellen nachgewiesen werden konnten (Abbildung 12) und diese in unterschiedlich starker Ausprägung exprimiert wurden (SAbbildung 1B, Tabelle 16). So wurden *TRPV1* und *TRPV3* in erhöhten Mengen in *GBM #4* und *GBM #23* im Vergleich zu den restlichen Genen und zu *GBM #10* gefunden, während in *GBM #10* die Expression von *TRPV2* und insbesondere von *TRPV4* stark ausgeprägt war (SAbbildung 1B, Tabelle 16).

Aufgrund fehlender spezifischer Antikörper konnte die Analyse der TRP-Kanäle auf Proteinebene nicht durchgeführt werden.

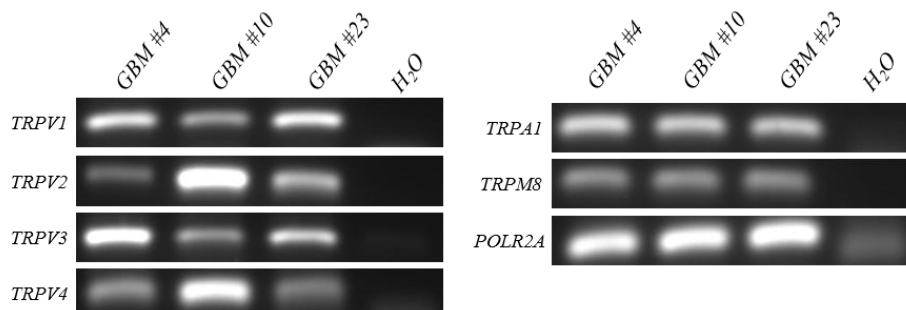


Abbildung 12: Nachweis der mRNA von nicht-klassischen ionotropen CB-Rezeptoren. Es wurden unbehandelte Zellen von *GBM #4*, *GBM #10* und *GBM #23* hinsichtlich der Transkriptmenge von *TRPV1*, *TRPV2*, *TRPV3*, *TRPV4*, *TRPA1* und *TRPM8* mittels quantitativer RT-PCR analysiert. In allen untersuchten Glioblastomzellen konnte ein PCR-Produkt der oben genannten Gene nach gelelektrophoretischer Auftrennung nachgewiesen werden. Als internes Referenzgen diente die RNA-Polymerase II RPB1 (*POLR2A*).

Tabelle 16: Vergleich der relativen Transkriptmengen von nicht-klassischen ionotropen CB-Rezeptoren. Die Quantifizierung der relativen Transkriptmenge erfolgte mittels *real-time* RT-PCR und der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode. Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM (relativ zur Menge in *GBM #4*) mit $n=8-12$ dargestellt. * $p<0,05$ vs. *GBM #4*; # $p<0,05$ vs. *GBM #10*

	<i>GBM #4</i>	<i>GBM #10</i>	<i>GBM #23</i>
<i>TRPV1</i>	1,04 \pm 0,09	0,47 \pm 0,06*	0,46 \pm 0,05*
<i>TRPV2</i>	1,04 \pm 0,09	91,98 \pm 7,01*	0,77 \pm 0,08*#
<i>TRPV3</i>	1,04 \pm 0,08	0,24 \pm 0,03*	1,83 \pm 0,20*#
<i>TRPV4</i>	1,21 \pm 0,32	1022 \pm 45,59*	1,67 \pm 0,52#
<i>TRPA1</i>	1,32 \pm 0,23	2,45 \pm 0,34*	0,40 \pm 0,05*#
<i>TRPM8</i>	1,04 \pm 0,08	5,80 \pm 0,44*	2,06 \pm 0,26*#

4.1.3 Enzyme

Um Aufschluss über die Expression der wichtigsten Synthese- und Abbauenzyme von ECs zu erhalten, wurde die Expression von DAGL, NAPE-PLD, MAGL und FAAH mittels quantitativer RT-PCR auf Transkriptebene gemessen. Die Auswertung ergab, dass die Enzyme auf Transkriptebene in unterschiedlich starker Ausprägung nachgewiesen werden konnten (Abbildung 13A, SAbbildung 1C, Tabelle 17).

Die Analyse der Expression der Enzyme des ECSs auf Proteinebene mittels Western Blot ergab inkohärente Befunde im Vergleich zu den Ergebnissen der RT-PCR. Als Positivkontrollen dienten Extrakte vom humanen *Hippocampus*, *Cerebellum* und temporalen *Cortex*. Es zeigte sich, dass DAGL α , NAPE-PLD und MAGL nicht in *GBM #4*, *GBM #10* und *GBM #23*, aber in den vermeintlichen Positivkontrollen auf Proteinebene nachgewiesen werden konnte (Abbildung 13B). Bezüglich NAPE-PLD zeigte sich im Western Blot eine zusätzliche Bande bei ca. 100 kDa, die in den Gewebeextrakten und in *GBM #10* vorkam (Abbildung 13B). Der Western Blot gegen FAAH ergab ein unspezifisches Bandenmuster, da sowohl bei den Zellen als auch bei den Gewebeproben Banden bei etwa 40 kDa und 50 kDa unterhalb der erwarteten Molekulargröße von 60 kDa detektiert wurden (Abbildung 13B). Zusätzlich wurde die Expression von DAGL β untersucht, wobei der Western Blot ein positives Signal in den untersuchten Zellen bei der erwarteten Größe von 28 kDa zeigte (Abbildung 13B). Als interne Ladekontrolle wurde β -Aktin mit einem Molekulargewicht von 42 kDa verwendet (Abbildung 13B).

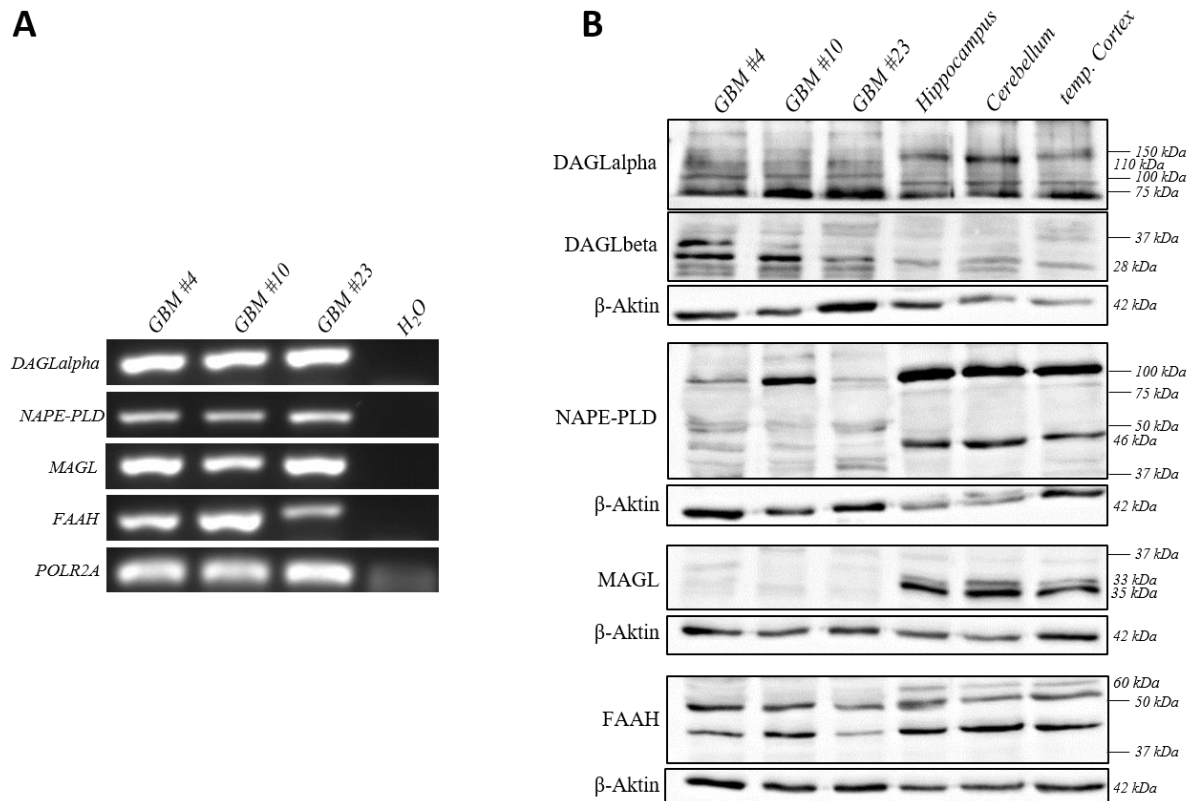


Abbildung 13: Nachweis von Enzymen des ECSs auf Transkript- und Proteinebene. A: Es wurden unbehandelte Zellen von *GBM #4*, *GBM #10* und *GBM #23* hinsichtlich der Transkriptmenge von *DAGLalpha*, *NAPE-PLD*, *MAGL* und *FAAH* mittels quantitativer RT-PCR analysiert. In allen untersuchten Glioblastomzellen konnte ein PCR-Produkt der oben genannten Gene nach gelelektrophoretischer Auftrennung nachgewiesen werden. Als internes Referenzgen diente die RNA-Polymerase II RPB1 (*POLR2A*). B: Repräsentative Western Blots zur Untersuchung von *DAGLα*, *DAGLβ*, *NAPE-PLD*, *MAGL* und *FAAH* in unbehandelten *GBM #4*, *GBM #10* und *GBM #23*. Als Positivkontrollen zur Untersuchung der Expression der Enzyme wurden Extrakte von humanen Gewebeprobe des *Hippocampus*, des *Cerebellums* und des temporalen *Cortex* mitgeführt. Für *DAGLα* erfolgte lediglich der Nachweis in den Gewebeprobe, während *DAGLβ* vor allem in den Zellen exprimiert wurde. *NAPE-PLD* wurde lediglich in den Extrakten nachgewiesen, obwohl der Western Blot eine zusätzliche Bande (100 kDa) in den Extrakten und *GBM #10* zeigte. Der Nachweis von *MAGL* erfolgte lediglich in den Extrakten. Für *FAAH* wurde ein unspezifisches Bandenmuster unterhalb der erwarteten Molekulargröße von 60 kDa in den Extrakten und Zellen generiert. Als interne Ladekontrolle diente β -Aktin mit einer Größe von 42 kDa.

Tabelle 17: Vergleich der relativen Transkriptmengen von Enzymen des ECSs Die Quantifizierung der relativen Transkriptmenge erfolgte mittels *real-time* RT-PCR und der $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Methode. Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM (relativ zur Menge in *GBM #4*) mit $n=12$ dargestellt. * $p < 0,05$ vs. *GBM #4*; # $p < 0,05$ vs. *GBM #10*

	<i>GBM #4</i>	<i>GBM #10</i>	<i>GBM #23</i>
<i>DAGLalpha</i>	1,02 \pm 0,05	2,36 \pm 0,07*	1,39 \pm 0,15*#
<i>NAPE-PLD</i>	0,88 \pm 0,07	10,92 \pm 0,73*	7,76 \pm 1,01*#
<i>MAGL</i>	1,07 \pm 0,10	0,09 \pm 0,01*	0,56 \pm 0,13*#
<i>FAAH</i>	1,05 \pm 0,10	7,89 \pm 0,40*	0,88 \pm 0,07#

4.2 Analyse der Rezeptorabhängigkeit der THC-vermittelten Abnahme Ki67⁺ Nuklei

Um den Rezeptor, der die Verringerung Ki67⁺ Nuklei nach THC Exposition vermittelt, zu eruieren, wurden pharmakologische Analysen mit verschiedenen Rezeptor-spezifischen Agonisten und Antagonisten der CB₁, CB₂, GPR18 und GPR55 Rezeptoren durchgeführt. Zur vollständigen Blockierung der Rezeptoren wurden die Zellen 15 min mit den entsprechenden Antagonisten präinkubiert. Da *GBM #23* auf eine THC Stimulation keine messbare Reaktion hinsichtlich der Anzahl Ki67⁺ Nuklei zeigte, wurden in den nachfolgenden Experimenten zur Aufklärung der Rezeptorabhängigkeit hauptsächlich *GBM #4* und *GBM #10* betrachtet.

4.2.1 Beteiligung der klassischen CB-Rezeptoren CB₁ und CB₂

Um die Rolle von CB₁ und CB₂ in der Abnahme Ki67⁺ Nuklei nach THC Stimulation zu klären, wurden selektive Antagonisten der Rezeptoren verwendet. Mit Hilfe der Antagonisten AM281 und AM630 wurde eine spezifische Blockierung des CB₁ und des CB₂ Rezeptors realisiert. Die Ergebnisse zeigten, dass in Anwesenheit beider Antagonisten der Effekt von THC sowohl in *GBM #4* als auch in *GBM #10* unverändert blieb (Abbildung 14). Die antagonistische Wirkung von AM281 und AM630 konnte bereits in früheren Arbeiten nachgewiesen werden, in denen die Effekte von hoch selektiven Liganden von CB₁ (ACEA) und CB₂ (JWH133) signifikant aufgehoben wurden [185,187,188]. Somit zeigen die Ergebnisse, dass THC unabhängig von CB₁ und/oder CB₂ den Anteil Ki67⁺ Nuklei in *GBM #4* und *GBM #10* reduzierte.

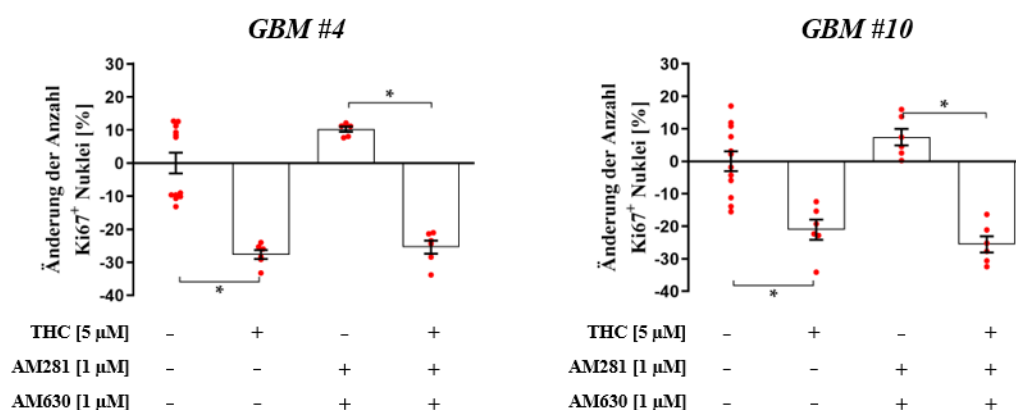


Abbildung 14: Einfluss von AM281 (CB₁) und AM630 (CB₂) auf die Anzahl Ki67⁺ Nuklei in THC-behandelten Glioblastomzellen. Gezeigt ist die prozentuale Änderung der Anzahl Ki67⁺ Nuklei bezogen auf die unbehandelte Kontrollgruppe von *GBM #4* und *GBM #10*. Eine signifikante Abnahme Ki67⁺ Nuklei konnte nach THC Applikation in *GBM #4* und *GBM #10* festgestellt werden. Der THC Effekt wurde durch eine Vorbehandlung mit den Antagonisten AM281 und AM630 nicht beeinflusst. Die Daten repräsentieren Mittelwerte ± SEM von N=3 unabhängigen Experimenten, die in Doppelbestimmung durchgeführt wurden. Signifikanz (*) wurde für p<0,05 gewählt.

4.2.2 Beteiligung des orphanen CB-Rezeptors GPR18

Es ist bekannt, dass THC als Agonist über GPR18 wirken kann [117]. Um zu analysieren, ob GPR18 für die Signalweiterleitung verantwortlich ist, wurden Experimente durchgeführt, bei denen GPR18 mit Hilfe des Antagonisten O-1918 blockiert wurde. O-1918 wurde in einer Konzentration von 30 μM verwendet [193]. Die Behandlung der Zellen mit O-1918, hatte keinen Einfluss auf die THC-induzierte Abnahme Ki67⁺ Nuklei in *GBM #4* und *GBM #10* (Abbildung 15). Im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe blieb der Anteil Ki67⁺ Nuklei nach Einzelstimulation mit O-1918 unverändert (Abbildung 15). Die Ergebnisse schließen somit eine Beteiligung von GPR18 an der Wirkung von THC aus.

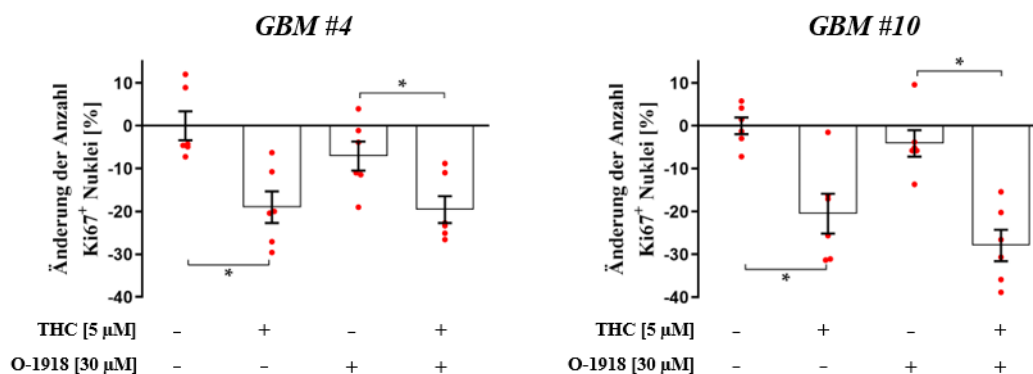


Abbildung 15: Einfluss von O-1918 (GPR18) auf die Anzahl Ki67⁺ Nuklei in THC-behandelten Glioblastomzellen. Gezeigt ist die prozentuale Änderung der Anzahl Ki67⁺ Nuklei bezogen auf die unbehandelte Kontrollgruppe von *GBM #4* und *GBM #10*. Nach THC Stimulation konnte eine signifikante Verringerung Ki67⁺ Nuklei in *GBM #4* und *GBM #10* nachgewiesen werden. Eine Vorbehandlung mit O-1918 nahm keinen Einfluss auf die Wirksamkeit von THC die Anzahl Ki67⁺ Nuklei in beiden Zellen zu reduzieren. Veränderungen der Verteilung Ki67⁺ Nuklei nach Einzelapplikation von O-1918 wurden nicht festgestellt. Die Daten repräsentieren Mittelwerte \pm SEM von N=3 unabhängigen Experimenten, die in Doppelbestimmung durchgeführt wurden. Signifikanz (*) wurde für $p < 0,05$ gewählt.

4.2.3 Beteiligung des orphanen CB-Rezeptors GPR55

Zur Evaluierung der Beteiligung von GPR55 an der Reduktion Ki67⁺ Nuklei nach THC Applikation wurden zwei verschiedene Strategien angewendet. Zum einen sollte die Wirksamkeit von THC in Anwesenheit eines potenten und hoch selektiven GPR55 Antagonisten untersucht werden. Zum anderen wurde der Einfluss einer spezifischen Aktivierung von GPR55 durch die Verwendung seines endogenen Agonisten LPI determiniert.

Für die optimale Antagonisierung von GPR55 wurde der synthetische und potente Antagonist CID16020046 (CID) in einer aufsteigenden Konzentrationsreihe (1 μ M; 5 μ M und 10 μ M) verwendet. Die Vorbehandlung der Zellen *GBM #4* und *GBM #10* mit CID ergab, dass die Abnahme Ki67⁺ Nuklei in THC-behandelten Zellen nicht durch die Applikation von 1 μ M CID, aber ab einer Konzentration von 5 μ M CID signifikant blockiert wurde (Abbildung 16A). Eine vollständige Inhibierung konnte nach der Applikation von 10 μ M CID in beiden Zellen erzielt werden (Abbildung 16A). Unabhängig von den verwendeten Konzentrationen zeigte CID allein keinen Einfluss auf die Anzahl Ki67⁺ Nuklei in *GBM #4* und *GBM #10* (Abbildung 16A), sowie *GBM #23* (SAbbildung 3A). Es ist anzumerken, dass THC auch in Anwesenheit von CID keine Wirkung auf die Anzahl Ki67⁺ Nuklei in *GBM #23* aufwies (SAbbildung 3A). Diese Daten geben Aufschluss, dass die Wirkung von THC über GPR55 vermittelt wurde.

Da in früheren Studien in Bezug auf Cannabinoide von einem biphasischen Wirkmechanismus berichtet wurde [194], wurden die Zellen von *GBM #4* und *GBM #10* zusätzlich neben 5 μ M mit 0,1 μ M; 1 μ M und 10 μ M THC in An- und Abwesenheit des GPR55 Antagonisten CID behandelt. Für eine vollständige Blockierung von GPR55 wurden 10 μ M CID eingesetzt. Die Anzahl Ki67⁺ Nuklei wurde sowohl in *GBM #4* als auch *GBM #10* durch die Zugabe von THC signifikant verringert, wobei die Auswirkungen bei der Behandlung mit 0,1 μ M und 1 μ M geringer als mit 5 μ M und 10 μ M THC ausgeprägt waren (Abbildung 16B). Unabhängig von den verwendeten Konzentrationen wurden die THC Effekte auch in Gegenwart von CID wirksam aufgehoben, sodass für THC eine biphasische Wirkung ausgeschlossen werden konnte (Abbildung 16B).

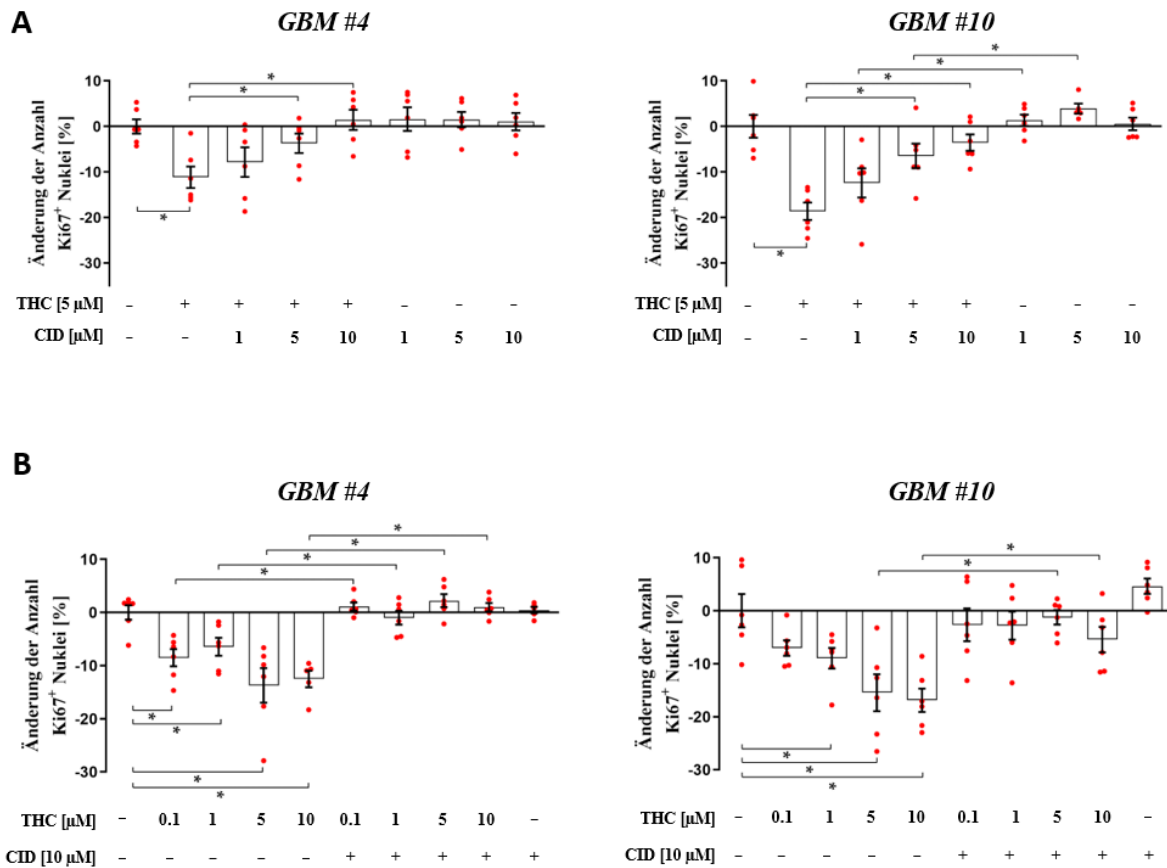


Abbildung 16: Einfluss von CID (GPR55) auf die Anzahl Ki67⁺ Nuklei in THC-behandelten Glioblastomzellen. Gezeigt ist die prozentuale Änderung der Anzahl Ki67⁺ Nuklei bezogen auf die unbehandelte Kontrollgruppe von *GBM #4* und *GBM #10*. A: Nach THC Applikation konnte eine signifikante Abnahme Ki67⁺ Nuklei in *GBM #4* und *GBM #10* beobachtet werden. Die reduzierende Wirkung von THC auf die Anzahl Ki67⁺ Nuklei von *GBM #4* und *GBM #10* wurde in Anwesenheit des selektiven GPR55 Antagonisten CID ab einer Konzentration von 5 μM signifikant blockiert. Eine vollständige Blockierung von GPR55 konnte nach Stimulation mit 10 μM CID festgestellt werden, da im Vergleich zu den Gruppen, die nur mit 1 μM oder 5 μM CID behandelt wurden, THC dennoch zu einer signifikanten Abnahme Ki67⁺ Nuklei führte. Die Einzelstimulation mit CID nahm keinen Einfluss auf die Verteilung Ki67⁺ Nuklei, unabhängig der verwendeten Konzentrationen. B: Im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe führte die Applikation steigender THC Konzentrationen (0,1 μM – 10 μM) über 24 h zu einer signifikanten Verringerung von Ki67⁺ Nuklei in *GBM #4* und *GBM #10*. Die reduzierende Wirkung wurde durch die simultane Gabe von 10 μM CID signifikant aufgehoben. CID allein bewirkte keinerlei Veränderungen. Die Daten repräsentieren Mittelwerte ± SEM von N=3 unabhängigen Experimenten, die in Doppelbestimmung durchgeführt wurden. Signifikanz (*) wurde für p<0,05 gewählt.

LPI wurde in früheren Arbeiten als spezifischer GPR55 Agonist identifiziert [144]. Die Anzahl Ki67⁺ Nuklei nach spezifischer GPR55 Aktivierung durch LPI sollte im Folgenden bestimmt werden. Anhand einer bereits publizierten Arbeit wurde für die folgenden Versuche eine LPI-Konzentration von 1 μ M gewählt [154]. Ähnlich wie für THC konnte eine signifikante Verringerung der Anzahl Ki67⁺ Nuklei nach Zugabe von 1 μ M LPI in *GBM #4* und *GBM #10* beobachtet werden (Abbildung 17A-C). Dagegen hatte LPI keine Effekte auf die Anzahl Ki67⁺ Nuklei in *GBM #23* (SAbbildung 3). Eine Ko-Stimulation mit CBD führte zu einer signifikanten Inhibierung der LPI Effekte in *GBM #4* und *GBM #10* (Abbildung 17A). CBD allein bewirkte keine Veränderungen (Abbildung 17A). Diese Daten lassen vermuten, dass CBD als Antagonist an GPR55 wirkte.

Die Spezifität von LPI sollte zusätzlich mit Hilfe einer aufsteigenden Konzentrationsreihe des selektiven GPR55-Antagonisten CID evaluiert werden. Ab einer CID Konzentration von 5 μ M wurde die Abnahme Ki67⁺ Nuklei in LPI-behandelten Zellen von *GBM #4* und *GBM #10* signifikant aufgehoben, was eine Beteiligung von GPR55 bestätigt (Abbildung 17B). In *GBM #23* wurde auch in Anwesenheit von CID keine Veränderungen der LPI Responsivität beobachtet (SAbbildung 3).

Weiterhin sollte geklärt werden, ob mit einer Ko-Stimulation von LPI mit THC additive oder inhibierende Effekte erzielt werden können. Wie bereits erwähnt, verringerten die Einzelstimulationen von LPI und THC die Anzahl Ki67⁺ Nuklei in *GBM #4* und *GBM #10* im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe (Abbildung 17C). Unabhängig von der Reihenfolge der Zugabe bei simultaner Inkubation, entwickelten LPI und THC gemeinsam keine additiven oder inhibierenden Effekte aufeinander (Abbildung 17C).

LPI entfaltete in dieser Arbeit in Bezug auf die Anzahl Ki67⁺ Nuklei ein ähnliches Wirkmuster wie THC und erwies somit die GPR55-Abhängigkeit der THC Effekte. Daher wurde in den nachfolgenden Experimente LPI als Positivkontrolle mitgeführt, um die Effekte von LPI und THC miteinander vergleichen zu können.

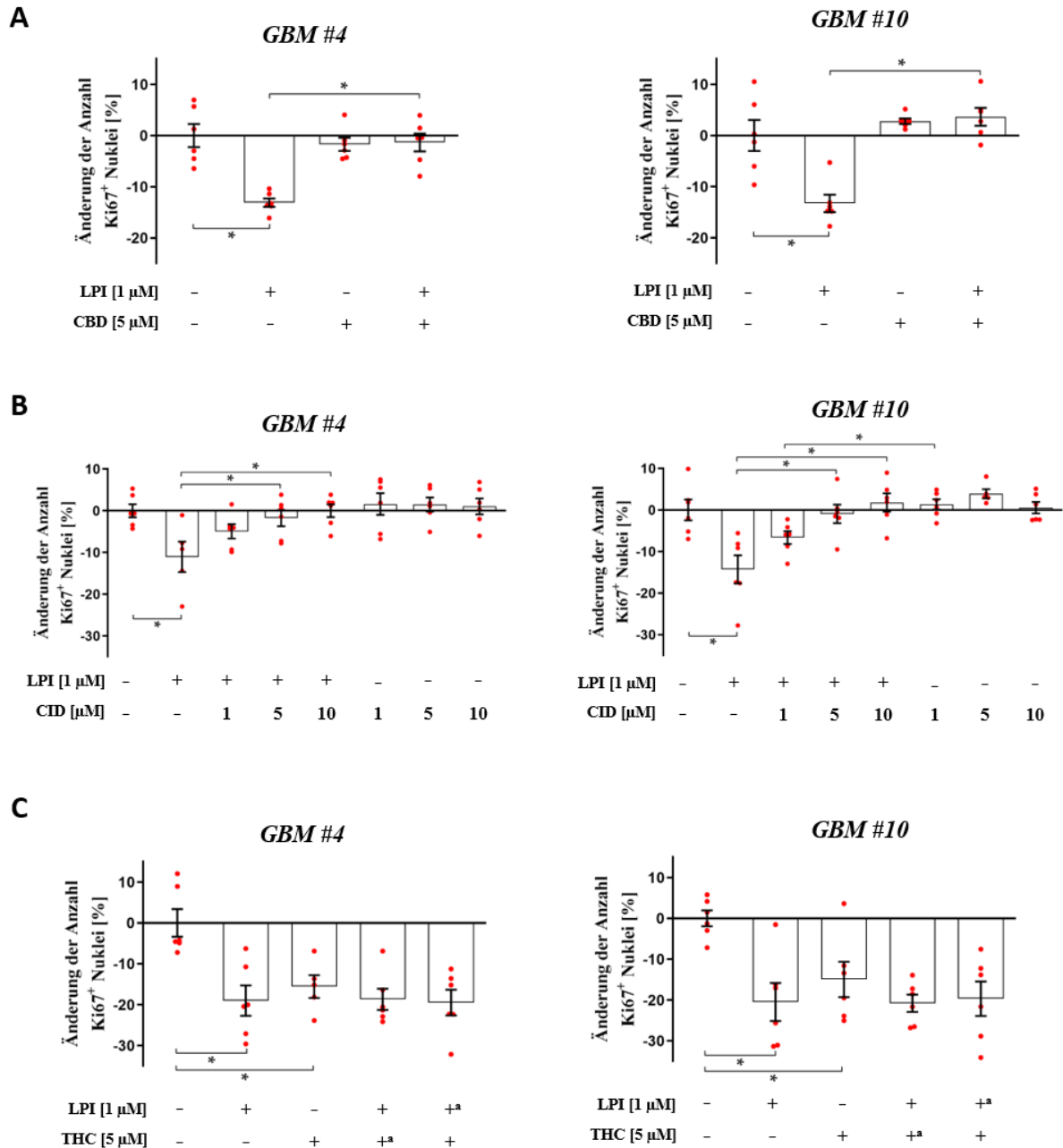


Abbildung 17: Einfluss von LPI auf die Anzahl Ki67⁺ Nuklei. Gezeigt ist die prozentuale Änderung der Anzahl Ki67⁺ Nuklei bezogen auf die unbehandelte Kontrollgruppe von *GBM #4* und *GBM #10* nach LPI Applikation in Anwesenheit von CBD (A), CID (B) und THC (C). A: Die Behandlung der Zellen mit 1 µM LPI führte zu einer signifikanten Verringerung Ki67⁺ Nuklei in *GBM #4* und *GBM #10*. In *GBM #4* und *GBM #10* führte die Anwesenheit von CBD zu einer signifikanten Inhibierung des LPI Effekts. CBD allein wies keinerlei Wirkung auf die Anzahl Ki67⁺ Nuklei in den untersuchten Glioblastomzellen auf. B: Die Stimulation von *GBM #4* und *GBM #10* mit LPI führte zu einer signifikanten Abnahme Ki67⁺ Nuklei innerhalb von 24 h. In Anwesenheit von 5 µM und 10 µM CID wurden die LPI Effekte signifikant aufgehoben. 1 µM CID war nicht ausreichend, um den LPI Effekt effektiv zu blockieren. CID allein induzierte keinerlei Veränderungen. C: Sowohl 1 µM LPI als auch 5 µM THC führten zu einer signifikanten Abnahme Ki67⁺ Nuklei in *GBM #4* und *GBM #10*. Im Vergleich zu LPI- bzw. THC-behandelten Zellen wies eine simultane Inkubation von LPI und THC weder auf additiven noch auf inhibierenden Effekte hin, unabhängig in welcher Reihenfolge die Substanzen appliziert wurden. Bei den Kombinationsbehandlungen erfolgte eine 15-minütige Vorinkubation mit THC oder LPI (+^a). Die Daten repräsentieren Mittelwerte ± SEM von N=3 unabhängigen Experimenten, die in Doppelbestimmung durchgeführt wurden. Signifikanz (*) wurde für p<0,05 gewählt.

4.3 Analyse der Beteiligung GPR55-assoziierter Signalkaskaden an der THC- und LPI-vermittelten Abnahme Ki67⁺ Nuklei

Zur Analyse, ob sich die GPR55-vermittelten Effekte durch die pharmakologische Hemmung GPR55-assoziierter Signalwege modulieren lassen, wurden Kombinationsbehandlungen mit verschiedenen Substanzen durchgeführt, die gezielt nachgeschaltete Effektoren von GPR55 blockieren. Zytotoxische Effekte verwendeter Inhibitoren konnten mittels des MTT-Viabilitätstests ausgeschlossen werden (SAbbildung 4).

4.3.1 G-Proteine

GPR55 gehört zu den GPCRs und interagiert bevorzugt mit $G\alpha_{12/13}$ - oder $G\alpha_q$ -Proteinen [175], kann aber auch die Signalweiterleitung nach Heterodimerisierung mit anderen Rezeptoren über $G\alpha_{o/i}$ -Proteine induzieren [195,196].

Zunächst wurden die Zellen hinsichtlich der Expressionen verschiedener $G\alpha$ -Untereinheiten auf Transkriptebene umfassend charakterisiert. Die Auswertung der RT-PCR ergab, dass die untersuchten $G\alpha$ -Untereinheiten nachgewiesen werden konnten (Abbildung 18). Es ist weiterhin zu erkennen, dass in jeder der betrachteten Zellen eine annähernd ähnliche Zusammenstellung der untersuchten Gene zu finden ist. So waren beispielsweise *GNAI2* sowie *GNASS* und *GNASL* am stärksten vertreten, während *GNAI1* und *GNAI2* vergleichsweise eher schwach exprimiert wurden (SAbbildung 1D). Es konnte lediglich eine signifikant höhere Menge von *GNAO1* in *GBM #4* und von *GNAQ* in *GBM #10* festgestellt werden (SAbbildung 1D, Tabelle 18). Die Daten weisen auf fehlende Unterschiede in der Expression $G\alpha$ -Untereinheiten hin, welche nicht die Zelltyp-abhängige aber ähnliche Responsivität auf THC und LPI in *GBM #4* und *GBM #10* erklären könnten.

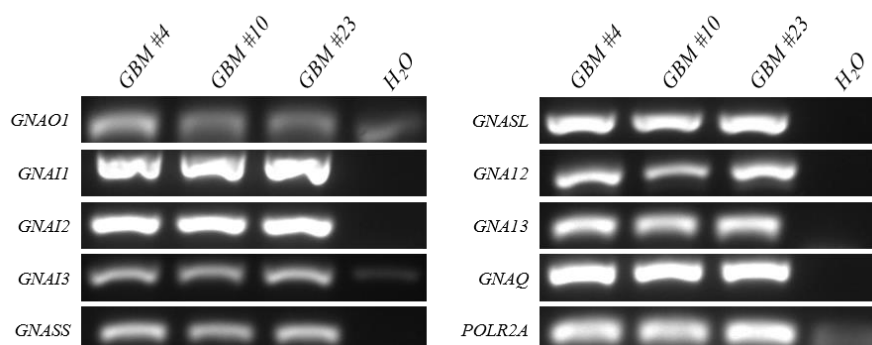


Abbildung 18: Nachweis der Transkripte von verschiedenen $G\alpha$ -Untereinheiten. Es wurden unbehandelte Zellen von *GBM #4*, *GBM #10* und *GBM #23* hinsichtlich der Transkriptmenge von *GNAO1*, *GNAI1*, *GNAI2*, *GNAI3*, *GNASS*, *GNASL*, *GNAI2*, *GNAI3* und *GNAQ* mittels quantitativer RT-PCR analysiert. In allen untersuchten Glioblastomzellen konnte ein PCR-Produkt der oben genannten Gene nach gelelektrophoretischer Auftrennung nachgewiesen werden. Als internes Referenzgen diente die RNA-Polymerase II RPB1 (*POLR2A*).

Tabelle 18: Vergleich der relativen Transkriptmengen von verschiedenen G α -Untereinheiten (G α -UE). Die Quantifizierung der relativen Transkriptmenge erfolgte mittels *real-time* RT-PCR und der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode. Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM (relativ zur Menge in *GBM #4*) mit $n=12$ dargestellt. * $p < 0,05$ vs. *GBM #4*; # $p < 0,05$ vs. *GBM #10*

		<i>GBM #4</i>	<i>GBM #10</i>	<i>GBM #23</i>
G$\alpha_{o/i}$-UE	<i>GNO1</i>	1,02 \pm 0,06	0,15 \pm 0,02*	0,18 \pm 0,03*
	<i>GNAI1</i>	1,10 \pm 0,12	2,04 \pm 0,25*	1,10 \pm 0,18#
	<i>GNAI2</i>	1,01 \pm 0,03	1,13 \pm 0,05*	1,01 \pm 0,05
	<i>GNAI3</i>	1,02 \pm 0,06	0,58 \pm 0,04*	0,76 \pm 0,08*#
Gα_s-UE	<i>GNASS</i>	1,01 \pm 0,04	0,69 \pm 0,03*	1,12 \pm 0,08#
	<i>GNASL</i>	1,03 \pm 0,07	0,69 \pm 0,04*	1,01 \pm 0,15#
G$\alpha_{12/13}$-UE	<i>GNAI2</i>	1,05 \pm 0,92	0,35 \pm 0,04*	0,62 \pm 0,12*
	<i>GNAI3</i>	1,03 \pm 0,07	0,90 \pm 0,07	1,09 \pm 0,10
Gα_q-UE	<i>GNAQ</i>	1,12 \pm 0,16	14,96 \pm 2,12*	1,42 \pm 0,29#

Eine Beteiligung von G $\alpha_{o/i}$ -Proteinen an der Regulation des Anteils Ki67⁺ Nuklei in THC und LPI-exponierten Glioblastomzellen wurde unter Verwendung von Pertussis Toxin (PTX) untersucht. PTX hemmt die Rezeptor-vermittelte Signalweiterleitung über eine irreversible ADP-Ribosylierung der G α -Untereinheiten [197]. Die Auswertung ergab, dass die Zugabe von PTX keine Inhibierung der THC und LPI Effekte in *GBM #4* und *GBM #10* bewirkte. Ferner führte PTX selbst zu einer reduzierten Anzahl Ki67⁺ Nuklei (Abbildung 19A-B). Darüber hinaus konnte nach einer Ko-Stimulation mit THC bzw. LPI kein additiver Effekt beobachtet werden (Abbildung 19A-B). In *GBM #23* blieb der Anteil Ki67⁺ Nuklei nach PTX-Zugabe unverändert (SAbbildung 3D). Da PTX selbst einen Effekt auf die Anzahl Ki67⁺ Nuklei aufwies, lassen die Ergebnisse keine klare Aussage über die Beteiligung von G $\alpha_{o/i}$ Proteinen an der Signalweiterleitung nach THC und LPI Stimulation zu.

Die Adenylat-Zyklase (AC) bleibt rückwirkend durch die PTX-vermittelte Inhibierung von G $\alpha_{o/i}$ -Proteinen ungehindert aktiviert. Deshalb sollte im Weiteren überprüft werden, ob eine gesteigerte AC Aktivität für die reduzierten Anteile Ki67⁺ Nuklei nach PTX Stimulation verantwortlich sein könnte. Hierfür wurden die Zellen mit Forskolin (FSK), einem AC-Stimulator, in einer aufsteigenden Konzentrationsreihe (0,1 μ M; 1 μ M; 5 μ M; 10 μ M und 30 μ M) behandelt. In *GBM #4* und *GBM #10* führte FSK zu einer Konzentrations-abhängigen Abnahme Ki67⁺ Nuklei (Abbildung 19C). Im Gegensatz dazu blieb FSK in *GBM #23* weitestgehend unwirksam, nur die Behandlung mit 30 μ M FSK verursachte eine signifikante Zunahme Ki67⁺ Nuklei (SAbbildung 3E). Die gemessenen Veränderungen stimmen mit den Beobachtungen nach PTX Stimulation überein. Die Daten suggerieren, dass eine Stimulation

der AC über i) eine Inhibierung von $G\alpha_{o/i}$ durch PTX und über ii) eine direkte Aktivierung mit FSK zu einer verringerten Anzahl $Ki67^+$ Nuklei führen könnte. Eine Regulation des Anteils $Ki67^+$ Nuklei durch THC bzw. LPI über die Aktivierung von $G\alpha_{o/i}$ und einer $G\alpha_{o/i}$ -assoziierten AC-Inhibierung scheint daher unwahrscheinlich.

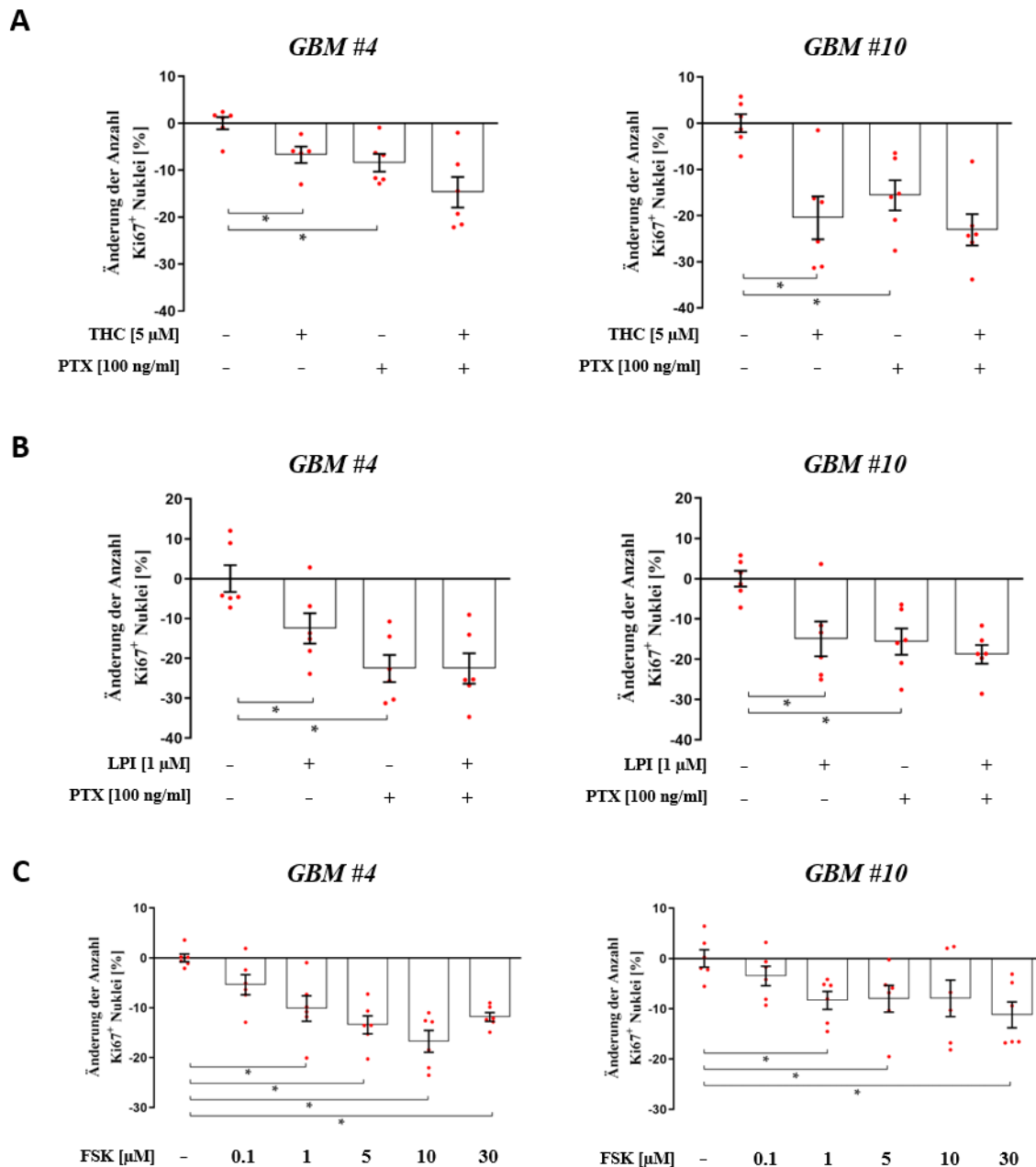


Abbildung 19: Einfluss von Pertussis Toxin (PTX, $G\alpha_{o/i}$ -Inhibitor) auf die Anzahl $Ki67^+$ Nuklei in THC- und LPI-behandelten Glioblastomzellen. A-B: Gezeigt ist die prozentuale Änderung der Anzahl $Ki67^+$ Nuklei bezogen auf die unbehandelte Kontrollgruppe von *GBM #4* und *GBM #10*. Eine signifikante Abnahme $Ki67^+$ Nuklei konnte nach THC (A) und LPI (B) Applikation in *GBM #4* und *GBM #10* festgestellt werden. Auch nach Einzelstimulation der Zellen mit PTX konnte in *GBM #4* und *GBM #10* eine signifikante Abnahme $Ki67^+$ Nuklei festgestellt werden. Ko-Stimulationen von THC (A) bzw. LPI (B) mit PTX zeigten weder eine inhibierende Wirkung von PTX auf die THC- bzw. LPI-vermittelten Effekte noch konnten additive Effekte gemessen werden. C: Gezeigt ist die prozentuale Änderung der Anzahl $Ki67^+$ Nuklei bezogen auf die unbehandelte Kontrollgruppe von *GBM #4* und *GBM #10* nach Stimulation mit FSK (0,1 μ M; 1 μ M; 5 μ M; 10 μ M und 30 μ M). In *GBM #4* und *GBM #10* wurde der Anteil $Ki67^+$ Nuklei nach FSK Applikation Konzentrations-abhängig reduziert. Die Daten repräsentieren Mittelwerte \pm SEM von N=3 unabhängigen Experimenten, die in Doppelbestimmung durchgeführt wurden. Signifikanz (*) wurde für $p < 0,05$ gewählt.

Da GPCRs nicht nur durch die Freisetzung von $G\alpha$ - sondern auch von $G\beta\gamma$ -Untereinheiten Signale generieren können, wurde im Nachfolgenden untersucht, ob $G\beta\gamma$ -Untereinheiten an der GPR55-vermittelten Abnahme $Ki67^+$ Nuklei beteiligt sein könnten. Eine gezielte Inhibierung von $G\beta\gamma$ wurde mit Hilfe von Gallein (1 μ M und 10 μ M), das an $G\beta\gamma$ bindet und die $G\beta\gamma$ -Signalübertragung an Effektoren unterbricht, realisiert. Die Vorbehandlung mit Gallein führte in *GBM #4* zu einer signifikanten Aufhebung der THC- und LPI-vermittelten Effekte (Abbildung 20A-B). Eine Einzelstimulation mit Gallein nahm keinen Einfluss auf die Anzahl $Ki67^+$ Nuklei (Abbildung 20A-B). Im Gegensatz dazu blieben die Effekte von THC und LPI auf *GBM #10* auch in Anwesenheit von Gallein, unabhängig der verwendeten Konzentrationen, erhalten (Abbildung 20A-B). Insgesamt zeigen die Daten, dass THC und LPI zum einen $G\beta\gamma$ -abhängig (*GBM #4*) und zum anderen $G\beta\gamma$ -unabhängig (*GBM #10*) die Anzahl $Ki67^+$ Nuklei reduzierten.

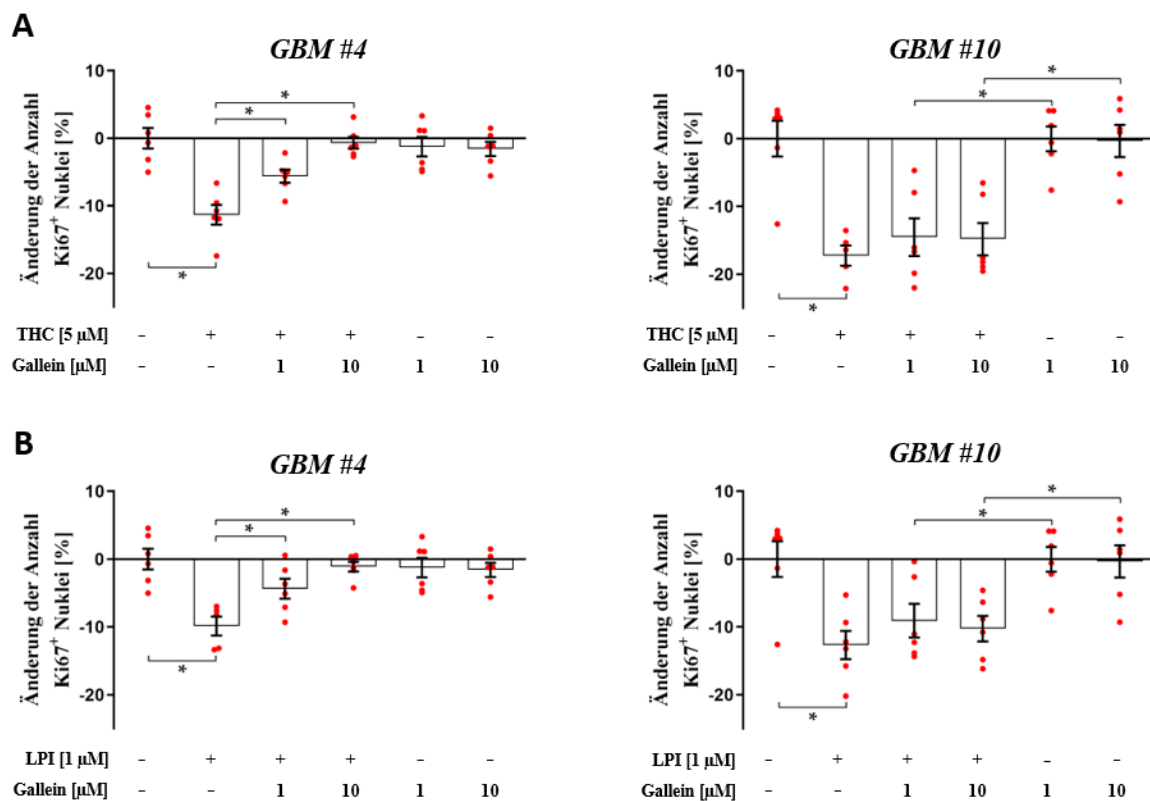


Abbildung 20: Einfluss von Gallein ($G\beta\gamma$ -Inhibitor) auf die Anzahl $Ki67^+$ Nuklei in THC- und LPI-behandelten Glioblastomzellen. A-B: Gezeigt ist die prozentuale Änderung der Anzahl $Ki67^+$ Nuklei bezogen auf die unbehandelte Kontrollgruppe von *GBM #4* und *GBM #10*. Eine signifikante Abnahme $Ki67^+$ Nuklei konnte nach THC (A) und LPI (B) Applikation in *GBM #4* und *GBM #10* festgestellt werden. Die Effekte von THC (A) und LPI (B) wurden in *GBM #4* durch eine Vorbehandlung mit Gallein (1 μ M; 10 μ M) signifikant inhibiert. In *GBM #10* blieben die THC- (A) und LPI-(B) vermittelte Abnahme $Ki67^+$ Nuklei in Anwesenheit von Gallein unverändert. Gallein selbst verursachte keine Veränderungen. Die Daten repräsentieren Mittelwerte \pm SEM von N=3 unabhängigen Experimenten, die in Doppelbestimmung durchgeführt wurden. Signifikanz (*) wurde für $p < 0,05$ gewählt.

4.3.2 RhoA-ROCK-Signalweg

Da eine Stimulation von GPR55 mit einer Aktivierung des RhoA-ROCK Signalweges einhergeht [176], wurde unter Verwendung des spezifischen ROCK-Inhibitors Y-27632 überprüft, ob dieser Signalweg an der Abnahme Ki67⁺ Nuklei nach THC und LPI Applikation involviert sein könnte. Die Vorbehandlung der Zellen mit Y-27632 erfolgte in einer aufsteigenden Konzentrationsreihe (10 μ M; 30 μ M und 50 μ M). Es zeigte sich, dass die Wirkung von THC und LPI auf *GBM #4* nicht durch Y-27632, unabhängig der verwendeten Konzentration, beeinflusst wurde (Abbildung 21). Zusätzlich ist anzumerken, dass hohe Konzentrationen von Y-27632 (30 μ M und 50 μ M) die Anzahl Ki67⁺ Nuklei signifikant in *GBM #4* verringerten (Abbildung 21). Eine inhibierende Wirkung von Y-27632 konnte ab einer Konzentration von 30 μ M auf die Responsivität von *GBM #10* auf THC und LPI festgestellt werden (Abbildung 21A-B). Eine Einzelstimulation mit Y-27632 nahm keinen Einfluss auf die Anzahl Ki67⁺ Nuklei. Diese Daten lassen vermuten, dass die Abnahme Ki67⁺ Nuklei nach THC bzw. LPI Stimulation zum einen auf einer ROCK-unabhängigen (*GBM #4*) und zum anderen auf einer ROCK-abhängigen (*GBM #10*) Signaltransduktion beruht.

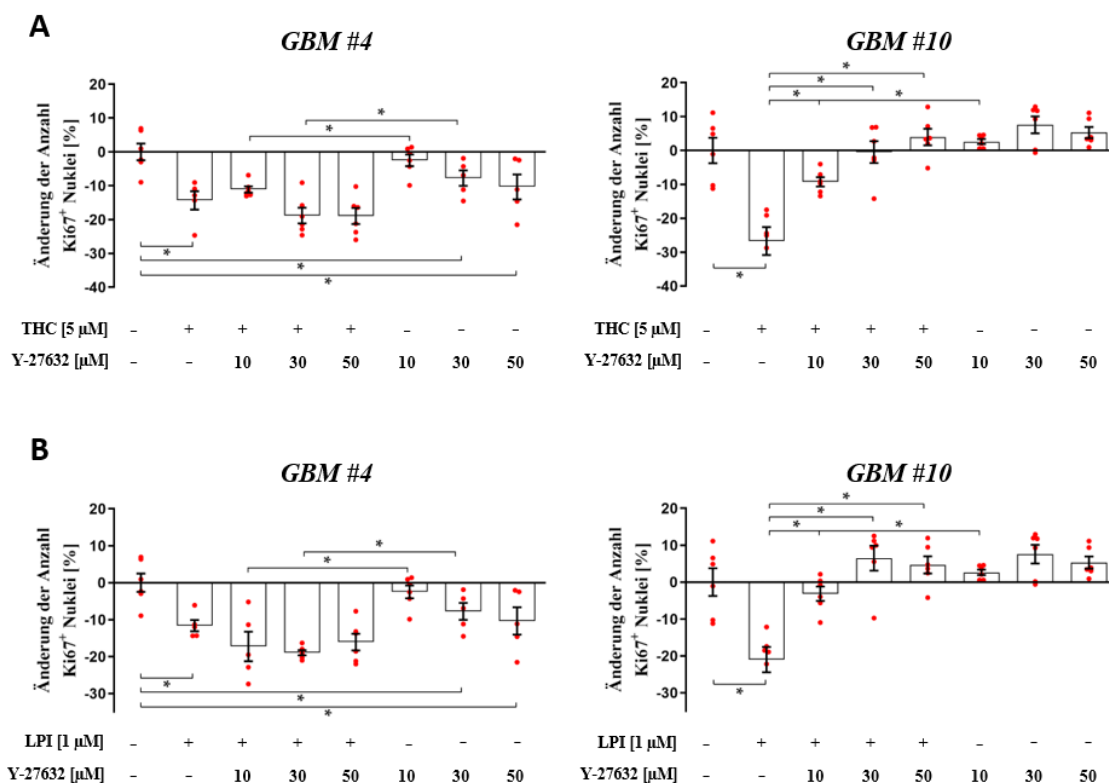


Abbildung 21: Einfluss von Y-27632 (ROCK-Inhibitor) auf die Anzahl Ki67⁺ Nuklei in THC- und LPI-behandelten Glioblastomzellen. Die prozentuale Änderung der Anzahl Ki67⁺ Nuklei bezogen auf die unbehandelte Kontrollgruppe von *GBM #4* und *GBM #10*. Eine signifikante Abnahme Ki67⁺ Nuklei konnte nach THC (A) oder LPI (B) Applikation in *GBM #4* und *GBM #10* festgestellt werden. Die Effekte von THC (A) und LPI (B) blieben auch nach der Vorbehandlung von *GBM #4* mit Y-27632 unverändert. Sowohl eine Einzelstimulation mit 30 μ M als auch 50 μ M Y-27632 verringerte die Anzahl Ki67⁺ Nuklei. In *GBM #10* führte eine Vorbehandlung der Zellen mit Y-27632 zu einer signifikanten Inhibierung der Effekte, die nach Applikation von THC (A) oder LPI (B) beobachtet wurden. Y-27632 allein nahm keinen Einfluss auf die Anzahl Ki67⁺ Nuklei. Die Daten repräsentieren Mittelwerte \pm SEM von N=3 unabhängigen Experimenten, die in Doppelbestimmung durchgeführt wurden. Signifikanz (*) wurde für $p < 0,05$ gewählt.

4.3.3 PLC-IP3-Signalweg

Um festzustellen, ob eine Aktivierung von PLC in den THC- und LPI-medierten Effekten involviert sein könnte, wurde der selektive PLC-Inhibitor U73122 verwendet. Vorversuche ergaben, dass Konzentrationen ab 5 μM stark toxisch auf die Zellen wirkten. Eine Vorbehandlung mit U73122 verursachte ab einer sehr geringen Konzentration von 0,1 μM eine vollständige Inhibierung der THC- bzw. LPI-induzierten Abnahme Ki67⁺ Nuklei sowohl in *GBM #4* als auch in *GBM #10* (Abbildung 22A+C). Nach einer Einzelstimulation mit U73122 blieb der Anteil Ki67⁺ Nuklei in beiden Zelllinien unverändert (Abbildung 22A+C). Im Gegensatz dazu zeigte U73343, die inaktive Form von U73122, keine inhibierende Wirkung auf die gemessenen THC und LPI Effekte in *GBM #4* und *GBM #10* (Abbildung 22B+D). Die Ergebnisse zeigen, dass THC und LPI sowohl in *GBM #4* als auch in *GBM #10* über einen PLC-abhängigen Signalweg die Abnahme Ki67⁺ Nuklei induzierten.

Bei der PLC-vermittelten Hydrolyse von Membran-gebundenem PIP₂ entstehen DAG und IP₃, welche anschließend als *second messenger* wirken. IP₃ bindet dabei an einen IP₃-sensitiven Rezeptor, welcher in der ER-Membran lokalisiert ist [198]. Um zu analysieren, ob IP₃ an der Signaltransduktion beteiligt sein könnte, wurde der korrespondierende IP₃-sensitive Rezeptor mit Hilfe des Antagonisten 2-APB blockiert. 2-APB wurde in einer aufsteigenden Konzentrationsreihe (10 μM ; 50 μM und 100 μM) eingesetzt. In *GBM #4* wurde durch die Vorbehandlung mit 10 μM 2-APB die Abnahme Ki67⁺ Nuklei in THC- und LPI-behandelten Zellen signifikant aufgehoben (Abbildung 23A-B). 50 μM und 100 μM 2-APB dagegen nahmen keinen Einfluss auf die THC- und LPI-vermittelten Effekte, was auf die signifikante Verringerung der Anzahl Ki67⁺ Nuklei bei den dazugehörigen Einzelstimulationen von 2-APB zurückzuführen ist (Abbildung 23A-B). Dagegen resultierte die Applikation sowohl von 10 μM als auch von 50 μM 2-APB in einer signifikanten Inhibierung der THC und LPI Effekte in *GBM #10*. 2-APB allein bewirkte in diesen Konzentrationen keine Veränderungen (Abbildung 23A-B). Allerdings verringerte die Einzelstimulation mit 100 μM 2-APB den Anteil Ki67⁺ Nuklei, sodass diese in THC- und LPI-behandelten Zellen nachweislich keinen inhibierenden Effekt aufwies (Abbildung 23A-B). Insgesamt lassen die Daten vermuten, dass IP₃ und die Aktivierung des IP₃-sensitiven Rezeptors an der Signalweiterleitung nach THC und LPI Stimulation involviert sind.

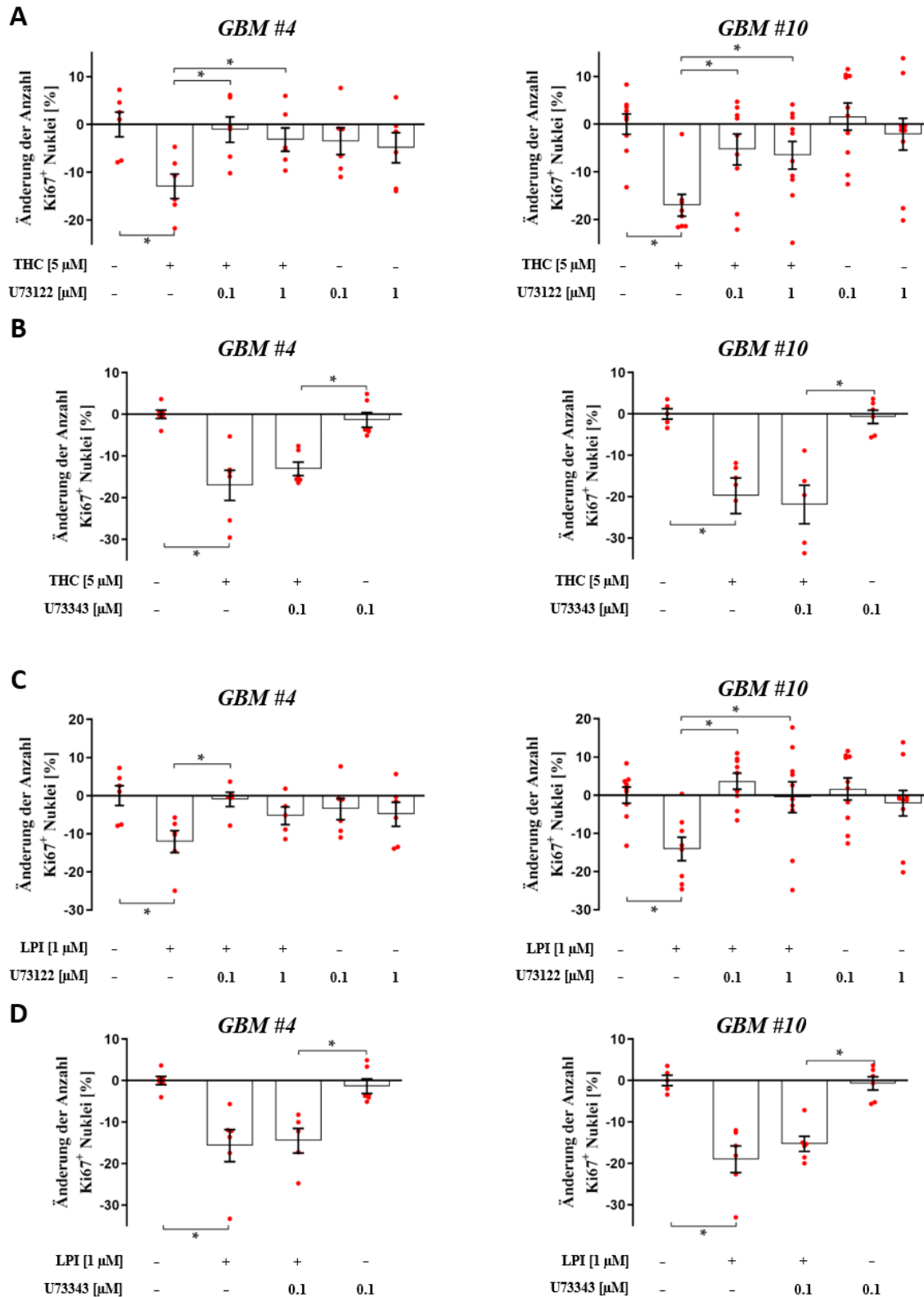


Abbildung 22: Einfluss von U73122 (PLC-Inhibitor) und U73343 (inaktive Form von U73122) auf die Anzahl Ki67⁺ Nuklei in THC- und LPI-behandelten Glioblastomzellen. A-D: Gezeigt ist die prozentuale Änderung der Anzahl Ki67⁺ Nuklei bezogen auf die unbehandelte Kontrollgruppe von *GBM #4* und *GBM #10*. Eine signifikante Abnahme Ki67⁺ Nuklei konnte nach THC (A-B) und LPI (C-D) Applikation in *GBM #4* und *GBM #10* festgestellt werden. Die Vorbehandlung mit 0,1 μM und 1 μM U73122 führte zu einer signifikanten Aufhebung der THC- (A) und LPI- (C) mediierten Effekte in *GBM #4* und *GBM #10*. Eine Einzelstimulation mit U73122 führte zu keinerlei Veränderungen. 0,1 μM U73343 zeigte keine inhibierende Wirkung auf die gemessenen Effekte von THC (B) und LPI (D). Die Daten repräsentieren Mittelwerte ± SEM von N=3 unabhängigen Experimenten, die in Doppelbestimmung durchgeführt wurden. Signifikanz (*) wurde für p<0,05 gewählt.

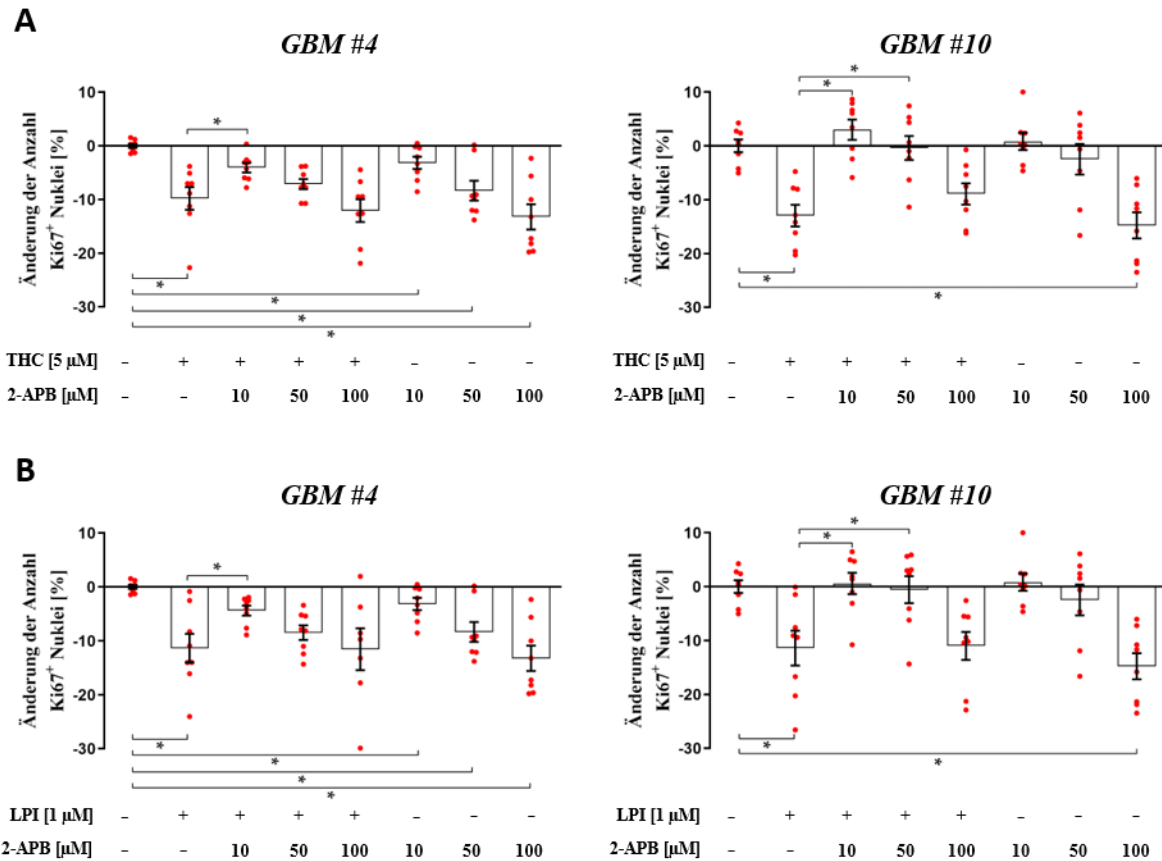


Abbildung 23: Einfluss von 2-APB (Inhibitor des IP3-sensitiven Rezeptors) auf die Anzahl Ki67⁺ Nuklei in THC- und LPI-behandelten Glioblastomzellen. A-B: Gezeigt ist die prozentuale Änderung der Anzahl Ki67⁺ Nuklei bezogen auf die unbehandelte Kontrollgruppe von *GBM #4* und *GBM #10*. Eine signifikante Abnahme Ki67⁺ Nuklei konnte nach THC (A) und LPI (B) Applikation in *GBM #4* und *GBM #10* festgestellt werden. Die Effekte von THC (A) und LPI (B) wurden durch die Vorbehandlung mit 10 μM 2-APB in *GBM #4* signifikant aufgehoben. Einzelstimulationen mit 50 μM und 100 μM 2-APB verringerten die Anzahl Ki67⁺ Nuklei und zeigten keine inhibierenden Wirkungen auf die Effekte von THC (A) und LPI (B). In *GBM #10* führten sowohl 10 μM als auch 50 μM 2-APB zu einer vollständigen Inhibierung der THC- (A) und LPI- (B) vermittelten Effekte und bewirkten einzeln keine Veränderungen. Lediglich 100 μM verringerte die Anzahl Ki67⁺ Nuklei und zeigte keine Wirkung auf THC (A) und LPI (B) Effekte. Die Daten repräsentieren Mittelwerte ± SEM von N=3 unabhängigen Experimenten, die in Doppelbestimmung durchgeführt wurden. Signifikanz (*) wurde für $p < 0,05$ gewählt.

4.3.4 Beteiligung von Calcineurin

Durch die Interaktion von IP3 mit IP3-sensitiven Rezeptoren der ER Membran kommt es zur intrazellulären Ca^{2+} -Mobilisierung. Ca^{2+} -Ionen können wiederum Calmodulin aktivieren, welches die zytosolische Proteinphosphatase Calcineurin stimuliert. Um zu analysieren, ob spezifisch Calcineurin an der Abnahme Ki67^+ Nuklei in THC- und LPI-behandelten Zellen involviert sein könnte, wurden Experimente mit den Calcineurin-Inhibitoren Cyclosporin A (CsA) und Tacrolimus (FK506) durchgeführt. Die Konzentrationen von CsA und FK506 wurden Zelltyp-abhängig gewählt. Es ist anzumerken, dass in Vorversuchen CsA-Konzentrationen $\geq 1 \mu\text{M}$ und FK506-Konzentrationen $\geq 5 \mu\text{M}$ toxisch auf *GBM #10* wirkten. Aus diesem Grund wurden für die Behandlungen von *GBM #10* niedrigere Konzentrationen als für *GBM #4* verwendet. Die Abnahme Ki67^+ Nuklei in THC- und LPI-stimulierten Zellen von *GBM #4* wurde in Anwesenheit von CsA und FK506 signifikant aufgehoben (Abbildung 24A-B). Eine geringe signifikante Abnahme Ki67^+ Nuklei wurde nach Einzelstimulation mit $1 \mu\text{M}$ CsA nachgewiesen (Abbildung 24A-B). Im Gegensatz dazu wurden die THC und LPI Effekte auf *GBM #10* durch CsA nicht beeinträchtigt, was auf einen starken Einfluss von CsA selbst auf die Anzahl Ki67^+ Nuklei zurückzuführen ist (Abbildung 24A-B). Ab einer Konzentration von $0,5 \mu\text{M}$ wurde die Anzahl Ki67^+ Nuklei durch CsA allein signifikant verringert (Abbildung 24A-B). In Anwesenheit von THC oder LPI blieben diese Effekte unverändert und *vice versa*. Die Behandlung mit FK506 blockierte hingegen die Effekte von THC und LPI in *GBM #10* signifikant (Abbildung 24A-B). Die reduzierte Anzahl Ki67^+ Nuklei nach der Kombination aus THC bzw. LPI und FK506 im Vergleich zur Einzelstimulation von FK506 lassen eine partielle Inhibierung der Effekte von THC und LPI vermuten. Insgesamt zeigen die Daten, dass THC und LPI in *GBM #4* eine Signalkaskade induzieren, in der Calcineurin beteiligt sein könnte. Für *GBM #10* lässt sich hingegen mit Hilfe von CsA keine klare Aussage über die Beteiligung von Calcineurin treffen. Die partielle Blockierung der THC und LPI Effekte durch FK506 weist auf eine partielle Beteiligung von Calcineurin bei der Reduktion Ki67^+ Nuklei in *GBM #10* hin.

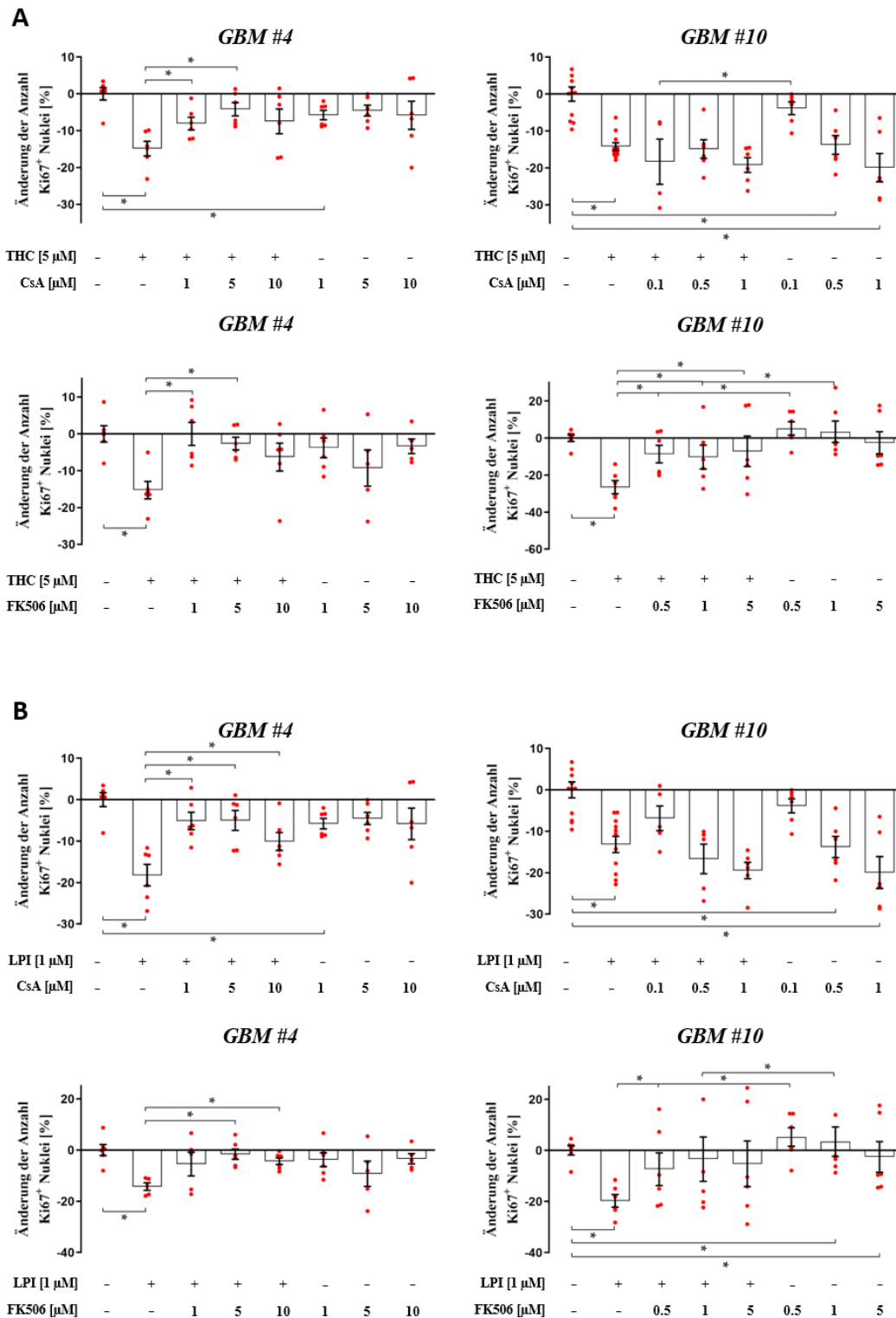


Abbildung 24: Einfluss von Cyclosporin A (CsA) und Tacrolimus (FK506) (Calcineurin-Inhibitoren) auf die Anzahl Ki67⁺ Nuklei in THC- und LPI-behandelten Glioblastomzellen. Die prozentuale Änderung der Anzahl Ki67⁺ Nuklei bezogen auf die unbehandelte Kontrollgruppe von *GBM #4* und *GBM #10*. Eine signifikante Abnahme Ki67⁺ Nuklei konnte nach THC (A) und LPI (B) Applikation in *GBM #4* und *GBM #10* festgestellt werden. Die Effekte von THC (A) und LPI (B) wurden durch die Vorbehandlung mit 1 μ M; 5 μ M und 10 μ M CsA bzw. 1 μ M und 5 μ M FK506 in *GBM #4* signifikant aufgehoben. In *GBM #10* konnten keine Effekte von CsA auf die THC- (A) und LPI- (B) vermittelten Abnahme Ki67⁺ Nuklei beobachtet werden. Einzelstimulationen mit 0,5 μ M und 1 μ M CsA führten hier zu einer signifikanten Verringerung des Anteils Ki67⁺ Nuklei. Eine partielle Inhibierung konnte nach 0,5 μ M FK506 festgestellt werden. Die Daten repräsentieren Mittelwerte \pm SEM von N=3 unabhängigen Experimenten, die in Doppelbestimmung durchgeführt wurden. Signifikanz (*) wurde für $p < 0,05$ gewählt.

4.3.5 Beteiligung von NFAT

Nach Ca^{2+} -abhängiger Aktivierung dephosphoryliert und aktiviert Calcineurin den Transkriptionsfaktor NFAT, wodurch die Aktivierung oder Inhibierung von NFAT-spezifischen Zielgenen ausgelöst wird [199,200]. NFAT ist in seiner inaktiven Form im Zytoplasma lokalisiert. Nach externen/internen Stimuli transloziert aktiviertes NFAT in den Nukleus [199,200]. Die Fähigkeit von THC und LPI NFAT zu aktivieren, sollte über die Visualisierung der subzellulären Lokalisation verschiedener NFAT-Isoformen (NFAT1-4) mit Hilfe Immunfluoreszenz-basierter Färbungen evaluiert werden. Da NFAT5 hauptsächlich durch osmotischen Stress Ca^{2+} -unabhängig aktiviert wird [201], wurde NFAT5 in den Untersuchungen nicht berücksichtigt. NFAT1, NFAT2, NFAT3 und NFAT4 konnten in den unbehandelten Kontrollgruppen sowohl im Zytoplasma als auch im Nukleus in unterschiedlicher Abundanz detektiert werden (Abbildungen 25+26). Es ist anzumerken, dass im Vergleich zu den übrigen Isoformen NFAT3 hauptsächlich im Nukleus und NFAT4 hauptsächlich im Zytoplasma von *GBM #4* und *GBM #10* vorkam. Im Gegensatz dazu waren in unbehandelten *GBM #23* Signale von NFAT4 auch im Nukleus detektierbar (SAbbildung 5). In unbehandelten *GBM #4* und *GBM #10* konnte eine transiente Translokation aller NFAT-Isoformen in den Nukleus 5 min und 10 min nachdem Mediumwechsel festgestellt werden, was exemplarisch für NFAT1 in *GBM #4* in SAbbildung 6 dargestellt ist. Stimulationen mit THC oder LPI für 5 min, 10 min, 2 h, 4 h und 24 h zeigten keine signifikanten Änderungen der Lokalisation von NFAT1 (SAbbildung 6), sowie NFAT2, NFAT3 und NFAT4 in *GBM #4* und *GBM #10* (Daten nicht gezeigt).

Als Positivkontrolle für die Translokation von NFAT wurden Ionomycin und Thapsigargin verwendet, da beide Substanzen Ca^{2+} -abhängige Signalwege aktivieren [202,203] (Abbildungen 25 + 26). 10 μM Ionomycin und 2 μM Thapsigargin führten nach 30-minütiger Stimulation in *GBM #4* und *GBM #10* zu einer Translokation von NFAT1 aus dem Zytoplasma in den Nukleus (Abbildung 25A). Die Lokalisationen von NFAT2-4 blieben hingegen unverändert (Abbildungen 25B+26).

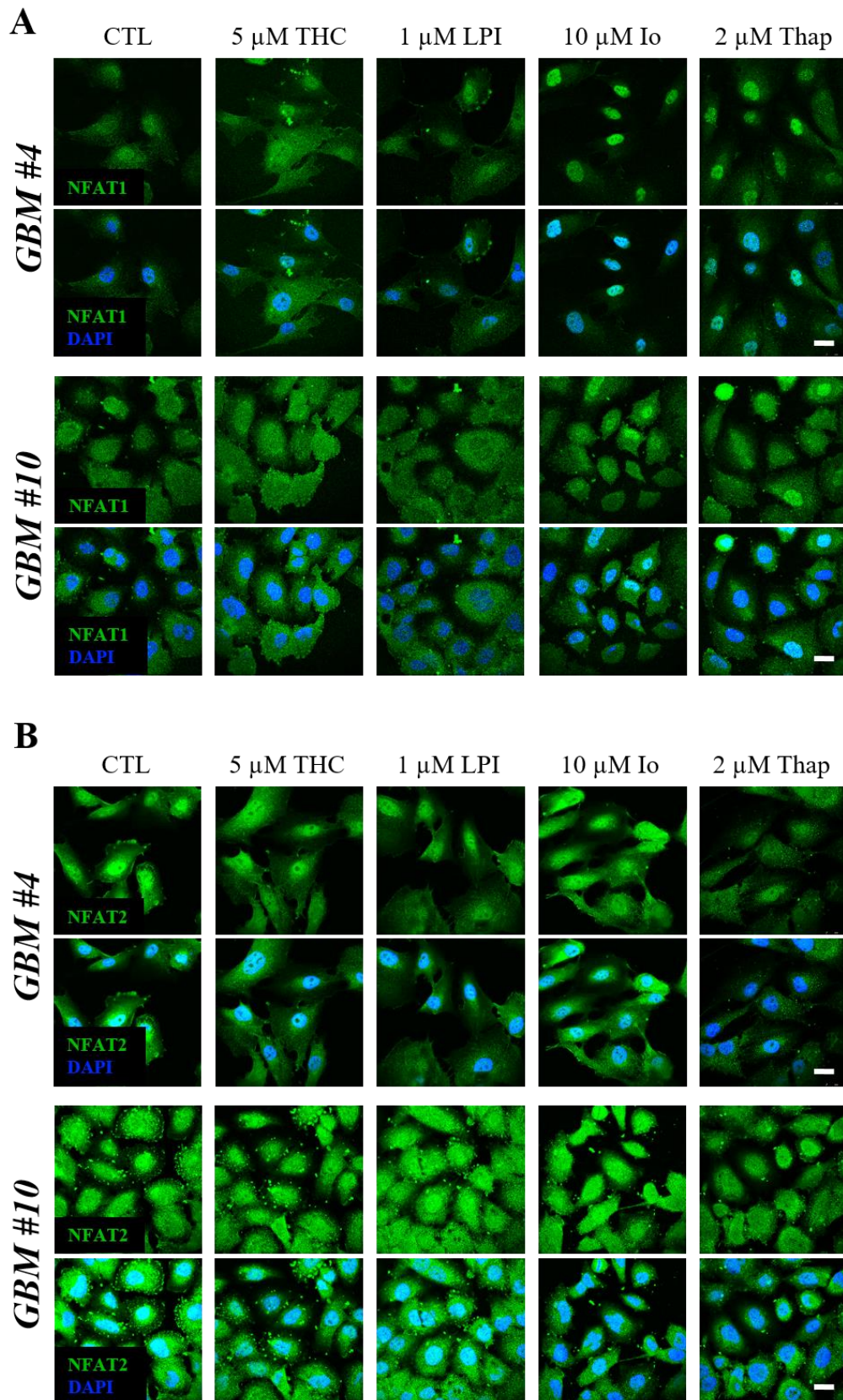


Abbildung 25: Einfluss von THC und LPI auf die subzelluläre Lokalisation von NFAT1 und NFAT2 nach 30 min. Repräsentative Aufnahmen von NFAT1 (A) und NFAT2 (B) nach 30-minütiger THC und LPI Stimulation. In unbehandelten Kontrollzellen waren NFAT1 (A) und NFAT2 (B) sowohl im Zytoplasma als auch im Nukleus lokalisiert. Translokationen von NFAT1 (A) und NFAT2 (B) nach THC oder LPI Gabe konnten in *GBM #4* und *GBM #10* nicht festgestellt werden. Erhöhte Signale von nukleären NFAT1 (A) wurden nach Ionomycin (Io) und Thapsigargin (Thap) Behandlung in beiden Zelllinien detektiert. Signale von NFAT2 (B) blieben hingegen unverändert. Die Zellkerne wurden mit DAPI gegengefärbt. Der Maßstab entspricht 25 μ m.

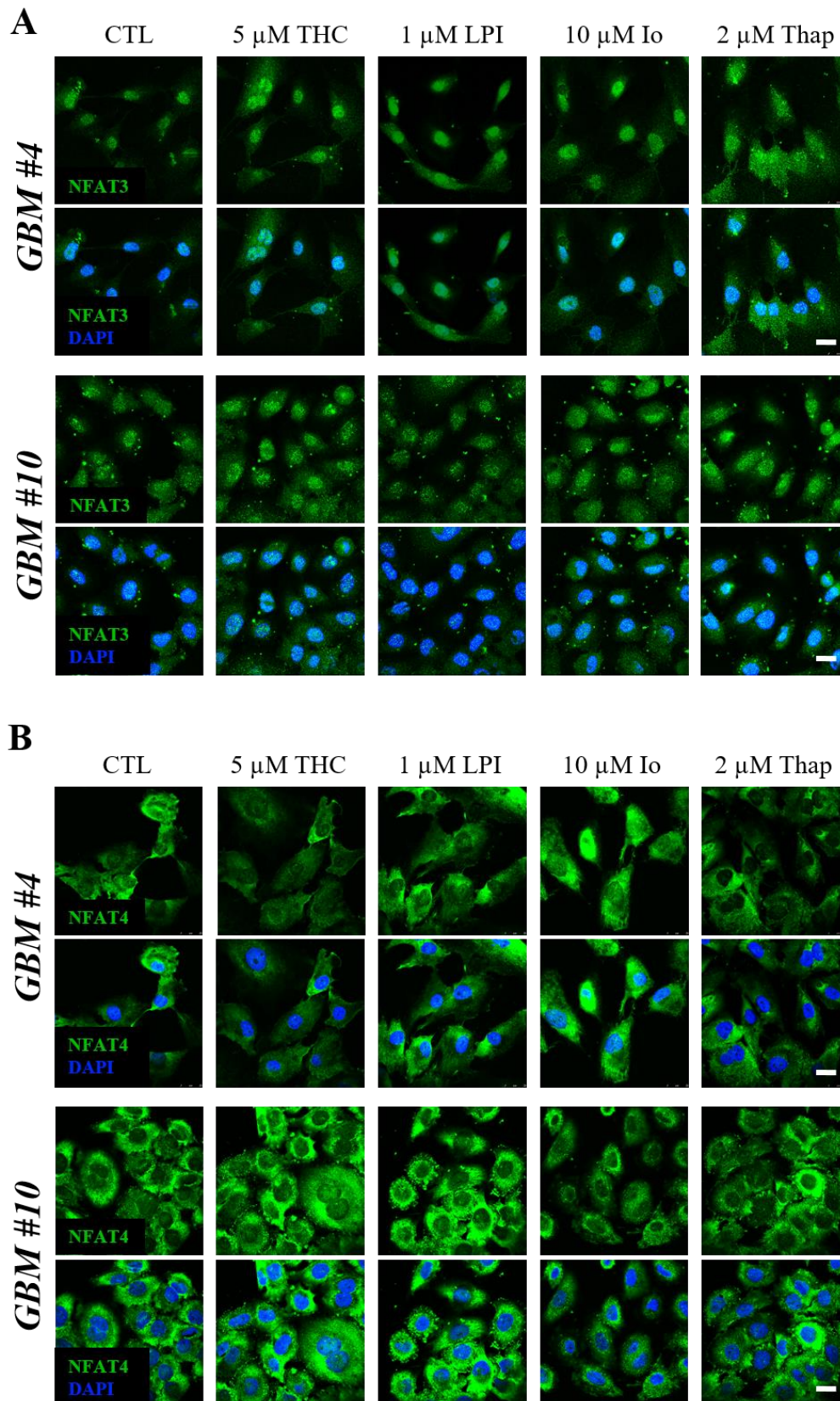


Abbildung 26: Einfluss von THC und LPI auf die subzelluläre Lokalisation von NFAT3 und NFAT4 nach 30 min. Repräsentative Aufnahmen von NFAT3 (A) und NFAT4 (B) nach 30-minütiger THC und LPI Stimulation. In unbehandelten Kontrollzellen waren NFAT3 (A) hauptsächlich im Nukleus und NFAT4 (B) hauptsächlich im Zytoplasma lokalisiert. Translokationen von NFAT3 (A) und NFAT4 (B) nach THC, LPI, Ionomycin (Io) oder Thapsigargin (Thap) Gabe konnten in *GBM #4* und *GBM #10* nicht festgestellt werden. Die Zellkerne wurden mit DAPI gegengefärbt. Der Maßstab entspricht 25 μ m.

Die Ionomycin-induzierte Translokation von NFAT1 in den Nukleus wurde auch in Anwesenheit von THC oder LPI nicht maßgeblich beeinflusst (Abbildung 27A). In Anwesenheit der Calcineurin-Inhibitoren FK506 und CsA wurde die Ionomycin-induzierte Translokation aufgehoben (Abbildung 27B). Diese Daten deuten auf eine Calcineurin-abhängige NFAT1-Aktivierung nach Stimulation mit Ionomycin hin. Zum anderen weisen die Daten auf eine hinreichende Inhibierung von Calcineurin durch die verwendeten Konzentrationen hin. Ähnliche Ergebnisse wurden auch für Thapsigargin generiert (Daten nicht gezeigt). Es ist anzumerken, dass eine alleinige Stimulation mit FK506 oder CsA keine signifikanten Änderungen der nukleären Signale von basal aktivem NFAT2 und NFAT3 herbeiführten (Abbildung 28). Dies lässt auf eine Calcineurin-unabhängige Aktivierung von NFAT2 und NFAT3 oder eine geringe Exportrate ins Zytosol schließen.

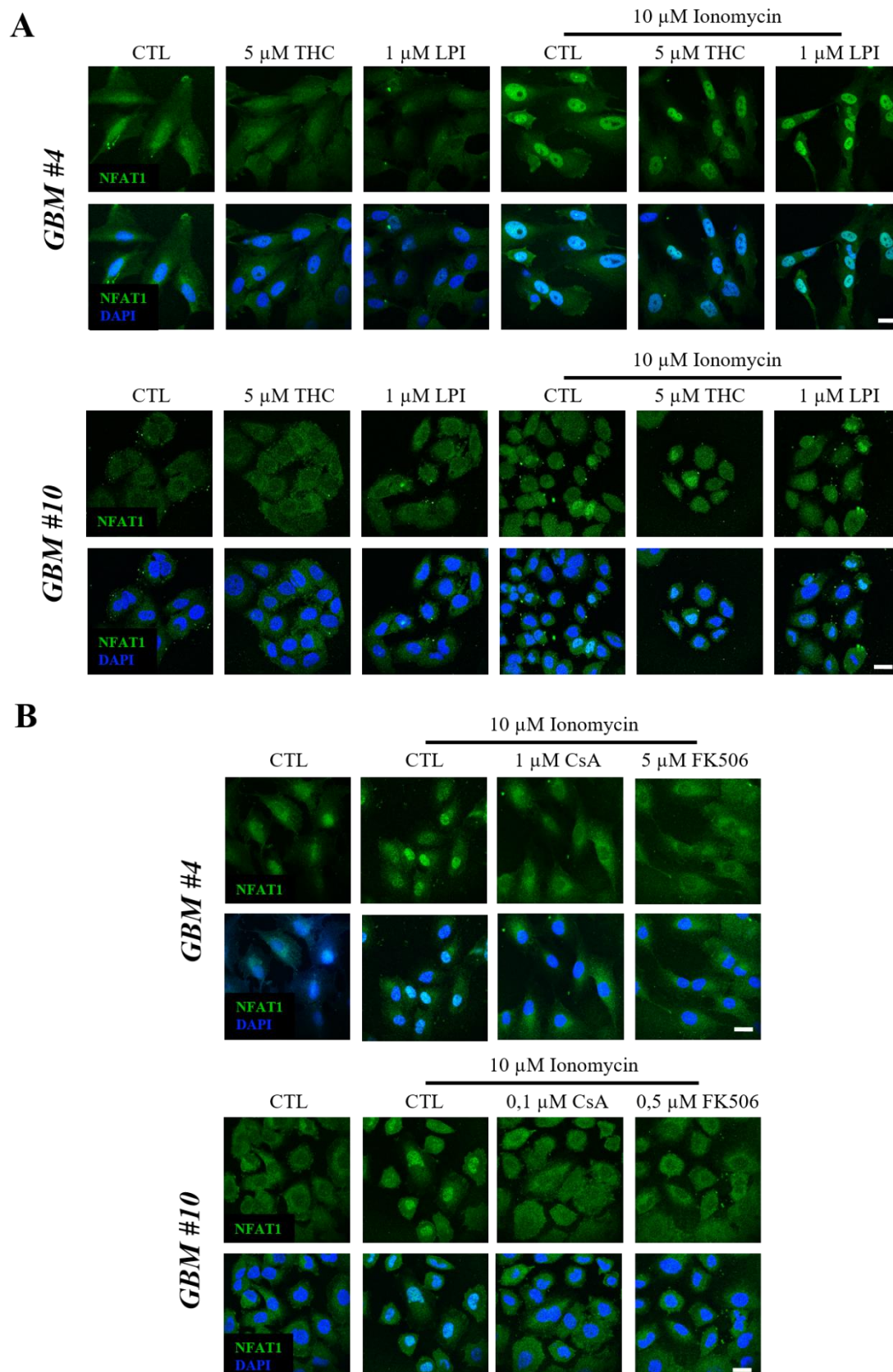


Abbildung 27: Calcineurin-abhängige Translokation von NFAT1 in den Nucleus nach Ionomycin Behandlung. Während THC und LPI keinen Einfluss auf die subzelluläre Lokalisation von NFAT1 in *GBM #4* und *GBM #10* zeigten, induzierte Ionomycin die Translokation von NFAT1 in den Nucleus nach 30 min (A). In Anwesenheit von THC oder LPI blieben die Ionomycin Effekte unverändert (A). Die Ionomycin-induzierte Translokation von NFAT1 in den Nucleus in *GBM #4* und *GBM #10* wurde durch die Präinkubation mit CsA oder FK506 aufgehoben (B). Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt. Der Maßstab entspricht 25 μ m.

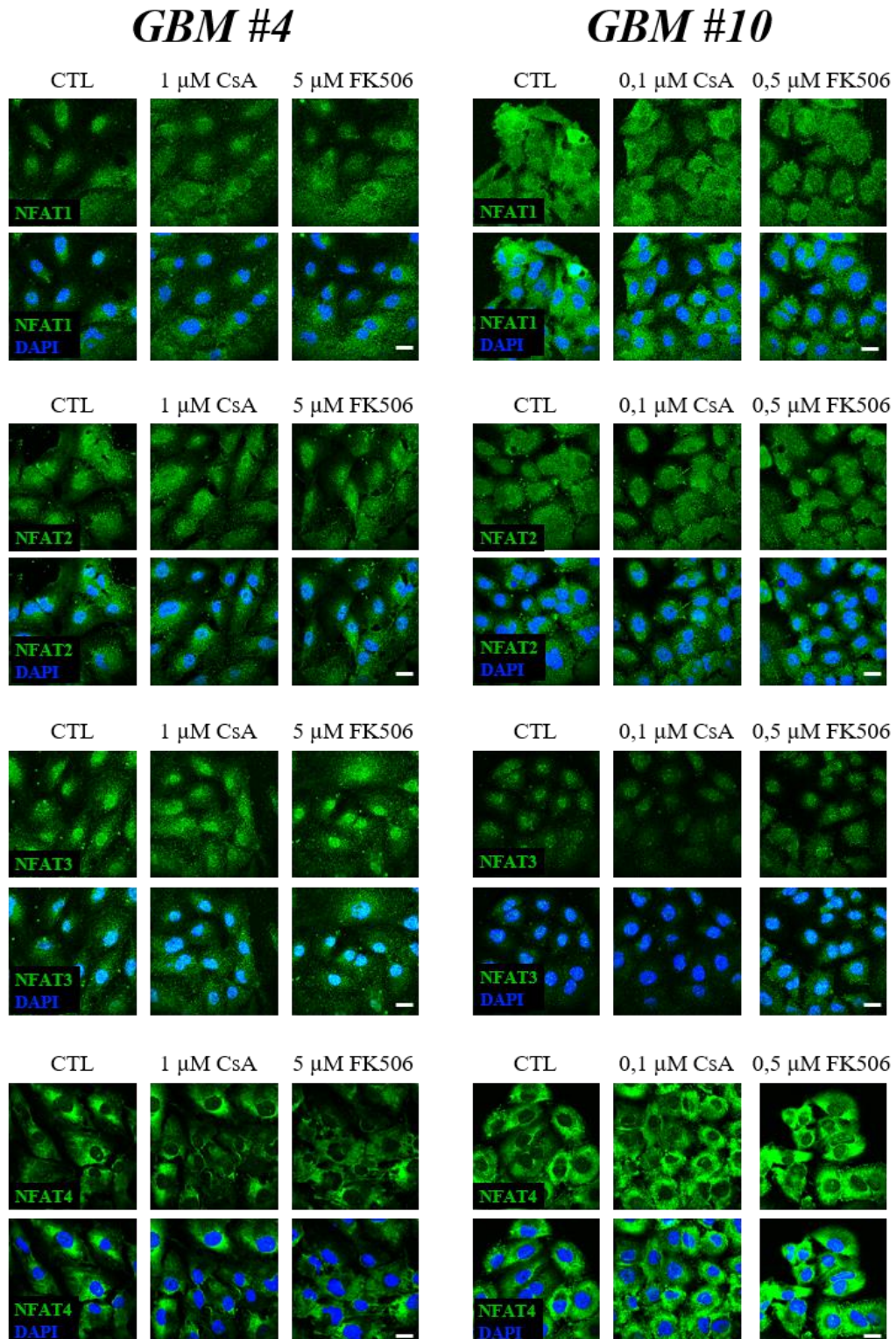


Abbildung 28: Subzelluläre Lokalisation von NFAT1-4 nach Calcineurin-Inhibierung. Zur vollständigen Blockierung Calcineurin-abhängiger Mechanismen wurden die Glioblastomzellen zunächst für 1 h mit CsA bzw. 1,5 h mit FK506 präinkubiert. Für *GBM #4* konnte gezeigt werden, dass NFAT1 nach CsA und FK506 Stimulation hauptsächlich im Zytoplasma vorkam und nukleäre Signale kaum evident waren. Nukleäre Signale von NFAT2 und NFAT3 blieben nach Calcineurin-Inhibierung hingegen unverändert. Die Zellkerne wurden mit DAPI gegengefärbt. Der Maßstab entspricht 25 μ m.

4.4 Untersuchungen zur funktionellen Bedeutung eines reduzierten Anteils Ki67⁺ Nuklei nach THC und LPI Stimulation auf die Proliferation

4.4.1 Einfluss von THC, LPI und CBD auf das kollektive Wachstum

Mit Hilfe eines Impedanz-basierten Echtzeitverfahren (iCELLigence™-RTCA) wurden Wachstumskurven generiert, um den Einfluss von THC, CBD und LPI auf die kollektive und adhäsionsabhängige Proliferation der untersuchten Glioblastomzellen zu bewerten. Die Änderungen der Impedanzen wurden als dimensionsloser Zellindex (CI) angegeben. Nach Zugabe der Substanzen kommt es auf Grund des Mediumwechsels und der damit verbundenen Störeinflüsse zunächst zu einem Abfall in der Messkurve, der keine Aussage über den Einfluss auf die Proliferation zulässt. Aus diesem Grund erfolgte eine statistische Auswertung nach 6 h, 12 h, 24 h und 48 h. Wie erwartet, wurde bei allen Glioblastomzellen ein Anstieg des Zellindex in Abhängigkeit von der Zeit in einer leicht wellenförmigen Ausprägung beobachtet (Abbildung 29). Es konnte gezeigt werden, dass THC und LPI, einzeln und in Kombination, keine erkennbaren Effekte auf die Proliferation von *GBM #4*, *GBM #10* und *GBM #23* aufwiesen, da im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollgruppen keine veränderten Zellindizes festgestellt wurden (Abbildung 29, SAbbildung 7C). Eine Stimulation mit CBD in einer Dosierung von 5 µM hingegen führte zu einer signifikanten Verringerung des gemessenen Zellindex nach 12 h und 24 h in *GBM #4* und *GBM #23* (Abbildung 29, SAbbildung 7A+B). Auch in Anwesenheit von THC oder LPI war jener Effekt von CBD auf *GBM #4* nachweisbar (Abbildung 29). In *GBM #4* manifestierte sich dieser durch ein vorübergehendes Sistieren des gemessenen Zellindex auf gleichem Niveau in den ersten 24 h (Abbildung 29). Danach entsprach die Steigung der Wachstumskurve wieder jener der unbehandelten Kontrollgruppe. Bei der Behandlung von *GBM #23* mit CBD wurde der Wachstumsverlauf nicht wesentlich beeinflusst, jedoch ist die Steigung der Kurve minimal flacher (SAbbildung 7A+B). In *GBM #10* beeinträchtigte CBD den gemessenen Zellindex nicht (Abbildung 29). Des Weiteren lassen die Daten vermuten, dass sowohl die Einzel- als auch die Kombinationsapplikationen von THC, LPI und CBD keine zytotoxischen Auswirkungen zur Folge hatten, da kein Abfall der Zellindizes detektiert werden konnte (Abbildung 29, SAbbildung 7A-C).

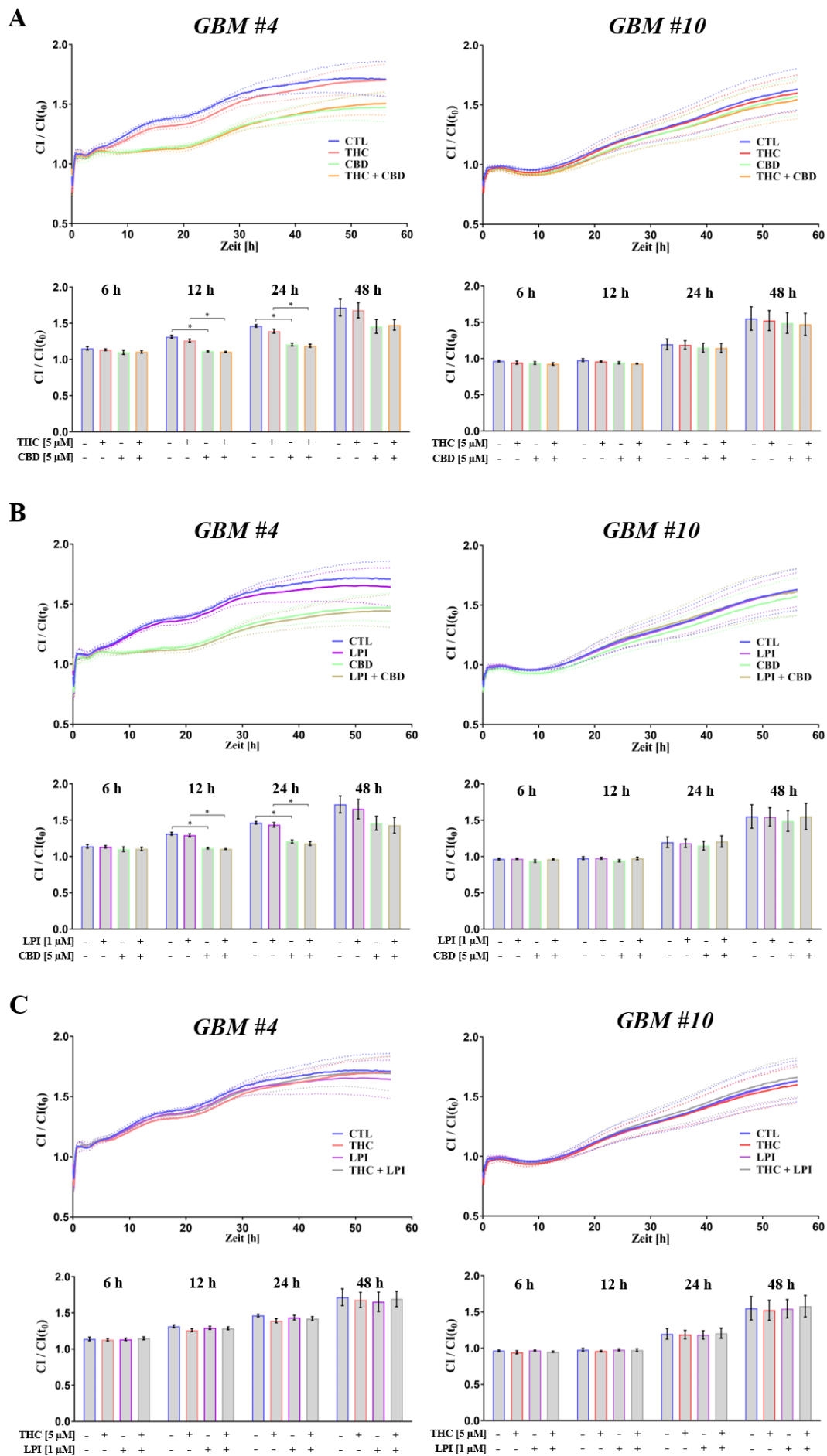


Abbildung 29: Verlauf der Proliferation von GBM #4 und GBM #10 ohne und nach Zugabe von THC, CBD und LPI mittels iCELLigence™-Systems. Zeitabhängiger Verlauf der Proliferation von *GBM #4* und *GBM #10* nach Zugabe von 5 μ M THC, 5 μ M CBD und 1 μ M LPI zum Zeitpunkt Null. Die Änderungen der Impedanz wurden als dimensionsloser Zellindex (CI) angegeben, welche auf den gemessenen Wert zum Zeitpunkt Null normiert wurden. Die statistische Auswertung erfolgte zu den Zeitpunkten 6 h, 12 h, 24 h und 48 h. THC und LPI, sowie deren Kombination nahmen keinen Einfluss auf die Proliferation der Zellen (A-C). CBD führte zu einer signifikanten Verringerung des Zellindex nach 12 h und 24 h in *GBM #4* im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe (A+B). Auch in Anwesenheit von THC (A) und LPI (B) reduzierte CBD den gemessenen Zellindex in *GBM #4* im Vergleich zu THC- bzw. LPI-behandelten Zellen. Die Daten repräsentieren Mittelwerte \pm SEM von N=3 unabhängigen Experimenten, die in Doppelbestimmung durchgeführt wurden. In den Graphen, welche die Änderung des CI über die Zeit zeigen, ist der SEM als gepunktete Linien dargestellt. Signifikanz (*) wurde für $p < 0,05$ gewählt.

Im Speziellen Fall von *GBM #4* sollte im Weiteren untersucht werden, ob der Effekt von CBD auf den Verlauf der Wachstumskurve durch eine erneute CBD-Zugabe nach 24 h aufrechterhalten werden kann. Auch nach erneuter Zugabe lässt sich ein deutlich geringerer Anstieg mit sistierender Tendenz erkennen (Abbildung 30A). Diese Änderung ist im Vergleich zur CBD-behandelten Gruppe ohne erneuter CBD-Zugabe aufgrund der hohen Standardabweichung statistisch nicht signifikant (Abbildung 30A). Diese Daten lassen vermuten, dass nach 24 h die wirksame Konzentration von CBD aufgebraucht ist und durch erneuter Applikation der Effekt aufrechterhalten werden kann.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass der beobachtete Effekt von CBD auf den Wachstumsverlauf von der verwendeten Konzentration abhängt (Abbildung 30B).

Da bezugnehmend zum Einfluss von CBD auf die Anzahl Ki67⁺ Nuklei in THC- und LPI-behandelten Zellen eine GPR55-antagonisierende Wirkung für CBD postuliert wurde, sollte mit Hilfe des GPR55-Antagonisten CID überprüft werden, ob die Effekte, die mittels des iCELLigence™-RTCA-Systems beobachtet wurden, auf einer Antagonisierung von GPR55 beruhen könnten. Unabhängig von der verwendeten Konzentration blieben die Kurvenverläufe nach Stimulation mit CID unverändert (Abbildung 30C). Diese Daten geben Hinweise, dass die CBD-vermittelte Abflachung der Wachstumskurve von *GBM #4* sehr wahrscheinlich nicht auf eine Interaktion mit GPR55 zurückzuführen scheint.

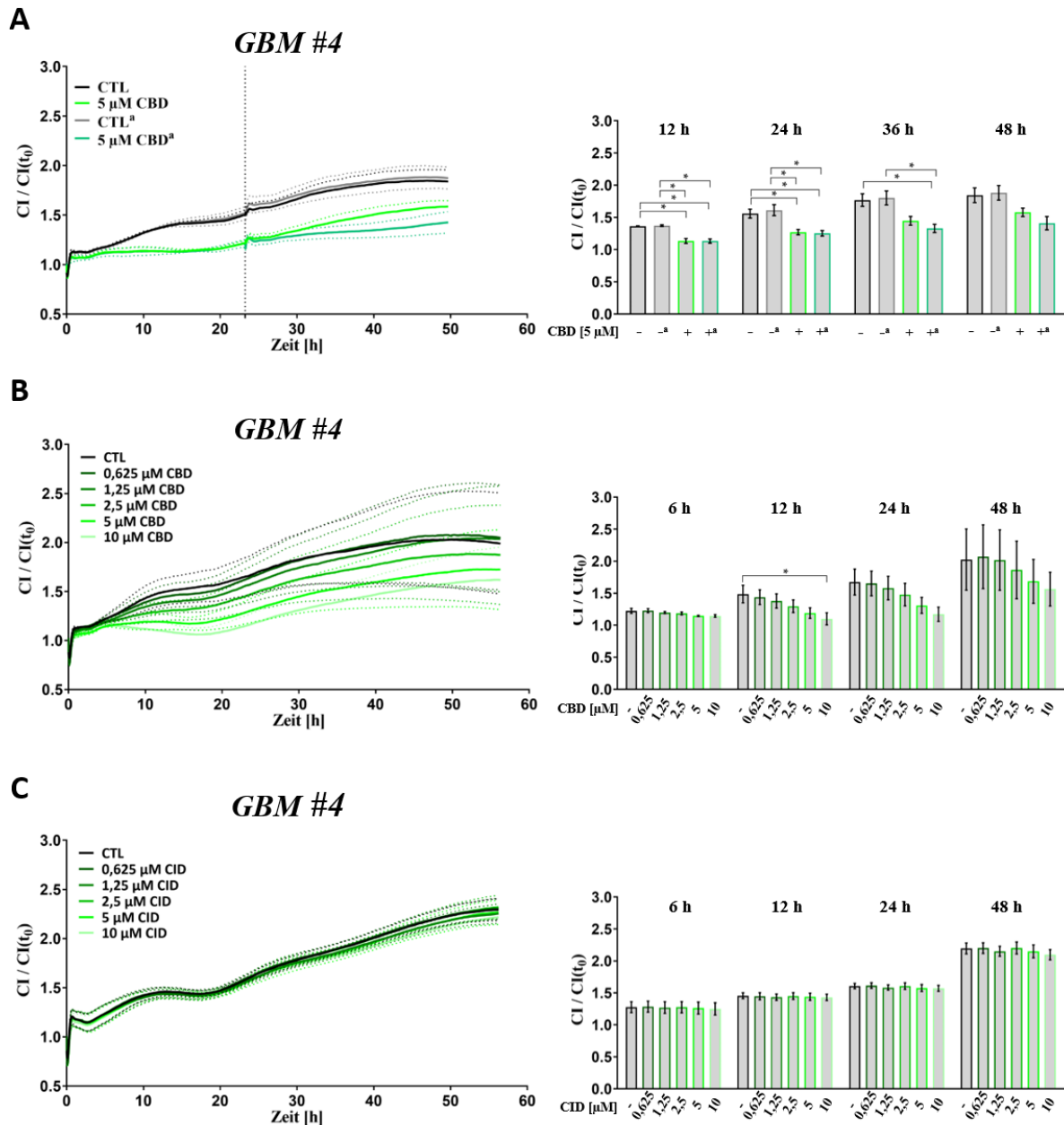


Abbildung 30: Verlauf der Proliferation von Glioblastomzellen ohne und nach Zugabe von CBD und CID. Zeitabhängiger Verlauf der Proliferation von *GBM #4* nach erneuter Zugabe von CBD innerhalb von 24 h (A), nach Zugabe einer Titrationsserie von CBD (B) und nach Zugabe einer Titrationsserie von CID (C) zum Zeitpunkt Null. A: Einfluss von CBD auf den Verlauf der Proliferation, wenn CBD nach 24 h erneut appliziert wurde. CBD verringerte signifikant den gemessenen Zellindex nach 12 h und 24 h im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollgruppen. Nach 24 h erfolgte die erneute Zugabe von CBD durch Wechsel des Mediums (^a). Auch hier ist eine Abflachung des Kurvenverlaufs im Vergleich zur bereits CBD-behandelten Gruppe ohne erneute Zugabe von CBD zu beobachten. Der Zellindex wurde Konzentrations-abhängig nach CBD Applikation verringert (B). Der Zellindex wurde nach CID Applikation nicht verändert (C). Die Daten repräsentieren Mittelwerte \pm SEM von N=3 unabhängigen Experimenten, die in Doppelbestimmung durchgeführt wurden. In den Graphen, welche die Änderung des CI über die Zeit zeigen, ist der SEM als gepunktete Linien dargestellt. Signifikanz (*) wurde für $p < 0,05$ gewählt.

4.4.2 Einfluss von THC, LPI und CBD auf das klonogene Wachstum

Mittels des Koloniebildungsassays sollte überprüft werden, ob THC, LPI und CBD Einfluss auf das klonogene Wachstum der Zellen haben könnte. Das klonogene Wachstum beschreibt *per definitionem* die Fähigkeit von Einzelzellen ohne direkt benachbarten Zellen zu proliferieren und Kolonien auszubilden. Weder die Behandlung mit THC noch mit LPI beeinflusste das klonogene Wachstum von *GBM #4* und *GBM #10* signifikant, da die Anzahl gebildeter Kolonien unverändert blieb (Abbildung 31). Interessanterweise führte eine Behandlung mit CBD zu einer signifikanten Abnahme der Anzahl gebildeter Kolonien (Abbildung 31). Des Weiteren erschienen makroskopisch die Größe der Kolonien nach Behandlung mit THC, LPI und CBD verändert zu sein, was auf eine veränderte Anzahl der Zellen pro Kolonie zurückzuführen sein könnte (Abbildung 31). Die Fähigkeit von *GBM #23* Kolonien zu bilden war für die folgenden Untersuchungen suboptimal (SAbbildung 7D) und wurde deshalb nicht weiter betrachtet.

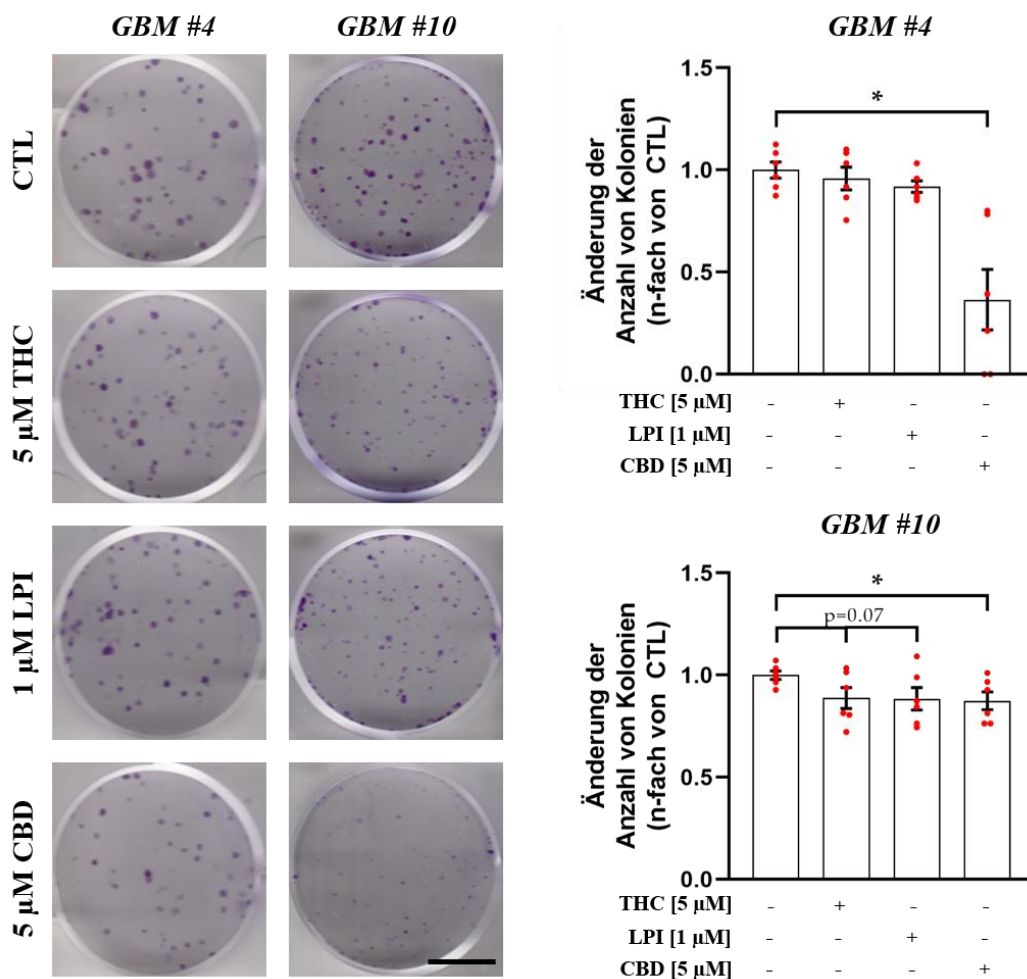


Abbildung 31: Einfluss von THC, LPI und CBD auf das klonogene Wachstum von *GBM #4* und *GBM #10*. In *GBM #4* und *GBM #10* führte eine Behandlung mit CBD zu einer signifikanten Abnahme gebildeter Kolonien, während THC und LPI unwirksam blieben. Die Daten repräsentieren Mittelwerte \pm SEM von $N=3$ unabhängigen Experimenten, die in Doppelbestimmung durchgeführt wurden. Signifikanz (*) wurde für $p<0,05$ gewählt. Der Maßstab entspricht 1 cm.

4.4.3 Einfluss von THC, LPI und CBD auf die Verteilung der Zellzyklusphasen

Nachfolgend sollte mittels Durchflusszytometrie untersucht werden, ob die Behandlung von *GBM #4* und *GBM #10* mit THC, LPI oder CBD die Phasen des Zellzyklus beeinflusst. Es konnten keine signifikanten Änderungen in der Verteilung einzelner Zellzyklus-Phasen nach THC, LPI oder CBD Gabe detektiert werden (Abbildung 32). Da in anderen Versuchen gezeigt wurde, dass sich nach einem 24-stündigem Serummangel Ki67⁺ Nuklei anreichern (Abschnitt 4.4.4), die auf eine Akkumulation G₀-arretierter Zellen hinweisen, wurde ebenfalls die Verteilung der Zellzyklus-Phasen nach Serumdepletion untersucht. In *GBM #4* konnte keine Änderung der Phasenverteilung festgestellt werden, wohingegen in *GBM #10* eine deutliche Anreicherungen von Zellen in der G₀/G₁-Phase und ein reduzierter Anteil von Zellen in der S-Phase evident waren (Abbildung 32).

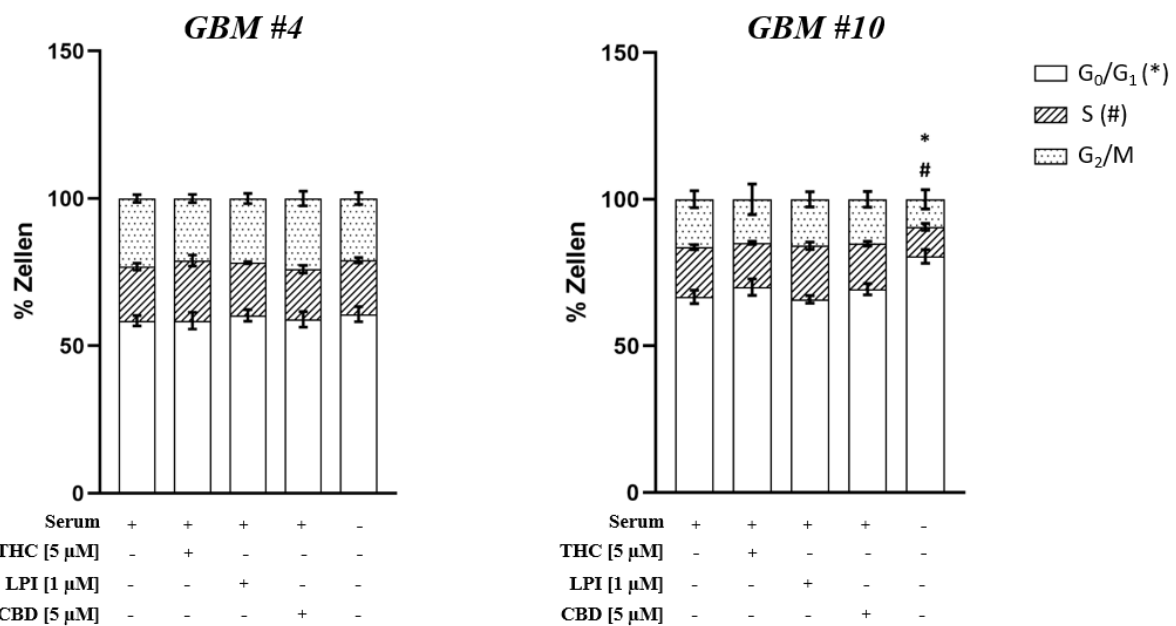


Abbildung 32: Verteilung der Phasen des Zellzyklus von *GBM #4* und *GBM #10* nach THC, LPI und CBD Gabe. Es konnten keine Effekte von THC, LPI und CBD auf die Verteilung der Zellzyklusphasen detektiert werden. Lediglich eine 24-stündige Serumfreisetzung führte zu einer signifikanten Abnahme von Zellen in der S-Phase und einer signifikanten Anreicherung G₀/G₁-arretierter Zellen in *GBM #10*. Die Daten repräsentieren Mittelwerte ± SEM von N=3 unabhängigen Experimenten. Signifikanz (*) wurde für p<0,05 gewählt.

4.4.4 Einfluss von THC und LPI auf die Transition von der G₀-Phase in die Proliferation

Um zu überprüfen, ob eine GPR55 Aktivierung durch THC und LPI den Rückeintritt von ruhenden Zellen (G₀-Arrest, Ki67⁻) in den Zellzyklus verhindern könnte, sollte zunächst durch 24-stündigem Serumangel ein G₀-Arrest induziert werden. Dieser ist gekennzeichnet durch den Verlust von Ki67. Sowohl die Analyse der Ki67-Immunoreaktivität als auch die durchflusszytometrischen Analysen zeigten eine deutliche Anreicherung einer Ki67⁻ und G₀/G₁ arretierten Zellpopulation nach 24-stündigem (Abbildungen 32 + 33A) und nach 48-stündigem Serumangel (Abbildung 33B). Die erneute Zugabe von Serum führte zu einer deutlichen Anreicherung Ki67⁺ Nuklei im Vergleich zu den Zellen ohne FKS und den normalen FKS-Kontrollen (Abbildung 33B). Daher lässt sich schlussfolgern, dass sich der G₀-Arrest nach Serumdepletion durch erneuter Serumzugabe reversibel manifestierte. In Anwesenheit von THC blieb der Anteil Ki67⁺ Nuklei nach Serumzugabe signifikant in *GBM #10* reduziert, da weniger Ki67⁺ Nuklei nachgewiesen wurden. In THC-behandelten Zellen von *GBM #4* und Zellen, die mit LPI behandelt wurden, unterlagen die Änderungen hingegen keiner Signifikanz (Abbildung 33B). Somit nehmen sowohl THC als auch LPI keinen wesentlichen Einfluss auf die Serum-induzierte Transition G₀-arretierter Zellen in die proliferative Phase. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass möglicherweise die weniger ausgeprägten Effekte auf eine THC- oder LPI-induzierte Apoptose von Ki67⁻-Zellen zurückzuführen sein könnte

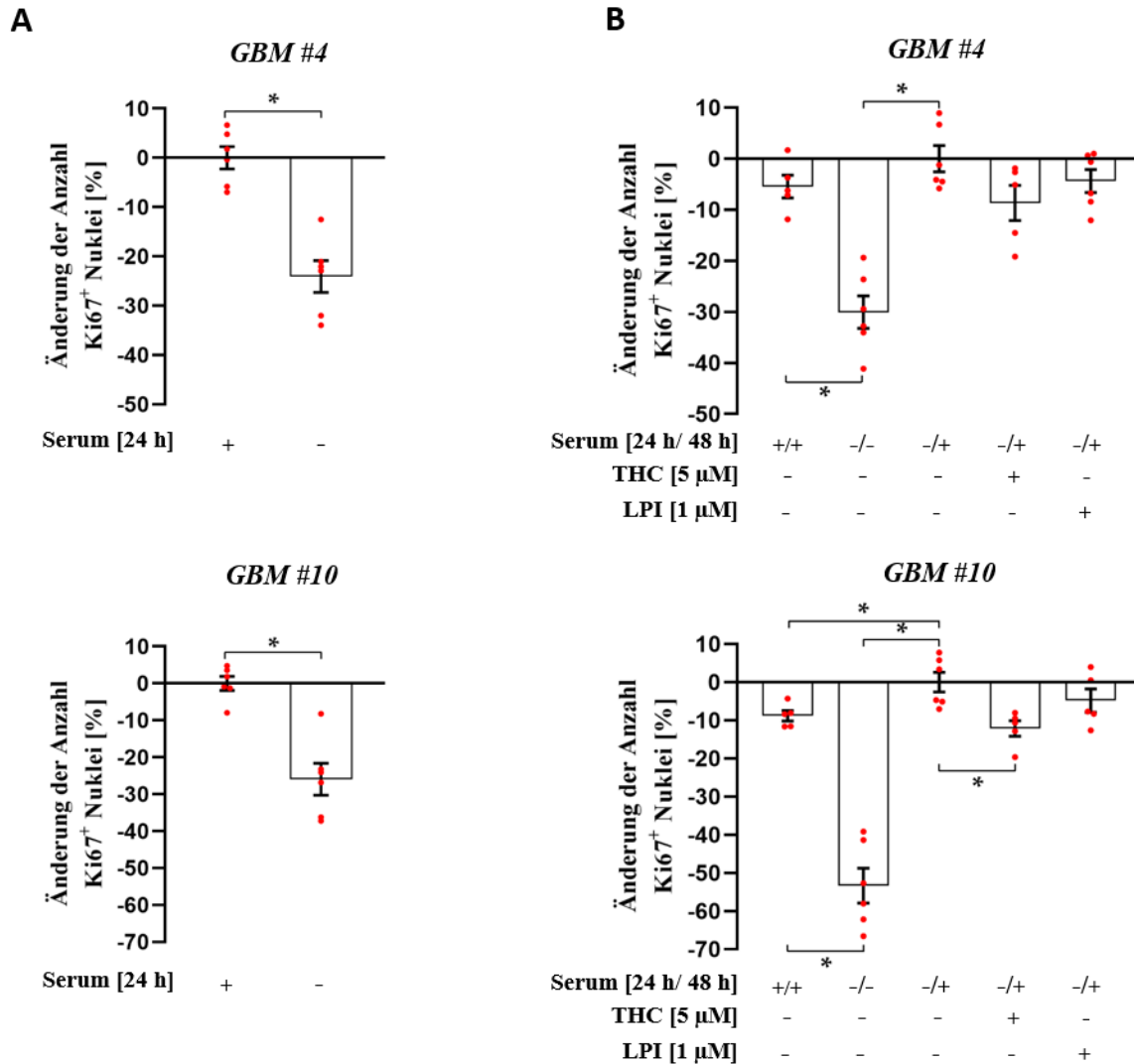


Abbildung 33: Einfluss von THC und LPI auf die Serum-induzierte Transition von G₀-arretierten Zellen in die Proliferation nach 24-stündiger Serumfreisetzung. Eine 24- bzw. 48-stündige Serumfreisetzung führte zu einer signifikanten Abnahme Ki67⁺ Nuklei in *GBM #4* und *GBM #10*. Nach erneuter Serumapplikation wurde eine erhöhte Anzahl Ki67⁺ Nuklei festgestellt. Lediglich eine Behandlung mit 5 μM THC in *GBM #10* führte zu einer verringerten Anzahl Ki67⁺ Nuklei. THC in *GBM #4* und LPI im Allgemeinen zeigten keinerlei signifikante Effekte. Zusätzlich schien eine erhöhte Menge Ki67⁺ Nuklei in Zellen mit 24-stündiger Serumfreisetzung und erneuter Serumzugabe im Vergleich zu Zellen, die kontinuierlich Serum erhielten, aufzutreten. Die Daten repräsentieren Mittelwerte ± SEM von N=3 unabhängigen Experimenten, die in Doppelbestimmung durchgeführt wurden. Signifikanz (*) wurde für p<0,05 gewählt.

5 Diskussion

Das Glioblastom stellt die häufigste Form maligner primärer Tumore des ZNS bei Erwachsenen dar [43]. Sie gelten als hochaggressiv und bedeuten unter dem derzeitigen Behandlungsregime, welches aus einer maximalen chirurgischen Resektion, gefolgt von Bestrahlung und Chemotherapie, besteht [52,53], eine infauste Prognose für betroffene Patienten. Aufgrund der inter- und intratumoralen Heterogenität in Bezug auf klinische Präsentation, Pathologie und genetischem Profil sind die Erfolgchancen für universelle Behandlungsstrategien eher gering [204]. Aus diesem Grund besteht für das Glioblastom ein hoher Bedarf an einer verbesserten Charakterisierung der Tumorzellen und einer individuell aufgestellten Therapie. Cannabinoide stellen auf Basis ihrer selektiven und vielfältigen anti-tumoralen Wirkung eine vielversprechende Wirkstoffklasse dar. Sie entfalten ihre Wirkung über die Aktivierung Cannabinoid-spezifischer Rezeptoren, welche unter anderem in Glioblastomzellen nachgewiesen wurden [73,88,105,205]. Für die bekanntesten Cannabinoide THC und CBD ergibt sich gemäß ihrer Pharmakologie und in Abhängigkeit der Expression klassischer und nicht-klassischer CB-Rezeptoren diverse Möglichkeiten der Rezeptor Interaktion, über die sich ihre Wirkung manifestieren können [118]. Für die präzise Untersuchung der Wirkmechanismen von Cannabinoiden auf Glioblastome ist es notwendig, Cannabinoid-sensitive Tumorsubtypen und die korrespondierenden Rezeptoren der Tumor-suppressiven Eigenschaften von Cannabinoiden zu identifizieren. Die Wahl Rezeptor-selektiver Cannabinoide und die Bestimmung der optimalen Zusammensetzung in Kombination mit Radio- und Chemotherapie ermöglicht die Entwicklung gezielter und individueller Therapien, um das Ansprechen von Glioblastom-Patienten auf die meist erfolglose multimodale Standardbehandlung zu verbessern. In der vorliegenden Arbeit wurden daher Effekte von THC und CBD auf primäre Glioblastomzellen hinsichtlich Responsivität, Rezeptorabhängigkeit und Rezeptor-assoziiierter Signalwege charakterisiert.

5.1 Die CB₁/CB₂-unabhängige Wirkung von THC und CBD auf die Anzahl Ki67⁺ Nuklei

In einer Vielzahl von Tumorzellen verschiedener Herkunft konnte durch die Wahl selektiver Rezeptorantagonisten oder durch einen siRNA-vermittelten *knockdown* von CB₁- und CB₂-Rezeptoren die Fähigkeit von THC, das Tumorwachstum zu hemmen und die Apoptose auszulösen, mit der Aktivierung jener Rezeptoren gezeigt werden [70,114]. CBD wurde lange Zeit als schwacher Antagonist von CB₁ und CB₂ eingestuft [118]. Untersuchungen zeigten, dass CBD als negativer allosterischer Modulator des CB₁-Rezeptors wirken kann und die CB₁-

abhängige Phosphorylierung von ERK1/2 in THC-stimulierten CB₁⁺ HEK293 Zellen veränderte [130]. Die Aufhebung THC-vermittelter Effekte durch CBD lässt in der vorliegenden Arbeit daher die Beteiligung klassischer CB-Rezeptoren vermuten. Sowohl CB₁ als auch CB₂ konnten auf Transkript- und Proteinebene in den getesteten Glioblastomzellen detektiert werden. Des Weiteren erbrachte in früheren Arbeiten die Inkubation mit den synthetischen Agonisten ACEA (CB₁) und JWH133 (CB₂) den Nachweis der Rezeptor-Funktionalität [187,188]. Konkret zeigte sich eine Zelltyp-abhängige Verringerung der Anzahl Ki67⁺ Nuklei in *GBM #10* und *GBM #23*, aber nicht in *GBM #4* [187,188]. Die Effekte von ACEA und JWH133 wurden in Gegenwart der selektiven Antagonisten AM281 (CB₁) oder AM630 (CB₂) aufgehoben, was ihre CB₁- und CB₂-spezifischen Wechselwirkungen bestätigten [187,188]. In der vorliegenden Arbeit blieb eine Präinkubation mit AM281 und AM630 auf die veränderte Anzahl Ki67⁺ Nuklei in THC-exponierten *GBM #4* und *GBM #10* Zellen unwirksam. Trotz des Nachweises der Rezeptor-Funktionalität in *GBM #23* blieb THC in derselben Zelllinie unwirksam. Obwohl THC als potenter CB₁- und CB₂-Ligand mit ähnlichen K_i-Werten für CB₁ (K_i = 5,05 nM) und CB₂ (K_i = 3,13 nM) im Vergleich zu ACEA (K_i = 1,4 nM) und JWH133 (K_i = 3,4 nM) beschrieben wird [206–208], deuten die Daten insgesamt auf eine CB₁/CB₂-unabhängige Signalwirkung von THC hin. Eine mögliche Erklärung für die Zelltyp-abhängigen und Liganden-spezifischen Reaktionen nach THC, ACEA und JWH133 Stimulation, könnte auf die einseitige Signalweiterleitung von CB-Rezeptoren (funktionelle Selektivität) zurückzuführen sein. Funktionelle Selektivität liegt vor, wenn über Liganden-spezifische Veränderungen der Rezeptorkonformation ein intrazellulärer Effektor durch einen Liganden vorzugsweise stärker und wirksamer aktiviert wird als ein anderer [209]. Mehrere Studien haben gezeigt, dass sich die Fähigkeit von THC, verschiedene Effektoren (G-Proteine und β -Arrestin) über CB₁- und CB₂-Rezeptoren zu bedienen, im Vergleich zu selektiven Agonisten unterscheidet [210–212]. Im Allgemeinen sind CB₁ und CB₂ an G-Proteine vom Typ G $\alpha_{o/i}$ gekoppelt [19]. Unter bestimmten Umständen kann CB₁ auch G-Proteine der Typen G α_s und G α_q oder andere Proteine wie β -Arrestin für die Signalgebung rekrutieren [20,22,213]. In einer *in vitro*-Analyse an Neuronen des Wildtyps oder mit einer Mutation im *huntingtin* Gen, was mit Symptomen der Huntington Krankheit assoziiert ist, bewirkte THC eine verstärkte β -Arrestin, G α_q und G $\beta\gamma$ Signalweiterleitung im Vergleich zu G $\alpha_{o/i}$ [211]. Der CB₁-Ligand AEA hingegen induzierte in den selben Zellen eine verstärkte G $\alpha_{o/i}$ Signalweiterleitung im Vergleich zu β -Arrestin und G α_q [211]. In Übereinstimmung mit dieser Studie wurde eine maximale G α_i -Aktivierung über CB₁ für die Agonisten HU-210 und AEA berichtet, während für THC nur eine partielle G α_i -Aktivierung festgestellt wurde [210].

Darüber hinaus wurde in Hirnrindenproben von Mäusen das $G\alpha_i$ -Unterfamilienmitglied $G\alpha_{i3}$ durch ACEA, nicht aber durch THC aktiviert [212]. Dies steht in guter Übereinstimmung mit der CB_1 -abhängigen Reduktion $Ki67^+$ Nuklei nach ACEA Stimulation in *GBM #23*, während THC keine Auswirkungen zeigte. Daher lassen sich die unterschiedlichen Reaktionen auf THC, ACEA und JWH133 bezüglich der Beteiligung von CB_1 und CB_2 als Folge Liganden-spezifischer Rezeptorkonformationen und die selektive Aktivierung nachgeschalteter Effektoren interpretieren. Das Ergebnis könnte die Transduktion mehrerer Signalwege durch den selben Rezeptor sein. Eine CB_1/CB_2 -abhängige Reduzierung der Anzahl $Ki67^+$ Nuklei war daher nur durch die Interaktion mit den hochselektiven Agonisten ACEA und JWH133 zu beobachten. Die Aufklärung der zugrundeliegenden Mechanismen sollte in weiterführenden Untersuchungen erfolgen. Des Weiteren sollte eruiert werden, ob THC Einfluss auf andere Tumor-assoziierte Mechanismen wie Migration oder Invasion über CB_1 - und/oder CB_2 -spezifische Signale nimmt.

5.2 Die GPR18-unabhängige Wirkung von THC auf die Anzahl $Ki67^+$ Nuklei

Anhand der Messung der Aktivierung von p44/42 MAPK in HEK293 Zellen, die GPR18 ektopisch überexprimierten, konnte gezeigt werden, dass THC neben CB_1 und CB_2 auch an den orphanen CB-Rezeptor GPR18 als starker Agonist bindet [117]. Die antagonisierende Wirkung von CBD auf die NaGly- und THC-vermittelte p44/42 MAPK Aktivierung in GPR18-exprimierenden HEK293 Zellen [117] und dessen Expression in den untersuchten Glioblastomzellen lassen GPR18 als potentieller Rezeptor von THC-induzierten Effekten vermuten. GPR18 kommt physiologisch in Hoden, Milz und in bestimmten Arealen des Gehirns (*Hypothalamus, Cerebellum, Hirnstamm und Striatum*) vor [214]. Seine mRNA wurde in Zelllinien einiger Tumorarten, darunter derer von Melanomen, Mammakarzinomen und Glioblastomen, gefunden [215–217]. Die genaue Rolle von GPR18 bei Tumorerkrankungen bleibt bis heute ungeklärt. Auswirkungen auf die Phosphorylierung von ERK1/2 nach einer Aktivierung von GPR18 mit NaGly in primären Glioblastomzellen (NZB11, NZB19) ließ sich in einer früheren Studie nicht nachweisen [217]. GPR18 ist ein $G\alpha_{o/i}$ -gekoppelter Rezeptor [132]. Es scheint denkbar, dass seine Aktivierung zu ähnlichen Effekten führen könnte, wie nach einer Aktivierung von CB_1 oder CB_2 zu beobachten ist. In unveröffentlichten Daten der Arbeitsgruppe konnte eine konzentrationsabhängige Verringerung $Ki67^+$ Nuklei nach Stimulation mit dem GPR18-Ligand NaGly in *GBM #10* und *GBM #23* beobachtet werden. Die Zelltyp-spezifischen Unterschiede bezüglich der Reaktion auf NaGly können auch im Fall von GPR18 auf die selektive Funktionalität, wie in Abschnitt 5.1 diskutiert, zurückzuführen sein. Welche Mechanismen hinter diesem Phänomen stecken, wurde in dieser Arbeit nicht weiter

analysiert. Die antagonisierende Wirkung des verwendeten GPR18 Antagonisten O-1918 wurde in der Arbeitsgruppe unter anderem auf die GPR18-vermittelte Neuroprotektion nach NMDA-induzierter neuronaler Schädigung im Modell der murinen hippocampalen Schnittkulturen nachgewiesen [193]. Da im Folgenden eine Antagonisierung von GPR18 durch O-1918 keine Auswirkungen auf THC-vermittelte Effekte zeigte, ist eine GPR18-Abhängigkeit unwahrscheinlich.

5.3 Die GPR55-abhängige Reduktion Ki67⁺ Nuklei nach THC und LPI Stimulation

Nachdem in dieser Arbeit dargelegt wurde, dass THC unabhängig von CB₁, CB₂ und GPR18 die Anzahl Ki67⁺ Nuklei reduzierte, wurde im Weiteren der Fokus auf den orphanen CB-Rezeptor GPR55 gelegt. Seine weite Verbreitung innerhalb des Körpers ließ die Vermutung aufkommen, dass GPR55 an der Regulierung verschiedener physio- und pathologischer Funktionen beteiligt sein könnte, darunter die Regulation des Hormonhaushaltes, von Gewebeentzündungen und des Energiestoffwechsels [150,218,219]. Mehr und mehr Studien wurden zur Erforschung der Bedeutung von GPR55 im Zusammenhang mit Tumorerkrankungen durchgeführt und zeigten eine Korrelation der GPR55 Expression und der Tumorzellproliferation [168,172]. Vor allem am Beispiel des Glioblastoms wurde eine positive Korrelation zwischen der Expression von GPR55 und der Malignität beobachtet [168]. In der vorliegenden Arbeit konnte GPR55 in primären humanen Glioblastomzellen sowohl auf Transkript- als auch auf Proteinebene nachgewiesen werden. Dies warf die Frage auf, ob GPR55 möglicherweise die CB₁/CB₂-unabhängige Wirkung von THC erklären könnte. Die Einordnung von GPR55 als mutmaßlicher CB-Rezeptor wird nach wie vor diskutiert. In den letzten Jahren häuften sich die Hinweise, dass GPR55 durch bestimmte CB₁- und CB₂-Rezeptor-Liganden aktiviert werden kann [179]. Im konkreten Fall von THC und CBD konnte beispielsweise anhand von Ligandenbindungstests aufgezeigt werden, dass THC als Agonist (EC₅₀ = 8 nM) an GPR55 bindet [147,151], während für CBD ein antagonistischer Wirkmechanismus (IC₅₀ = 445 nM) festgestellt wurde [151,155]. In HEK293 Zellen, die den humanen GPR55 Rezeptor transient exprimierten, und in murinen Neuronen der Spinalganglien führte eine Behandlung mit 5 µM THC zu einem GPR55-vermittelten Anstieg der intrazellulären Ca²⁺ Konzentration [147]. Interessanterweise zeigte sich auch eine Erhöhung des intrazellulären Ca²⁺-Spiegels nach Applikation von 3 µM LPI in den selben Zellen und zwar in einem ähnlichen Ausmaß wie für THC gezeigt wurde [147]. Für CBD hingegen konnten *per se* keinerlei Effekte beobachtet werden [147]. Es ist bekannt, dass CBD die LPI-induzierte ERK1/2 Phosphorylierung in humanen Osteoklasten GPR55-abhängig wirksam antagonisierte

[155]. Dies entspräche dem Verhalten von THC und CBD, welches hinsichtlich der Modulation der Anzahl Ki67⁺ Nuklei im Rahmen der vorliegenden Arbeit beobachtet wurde. Aus diesem Grund sollte mit Hilfe von LPI und mit einem hoch selektiven GPR55 Antagonisten (CID) eruiert werden, ob GPR55 als Mediator für die THC Effekte in Frage kommt. Wie für THC konnte eine Reduktion Ki67⁺ Nuklei nach Stimulation mit LPI nachgewiesen werden. Des Weiteren konnten konsistente Daten erhoben werden, bei denen sowohl THC als auch LPI Effekte erfolgreich mittels CID und CBD aufgehoben wurden. Die Daten deuten darauf hin, dass eine Aktivierung von GPR55 im Allgemeinen und im Speziellen nach THC Applikation mit einer reduzierter Anzahl Ki67⁺ Nuklei einhergeht. Zum anderen bestätigt der Vergleich der Wirkung des hoch selektiven Antagonisten CID mit der Wirkung von CBD auf die Effekte von THC und LPI das antagonistische Verhalten von CBD an GPR55. Weiterhin lässt sich anhand fehlender Wirkungen der Einzelstimulationen von CID und CBD eine basal konstitutive Aktivierung von GPR55 hinsichtlich der Modulation Ki67⁺ Nuklei ausschließen.

Eine Studie von 2011 legte nahe, dass bestimmte Cannabinoide die LPI-induzierte Aktivierung von GPR55 nicht-kompetitiv hemmen oder verstärken könnten [182]. Es wurde die Möglichkeit einer orthosterischen und allosterischen Bindungsstelle an GPR55 postuliert, wobei sie für THC eine allosterische Inhibierung der LPI-induzierten Aktivierung von GPR55 vermuteten [182]. Die GPR55-vermittelte Signalübertragung wurde hier auf Ebene der Phosphorylierung von ERK1/2 in GPR55-transfizierten HEK293 Zellen untersucht. In der vorliegenden Arbeit konnten hinsichtlich der Anzahl Ki67⁺ Nuklei weder additive noch inhibierende Effekte einer Ko-Stimulation von THC und LPI, unabhängig des Applikationszeitpunktes, beobachtet werden, was keinerlei Hinweise auf ein allosterisches Bindungsverhalten von THC liefert. In kristallographischen Untersuchungen konnte eine allosterische Bindungsstelle nicht identifiziert werden [142,143,220]. Vielmehr zeigte sich, dass LPI, synthetische Liganden und einige Cannabinoide mit dem positiv geladenen Aminosäurerest K2.60 innerhalb der Hauptbindungstasche von GPR55 interagierten [142,143,220]. Für CBD zeigte sich beispielsweise eine orthosterische Bindung, in dem sein Pentylrest tief in die Bindungstasche eindringt und seine beiden freien Hydroxylgruppen mit den Resten K2.60 und E3.29 Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden [142]. In dieser Position blockierte CBD sterisch die Kippschaltreste, die die notwendigen Konformationsänderungen herbeiführten, was das antagonistische Verhalten von CBD an GPR55 erklärt [142]. Für THC existieren bisher keine kristallographischen Daten zur Bindung an GPR55. Da THC über eine freie Hydroxylgruppe verfügt und sich strukturell nicht wesentlich von CBD unterscheidet, ist es durchaus denkbar, dass THC mit dem selben kritischen Rest innerhalb der Bindungstasche

interagiert. Das agonistische Verhalten von THC an GPR55 lässt sich möglicherweise im Vergleich zu CBD durch die fehlende Interaktion der zweiten Hydroxylgruppe mit Resten innerhalb der Bindungstasche erklären. Sodass THC eine andere Position innerhalb der Bindungstasche einnimmt, welche die notwendige Interaktion der Kippschaltreste, die für die Konformationsänderung notwendig ist, gewährleistet. Auf diese Weise könnte THC die Wirkung von LPI maßgeblich orthosterisch beeinflussen. Dieses Phänomen führte möglicherweise zur partiellen Hemmung der LPI-vermittelten ERK1/2 Phosphorylierung in GPR55⁺ HEK293 Zellen, indem es einen Teil der GPR55-Rezeptoren besetzte und die Bindung von LPI an GPR55 verhinderte [182]. Es ist anzumerken, dass die Autoren eine geringe THC-Konzentration (1 μM) in Kombination mit LPI (0,01-10 μM) verwendeten, die in Abwesenheit von LPI keine signifikanten Auswirkungen auf die ERK1/2 Phosphorylierungen zeigte, obwohl THC in höheren Konzentrationen ($\geq 5 \mu\text{M}$) die ERK1/2-Phosphorylierung GPR55-abhängig förderte [182]. Aufgrund fehlender inhibierender und additiver Effekte kann eine allosterische Bindung von THC an GPR55 in der vorliegenden Arbeit ausgeschlossen werden. Signale von unterschiedlichen Rezeptoren scheinen ebenfalls unwahrscheinlich, da sie sich gegenseitig verstärken oder einander entgegenwirken würden. Zumal die Hauptinteraktionspartner von THC (CB₁ und CB₂) bereits ausgeschlossen wurden.

Es ist im Allgemeinen bekannt, dass Cannabinoide biphasische Effekte bei der Applikation unterschiedlicher Konzentrationen hervorrufen können [114,182,194]. Die Gründe liegen hier meist in der Menge der Rezeptoren, der Dauer der Rezeptoraktivierung und in der Pharmakologie der Liganden. Untersuchungen an der humanen Glioblastomzelllinie SF126 zeigten eine Proliferationsförderung bei Exposition mit nanomolaren THC-Konzentrationen und eine Hemmung nach Applikation mikromolarer Konzentrationen [114]. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass eine kurzfristige und geringe ERK1/2-Stimulation das Zellwachstum anregte und eine langfristige und hohe ERK1/2-Stimulation mit dem Zelltod einherging [114]. Des Weiteren vermuteten die Autoren weitere Rezeptoren, die durch THC aktiviert wurden, da nur eine partielle Hemmung der THC Effekte in Anwesenheit von CB₁/CB₂ Antagonisten erzielt wurde [114]. In anderen Experimenten, bei denen Effekte auf die FSK-stimulierte cAMP-Produktion untersucht wurden, konnten auf Ebene der Rezeptorbindung biphasische Effekte beobachtet werden [194]. Bei Konzentrationen $\leq 1 \mu\text{M}$ inhibierte THC die cAMP-Produktion CB₂-abhängig. THC Konzentrationen $\geq 5 \mu\text{M}$ blockierten die CB₂-vermittelte Hemmung der cAMP-Produktion über die Aktivierung von GPR55, was letztlich auf die Bildung von CB₂-GPR55-Heteromeren zurückgeführt wurde [194]. Um zu testen, ob THC in der vorliegenden Arbeit biphasische Effekte hervorruft, wurden die Zellen

exemplarisch mit Konzentrationen zwischen 0,1 μM – 10 μM THC behandelt. Es wurden Dosis-abhängige und vergleichbare Effekte in unterschiedlicher Intensität beobachtet, die durch den GPR55 Antagonisten CID konsistent und vollständig blockiert wurden. Biphasische Effekte hinsichtlich der GPR55-abhängigen Modulation der Anzahl Ki67⁺ Nuklei in den untersuchten Zellen können daher ausgeschlossen werden.

5.4 Die Zelltyp-spezifische Wirkung von THC und LPI

Obwohl GPR55 in *GBM #23* nachgewiesen wurde, waren sowohl THC als auch LPI nicht in der Lage, den Anteil Ki67⁺ Nuklei zu verändern. Diese Ergebnisse deuten auf Unterschiede zwischen den drei betrachteten Glioblastomzellen im Hinblick auf die Wirksamkeit von THC, die Anzahl Ki67⁺ Nuklei zu modulieren, hin. Der genetische Hintergrund aufgrund der inter- und intratumoralen Heterogenität könnte für eine Tumor- und Zelltyp-spezifische Reaktion nach Aktivierung von GPR55 verantwortlich sein. Glioblastome sind durch eine hohe Anzahl genetischer Veränderungen charakterisiert, die zu Alterationen in Proliferation, Migration und Invasivität führten [221]. Mutationen in nachgeschalteten Effektoren von GPR55 in *GBM #23*, was zu einer Unterbrechung oder Verschiebung seiner Signalübertragung führt, könnten die Zelltyp-spezifischen Reaktionen erklären. Der Mutationsstatus an der GPR55-Signalübertragung beteiligter Effektoren in den untersuchten Glioblastomzellen ist unbekannt und sollte in weiteren Untersuchungen ermittelt werden.

Ein weiterer Aspekt stellen Variationen der Protein-Protein-Interaktionen, wie die Bindung akzessorischer Proteine an GPR55 in Folge der funktionellen Selektivität oder der Dimerisierung von GPR55 mit anderen GPCRs dar. Die Menge bestimmter G-Proteine, die intrazellulär an GPCRs gekoppelt sind, ist ein entscheidender Parameter für die Signalweiterleitung eines Rezeptors [20,22]. In einer Studie an mCB₁-exprimierenden HEK293 Zellen wurde gezeigt, dass sich in Gegenwart von PTX die CB₁-Kopplung an G $\alpha_{o/i}$ zu G α_q -Proteine verschob, wenn CB₁ durch WIN 55,212-2 aktiviert wurde [22]. Durch die Hemmung der G $\alpha_{o/i}$ -Untereinheit schwächt PTX die Wechselwirkungen der heterotrimeren G $\alpha_{o/i}$ -Proteine mit CB₁-Rezeptoren ab, was zu einem Anstieg des Verhältnisses von funktionellem G α_q zu G $\alpha_{o/i}$ führte und eine Kopplung an die weniger bevorzugten G α_q -Proteinen ermöglichte [22]. Ähnliche Ergebnisse wurden in hCB₁-exprimierenden HEK293 Zellen erzielt, in der PTX eine Verschiebung von G α_i - zu G α_s -vermittelten Signalen nach Applikation von WIN55,212-2 und THC auslöste [20]. Außerdem war diese Art der Signalverschiebung auch in Folge der „Erschöpfung“ von G α_i -Proteinen nachweisbar, wenn die CB₁-Rezeptorexpression artifiziell erhöht wurde [20]. Interessanterweise wurde dieses Phänomen durch eine Erhöhung der Menge

des $G\alpha_i$ -Proteins umgekehrt [20]. Es ist daher denkbar, dass sich die Glioblastomzellen in der vorliegenden Arbeit hinsichtlich des Aufbaus und des Expressionsniveaus (Über- oder Unterexpression) bestimmter G-Proteine oder anderer Effektormoleküle unterscheiden. Gerade die detektierten Expressionsunterschiede von $G\alpha_o$ in *GBM #4* und $G\alpha_q$ in *GBM #10*, sowie die Unterschiede in der Signalweiterleitung, die im nachfolgenden diskutiert werden, könnten auf Effekte von THC und LPI günstig wirken und diese These unterstützen.

Darüber hinaus können GPR55-assoziierte Signalkaskaden durch Interaktionen mit CB_1 - und CB_2 -Rezeptoren verändert werden [194–196,222]. In HEK293 Zellen, die mit CB_1 und GPR55 ko-transfiziert wurden, führte die Anwesenheit von CB_1 -Rezeptoren zu einer Verringerung oder zu einer Hemmung der GPR55-vermittelten Signalübertragung [196]. In ähnlicher Weise wurde nach Dimerisierung von GPR55 mit CB_2 -Rezeptoren eine verringerte GPR55-vermittelte Signaltransduktion beobachtet [194,195]. Zusätzlich wurde hier ein Phänomen des Kreuzantagonismus beschrieben, das darauf hindeutet, dass ein Rezeptor durch die Verwendung des Antagonisten des Partnerrezeptors in einer scheinbar spezifischen Art angreifbar ist. Insbesondere wurde die LPI-induzierte ERK1/2-Phosphorylierung durch AM630 oder SR144528 (CB_2 -Antagonisten) verhindert [194,195], während die Wirkung von HU-308 (CB_2 -Agonist) durch den GPR55-Antagonisten HBA blockiert wurde [194]. Die Antagonisierung von CB_2 mit AM630 hatte hingegen keinen Einfluss auf die GPR55-vermittelte NFAT-Aktivierung [195]. Hier führte stattdessen die Interaktion mit CB_2 zu einer reduzierten NFAT-Aktivierung durch die LPI/GPR55-Signalachse [195]. In der vorliegenden Arbeit konnten CB_1 und CB_2 auf Transkript- und Proteinebene nachgewiesen und deren Funktionalität in Vorversuchen bestätigt werden. Da die Blockierung von CB_1 und CB_2 die GPR55-abhängige THC-Signalisierung in *GBM #4* und *GBM #10* nicht beeinflusste, spricht dies gegen einen Kreuzantagonismus in Folge der Heterodimerisierung von GPR55 mit CB_1 oder CB_2 . Da sowohl eine erhöhte GPR55- als auch eine deutlich erhöhte CB_2 -Expression in *GBM #23* gefunden wurde, könnte eine Heterodimerisierung dieser Rezeptoren die gegensätzlichen Ergebnisse in *GBM #23* erklären. Untersuchungen an der humanen Brustkrebszelllinie MDA-MB231 zeigten, dass durch einen gezielten *Knockout* oder *Knockdown* von CB_2 ein Wechsel von GPR55-abhängigen Effekten von einem proliferativen hin zu einem zytotoxischen Mechanismus induziert werden konnte [222]. Ob GPR55-vermittelte Signalkaskaden in *GBM #23* durch die Heterodimerisierung mit CB_2 -Rezeptoren verändert wurden, sollte in weiteren Untersuchungen betrachtet werden.

5.5 Die Zelltyp-abhängige Kopplung von $G\alpha_q$ und/oder $G\alpha_{12/13}$ an GPR55 sowie die Rolle von $G\beta\gamma$ unter Berücksichtigung der Beteiligung der PLC-IP3- und RhoA-ROCK-Signalwege

Es wird angenommen, dass GPR55 an $G\alpha_q$ - und $G\alpha_{12/13}$ - und nicht an $G\alpha_s$ - oder $G\alpha_{o/i}$ -Proteinen koppelt [147,151,176]. Der Stimulierung von $G\alpha_q$ folgt im Allgemeinen die Aktivierung der Phosphodiesterase PLC [147]. Experimente an Zelllinien und Primärzellen ergaben, dass die pharmakologische Aktivierung von GPR55 mit LPI und Cannabinoiden über die Aktivierung von PLC und der Bildung von IP3 zu einem Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration ($[Ca^{2+}]_i$) führte [147,158,176,223]. In HEK293 Zellen und Neuronen von Spinalganglien wurde eine PLC-IP3-abhängige Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ nach Stimulation mit 5 μ M THC und mit 3 μ M LPI *via* GPR55 beobachtet [147]. Die Daten der vorliegenden Arbeit deuten konsistent daraufhin, dass die THC-vermittelte Reduktion Ki67⁺ Nuklei einem PLC- und IP3-abhängigen Mechanismus über GPR55 folgte. Eine PLC-IP3-abhängige Signaltransduktion über die Aktivierung der klassischen CB-Rezeptoren (CB₁ und CB₂) konnte für THC bislang nicht beobachtet werden. In CB₁-transfizierten HEK293 Zellen hatte eine Stimulation mit 10 μ M THC keine messbaren Auswirkungen auf die $[Ca^{2+}]_i$, obwohl eine CB₁-abhängige Ca^{2+} -Freisetzung *via* WIN 55,212-2 nachgewiesen wurde [22]. Dies stimmt mit der CB₁-unabhängigen Wirkung von THC bezüglich der Modulation der Anzahl Ki67⁺ Nuklei, trotz der Expression funktionaler CB₁-Rezeptoren, überein. Zusammen mit den kongruierenden LPI-Daten bestätigen diese Daten die postulierte GPR55-Abhängigkeit und einen PLC-IP3-abhängigen Mechanismus. Aufgrund der Beteiligung IP3-sensitiver Rezeptoren kann in der vorliegenden Arbeit von einem Ca^{2+} -abhängigen Prozess ausgegangen werden, da IP3-sensitive Rezeptoren die Freisetzung von Ca^{2+} vom ER ins Zytosol induzieren [198]. In weiterführenden Untersuchungen sollte deshalb mit Hilfe des *Calcium-Imagings* die Freisetzung von Ca^{2+} genauer untersucht werden.

Neben dem PLC-IP3-Signalweg wurde in HEK293 und PC12 Zellen über eine GPR55-vermittelte Aktivierung von RhoA nach Stimulation mit LPI und Cannabinoiden berichtet [147,151,156,176]. Es zeigte sich, dass RhoA-ROCK *downstream* von $G\alpha_{12/13}$ -Untereinheiten und in geringerem Maße von $G\alpha_q$ aktiviert wird. Da viele zelluläre Vorgänge, wie Proliferation oder Migration unter anderem von RhoA und der RhoA Kinase ROCK beeinflusst werden, wurde in der vorliegenden Arbeit die Beteiligung von RhoA über die Inhibierung von ROCK untersucht. Es wurde eine Zelltyp-abhängige Beteiligung von ROCK beobachtet, die im Allgemeinen auf Unterschiede in der intrazellulären Kopplung von G-Proteinen an GPR55 zurückzuführen war. Interessanterweise scheint in *GBM #10* die Reduktion Ki67⁺ Nuklei nach

THC und LPI Stimulation auf ein Zusammenspiel der PLC- und RhoA-ROCK-Signalwege zu beruhen. In murinen Endothelzellen aus Mesenterialarterien wurde eine Interaktion der Signalwege hinsichtlich der Modulation von $[Ca^{2+}]_i$ nach GPR55-Aktivierung durch LPI oder AM251 festgestellt [32]. Die Freisetzung von intrazellulärem Ca^{2+} war durch zwei Phasen gekennzeichnet. Die Hemmung von PLC durch U73122 blockierte die initiale Ca^{2+} -Freisetzung, während die Blockade der späten Freisetzung durch die Hemmung von ROCK mittels Y-27632 erreicht wurde, was auf einen biphasischen Mechanismus schließen lässt [32]. Beide Phasen wurden durch die Blockierung IP3-sensitiver Rezeptoren mittels 2-APB aufgehoben, was auf eine ROCK-induzierte IP3-Bildung durch direkte PLC-Aktivierung hinweisen könnte [32]. Diese Daten lassen einen ähnlichen Mechanismus in *GBM #10* nach THC Stimulation vermuten, welcher sowohl PLC- als auch ROCK-abhängig ablief. Ob RhoA-ROCK *upstream, downstream* oder dual aktiviert wurde, ließ sich in der vorliegenden Arbeit nicht genau klären. Der genaue Mechanismus der ROCK-gesteuerten PLC-Aktivierung ist noch nicht ausreichend bekannt. Eine Erklärung für die Interaktion liefern Untersuchungen an HEK293 Zellen, bei denen die Rolle des Aktin-Zytoskeletts bei der Erzeugung von GPR55-abhängigen Ca^{2+} -Signalen eruiert wurde [147]. Die Familie der Rho-Proteine, einschließlich RhoA, reguliert neben der Proteinbiosynthese und der Zellproliferation auch die Organisation des Aktin-Zytoskeletts, in dem es beispielsweise die Aktin Stabilisierung über die Aktivierung der LIM-Kinase oder die Aktomyosin Kontraktion über MLC (*modulator of VRAC current 1*) beeinflusste [224]. Der THC-vermittelte Ca^{2+} -Anstieg in GPR55-exprimierenden HEK293 Zellen erforderte sowohl eine RhoA-Aktivierung als auch ein intaktes Aktin-Zytoskelett [147]. Im Gegensatz dazu wurde der rein PLC-vermittelte Weg, wie er beispielsweise bei der Aktivierung muskarinerg Acetylcholin-Rezeptoren des parasympathischen Nervensystems auftritt, weder durch eine RhoA Inhibierung noch durch eine verschlechterte Bildung des Aktin-Zytoskeletts beeinträchtigt [224]. Diese Daten deuten darauf hin, dass ein intaktes Aktin-Zytoskelett eine zentrale Rolle bei der Modulation von $[Ca^{2+}]_i$ spielen könnte, wenn GPR55 mit RhoA/ROCK-Signalen gekoppelt ist. Eine Erklärung für dieses Phänomen liefert eine Studie an der murinen Fibroblasten Zelllinie NIH 3T3 [225]. Die Studie postulierte, dass eine Störung des Zytoskeletts die räumliche Beziehung zwischen PLC und IP3-sensitiven Rezeptoren veränderte, wodurch die PLC-abhängige Ca^{2+} -Signalgebung beeinträchtigt wurde [225]. Insgesamt legen diese Daten nahe, dass RhoA-ROCK-Signalwege indirekt die PLC-abhängige Reduktion Ki67⁺ Nuklei in *GBM #10* durch Alterationen der räumlichen Lage von PLC und IP3-sensitiven Rezeptoren fördern könnte. Die Notwendigkeit der direkten Aktivierung von

ROCK wird durch den ROCK-unabhängige Signalmechanismus in *GBM #4* unterstützt, was die Beteiligung von basal-aktivem ROCK ausschließt.

Der Unterschied in der Beteiligung von RhoA-ROCK lässt weiterhin vermuten, dass der GPR55-Signalweg nach Interaktion mit THC oder LPI zur Verringerung der Anzahl Ki67⁺ Nuklei in *GBM #4* an die $G\alpha_q$ -Aktivierung gekoppelt ist. In *GBM #10* scheint die Signalweiterleitung hingegen auf einer $G\alpha_{12/13}$ -Kopplung oder auf einer dualen Signalweiterleitung *via* $G\alpha_q$ und $G\alpha_{12/13}$ zu beruhen. Vergleichbare Beobachtungen konnten in GPR55-exprimierenden HEK293 Zellen [176], in Neuronen der Spinalganglien [147] und in Endothelzellen der Mesenterialarterien [156] verzeichnet werden, bei der sowohl eine PLC- als auch RhoA-ROCK-abhängige Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ gemessen wurde. Darüber hinaus konnte der Anstieg von $[Ca^{2+}]_i$ in Neuronen muriner Spinalganglien nach GPR55-Aktivierung auf eine duale $G\alpha_{12/13}$ - und $G\alpha_q$ -Signalweiterleitung zurückgeführt werden [147]. Einige GPCRs wechseln funktionell in Abhängigkeit der Expressionsstärke der G-Proteine die Subfamilie der G-Proteine, mit denen sie assoziiert sind [20,22]. In der vorliegenden Arbeit wurden zwar Unterschiede in der Expression der relevanten $G\alpha_q$ und $G\alpha_{12}$ gefunden, allerdings ohne die Zelltyp-spezifische Signalübertragung erklären zu können.

Man sollte nicht außer Acht lassen, dass aktivierte GPCRs nach Dissoziation des trimeren G-Protein-Komplexes vom Rezeptor sowohl durch freie $G\alpha$ -Untereinheiten als auch durch freie und aktive $G\beta\gamma$ Untereinheiten Signalkaskaden in Gang setzen können. Aus diesem Grund wurde die Beteiligung einer $G\beta\gamma$ -abhängigen Signaltransduktion untersucht. Interessanterweise konnte auch hier eine Zelltyp-spezifische $G\beta\gamma$ -Abhängigkeit festgestellt werden. Ein derartiger Zusammenhang mit der Aktivierung von GPR55 in Tumorzellen wurde bisher nicht gezeigt. In Schnittkulturen der *Substantia nigra* muriner Gehirne wurde eine GPR55 Stimulation durch LPI oder O-1602 mit der nigralen präsynaptischen Freisetzung von [³H] γ -Amino-Buttersäure (GABA) in Verbindung gebracht [226]. Diese Studie bekräftigte die Möglichkeit der Beteiligung von $G\beta\gamma$ an GPR55-gesteuerten Prozessen, in dem gezeigt wurde, dass die nigrale GABA-Freisetzung durch die Blockade von $G\beta\gamma$ *via* Gallein signifikant aufgehoben wurde. Im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit wurde eine $G\beta\gamma$ -induzierte AC Aktivierung und eine nachgeschaltete cAMP Akkumulation als zugrundeliegender Mechanismus angenommen [226], was auf Spezies- und Zelltyp-spezifischen Unterschiede zurückzuführen ist.

Obwohl alle Isoformen von G-Proteinen pro Aktivierungsereignis ein Molekül eines $G\beta\gamma$ -Dimers freisetzen, ist die $G\beta\gamma$ -Signalgebung stark an $G\alpha_{o/i}$ -Proteine gebunden [227]. Zur Überprüfung ob $G\alpha_{o/i}$ -gekoppelte Rezeptoren an den THC- und LPI-vermittelten Effekte involviert sind, wurde PTX verwendet. PTX verhindert die Signalweiterleitung $G\alpha_{o/i}$ -

stimulierender Rezeptoren durch die Mobilisierung des enzymatischen A-Protomers von PTX, die eine irreversible ADP-Ribosylierung der α -Untereinheit des trimeren $G\alpha_{o/i}\beta\gamma$ -Komplexes katalysiert [197]. PTX erwies sich in der vorliegenden Arbeit zur Erforschung $G\alpha_{o/i}$ -abhängiger Signaltransduktionen als ungeeignet, da es selbst einen maßgeblichen Einfluss auf die Anzahl $Ki67^+$ Nuklei nahm. Es ist möglich, dass die Reaktionen der Zellen auf PTX auf einer Akkumulation von cAMP in Folge einer verstärkten cAMP-Produktion über stimulierende GPCRs oder der ungehinderten Aktivierung cAMP-vermittelter Signalwege zurückzuführen war. Neben der $G\alpha_{o/i}$ -abhängigen Wirkung existiert noch ein weiterer Prozess, der die Bindung des B-Oligomers von PTX an verschiedene Zielproteine auf der Zelloberfläche, wie dem TLR4, beinhaltet [228]. Im Unterschied zur $G\alpha_{o/i}$ -abhängigen Wirkung erfordert der G-unabhängige Mechanismus hohe PTX-Konzentrationen. Zusätzlich zeigte die Stimulation mit dem AC-Stimulator Forskolin ähnliche Effekte wie PTX, was eine ungehinderte Aktivierung cAMP-vermittelter Signalwege verdeutlicht und einen G-Protein-unabhängigen Mechanismus widerlegt. Da die PTX-Behandlung eine hohe Hintergrundaktivität zeigte, ist die Rolle von $G\beta\gamma$, die von $G\alpha_{o/i}$ ausgehen, bei der GPR55-Signalgebung im *GBM #4* nach wie vor ungeklärt. Im Vergleich zu $G\alpha_{o/i}$ -abgeleiteten Untereinheiten können Signale auch in geringerem Maße von $G\alpha_q$ -gekoppelten $G\beta\gamma$ -Untereinheiten über die PI3K-Aktivierung erzeugt werden [229]. Die PI3K- und die konsekutive PLC-Aktivierung wurden als Mechanismen für die GPR55-gesteuerte Ca^{2+} -Signalgebung in Endothelzellen nach AEA-Behandlung beschrieben [178]. In Übereinstimmung mit der $G\alpha_q$ -Signalgebung in *GBM #4* ist eine von $G\alpha_q$ -abgeleitete $G\beta\gamma$ -Signalgebung über PI3K wahrscheinlicher. Daher sollte in weiterführenden Untersuchungen die Beteiligung von PI3K eruiert werden. Ungeachtet der Herkunft der beteiligten $G\beta\gamma$ -Untereinheiten liefert die Regulation der PLC einen weiteren möglichen Erklärungsansatz für die beobachtete $G\beta\gamma$ -Abhängigkeit. Denn $G\beta\gamma$ -Untereinheiten können über die Interaktion mit PLC das Ausmaß $G\alpha_q$ -abhängiger Signaltransduktion beeinflussen. $G\beta\gamma$ -Untereinheiten sind in der Lage die PLC-Lipase-Aktivität direkt zu stimulieren [229,230] und auf diese Weise mit der $G\alpha_q$ -abhängigen Stimulation von PLC synergistisch wirken [230–232]. Zusätzlich ist PLC sowohl ein Effektor von $G\alpha_q$ als auch ein $G\alpha_q$ -selektives GTPase-aktivierendes Protein (GAP) und verkürzt seine Signalkinetik, indem es die $G\alpha$ -GTPase Aktivität von $G\alpha_q$ erhöhte. Die GAP-Aktivität von PLC kann durch die Wechselwirkung mit $G\beta\gamma$ -Untereinheiten gehemmt werden [230,233] und bietet neben der Synergie eine weitere Möglichkeit, die Reaktion auf $G\alpha_q$ -Signale zu modifizieren. Da durch Gallein die Interaktion von $G\beta\gamma$ -Untereinheiten mit nachgeschalteten Effektoren unterbunden wurde, ist es denkbar, dass eine alleinige Stimulation von PLC durch $G\alpha_q$ nicht ausreichte, um die Wirkungen von THC und LPI auf $Ki67^+$ Nuklei

zu entfalten. Somit könnte im konkreten Fall von *GBM #4* die GPR55-abhängige Reduktion Ki67⁺ Nuklei von der Dauer und Stärke der Stimulation von PLC über die Interaktion mit Gα_q und funktionalen Gβγ-Untereinheiten bestimmt werden. Dies würde in Einklang mit der Gα_q-abhängigen Signalgebung nach GPR55-Aktivierung stehen. Im Unterschied dazu konnten für die Effekte auf *GBM #10* keine Gβγ-Abhängigkeit festgestellt werden. Die Ursache für die Divergenz der Signalweiterleitungen auf Ebene nachgeschalteter Effektoren könnte in der Kopplung von GPR55 an Gα_{12/13} und der resultierenden ROCK-Abhängigkeit begründet liegen. Möglicherweise trägt hier der RhoA-ROCK-Signalweg direkt oder indirekt zur ausreichenden Dauer und Stärke der Stimulation von PLC und/oder nachgeschalteter Signale bei, die notwendig sind, um die Anzahl Ki67⁺ Nuklei zu modulieren. Wie bereits diskutiert liefern Ca²⁺ Messungen an murinen Endothelzellen von Mesenterialarterien, bei der nach Stimulation von GPR55 mittels LPI und AM251 eine biphasische Erhöhung der [Ca²⁺]_i beobachtet wurde, Hinweise auf eine mögliche Erklärung dieses Phänomens [156].

5.6 Die Zelltyp-abhängige Beteiligung von Calcineurin und die Rolle von NFAT

Aufgrund der Beteiligung IP3-sensitiver Rezeptoren wurde in der vorliegenden Arbeit von einem Ca²⁺-abhängigen Prozess ausgegangen [198]. Ca²⁺-Ionen können im Zytosol als *second messenger* verschiedene Ca²⁺-abhängige Proteinkinasen und die Ca²⁺/Calmodulin-abhängige Proteinphosphatase Calcineurin aktivieren [200]. Diese Enzyme fungieren als Signalübermittler für die Weiterleitung des Ca²⁺-Signals aus dem Zytosol in den Nukleus. Während Ca²⁺-abhängige Proteinkinasen Transkriptionsfaktoren, wie CREB oder NF-κB phosphorylieren und aktivieren, katalysiert Calcineurin die Dephosphorylierung von hyperphosphorylierten Transkriptionsfaktoren [199]. Ein prominentes Beispiel bildet NFAT, was resident im Zytoplasma lokalisiert ist und dessen Aktivierung durch Calcineurin zur Translokation in den Nukleus und der Induktion/Repression NFAT-spezifischer Zielgene führt [199]. Es wurde berichtet, dass eine GPR55-Aktivierung durch LPI oder Cannabinoiden mit einer Aktivierung von NFAT über die Erhöhung [Ca²⁺]_i einhergeht [175,176]. Zusätzlich bedingt eine Aktivierung von IP3-sensitiven Rezeptoren in der Regel eine Erhöhung der [Ca²⁺]_i [198], was mit einer GPR55-abhängigen Aktivierung von NFAT assoziiert wurde [175,178,234].

Um die Beteiligung von Calcineurin in der vorliegenden Arbeit zu untersuchen, wurden die nicht-kompetitiven Calcineurin-Inhibitoren Cyclosporin A (CsA) und Tacrolimus (FK506) genutzt. Im Allgemeinen binden Calcineurin-Inhibitoren mit hoher Affinität an bestimmte zytoplasmatische Rezeptoren, die als Immunophiline bezeichnet werden, darunter Cyclophilin

und das FK-Bindungsprotein (FKBP). Die CsA-Cyclophilin bzw. FK506-FKBP Komplexe hemmen konsekutiv Calcineurin, in dem sie den Zugang von Peptid- und Proteinsubstraten zum aktiven Zentrum von Calcineurin limitieren [235,236]. Während für *GBM #4* eine klare Beteiligung von Calcineurin dargelegt werden konnte, blieb in *GBM #10* die Stimulation mit CsA erfolglos, wohingegen FK506 zu einer partiellen Inhibierung der Effekte führte. Die Divergenz in der konzentrationsabhängigen Responsivität auf CsA und FK506 lässt sich anhand einer höheren Bindungsaffinität von FK506-FKB-Komplexe an Calcineurin im Vergleich zu CsA-Cyclophilin-Komplexe erklären [237]. Somit scheint Calcineurin nicht ausschließlich zu der THC- und LPI-induzierten Abnahme Ki67⁺ Nuklei in *GBM #10* beizutragen. Die starke Hintergrundaktivität von CsA und FK506 lässt eine klare Aussage nicht zu und war nicht zwingend auf die Inhibierung basal aktivem NFAT zurückzuführen. Nach CsA und FK506 Behandlung waren NFAT2 und NFAT3 im Nukleus vorhanden, was auf einen scheinbar Calcineurin-unabhängigen Mechanismus ihrer konstitutiven Aktivierung hindeutet. Weiterhin ist anzumerken, dass die Wirkung der Inhibitoren nicht nur auf Calcineurin beschränkt ist, sondern beide Substanzen zusätzlich die transkriptionelle Aktivität von NF- κ B oder die proteosomale Degradation von Proteinen [238] beeinflussen können.

Eine Induktion von NFAT im Allgemeinen und NFAT4 im Besonderen wurde nach LPI-vermittelter GPR55-Aktivierung berichtet [175,178,234]. Die Unterschiede zur vorliegenden Arbeit können durch die verwendeten experimentellen Bedingungen erklärt werden, darunter eine artifizielle Überexpression von GPR55 in transfizierten HEK293 Zellen oder eine Serumdepletion vor und während der Stimulation. Unter diesen Bedingungen wird eine effiziente NFAT-Aktivierung durch einen anhaltenden Ca²⁺-Stimulus begünstigt. Diese Faktoren schienen bei den hier untersuchten Glioblastomzellen nicht erfüllt zu sein. Die Intensität und Dauer der durch „store-operated“ Ca²⁺ Kanäle-erzeugten Ca²⁺-Signalen, wie beispielweise durch IP3-sensitive Rezeptoren, spielen scheinbar eine entscheidende Rolle in der Aktivierung von NFAT [199]. Für NFAT1 und NFAT4 konnte beispielsweise gezeigt werden, dass sie zwar durch die selben Ca²⁺-Signale stimuliert wurden, aber für ihre Aktivität unterschiedliche starke und subzelluläre Ca²⁺-Signale benötigt wurden. Während NFAT1 bei niedrigen Reizintensitäten selektiv rekrutiert wurde, erfolgte die Aktivierung beider Isoformen mit zunehmender Rezeptorbesetzung und kontinuierlichem Ca²⁺ Einstrom. Des Weiteren zeigte sich eine unterschiedliche Kinetik ihres Kernexports: Der langsame Export von NFAT1 ermöglichte die Aktivierung der Genexpression auch bei niederfrequenten Ca²⁺-*Spikes*, da es im Zellkern verblieb, lange nachdem das Ca²⁺-Signal beendet war. Im Gegensatz dazu war NFAT4 nur wirksam, wenn der Ca²⁺-Anstieg anhaltend war, da dessen Export rapide erfolgte

[239]. Im Vergleich zu akuten Ca^{2+} -Signalen nach Exposition mit Ionomycin [203] oder Thapsigargin [202], was in der vorliegenden Arbeit zu einer deutlichen Anreicherung von NFAT1 im Nukleus führte, waren THC und LPI bei der Translokation von NFAT1 unwirksam. Ein möglicher Erklärungsansatz für die differente Fähigkeit der NFAT1-Aktivierung, könnte auf die Ausbildung von Ca^{2+} -Stimuli unterschiedlicher Intensitäten zurückzuführen sein. Die Effizienz der NFAT1 Aktivierung wird zusätzlich durch die Aktivität der nukleären Glykogensynthase-Kinase 3 beta (GSK3 β), die NFAT dauerhaft phosphoryliert und der dephosphorylierenden Aktivität von Calcineurin entgegenwirkt, bestimmt. Um die GSK3 β -Aktivität zu überwinden, sind daher möglicherweise stärkere Ca^{2+} Signale notwendig, wie sie nach Ionomycin und Thapsigargin Behandlung gefunden werden.

Translokationen von NFAT2-4 konnten auch nach Behandlung mit Ionomycin oder Thapsigargin, sowie mit THC oder LPI nicht beobachtet werden. Um nukleäre Signale von NFAT2-4 zu generieren, ist möglicherweise die Induktion weiterer Transkriptionsfaktoren notwendig, die als Kooperationspartnern von NFAT agieren, darunter c-Fos und c-Jun. Letzteres wird durch Beobachtungen in NFAT-überexprimierenden HEK293 Zellen gestützt, bei der die NFAT-abhängige Expression eines Luziferase Gens nur bei Ko-Stimulation von Ionomycin mit der PKC-aktivierenden Substanz PdBu erhöht wurde [240]. Zusätzlich scheinen NFAT4-Signale durch eine pulsierende Translokationsdynamik gekennzeichnet zu sein, wie sie in Mastzellen nachgewiesen wurde [241]. Daher ist die Bestimmung eines exakten Zeitpunktes der Kerntranslokation ohne *Live*-Bildgebung schwierig.

Insgesamt zeigen die Daten, dass NFAT nicht an der Reduktion Ki67⁺ Nuklei beteiligt war, was auf einer ungenügenden Intensität und Dauer des Ca^{2+} Signals für eine effiziente NFAT-Aktivierung zurückzuführen sein könnte. Neben NFAT dephosphoryliert Calcineurin auch andere Transkriptionsfaktoren, darunter den CREB-regulierten Transkriptions-Koaktivator 1 [242], Transkriptionsfaktor EB (TFEB) [243], *Myocyte Enhancer Factor-2* (MEF-2) [244] und *ETS-Like-1* (ELK-1) [200]. Da sowohl CsA als auch FK506 die transkriptionelle Aktivität von NF- κ B inhibieren könnten und NF- κ B durch die Ca^{2+} /Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II (CaMKII) aktiviert werden kann, sollte in weiteren Untersuchungen die Rolle von NF- κ B als Calcineurin-unabhängiger Mechanismus eruiert werden.

Auf Grundlage der ähnlich Zelltyp-abhängigen Effekte von FSK, PTX und cAMP-vermittelter Signalwege sei auch die mögliche Beteiligung von CREB hervorzuheben. CREB ist zwar kein direktes Substrat für Calcineurin, kann aber indirekt durch Calcineurin bzw. durch Ca^{2+} -Signale reguliert werden. Calcineurin kann beispielsweise Teil einer negativen Rückkopplungsschleife der Ca^{2+} -initiierten Transkription von CREB-Zielgenen sein, in dem es die Aktivität der

Proteinphosphatase-1, welche für die Inaktivierung von CREB verantwortlich ist, beeinflusst [245]. Interessant ist, dass ein Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ über die Aktivierung der CaMKIV die CREB-gesteuerte Gentranskription aktiviert und anschließend eine Inaktivierung von CREB über die von Calcineurin-vermittelte Aktivierung der Proteinphosphatase induziert [245]. Calcineurin kann alternativ aber auch als positiver Regulator von CREB fungieren, in dem es die nukleäre Translokation von *CREB-regulated transcriptional co-activators* (CRTC) fördert [242]. Unter basalen Bedingungen werden CRTCs phosphoryliert und durch Wechselwirkungen mit 14-3-3-Proteinen im Zytoplasma gehalten. Sowohl cAMP- als auch Ca^{2+} Signale können die Dephosphorylierung von CRTCs durch Hemmung der *salt-inducible* Kinasen (SIKs, die CRTCs phosphorylieren) bzw. durch Induktion der CRTC-Phosphatase Calcineurin induzieren. Dephosphoryliertes CRTC transloziert in den Nukleus, wo es sich an die bZIP Domäne von CREB bindet und als Ko-Aktivator wirkt [242]. Welche der beiden vorgestellten Mechanismen vorrangig für veränderte Ca^{2+} -abhängige CREB-Aktivierungen verantwortlich sind, ist bis heute im Detail nicht verstanden, könnten aber auf Zelltyp-spezifischen Unterschiede oder auch auf die Amplitude, Dauer und subzelluläre Lokalisierung von Ca^{2+} -Signalen zurückzuführen sein [200]. Diese Hypothesen sollten in zukünftigen Untersuchungen, die die Analysen des Phosphorylierungszustands, der Aktivität und der Kernlokalisierung von CREB und CRTCs beinhalten, in Betracht gezogen werden.

5.7 Die funktionelle Bedeutung eines reduzierten Anteils Ki67⁺ Nuklei unter Berücksichtigung zugrundeliegender Signalwege

In der modernen Diagnostik gilt Ki67 als reliabler Proliferationsmarker mit prognostischer Relevanz für die Überlebenschance von Tumorpatienten [246–249]. In der Diagnostik von Glioblastomen ist die immunhistochemische Markierung von Ki67 die am häufigsten verwendete Methode zu Messung der Proliferation. Die prognostische Rolle von Ki67 erscheint im konkreten Beispiel des Glioblastoms dennoch nicht ganz klar. Während einige Studien von einer verbesserten Überlebenschance bei hohen Ki67 Indices berichteten [250,251], zeigten andere eine Assoziation einer schlechten Prognose mit hohen Ki67 Indizes [252,253] oder keinen Zusammenhang zwischen der Überlebensrate und dem Ki67 Index [254–256]. Da Ki67 nur von Zellen exprimiert wird, die sich aktiv innerhalb der G₁, S, G₂ und M-Phase des Zellzyklus befinden, ermöglicht eine Ki67-Färbung eine Unterscheidung von Zellen, die sich im Proliferationsprozess befinden und Zellen der G₀-Phase. Die GPR55-medierte Änderungen der Anzahl Ki67⁺ Nuklei implizieren einen höheren Anteil Proliferations-ruhender Zellen im Verhältnis zur Gesamtzellzahl, was erwartungsgemäß mit Alterationen der Proliferationsraten einhergehen würden. In Übereinstimmung mit der unveränderten Verteilung

der Zellzyklusphasen stellten sich Effekte nach THC oder LPI Stimulation weder für das kollektive noch für das klonogene Wachstum der Zellen ein. Die Fähigkeit von THC, das Wachstum zu hemmen und die Apoptose auszulösen, wurde in Glioblastomzellen nachgewiesen [65,112]. Die meisten Studien, welche die Wirkung von Cannabinoiden auf Proliferation und Apoptose untersuchten, setzten die Zellen für ihre Experimente vor und während der Stimulation serumfrei [70]. Serumdepletion stellt für die Zellen eine enorme Stress-Situation dar und führte in der vorliegenden Arbeit *per se* zu einem reduzierten Anteil Ki67⁺ Nuklei. Unterschiede in den verwendeten Serumkonzentrationen stellen möglicherweise die Ursache für Unterschiede zur Literatur dar. Sowohl das Serum selbst als auch einige Serumbestandteile, wie beispielsweise Albumin, können die Wirkungen von THC, AEA und CBD beeinflussen oder sogar einschränken [257]. In Vorversuchen konnte beispielsweise gezeigt werden, dass THC ab einer Serumkonzentration < 2,5 % (v/v) zur Akkumulation intrazellulärer Lipidtröpfchen führte, was auf erhöhten Stress und eine beginnende Apoptose-Reaktion hinwies. Der Serumentzug ist jedoch nur eingeschränkt mit der *in vivo*-Situation vergleichbar, in der Glioblastome von dichten Blutgefäßen in Folge der hohen Vaskularisierung versorgt werden [51]. Es gibt natürlich auch Bereiche im Tumor, die unterversorgt sind, sich aber hauptsächlich durch nekrotische Bereiche mit kaum lebensfähigen Zellen auszeichnen [51]. Diese Zellen wurden in der vorliegenden Arbeit nicht vorrangig betrachtet.

Eine Unterscheidung zwischen ruhenden und seneszenten / differenzierten postmitotischen Zellen bei negativer Immunreaktion gegen Ki67 ist nicht möglich. Ruhende Zellen, die aus dem Zellzyklus ausgetreten sind, können nach entsprechenden exogenen Stimuli erneut in die Proliferation eintreten, während seneszente bzw. differenzierte Zellen irreversibel in ihrer Proliferationsfähigkeit eingeschränkt sind. Daher sollte weiter überprüft werden, ob eine GPR55-Aktivierung mit THC oder LPI einen Wiedereintritt ruhender Zellen in die Proliferation verhinderte. Die Induktion eines reversiblen ruhenden Zustandes lässt sich mit Hilfe einer Serumdepletion und -induktion imitieren [258,259]. Die Zugabe von Serum reaktiviert die Proliferation ruhender Zellen und ermöglicht den Wiedereintritt in den Zellzyklus [259]. Eine Erhöhung der Anzahl ruhender Zellen nach Serumdepletion konnte anhand einer reduzierten Anzahl Ki67⁺ Nuklei festgestellt werden. Eine erneute Zugabe von Serum führte wiederum zu einem erhöhten Anteil Ki67⁺ Nuklei, was die Reversibilität des Proliferationsstopps verdeutlicht. Auf die Serum-induzierte Reaktivierung der Proliferation nahmen THC und LPI keinen wesentlichen Einfluss. Dies könnte möglicherweise auf eine Synchronisation der Zellen auf eine Zellzyklusphase, in dem Fall G₀, oder auf eine Eliminierung THC/LPI-sensitiver Zellen während oder nach Serumentzug zurückzuführen sein. Ob eine veränderte Rezeptor-Besetzung,

die teils homogene Verteilung der Zellzyklusphasen oder Apoptoseereignisse THC/LPI sensitiver Zellen für die veränderten Effekte verantwortlich sind, sollte in weiteren Untersuchungen verfolgt werden. Des Weiteren sollte durch die Wahl früherer Zeitpunkte überprüft werden, ob der Wiedereintritt in die Proliferation verzögert aufgetreten sein könnte. Insgesamt liefern die Daten keine Hinweise, dass eine veränderte Ki67 Anzahl mit einer veränderten Proliferation korrelierte und Ki67 in diesem Kontext als Proliferationsmarker betrachtet werden kann. Eine Studie an der humanen Darmkrebs-Zelllinie DLD-1 konnte mittels Genom-Editierung feststellen, dass Ki67 Zelltyp-abhängig für die Lebensfähigkeit und für die Zellproliferation keine Relevanz zeigte [260]. Stattdessen wurde Ki67 als sogenannter „Lizenzierungsfaktor“ für die Aufrechterhaltung der Tumorstammzell-Nische identifiziert. Die Ausschaltung von Ki67 reduzierte die Anzahl der Zellen, die CD133 exprimierten [260]. CD133 gilt gemeinhin als Marker für Glioblastomstammzellen (*Glioma stem-like cells*, GSC). GSCs sind eine kleine Subpopulation von Tumorzellen innerhalb des Glioblastoms mit der Fähigkeit zur unbegrenzten Vermehrung, Selbsterneuerung und multipotenten Differenzierung [261]. Sie sind für die Entstehung des Glioblastoms, die Invasivität, die Therapieresistenz und das spätere Wiederauftreten des Tumors verantwortlich und gelten daher als wichtiges Ziel für die Behandlung des Glioblastoms [262]. Kürzlich wurde berichtet, dass das Vorhandensein von proliferativen CD133⁺/Ki67⁺ GSCs den Krankheitsverlauf mit einer schlechten Prognose begleitet [263]. Der Verlust des Stammzellcharakters geht häufig mit einem reduzierten Anteil Ki67⁺ Nuklei einher, was zu einer Verringerung der Selbsterneuerung und einer Abnahme der Stammzellpopulation beiträgt. Der reduzierte Anteil Ki67⁺ Nuklei in dieser Arbeit könnte möglicherweise Ausdruck einer Stammzelldepletion sein. Der Anteil CD133⁺ Zellen in histologischen Schnitten des Glioblastoms beträgt in der Regel zwischen 0,5-10 % [264]. In den Zellkulturen von *GBM #4* und *GBM #10* entsprach der Anteil unter 1 %, was die Theorie der Stammzelldepletion entkräften könnte, da die Abnahme Ki67⁺ Nuklei zwischen 10 % und 20 % betrug. Inzwischen wird die Spezifität von CD133 als GSC-Marker zunehmend in Frage gestellt. Es hat den Anschein, dass die Expression von CD133 nicht immer verlässlich alle GSCs markiert, da die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und zur Tumorigenese auch von CD133⁻ Zellen primärer Tumore in einem Xenotransplantationsmodell nachgewiesen werden konnte [265,266]. Des Weiteren scheint die Expression von CD133 in GSCs je nach Kulturbedingungen einer Regulation durch die "Mikroumgebung" zu unterliegen [267,268]. In den Glioblastomzelllinien U87 und U373 führte eine gezielte Aktivierung von CB-Rezeptoren *via* HU-210 und JWH133 zu einer verstärkten Anhäufung S100beta⁺ und GFAP⁺ Zellen, welche als Marker der Differenzierung von GSCs verwendet wurden [269]. Die Rolle von

GPR55 in der Erhaltung der Stammzellpopulation ist bisher unbekannt. In weiteren Untersuchungen sollten daher der Einfluss von THC und LPI auf die Expression und Verteilung von Stammzell- und Differenzierungsmarker eruiert werden.

GSCs lassen sich anhand ihres biologischen Verhaltens in ruhende und proliferative Zellen unterteilen [270], die mit Hilfe von Ki67 unterschieden werden könnten. Die Akkumulation von p27 in der G₀-Phase in GSCs wird mit der Aufrechterhaltung der Ruhephase der Zellen assoziiert [271]. Die Expression Ca²⁺-regulierter Gene wie *CACNB1*, *CAPS*, *CACNA2D1*, *PKD2* und *ORAI2* [272] oder die Aktivität des Notch-Signalweges [267] werden hinsichtlich ihrer Auswirkungen auf die Ruhephase diskutiert. Da in der vorliegenden Arbeit ein IP3-abhängiger Mechanismus gefunden wurde, der letzten Endes eine Erhöhung [Ca²⁺]_i bedeutet, sollte in weiterführenden Untersuchungen die Expression genannter Ca²⁺-regulierter Gene betrachtet werden.

Eine besondere Eigenschaft von GSCs ist die erworbene Resistenz gegen gängige Arzneimittelstoffen [262]. Aus diesem Grund ist die Entwicklung neuer Strategien, die solche Resistenzmechanismen umgehen könnten, von essentieller Bedeutung. Cannabinoide scheinen ein probates Mittel zu sein, da sie eine erhöhte Sensitivität in Cannabinoid-behandelten Glioblastomzellen gegen Chemotherapeutika bzw. Bestrahlung auslösen [59,60]. Geeignete Marker, die eine veränderte Sensitivität anzeigen, wären von enormer Bedeutung. Der Verlust von Ki67 führte in früheren Arbeiten zu einer verminderten Expression von Genen, die xenobiotische Stoffwechselfaktoren kodieren, was sich in einer erhöhten Sensitivität gegenüber gängige Chemotherapeutika niederschlug [260,273]. Die therapeutische Ausrichtung auf Ki67 selbst dürfte schwierig sein, da es sich um ein intrinsisch ungeordnetes Protein ohne inhärente Enzymaktivität handelt. Es könnte jedoch von therapeutischem Nutzen sein, Ki67 und seine Effektoren über die Kontrolle der zellulären Anpassung an die Umwelt zu beeinflussen. Möglicherweise stellt ein reduzierter Anteil Ki67⁺ Nuklei in Folge einer Cannabinoid-Behandlung ein Indiz für eine veränderte Sensitivität von Tumorzellen gegenüber Chemotherapeutika oder Strahlentherapie dar, was die Interpretationsmöglichkeit von Ki67 als Sensitivitätsmarker erweitern würde. Ob die Expression von Ki67 direkt durch eine Cannabinoid-Behandlung beeinflusst wurde oder lediglich Ausdruck einer erhöhten Sensitivierung war, bleibt ungeklärt. Die Sensitivität THC/LPI-behandelten Zellen gegenüber Temozolomid und Bestrahlung sollte daher in weiterführenden Untersuchungen evaluiert werden.

5.8 Die GPR55-unabhängige Reduktion des kollektiven und klonogenen Wachstums nach CBD Behandlung

Während CBD keinerlei Wirkung auf die Anzahl Ki67⁺ Nuklei zeigte, reduzierte CBD zum einen das klonogene Wachstum und zum anderen das kollektive Wachstum. Letzteres wurde über Zell-Widerstände gemessen, welche mit Hilfe des iCELLigence™-System erfasst wurden. Die Effekte auf die gemessenen Zellwiderstände manifestierten sich konzentrationsabhängig in einem sistierenden Kurvenverlauf über 24 h. Danach entsprach der Kurvenverlauf jener der Kontrolle. Eine Reapplikation von CBD nach 24 h führte zu einer Aufrechterhaltung der gemessenen Effekte. Die zeitabhängige Wirkung von CBD könnte auf seine Halbwertszeit zurückzuführen sein, welche mit 18-32 h angegeben wurde [274]. Hinsichtlich der Regulation der Anzahl Ki67⁺ Nuklei zeigte sich für CBD ein antagonistisches Verhalten am GPR55-Rezeptor. Eine gezielte GPR55-Antagonisierung mittels CID zeigte in der iCELLigence™ Messung keinerlei vergleichbare Effekte, was einen GPR55-unabhängigen Mechanismus von CBD impliziert. In Anlehnung an frühere Arbeiten könnte CBD stattdessen *via* TRPV1 oder TRPV2 wirken [134,275].

Im Allgemeinen lässt sich das Ausmaß der gemessenen Impedanz anhand des Stromflusses erklären. Der elektrische Strom fließt zwischen Elektroden durch eine Kombination von drei grundlegenden Stromflüssen: transzellulär, parazellulär und subzellulär. Diese Flüsse reagieren auf verschiedene Aspekte der Zellfunktion, nämlich die Anzahl der Zellen und ihre Morphologie, sowie die Qualität von Zell-Zell- bzw. Zell-Matrix Interaktionen. Die Unterscheidung der Impedanzeinflüsse im Speziellen war in der vorliegenden Arbeit nicht möglich. Da sowohl die durchflusszytometrischen Analysen als auch Viabilitätsmessungen mittels MTT-Assays [185] keinen Einfluss auf die Viabilität der Zellen zeigten, kann das Sistieren der gemessenen Impedanz nicht auf einen vorübergehenden Proliferationsstopp oder auf eine Apoptoseinduktion hinweisen. In unveröffentlichten Arbeiten der Arbeitsgruppe konnten keine Änderungen in der Zellgröße mittels *Live Cell Imaging* oder in der Elastizität mittels *Atomic force microscopy* nach CBD Behandlung festgestellt werden. Änderungen in der Größe und Form in Folge Alterationen des Zytoskellets können somit ausgeschlossen werden. Die Daten könnten stattdessen Änderungen in ausgebildeten Zell-Zell Interaktionen oder eine vorübergehende Ablösung der Zellen von der Wachstumsoberfläche widerspiegeln. Durch eine Variation der Frequenz des Wechselstroms kann eine Unterscheidung der Interaktionen erreicht werden, da niederfrequente Ströme extrazelluläre Änderungen (Zell-Matrix Interaktion) erfassen, während hochfrequente Ströme bevorzugt durch Zellmembranen (Zell-Zell Interaktionen) fließen. Das iCELLigence™ konzentrierte sich auf eine einzige Frequenz

(10^4 Hz) und ließ sich dahingehend nicht modifizieren. Als ergänzende Alternative könnte das ECIS-System von Applied Biophysics Verwendung finden, das beispielsweise Algorithmen umfasst, die die subzellulären oder parazellulären Stromflüsse beschreiben und bei der Interpretation der Ergebnisse weiterhelfen könnten [276].

6 Zusammenfassung

Das Glioblastom, der häufigste primäre Hirntumor, ist ein aggressiver und hoch invasiver Tumor, der durch eine inter- und intratumorale Heterogenität gekennzeichnet ist. Trotz multimodaler Behandlungsmöglichkeiten gilt es nach wie vor als unheilbar. Cannabinoide scheinen aufgrund zahlreicher anti-tumoraler Eigenschaften eine potentiell Therapieunterstützende Substanzklasse zu sein. Die Identifizierung und Validierung verantwortlicher Signaleffektoren von Cannabinoiden spielen eine entscheidende Rolle in der Entwicklung gezielter und individueller Therapieoptionen. In der vorliegenden Arbeit konnten weitere Erkenntnisse zum Wirkmechanismus von THC und CBD in Tumorzellen gewonnen werden. Es konnte gezeigt werden, dass THC die Anzahl Ki67⁺ Nuklei von Glioblastomzellen nicht wie üblich durch CB₁- und CB₂-Rezeptoren, sondern durch die Aktivierung des orphanen CB-Rezeptors GPR55 veränderte. Des Weiteren zeigte eine spezifische Aktivierung von GPR55 mittels LPI eine THC-ähnliche Wirkung, welche in Anwesenheit GPR55-spezifischer Antagonisten aufgehoben wurde (Abbildung 34). Obwohl GPR55 in allen untersuchten Zellpopulationen nachgewiesen wurde, erfolgten die THC- und LPI-vermittelten Effekte Zelltyp-spezifisch, die auf Unterschiede in der Regulation der Signalweiterleitung oder auf Unterschiede im genetischen Hintergrund der Zellen zurückgeführt wurden.

Die Analyse GPR55-assoziiertes Signalwege ergab sowohl in *GBM #4* als auch *GBM #10* eine Beteiligung des PLC-IP3 Signalweges (Abbildung 34). Unterschiede in der Beteiligung von Gβγ-Untereinheiten und des RhoA-ROCK-Signalweges könnten sich durch Unterschiede in der Rezeptor-Kopplung zu intrazellulären G-Proteinen erklären lassen. Während der Gβγ-abhängige und RhoA/ROCK-unabhängige Mechanismus in *GBM #4* auf eine Gα_q Kopplung hinweisen könnte, könnte die RhoA-ROCK-Abhängigkeit in *GBM #10* aus einer Gα_{12/13} Kopplung an GPR55 resultieren. Des Weiteren zeigte sich eine Beteiligung von Calcineurin, was mit der IP3-gesteuerten Freisetzung intrazellulärer Ca²⁺ zusammenhängen könnte (Abbildung 34). Die Calcineurin-abhängige Lokalisation und Aktivität des Transkriptionsfaktors NFAT blieben nach Exposition mit THC oder LPI zu verschiedenen Zeitpunkten unverändert, was eine NFAT-Beteiligung unwahrscheinlich macht.

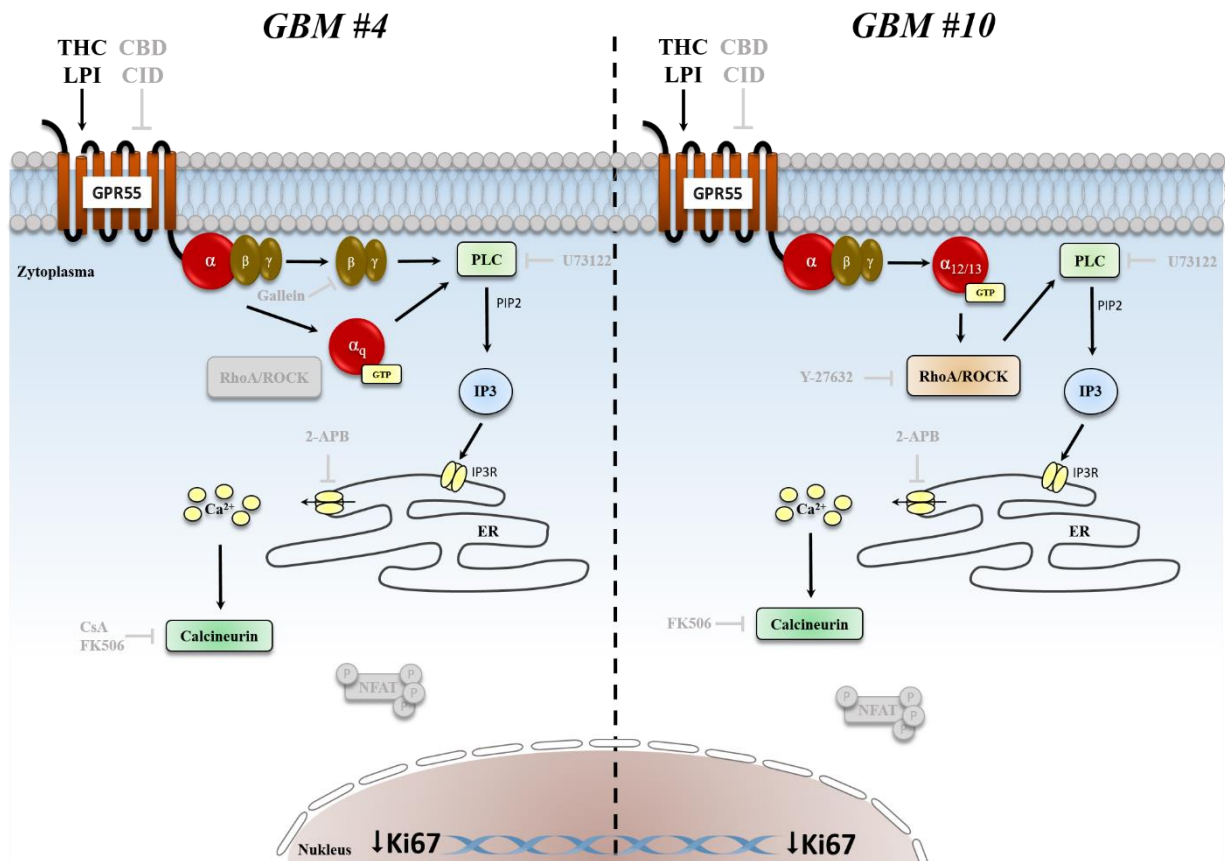


Abbildung 34: Graphische Zusammenfassung der Zelltyp-spezifischen THC- und LPI-vermittelten Reduktion der Anzahl Ki67⁺ Nuklei über GPR55 und GPR55-assoziierten Signalwege in humanen Glioblastomzellen. Gezeigt sind außerdem die Angriffspunkte der eingesetzten Inhibitoren zur Analyse GPR55-assoziiierter Signalwege.

In der modernen Diagnostik gilt Ki67 als reliabler Proliferationsmarker mit prognostischer Relevanz. Eine Korrelation zwischen der Reduktion Ki67⁺ Nuklei und einer veränderten Proliferation konnte nach THC oder LPI Behandlung nicht festgestellt werden. Trotz der unveränderten Anzahl Ki67⁺ Nuklei induzierte CBD eine Abnahme der Impedanz-basierten Wachstumskurven und eine Reduktion des klonogenen Wachstums, was auf GPR55-unabhängigen Signalwegen beruhen könnte.

THC scheint ein vielversprechender Wirkstoff für die individuelle Behandlung von Glioblastomen zu sein, die über funktionelle GPR55-Rezeptoren verfügen. Eine weitere Charakterisierung der GPR55-medierten Regulation von Ki67 und die Aufklärung von Faktoren, die zu Zelltyp-spezifischen Reaktionen beitragen, wird notwendig sein, um tiefere Einblicke in das individuelle Ansprechen von Glioblastomen auf Cannabinoiden zu gewinnen und die Entwicklung individuell-aufgestellter Therapieoptionen zu ermöglichen.

7 Literaturverzeichnis

1. Atzendorf, J.; Rauschert, C.; Seitz, N.-N.; Lochbühler, K.; Kraus, L. The Use of Alcohol, Tobacco, Illegal Drugs and Medicines. *Deutsches Ärzteblatt international* 2019, doi:10.3238/arztebl.2019.0577.
2. Hildegard von Bingen Heilsame Schöpfung - Die Natürliche Wirkkraft Der Dinge: Physica; Eibingen Benediktinerinnen St. Hildegard, Ed.; Beuroner Kunstvlg, 2012; Vol. 5; ISBN 978-3-87071-271-6.
3. Zuardi, A.W. History of Cannabis as a Medicine: A Review. *Rev. Bras. Psiquiatr.* 2006, 28, 153–157, doi:10.1590/S1516-44462006000200015.
4. Hill, K.P.; Palastro, M.D.; Johnson, B.; Ditre, J.W. Cannabis and Pain: A Clinical Review. *Cannabis and Cannabinoid Research* 2017, 2, 96–104, doi:10.1089/can.2017.0017.
5. Parker, L.A.; Rock, E.M.; Limebeer, C.L. Regulation of Nausea and Vomiting by Cannabinoids: Cannabinoids and Nausea and Vomiting. *British Journal of Pharmacology* 2011, 163, 1411–1422, doi:10.1111/j.1476-5381.2010.01176.x.
6. Henson, J.D.; Vitetta, L.; Hall, S. Tetrahydrocannabinol and Cannabidiol Medicines for Chronic Pain and Mental Health Conditions. *Inflammopharmacol* 2022, 30, 1167–1178, doi:10.1007/s10787-022-01020-z.
7. Bennici, A.; Mannucci, C.; Calapai, F.; Cardia, L.; Ammendolia, I.; Gangemi, S.; Calapai, G.; Griscti Soler, D. Safety of Medical Cannabis in Neuropathic Chronic Pain Management. *Molecules* 2021, 26, 6257, doi:10.3390/molecules26206257.
8. Rosenberg, E.C.; Tsien, R.W.; Whalley, B.J.; Devinsky, O. Cannabinoids and Epilepsy. *Neurotherapeutics* 2015, 12, 747–768, doi:10.1007/s13311-015-0375-5.
9. Manera, C.; Bertini, S. Cannabinoid-Based Medicines and Multiple Sclerosis. In *Cannabinoids and Neuropsychiatric Disorders*; Murillo-Rodriguez, E., Pandi-Perumal, S.R., Monti, J.M., Eds.; Springer International Publishing: Cham, 2021; Vol. 1264, pp. 111–129 ISBN 978-3-030-57368-3.
10. Keating, G.M. Delta-9-Tetrahydrocannabinol/Cannabidiol Oromucosal Spray (Sativex®): A Review in Multiple Sclerosis-Related Spasticity. *Drugs* 2017, 77, 563–574, doi:10.1007/s40265-017-0720-6.
11. Lutge, E.E.; Gray, A.; Siegfried, N. The Medical Use of Cannabis for Reducing Morbidity and Mortality in Patients with HIV/AIDS. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2013, doi:10.1002/14651858.CD005175.pub3.
12. Radwan, M.M.; Chandra, S.; Gul, S.; ElSohly, M.A. Cannabinoids, Phenolics, Terpenes and Alkaloids of Cannabis. *Molecules* 2021, 26, 2774, doi:10.3390/molecules26092774.
13. Mechoulam, R. Marijuana Chemistry: Recent Advances in Cannabinoid Chemistry Open the Area to More Sophisticated Biological Research. *Science* 1970, 168, 1159–1166, doi:10.1126/science.168.3936.1159.
14. Gaoni, Y.; Mechoulam, R. Isolation, Structure, and Partial Synthesis of an Active Constituent of Hashish. *J. Am. Chem. Soc.* 1964, 86, 1646–1647, doi:10.1021/ja01062a046.
15. Adams, R.; Hunt, M.; Clark, J.H. Structure of Cannabidiol, a Product Isolated from the Marijuana Extract of Minnesota Wild Hemp. I. *J. Am. Chem. Soc.* 1940, 62, 196–200, doi:10.1021/ja01858a058.
16. Breijyeh, Z.; Jubeh, B.; Bufo, S.A.; Karaman, R.; Scrano, L. Cannabis: A Toxin-Producing Plant with Potential Therapeutic Uses. *Toxins* 2021, 13, 117, doi:10.3390/toxins13020117.
17. Matsuda, L.A.; Lolait, S.J.; Brownstein, M.J.; Young, A.C.; Bonner, T.I. Structure of a Cannabinoid Receptor and Functional Expression of the Cloned cDNA. *Nature* 1990, 346, 561–564, doi:10.1038/346561a0.

18. Munro, S.; Thomas, K.L.; Abu-Shaar, M. Molecular Characterization of a Peripheral Receptor for Cannabinoids. *Nature* 1993, 365, 61–65, doi:10.1038/365061a0.
19. Howlett, A.C. International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of Cannabinoid Receptors. *Pharmacological Reviews* 2002, 54, 161–202, doi:10.1124/pr.54.2.161.
20. Finlay, D.B.; Cawston, E.E.; Grimsey, N.L.; Hunter, M.R.; Korde, A.; Vemuri, V.K.; Makriyannis, A.; Glass, M. $G\alpha_s$ Signalling of the CB₁ Receptor and the Influence of Receptor Number: CB₁ Receptor $G\alpha_s$ Signalling. *British Journal of Pharmacology* 2017, 174, 2545–2562, doi:10.1111/bph.13866.
21. Saroz, Y.; Kho, D.T.; Glass, M.; Graham, E.S.; Grimsey, N.L. Cannabinoid Receptor 2 (CB₂) Signals via G-Alpha-s and Induces IL-6 and IL-10 Cytokine Secretion in Human Primary Leukocytes. *ACS Pharmacol. Transl. Sci.* 2019, 2, 414–428, doi:10.1021/acspsci.9b00049.
22. Lauckner, J.E.; Hille, B.; Mackie, K. The Cannabinoid Agonist WIN55,212-2 Increases Intracellular Calcium via CB1 Receptor Coupling to Gq/11 G Proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2005, 102, 19144–19149, doi:10.1073/pnas.0509588102.
23. Ishii, I.; Chun, J. Anandamide-Induced Neuroblastoma Cell Rounding via the CB1 Cannabinoid Receptors: *Neuroreport* 2002, 13, 593–596, doi:10.1097/00001756-200204160-00011.
24. Aizpurua-Olaizola, O.; Elezgarai, I.; Rico-Barrio, I.; Zarandona, I.; Etxebarria, N.; Usobiaga, A. Targeting the Endocannabinoid System: Future Therapeutic Strategies. *Drug Discovery Today* 2017, 22, 105–110, doi:10.1016/j.drudis.2016.08.005.
25. Gong, J.-P.; Onaivi, E.S.; Ishiguro, H.; Liu, Q.-R.; Tagliaferro, P.A.; Brusco, A.; Uhl, G.R. Cannabinoid CB2 Receptors: Immunohistochemical Localization in Rat Brain. *Brain Research* 2006, 1071, 10–23, doi:10.1016/j.brainres.2005.11.035.
26. Bie, B.; Wu, J.; Foss, J.F.; Naguib, M. An Overview of the Cannabinoid Type 2 Receptor System and Its Therapeutic Potential. *Current Opinion in Anaesthesiology* 2018, 31, 407–414, doi:10.1097/ACO.0000000000000616.
27. Devane, W.A.; Hanuš, L.; Breuer, A.; Pertwee, R.G.; Stevenson, L.A.; Griffin, G.; Gibson, D.; Mandelbaum, A.; Etinger, A.; Mechoulam, R. Isolation and Structure of a Brain Constituent That Binds to the Cannabinoid Receptor. *Science* 1992, 258, 1946–1949, doi:10.1126/science.1470919.
28. Mechoulam, R.; Ben-Shabat, S.; Hanus, L.; Ligumsky, M.; Kaminski, N.E.; Schatz, A.R.; Gopher, A.; Almog, S.; Martin, B.R.; Compton, D.R.; et al. Identification of an Endogenous 2-Monoglyceride, Present in Canine Gut, That Binds to Cannabinoid Receptors. *Biochemical Pharmacology* 1995, 50, 83–90, doi:10.1016/0006-2952(95)00109-D.
29. Sugiura, T.; Kondo, S.; Sukagawa, A.; Nakane, S.; Shinoda, A.; Itoh, K.; Yamashita, A.; Waku, K. 2-Arachidonoylglycerol: A Possible Endogenous Cannabinoid Receptor Ligand in Brain. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1995, 215, 89–97, doi:10.1006/bbrc.1995.2437.
30. Gross, O.P.; von Gersdorff, H. Recycling at Synapses. *eLife* 2016, 5, e17692, doi:10.7554/eLife.17692.
31. Di Marzo, V.; Stella, N.; Zimmer, A. Endocannabinoid Signalling and the Deteriorating Brain. *Nat Rev Neurosci* 2015, 16, 30–42, doi:10.1038/nrn3876.
32. Pyszniak, M.; Tabarkiewicz, J.; Łuszczki, J. Endocannabinoid System as a Regulator of Tumor Cell Malignancy – Biological Pathways and Clinical Significance. *OTT* 2016, Volume 9, 4323–4336, doi:10.2147/OTT.S106944.

33. Lu, H.-C.; Mackie, K. Review of the Endocannabinoid System. *Biological Psychiatry: Cognitive Neuroscience and Neuroimaging* 2021, 6, 607–615, doi:10.1016/j.bpsc.2020.07.016.
34. Pertwee, R.G.; Howlett, A.C.; Abood, M.E.; Alexander, S.P.H.; Di Marzo, V.; Elphick, M.R.; Greasley, P.J.; Hansen, H.S.; Kunos, G.; Mackie, K.; et al. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXIX. Cannabinoid Receptors and Their Ligands: Beyond CB₁ and CB₂. *Pharmacol Rev* 2010, 62, 588–631, doi:10.1124/pr.110.003004.
35. Sami, M.B.; Rabiner, E.A.; Bhattacharyya, S. Does Cannabis Affect Dopaminergic Signaling in the Human Brain? A Systematic Review of Evidence to Date. *European Neuropsychopharmacology* 2015, 25, 1201–1224, doi:10.1016/j.euroneuro.2015.03.011.
36. An, D.; Peigneur, S.; Hendrickx, L.A.; Tytgat, J. Targeting Cannabinoid Receptors: Current Status and Prospects of Natural Products. *IJMS* 2020, 21, 5064, doi:10.3390/ijms21145064.
37. Colizzi, M.; Bhattacharyya, S. Does Cannabis Composition Matter? Differential Effects of Delta-9-Tetrahydrocannabinol and Cannabidiol on Human Cognition. *Curr Addict Rep* 2017, 4, 62–74, doi:10.1007/s40429-017-0142-2.
38. Barnes, M.P. Sativex[®]: Clinical Efficacy and Tolerability in the Treatment of Symptoms of Multiple Sclerosis and Neuropathic Pain. *Expert Opinion on Pharmacotherapy* 2006, 7, 607–615, doi:10.1517/14656566.7.5.607.
39. Parmar, J.R.; Forrest, B.D.; Freeman, R.A. Medical Marijuana Patient Counseling Points for Health Care Professionals Based on Trends in the Medical Uses, Efficacy, and Adverse Effects of Cannabis-Based Pharmaceutical Drugs. *Research in Social and Administrative Pharmacy* 2016, 12, 638–654, doi:10.1016/j.sapharm.2015.09.002.
40. Sung, H.; Ferlay, J.; Siegel, R.L.; Laversanne, M.; Soerjomataram, I.; Jemal, A.; Bray, F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA A Cancer J Clin* 2021, 71, 209–249, doi:10.3322/caac.21660.
41. Torre, L.A.; Bray, F.; Siegel, R.L.; Ferlay, J.; Lortet-Tieulent, J.; Jemal, A. Global Cancer Statistics, 2012: Global Cancer Statistics, 2012. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 2015, 65, 87–108, doi:10.3322/caac.21262.
42. Wu, S.; Zhu, W.; Thompson, P.; Hannun, Y.A. Evaluating Intrinsic and Non-Intrinsic Cancer Risk Factors. *Nat Commun* 2018, 9, 3490, doi:10.1038/s41467-018-05467-z.
43. Ostrom, Q.T.; Cioffi, G.; Waite, K.; Kruchko, C.; Barnholtz-Sloan, J.S. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2014–2018. *Neuro-Oncology* 2021, 23, iii1–iii105, doi:10.1093/neuonc/noab200.
44. Stark, A.M.; van de Bergh, J.; Hedderich, J.; Mehdorn, H.M.; Nabavi, A. Glioblastoma: Clinical Characteristics, Prognostic Factors and Survival in 492 Patients. *Clinical Neurology and Neurosurgery* 2012, 114, 840–845, doi:10.1016/j.clineuro.2012.01.026.
45. Barnholtz-Sloan, J.S.; Ostrom, Q.T.; Cote, D. Epidemiology of Brain Tumors. *Neurologic Clinics* 2018, 36, 395–419, doi:10.1016/j.ncl.2018.04.001.
46. Boccellato, C.; Rehm, M. Glioblastoma, from Disease Understanding towards Optimal Cell-Based in Vitro Models. *Cell Oncol.* 2022, doi:10.1007/s13402-022-00684-7.
47. Grochans, S.; Cybulska, A.M.; Simińska, D.; Korbecki, J.; Kojder, K.; Chlubek, D.; Baranowska-Bosiacka, I. Epidemiology of Glioblastoma Multiforme—Literature Review. *Cancers* 2022, 14, 2412, doi:10.3390/cancers14102412.
48. Jiang, Y.; Marinescu, V.D.; Xie, Y.; Jarvius, M.; Maturi, N.P.; Haglund, C.; Olofsson, S.; Lindberg, N.; Olofsson, T.; Leijonmarck, C.; et al. Glioblastoma Cell Malignancy and Drug Sensitivity Are Affected by the Cell of Origin. *Cell Reports* 2017, 18, 977–990, doi:10.1016/j.celrep.2017.01.003.

49. Phillips, H.S.; Kharbanda, S.; Chen, R.; Forrest, W.F.; Soriano, R.H.; Wu, T.D.; Misra, A.; Nigro, J.M.; Colman, H.; Soroceanu, L.; et al. Molecular Subclasses of High-Grade Glioma Predict Prognosis, Delineate a Pattern of Disease Progression, and Resemble Stages in Neurogenesis. *Cancer Cell* 2006, 9, 157–173, doi:10.1016/j.ccr.2006.02.019.
50. Louis, D.N.; Perry, A.; Wesseling, P.; Brat, D.J.; Cree, I.A.; Figarella-Branger, D.; Hawkins, C.; Ng, H.K.; Pfister, S.M.; Reifenberger, G.; et al. The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: A Summary. *Neuro-Oncology* 2021, 23, 1231–1251, doi:10.1093/neuonc/noab106.
51. Alexander, B.M.; Cloughesy, T.F. Adult Glioblastoma. *JCO* 2017, 35, 2402–2409, doi:10.1200/JCO.2017.73.0119.
52. Stupp, R.; Mason, W.P.; van den Bent, M.J.; Weller, M.; Fisher, B.; Taphoorn, M.J.B.; Belanger, K.; Brandes, A.A.; Marosi, C.; Bogdahn, U.; et al. Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma. *N Engl J Med* 2005, 352, 987–996, doi:10.1056/NEJMoa043330.
53. Stupp, R.; Brada, M.; van den Bent, M.J.; Tonn, J.-C.; Pentheroudakis, G. High-Grade Glioma: ESMO Clinical Practice Guidelines for Diagnosis, Treatment and Follow-Up. *Annals of Oncology* 2014, 25, iii93–iii101, doi:10.1093/annonc/mdu050.
54. Verhaak, R.G.W.; Hoadley, K.A.; Purdom, E.; Wang, V.; Qi, Y.; Wilkerson, M.D.; Miller, C.R.; Ding, L.; Golub, T.; Mesirov, J.P.; et al. Integrated Genomic Analysis Identifies Clinically Relevant Subtypes of Glioblastoma Characterized by Abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell* 2010, 17, 98–110, doi:10.1016/j.ccr.2009.12.020.
55. Aubry, M.; de Tayrac, M.; Etcheverry, A.; Clavreul, A.; Saikali, S.; Menei, P.; Mosser, J. From the Core to beyond the Margin: A Genomic Picture of Glioblastoma Intratumor Heterogeneity. *Oncotarget* 2015, 6, 12094–12109, doi:10.18632/oncotarget.3297.
56. Petrecca, K.; Guiot, M.-C.; Panet-Raymond, V.; Souhami, L. Failure Pattern Following Complete Resection plus Radiotherapy and Temozolomide Is at the Resection Margin in Patients with Glioblastoma. *J Neurooncol* 2013, 111, 19–23, doi:10.1007/s11060-012-0983-4.
57. Vilar, J.B.; Christmann, M.; Tomicic, M.T. Alterations in Molecular Profiles Affecting Glioblastoma Resistance to Radiochemotherapy: Where Does the Good Go? *Cancers* 2022, 14, 2416, doi:10.3390/cancers14102416.
58. Thakur, A.; Faujdar, C.; Sharma, R.; Sharma, S.; Malik, B.; Nepali, K.; Liou, J.P. Glioblastoma: Current Status, Emerging Targets, and Recent Advances. *J. Med. Chem.* 2022, 65, 8596–8685, doi:10.1021/acs.jmedchem.1c01946.
59. Ivanov, V.N.; Wu, J.; Hei, T.K. Regulation of Human Glioblastoma Cell Death by Combined Treatment of Cannabidiol, γ -Radiation and Small Molecule Inhibitors of Cell Signaling Pathways. *Oncotarget* 2017, 8, 74068–74095, doi:10.18632/oncotarget.18240.
60. Torres, S.; Lorente, M.; Rodríguez-Fornes, F.; Hernández-Tiedra, S.; Salazar, M.; García-Taboada, E.; Barcia, J.; Guzman, M.; Velasco, G. A Combined Preclinical Therapy of Cannabinoids and Temozolomide against Glioma. *Molecular Cancer Therapeutics* 2011, 10, 90–103, doi:10.1158/1535-7163.MCT-10-0688.
61. López-Valero, I.; Torres, S.; Salazar-Roa, M.; García-Taboada, E.; Hernández-Tiedra, S.; Guzmán, M.; Sepúlveda, J.M.; Velasco, G.; Lorente, M. Optimization of a Preclinical Therapy of Cannabinoids in Combination with Temozolomide against Glioma. *Biochem Pharmacol* 2018, 157, 275–284, doi:10.1016/j.bcp.2018.08.023.
62. López-Valero, I.; Saiz-Ladera, C.; Torres, S.; Hernández-Tiedra, S.; García-Taboada, E.; Rodríguez-Fornés, F.; Barba, M.; Dávila, D.; Salvador-Tormo, N.; Guzmán, M.; et al. Targeting Glioma Initiating Cells with A Combined Therapy of Cannabinoids and Temozolomide. *Biochem Pharmacol* 2018, 157, 266–274, doi:10.1016/j.bcp.2018.09.007.

63. Salazar, M.; Carracedo, A.; Salanueva, Í.J.; Hernández-Tiedra, S.; Lorente, M.; Egia, A.; Vázquez, P.; Blázquez, C.; Torres, S.; García, S.; et al. Cannabinoid Action Induces Autophagy-Mediated Cell Death through Stimulation of ER Stress in Human Glioma Cells. *J. Clin. Invest.* 2009, 119, 1359–1372, doi:10.1172/JCI37948.
64. Salazar, M.; Carracedo, A.; Salanueva, I.J.; Hernández-Tiedra, S.; Egia, A.; Lorente, M.; Vázquez, P.; Torres, S.; Iovanna, J.L.; Guzmán, M.; et al. TRB3 Links ER Stress to Autophagy in Cannabinoid Anti-Tumoral Action. *Autophagy* 2009, 5, 1048–1049, doi:10.4161/auto.5.7.9508.
65. Carracedo, A.; Lorente, M.; Egia, A.; Blázquez, C.; García, S.; Giroux, V.; Malicet, C.; Villuendas, R.; Gironella, M.; González-Feria, L.; et al. The Stress-Regulated Protein P8 Mediates Cannabinoid-Induced Apoptosis of Tumor Cells. *Cancer Cell* 2006, 9, 301–312, doi:10.1016/j.ccr.2006.03.005.
66. Sánchez, C.; Galve-Roperh, I.; Canova, C.; Brachet, P.; Guzmán, M. Delta9-Tetrahydrocannabinol Induces Apoptosis in C6 Glioma Cells. *FEBS Lett* 1998, 436, 6–10, doi:10.1016/s0014-5793(98)01085-0.
67. Shrivastava, A.; Kuzontkoski, P.M.; Groopman, J.E.; Prasad, A. Cannabidiol Induces Programmed Cell Death in Breast Cancer Cells by Coordinating the Cross-Talk between Apoptosis and Autophagy. *Mol Cancer Ther* 2011, 10, 1161–1172, doi:10.1158/1535-7163.MCT-10-1100.
68. Zhang, X.; Qin, Y.; Pan, Z.; Li, M.; Liu, X.; Chen, X.; Qu, G.; Zhou, L.; Xu, M.; Zheng, Q.; et al. Cannabidiol Induces Cell Cycle Arrest and Cell Apoptosis in Human Gastric Cancer SGC-7901 Cells. *Biomolecules* 2019, 9, 302, doi:10.3390/biom9080302.
69. Galanti, G.; Fisher, T.; Kventsel, I.; Shoham, J.; Gallily, R.; Mechoulam, R.; Lavie, G.; Amariglio, N.; Rechavi, G.; Toren, A. Δ^9 -Tetrahydrocannabinol Inhibits Cell Cycle Progression by Downregulation of E2F1 in Human Glioblastoma Multiforme Cells. *Acta Oncologica* 2008, 47, 1062–1070, doi:10.1080/02841860701678787.
70. Caffarel, M.M.; Sarrió, D.; Palacios, J.; Guzmán, M.; Sánchez, C. Δ^9 -Tetrahydrocannabinol Inhibits Cell Cycle Progression in Human Breast Cancer Cells through Cdc2 Regulation. *Cancer Research* 2006, 66, 6615–6621, doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-4566.
71. Hohmann, T.; Feese, K.; Ghadban, C.; Dehghani, F.; Grabiec, U. On the Influence of Cannabinoids on Cell Morphology and Motility of Glioblastoma Cells. *PLoS ONE* 2019, 14, e0212037, doi:10.1371/journal.pone.0212037.
72. Blázquez, C.; Salazar, M.; Carracedo, A.; Lorente, M.; Egia, A.; González-Feria, L.; Haro, A.; Velasco, G.; Guzmán, M. Cannabinoids Inhibit Glioma Cell Invasion by Down-Regulating Matrix Metalloproteinase-2 Expression. *Cancer Res* 2008, 68, 1945–1952, doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-5176.
73. Hohmann, T.; Grabiec, U.; Ghadban, C.; Feese, K.; Dehghani, F. The Influence of Biomechanical Properties and Cannabinoids on Tumor Invasion. *Cell Adh Migr* 2017, 11, 54–67, doi:10.1080/19336918.2016.1183867.
74. Hohmann, T.; Feese, K.; Greither, T.; Ghadban, C.; Jäger, V.; Dehghani, F.; Grabiec, U. Synthetic Cannabinoids Influence the Invasion of Glioblastoma Cell Lines in a Cell- and Receptor-Dependent Manner. *Cancers (Basel)* 2019, 11, doi:10.3390/cancers11020161.
75. Solinas, M.; Massi, P.; Cinquina, V.; Valenti, M.; Bolognini, D.; Gariboldi, M.; Monti, E.; Rubino, T.; Parolaro, D. Cannabidiol, a Non-Psychoactive Cannabinoid Compound, Inhibits Proliferation and Invasion in U87-MG and T98G Glioma Cells through a Multitarget Effect. *PLoS ONE* 2013, 8, e76918, doi:10.1371/journal.pone.0076918.
76. McAllister, S.D.; Christian, R.T.; Horowitz, M.P.; Garcia, A.; Desprez, P.-Y. Cannabidiol as a Novel Inhibitor of Id-1 Gene Expression in Aggressive Breast Cancer Cells. *Mol Cancer Ther* 2007, 6, 2921–2927, doi:10.1158/1535-7163.MCT-07-0371.

77. McAllister, S.D.; Murase, R.; Christian, R.T.; Lau, D.; Zielinski, A.J.; Allison, J.; Almanza, C.; Pakdel, A.; Lee, J.; Limbad, C.; et al. Pathways Mediating the Effects of Cannabidiol on the Reduction of Breast Cancer Cell Proliferation, Invasion, and Metastasis. *Breast Cancer Res Treat* 2011, 129, 37–47, doi:10.1007/s10549-010-1177-4.
78. Blázquez, C.; González-Feria, L.; Alvarez, L.; Haro, A.; Casanova, M.L.; Guzmán, M. Cannabinoids Inhibit the Vascular Endothelial Growth Factor Pathway in Gliomas. *Cancer Res* 2004, 64, 5617–5623, doi:10.1158/0008-5472.CAN-03-3927.
79. Blázquez, C.; Casanova, M.L.; Planas, A.; Gómez Del Pulgar, T.; Villanueva, C.; Fernández-Aceñero, M.J.; Aragonés, J.; Huffman, J.W.; Jorcano, J.L.; Guzmán, M. Inhibition of Tumor Angiogenesis by Cannabinoids. *FASEB J* 2003, 17, 529–531, doi:10.1096/fj.02-0795fje.
80. Hart, S.; Fischer, O.M.; 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, 1943–1950, doi:10.1158/0008-5472.can-03-3720.
81. Hunault, C.C.; Mensinga, T.T.; de Vries, I.; Kelholt-Dijkman, H.H.; Hoek, J.; Kruidenier, M.; Leenders, M.E.C.; Meulenbelt, J. Delta-9-Tetrahydrocannabinol (THC) Serum Concentrations and Pharmacological Effects in Males after Smoking a Combination of Tobacco and Cannabis Containing up to 69 Mg THC. *Psychopharmacology* 2008, 201, 171–181, doi:10.1007/s00213-008-1260-2.
82. Guzmán, M.; Duarte, M.J.; Blázquez, C.; Ravina, J.; Rosa, M.C.; Galve-Roperh, I.; Sánchez, C.; Velasco, G.; González-Feria, L. A Pilot Clinical Study of Δ 9-Tetrahydrocannabinol in Patients with Recurrent Glioblastoma Multiforme. *Br J Cancer* 2006, 95, 197–203, doi:10.1038/sj.bjc.6603236.
83. Likar, R.; Koestenberger, M.; Stultsch, M.; Nahler, G. Concomitant Treatment of Malignant Brain Tumours With CBD – A Case Series and Review of the Literature. *Anticancer Res* 2019, 39, 5797–5801, doi:10.21873/anticancer.13783.
84. Likar, R.; Koestenberger, M.; Stultsch, M.; Nahler, G. Cannabidiol May Prolong Survival in Patients With Glioblastoma Multiforme. *CDP* 2021, 1, 77–82, doi:10.21873/cdp.10011.
85. Rupprecht, A.; Theisen, U.; Wendt, F.; Frank, M.; Hinz, B. The Combination of Δ 9-Tetrahydrocannabinol and Cannabidiol Suppresses Mitochondrial Respiration of Human Glioblastoma Cells via Downregulation of Specific Respiratory Chain Proteins. *Cancers (Basel)* 2022, 14, 3129, doi:10.3390/cancers14133129.
86. Scott, K.A.; Dalglish, A.G.; Liu, W.M. The Combination of Cannabidiol and Δ 9-Tetrahydrocannabinol Enhances the Anticancer Effects of Radiation in an Orthotopic Murine Glioma Model. *Mol Cancer Ther* 2014, 13, 2955–2967, doi:10.1158/1535-7163.MCT-14-0402.
87. Twelves, C.; Sabel, M.; Checketts, D.; Miller, S.; Tayo, B.; Jove, M.; Brazil, L.; Short, S.C.; GWCA1208 study group A Phase 1b Randomised, Placebo-Controlled Trial of Nabiximols Cannabinoid Oromucosal Spray with Temozolomide in Patients with Recurrent Glioblastoma. *Br J Cancer* 2021, 124, 1379–1387, doi:10.1038/s41416-021-01259-3.
88. Galve-Roperh, I.; Sánchez, C.; Cortés, M.L.; del Pulgar, T.G.; Izquierdo, M.; Guzmán, M. Anti-Tumoral Action of Cannabinoids: Involvement of Sustained Ceramide Accumulation and Extracellular Signal-Regulated Kinase Activation. *Nat Med* 2000, 6, 313–319, doi:10.1038/73171.
89. Talarico, G.; Trebbastoni, A.; Bruno, G.; de Lena, C. Modulation of the Cannabinoid System: A New Perspective for the Treatment of the Alzheimer’s Disease. *Curr Neuropharmacol* 2019, 17, 176–183, doi:10.2174/1570159X16666180702144644.

90. Navarrete, F.; García-Gutiérrez, M.S.; Aracil-Fernández, A.; Lanciego, J.L.; Manzanares, J. Cannabinoid CB1 and CB2 Receptors, and Monoacylglycerol Lipase Gene Expression Alterations in the Basal Ganglia of Patients with Parkinson's Disease. *Neurotherapeutics* 2018, 15, 459–469, doi:10.1007/s13311-018-0603-x.
91. Pucci, M.; Micioni Di Bonaventura, M.V.; Vezzoli, V.; Zaplatic, E.; Massimini, M.; Mai, S.; Sartorio, A.; Scacchi, M.; Persani, L.; Maccarrone, M.; et al. Preclinical and Clinical Evidence for a Distinct Regulation of Mu Opioid and Type 1 Cannabinoid Receptor Genes Expression in Obesity. *Front Genet* 2019, 10, 523, doi:10.3389/fgene.2019.00523.
92. Barutta, F.; Mastrocola, R.; Bellini, S.; Bruno, G.; Gruden, G. Cannabinoid Receptors in Diabetic Kidney Disease. *Curr Diab Rep* 2018, 18, 9, doi:10.1007/s11892-018-0975-7.
93. Chung, S.C.; Hammarsten, P.; Josefsson, A.; Stattin, P.; Granfors, T.; Egevad, L.; Mancini, G.; Lutz, B.; Bergh, A.; Fowler, C.J. A High Cannabinoid CB(1) Receptor Immunoreactivity Is Associated with Disease Severity and Outcome in Prostate Cancer. *Eur J Cancer* 2009, 45, 174–182, doi:10.1016/j.ejca.2008.10.010.
94. Martínez-Martínez, E.; Gómez, I.; Martín, P.; Sánchez, A.; Román, L.; Tejerina, E.; Bonilla, F.; Merino, A.G.; de Herreros, A.G.; Provencio, M.; et al. Cannabinoids Receptor Type 2, CB2, Expression Correlates with Human Colon Cancer Progression and Predicts Patient Survival. *Oncoscience* 2015, 2, 131–141, doi:10.18632/oncoscience.119.
95. Gustafsson, S.B.; Palmqvist, R.; Henriksson, M.L.; Dahlin, A.M.; Edin, S.; Jacobsson, S.O.P.; Öberg, Å.; Fowler, C.J. High Tumour Cannabinoid CB1 Receptor Immunoreactivity Negatively Impacts Disease-Specific Survival in Stage II Microsatellite Stable Colorectal Cancer. *PLoS One* 2011, 6, e23003, doi:10.1371/journal.pone.0023003.
96. Xu, X.; Liu, Y.; Huang, S.; Liu, G.; Xie, C.; Zhou, J.; Fan, W.; Li, Q.; Wang, Q.; Zhong, D.; et al. Overexpression of Cannabinoid Receptors CB1 and CB2 Correlates with Improved Prognosis of Patients with Hepatocellular Carcinoma. *Cancer Genet Cytogenet* 2006, 171, 31–38, doi:10.1016/j.cancergencyto.2006.06.014.
97. Wu, X.; Han, L.; Zhang, X.; Li, L.; Jiang, C.; Qiu, Y.; Huang, R.; Xie, B.; Lin, Z.; Ren, J.; et al. Alteration of Endocannabinoid System in Human Gliomas: Endocannabinoid Levels in Gliomas. *Journal of Neurochemistry* 2012, 120, 842–849, doi:10.1111/j.1471-4159.2011.07625.x.
98. Petersen, G.; Moesgaard, B.; Schmid, P.C.; Schmid, H.H.O.; Broholm, H.; Kosteljanetz, M.; Hansen, H.S. Endocannabinoid Metabolism in Human Glioblastomas and Meningiomas Compared to Human Non-Tumour Brain Tissue: Endocannabinoid Metabolism in Human Brain Tumours. *Journal of Neurochemistry* 2005, 93, 299–309, doi:10.1111/j.1471-4159.2005.03013.x.
99. Ellert-Miklaszewska, A.; Grajkowska, W.; Gabrusiewicz, K.; Kaminska, B.; Konarska, L. Distinctive Pattern of Cannabinoid Receptor Type II (CB2) Expression in Adult and Pediatric Brain Tumors. *Brain Research* 2007, 1137, 161–169, doi:10.1016/j.brainres.2006.12.060.
100. Hashemi, M.; Bashi, S.; Zali, A. The Expression Level of Cannabinoid Receptors Type 1 and 2 in the Different Types of Astrocytomas. *Mol Biol Rep* 2020, 47, 5461–5467, doi:10.1007/s11033-020-05636-8.
101. Maccarrone, M.; Lorenzon, T.; Bari, M.; Melino, G.; Finazzi-Agrò, A. Anandamide Induces Apoptosis in Human Cells via Vanilloid Receptors. *Journal of Biological Chemistry* 2000, 275, 31938–31945, doi:10.1074/jbc.M005722200.
102. Schley, M.; Ständer, S.; Kerner, J.; Vajkoczy, P.; Schüpfer, G.; Dusch, M.; Schmelz, M.; Konrad, C. Predominant CB2 Receptor Expression in Endothelial Cells of Glioblastoma in Humans. *Brain Research Bulletin* 2009, 79, 333–337, doi:10.1016/j.brainresbull.2009.01.011.

103. De Jesús, M.L.; Hostalot, C.; Garibi, J.M.; Sallés, J.; Meana, J.J.; Callado, L.F. Opposite Changes in Cannabinoid CB1 and CB2 Receptor Expression in Human Gliomas. *Neurochemistry International* 2010, 56, 829–833, doi:10.1016/j.neuint.2010.03.007.
104. Ciaglia, E.; Torelli, G.; Pisanti, S.; Picardi, P.; D'Alessandro, A.; Laezza, C.; Malfitano, A.M.; Fiore, D.; Zottola, A.C.P.; Proto, M.C.; et al. Cannabinoid Receptor CB1 Regulates STAT3 Activity and Its Expression Dictates the Responsiveness to SR141716 Treatment in Human Glioma Patients' Cells. *Oncotarget* 2015, 6, 15464–15481, doi:10.18632/oncotarget.3895.
105. Sánchez, C.; de Ceballos, M.L.; Gomez del Pulgar, T.; Rueda, D.; Corbacho, C.; Velasco, G.; Galve-Roperh, I.; Huffman, J.W.; Ramón y Cajal, S.; Guzmán, M. Inhibition of Glioma Growth in Vivo by Selective Activation of the CB(2) Cannabinoid Receptor. *Cancer Res* 2001, 61, 5784–5789.
106. Gómez del Pulgar, T.; Velasco, G.; Sánchez, C.; Haro, A.; Guzmán, M. De Novo-Synthesized Ceramide Is Involved in Cannabinoid-Induced Apoptosis. *Biochem J* 2002, 363, 183–188, doi:10.1042/0264-6021:3630183.
107. Hernández-Tiedra, S.; Fabriàs, G.; Dávila, D.; Salanueva, Í.J.; Casas, J.; Montes, L.R.; Antón, Z.; García-Taboada, E.; Salazar-Roa, M.; Lorente, M.; et al. Dihydroceramide Accumulation Mediates Cytotoxic Autophagy of Cancer Cells via Autolysosome Destabilization. *Autophagy* 2016, 12, 2213–2229, doi:10.1080/15548627.2016.1213927.
108. Dumitru, C.A.; Sandalcioglu, I.E.; Karsak, M. Cannabinoids in Glioblastoma Therapy: New Applications for Old Drugs. *Front. Mol. Neurosci.* 2018, 11, 159, doi:10.3389/fnmol.2018.00159.
109. Carracedo, A.; Gironella, M.; Lorente, M.; Garcia, S.; Guzmán, M.; Velasco, G.; Iovanna, J.L. Cannabinoids Induce Apoptosis of Pancreatic Tumor Cells via Endoplasmic Reticulum Stress-Related Genes. *Cancer Res* 2006, 66, 6748–6755, doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-0169.
110. Massi, P.; Vaccani, A.; Bianchessi, S.; Costa, B.; Macchi, P.; Parolaro, D. The Non-Psychoactive Cannabidiol Triggers Caspase Activation and Oxidative Stress in Human Glioma Cells. *Cell Mol Life Sci* 2006, 63, 2057–2066, doi:10.1007/s00018-006-6156-x.
111. De Petrocellis, L.; Orlando, P.; Moriello, A.S.; Aviello, G.; Stott, C.; Izzo, A.A.; Di Marzo, V. Cannabinoid Actions at TRPV Channels: Effects on TRPV3 and TRPV4 and Their Potential Relevance to Gastrointestinal Inflammation: Plant Cannabinoids and TRPV Channels. *Acta Physiologica* 2012, 204, 255–266, doi:10.1111/j.1748-1716.2011.02338.x.
112. Marcu, J.P.; Christian, R.T.; Lau, D.; Zielinski, A.J.; Horowitz, M.P.; Lee, J.; Pakdel, A.; Allison, J.; Limbad, C.; Moore, D.H.; et al. Cannabidiol Enhances the Inhibitory Effects of Delta9-Tetrahydrocannabinol on Human Glioblastoma Cell Proliferation and Survival. *Mol. Cancer Ther.* 2010, 9, 180–189, doi:10.1158/1535-7163.MCT-09-0407.
113. Pertwee, R.G. Pharmacology of Cannabinoid Receptor Ligands. *Curr Med Chem* 1999, 6, 635–664.
114. Allister, S.D.M.; Chan, C.; Taft, R.J.; Luu, T.; Abood, M.E.; Moore, D.H.; Aldape, K.; Yount, G. Cannabinoids Selectively Inhibit Proliferation and Induce Death of Cultured Human Glioblastoma Multiforme Cells. *J Neurooncol* 2005, 74, 31–40, doi:10.1007/s11060-004-5950-2.
115. Takeda, S.; Yamaori, S.; Motoya, E.; Matsunaga, T.; Kimura, T.; Yamamoto, I.; Watanabe, K. Δ 9-Tetrahydrocannabinol Enhances MCF-7 Cell Proliferation via Cannabinoid Receptor-Independent Signaling. *Toxicology* 2008, 245, 141–146, doi:10.1016/j.tox.2007.12.019.
116. Ryberg, E.; Larsson, N.; Sjögren, S.; Hjorth, S.; Hermansson, N.-O.; Leonova, J.; Elebring, T.; Nilsson, K.; Drmota, T.; Greasley, P.J. The Orphan Receptor GPR55 Is a

- Novel Cannabinoid Receptor: GPR55, a Novel Cannabinoid Receptor. *British Journal of Pharmacology* 2009, 152, 1092–1101, doi:10.1038/sj.bjp.0707460.
117. McHugh, D.; Page, J.; Dunn, E.; Bradshaw, H.B. Δ^9 -Tetrahydrocannabinol and N-Arachidonyl Glycine Are Full Agonists at GPR18 Receptors and Induce Migration in Human Endometrial HEC-1B Cells: Novel CB Pharmacology at GPR18. *British Journal of Pharmacology* 2012, 165, 2414–2424, doi:10.1111/j.1476-5381.2011.01497.x.
 118. Morales, P.; Hurst, D.P.; Reggio, P.H. Molecular Targets of the Phytocannabinoids: A Complex Picture. In *Phytocannabinoids*; Kinghorn, A.D., Falk, H., Gibbons, S., Kobayashi, J., Eds.; Springer International Publishing: Cham, 2017; Vol. 103, pp. 103–131 ISBN 978-3-319-45539-6.
 119. Rock, E.; Bolognini, D.; Limebeer, C.; Cascio, M.; Anavi-Goffer, S.; Fletcher, P.; Mechoulam, R.; Pertwee, R.; Parker, L. Cannabidiol, a Non-Psychotropic Component of Cannabis, Attenuates Vomiting and Nausea-like Behaviour via Indirect Agonism of 5-HT_{1A} Somatodendritic Autoreceptors in the Dorsal Raphe Nucleus: CBD, 5-HT_{1A} Agonism and Nausea. *British Journal of Pharmacology* 2012, 165, 2620–2634, doi:10.1111/j.1476-5381.2011.01621.x.
 120. Barann, M.; Molderings, G.; Brüß, M.; Bönisch, H.; Urban, B.W.; Göthert, M. Direct Inhibition by Cannabinoids of Human 5-HT_{3A} Receptors: Probable Involvement of an Allosteric Modulatory Site: Cannabinoid Effects on H5-HT_{3A} Receptors. *British Journal of Pharmacology* 2002, 137, 589–596, doi:10.1038/sj.bjp.0704829.
 121. Shi, B.; Yang, R.; Wang, X.; Liu, H.; Zou, L.; Hu, X.; Wu, J.; Zou, A.; Liu, L. Inhibition of 5-HT₃ Receptors-Activated Currents by Cannabinoids in Rat Trigeminal Ganglion Neurons. *J. Huazhong Univ. Sci. Technol. [Med. Sci.]* 2012, 32, 265–271, doi:10.1007/s11596-012-0047-1.
 122. Yang, K.-H.; Galadari, S.; Isaev, D.; Petroianu, G.; Shippenberg, T.S.; Oz, M. The Nonpsychoactive Cannabinoid Cannabidiol Inhibits 5-Hydroxytryptamine_{3A} Receptor-Mediated Currents in *Xenopus Laevis* Oocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 2010, 333, 547–554, doi:10.1124/jpet.109.162594.
 123. Kathmann, M.; Flau, K.; Redmer, A.; Tränkle, C.; Schlicker, E. Cannabidiol Is an Allosteric Modulator at Mu- and Delta-Opioid Receptors. *Naunyn Schmied Arch Pharmacol* 2006, 372, 354–361, doi:10.1007/s00210-006-0033-x.
 124. O’Sullivan, S.E.; Kendall, D.A.; Randall, M.D. Further Characterization of the Time-Dependent Vascular Effects of Δ^9 -Tetrahydrocannabinol. *J Pharmacol Exp Ther* 2006, 317, 428–438, doi:10.1124/jpet.105.095828.
 125. Esposito, G.; Scuderi, C.; Valenza, M.; Togna, G.I.; Latina, V.; De Filippis, D.; Cipriano, M.; Carratù, M.R.; Iuvone, T.; Steardo, L. Cannabidiol Reduces A β -Induced Neuroinflammation and Promotes Hippocampal Neurogenesis through PPAR γ Involvement. *PLoS ONE* 2011, 6, e28668, doi:10.1371/journal.pone.0028668.
 126. Qin, N.; Neepser, M.P.; Liu, Y.; Hutchinson, T.L.; Lubin, M.L.; Flores, C.M. TRPV2 Is Activated by Cannabidiol and Mediates CGRP Release in Cultured Rat Dorsal Root Ganglion Neurons. *Journal of Neuroscience* 2008, 28, 6231–6238, doi:10.1523/JNEUROSCI.0504-08.2008.
 127. De Petrocellis, L.; Ligresti, A.; Moriello, A.S.; Allarà, M.; Bisogno, T.; Petrosino, S.; Stott, C.G.; Di Marzo, V. Effects of Cannabinoids and Cannabinoid-Enriched Cannabis Extracts on TRP Channels and Endocannabinoid Metabolic Enzymes. *Br. J. Pharmacol.* 2011, 163, 1479–1494, doi:10.1111/j.1476-5381.2010.01166.x.
 128. De Petrocellis, L.; Vellani, V.; Schiano-Moriello, A.; Marini, P.; Magherini, P.C.; Orlando, P.; Di Marzo, V. Plant-Derived Cannabinoids Modulate the Activity of Transient Receptor Potential Channels of Ankyrin Type-1 and Melastatin Type-8. *J Pharmacol Exp Ther* 2008, 325, 1007–1015, doi:10.1124/jpet.107.134809.

129. Thomas, A.; Baillie, G.L.; Phillips, A.M.; Razdan, R.K.; Ross, R.A.; Pertwee, R.G. Cannabidiol Displays Unexpectedly High Potency as an Antagonist of CB1 and CB2 Receptor Agonists in Vitro. *Br. J. Pharmacol.* 2007, 150, 613–623, doi:10.1038/sj.bjp.0707133.
130. Laprairie, R.B.; Bagher, A.M.; Kelly, M.E.M.; Denovan-Wright, E.M. Cannabidiol Is a Negative Allosteric Modulator of the Cannabinoid CB₁ Receptor: Negative Allosteric Modulation of CB₁ by Cannabidiol. *British Journal of Pharmacology* 2015, 172, 4790–4805, doi:10.1111/bph.13250.
131. McPartland, J.M.; Glass, M.; Pertwee, R.G. Meta-Analysis of Cannabinoid Ligand Binding Affinity and Receptor Distribution: Interspecies Differences: Ligand Affinity and Receptor Distribution of CB1. *British Journal of Pharmacology* 2007, 152, 583–593, doi:10.1038/sj.bjp.0707399.
132. Morales, P.; Lago-Fernandez, A.; Hurst, D.P.; Sotudeh, N.; Brailoiu, E.; Reggio, P.H.; Abood, M.E.; Jagerovic, N. Therapeutic Exploitation of GPR18: Beyond the Cannabinoids?: Miniperspective. *J. Med. Chem.* 2020, 63, 14216–14227, doi:10.1021/acs.jmedchem.0c00926.
133. Zheng, J. Molecular Mechanism of TRP Channels. In *Comprehensive Physiology*; Terjung, R., Ed.; Wiley, 2013; pp. 221–242 ISBN 978-0-470-65071-4.
134. Marinelli, O.; Morelli, M.B.; Annibali, D.; Aguzzi, C.; Zeppa, L.; Tuyaeerts, S.; Amantini, C.; Amant, F.; Ferretti, B.; Maggi, F.; et al. The Effects of Cannabidiol and Prognostic Role of TRPV2 in Human Endometrial Cancer. *IJMS* 2020, 21, 5409, doi:10.3390/ijms21155409.
135. Gomes, F.V.; Resstel, L.B.M.; Guimarães, F.S. The Anxiolytic-like Effects of Cannabidiol Injected into the Bed Nucleus of the Stria Terminalis Are Mediated by 5-HT_{1A} Receptors. *Psychopharmacology* 2011, 213, 465–473, doi:10.1007/s00213-010-2036-z.
136. Hind, W.H.; England, T.J.; O’Sullivan, S.E. Cannabidiol Protects an in Vitro Model of the Blood-Brain Barrier from Oxygen-Glucose Deprivation via PPAR γ and 5-HT_{1A} Receptors: CBD Modulates BBB Permeability. *British Journal of Pharmacology* 2016, 173, 815–825, doi:10.1111/bph.13368.
137. Carroll, C.B.; Zeissler, M.-L.; Hanemann, C.O.; Zajicek, J.P. Δ^9 -Tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) Exerts a Direct Neuroprotective Effect in a Human Cell Culture Model of Parkinson’s Disease: Direct Neuroprotection by Δ^9 -THC in PD Model. *Neuropathology and Applied Neurobiology* 2012, 38, 535–547, doi:10.1111/j.1365-2990.2011.01248.x.
138. Scuderi, C.; Steardo, L.; Esposito, G. Cannabidiol Promotes Amyloid Precursor Protein Ubiquitination and Reduction of Beta Amyloid Expression in SHSY5Y^{APP+} Cells Through PPAR γ Involvement: CBD PROMOTES APP UBIQUITINATION VIA PPAR γ . *Phytother. Res.* 2014, 28, 1007–1013, doi:10.1002/ptr.5095.
139. Sawzdargo, M.; Nguyen, T.; Lee, D.K.; Lynch, K.R.; Cheng, R.; Heng, H.H.Q.; George, S.R.; O’Dowd, B.F. Identification and Cloning of Three Novel Human G Protein-Coupled Receptor Genes GPR52, Ψ GPR53 and GPR55: GPR55 Is Extensively Expressed in Human Brain. *Molecular Brain Research* 1999, 64, 193–198, doi:10.1016/S0169-328X(98)00277-0.
140. Baker, D.; Pryce, G.; Davies, W.L.; Hiley, C.R. In Silico Patent Searching Reveals a New Cannabinoid Receptor. *Trends in Pharmacological Sciences* 2006, 27, 1–4, doi:10.1016/j.tips.2005.11.003.
141. Brown, A.J. Novel Cannabinoid Receptors: Novel Cannabinoid Receptors. *British Journal of Pharmacology* 2009, 152, 567–575, doi:10.1038/sj.bjp.0707481.
142. Kotsikorou, E.; Madrigal, K.E.; Hurst, D.P.; Sharir, H.; Lynch, D.L.; Heynen-Genel, S.; Milan, L.B.; Chung, T.D.Y.; Seltzman, H.H.; Bai, Y.; et al. Identification of the GPR55

- Agonist Binding Site Using a Novel Set of High-Potency GPR55 Selective Ligands. *Biochemistry* 2011, 50, 5633–5647, doi:10.1021/bi200010k.
143. Kotsikorou, E.; Sharir, H.; Shore, D.M.; Hurst, D.P.; Lynch, D.L.; Madrigal, K.E.; Heynen-Genel, S.; Milan, L.B.; Chung, T.D.Y.; Seltzman, H.H.; et al. Identification of the GPR55 Antagonist Binding Site Using a Novel Set of High-Potency GPR55 Selective Ligands. *Biochemistry* 2013, 52, 9456–9469, doi:10.1021/bi4008885.
144. Oka, S.; Nakajima, K.; Yamashita, A.; Kishimoto, S.; Sugiura, T. Identification of GPR55 as a Lysophosphatidylinositol Receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2007, 362, 928–934, doi:10.1016/j.bbrc.2007.08.078.
145. Ruban, E.L.; Ferro, R.; Arifin, S.A.; Falasca, M. Lysophosphatidylinositol: A Novel Link between ABC Transporters and G-Protein-Coupled Receptors. *Biochemical Society Transactions* 2014, 42, 1372–1377, doi:10.1042/BST20140151.
146. Richmond, G.S.; Smith, T.K. Phospholipases A₁. *Int J Mol Sci* 2011, 12, 588–612, doi:10.3390/ijms12010588.
147. Lauckner, J.E.; Jensen, J.B.; Chen, H.-Y.; Lu, H.-C.; Hille, B.; Mackie, K. GPR55 Is a Cannabinoid Receptor That Increases Intracellular Calcium and Inhibits M Current. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2008, 105, 2699–2704, doi:10.1073/pnas.0711278105.
148. Staton, P.C.; Hatcher, J.P.; Walker, D.J.; Morrison, A.D.; Shapland, E.M.; Hughes, J.P.; Chong, E.; Mander, P.K.; Green, P.J.; Billinton, A.; et al. The Putative Cannabinoid Receptor GPR55 Plays a Role in Mechanical Hyperalgesia Associated with Inflammatory and Neuropathic Pain. *Pain* 2008, 139, 225–236, doi:10.1016/j.pain.2008.04.006.
149. Pietr, M.; Kozela, E.; Levy, R.; Rimmerman, N.; Lin, Y.H.; Stella, N.; Vogel, Z.; Juknat, A. Differential Changes in GPR55 during Microglial Cell Activation. *FEBS Letters* 2009, 583, 2071–2076, doi:10.1016/j.febslet.2009.05.028.
150. Henstridge, C.M.; Balenga, N.A.B.; Kargl, J.; Andradas, C.; Brown, A.J.; Irving, A.; Sanchez, C.; Waldhoer, M. Minireview: Recent Developments in the Physiology and Pathology of the Lysophosphatidylinositol-Sensitive Receptor GPR55. *Molecular Endocrinology* 2011, 25, 1835–1848, doi:10.1210/me.2011-1197.
151. Ryberg, E.; Larsson, N.; Sjögren, S.; Hjorth, S.; Hermansson, N.-O.; Leonova, J.; Elebring, T.; Nilsson, K.; Drmota, T.; Greasley, P.J. The Orphan Receptor GPR55 Is a Novel Cannabinoid Receptor: GPR55, a Novel Cannabinoid Receptor. *British Journal of Pharmacology* 2007, 152, 1092–1101, doi:10.1038/sj.bjp.0707460.
152. Oka, S.; Kimura, S.; Toshida, T.; Ota, R.; Yamashita, A.; Sugiura, T. Lysophosphatidylinositol Induces Rapid Phosphorylation of P38 Mitogen-Activated Protein Kinase and Activating Transcription Factor 2 in HEK293 Cells Expressing GPR55 and IM-9 Lymphoblastoid Cells. *Journal of Biochemistry* 2010, 147, 671–678, doi:10.1093/jb/mvp208.
153. Kremshofer, J.; Siwetz, M.; Berghold, V.M.; Lang, I.; Huppertz, B.; Gauster, M. A Role for GPR55 in Human Placental Venous Endothelial Cells. *Histochem Cell Biol* 2015, 144, 49–58, doi:10.1007/s00418-015-1321-7.
154. Kallendrusch, S.; Kremzow, S.; Nowicki, M.; Grabiec, U.; Winkelmann, R.; Benz, A.; Kraft, R.; Bechmann, I.; Dehghani, F.; Koch, M. The G Protein-Coupled Receptor 55 Ligand L- α -Lysophosphatidylinositol Exerts Microglia-Dependent Neuroprotection After Excitotoxic Lesion: Microglia-Dependent GPR55-Driven Neuroprotection. *Glia* 2013, 61, 1822–1831, doi:10.1002/glia.22560.
155. Whyte, L.S.; Ryberg, E.; Sims, N.A.; Ridge, S.A.; Mackie, K.; Greasley, P.J.; Ross, R.A.; Rogers, M.J. The Putative Cannabinoid Receptor GPR55 Affects Osteoclast Function in Vitro and Bone Mass in Vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2009, 106, 16511–16516, doi:10.1073/pnas.0902743106.

156. AlSuleimani, Y.M.; Hiley, C.R. The GPR55 Agonist Lysophosphatidylinositol Relaxes Rat Mesenteric Resistance Artery and Induces Ca²⁺ Release in Rat Mesenteric Artery Endothelial Cells: The GPR55 Agonist Lysophosphatidylinositol. *Br J Pharmacol* 2015, 172, 3043–3057, doi:10.1111/bph.13107.
157. Al Suleimani, Y.M.; Al Mahruqi, A.S.; Hiley, C.R. Mechanisms of Vasorelaxation Induced by the Cannabidiol Analogue Compound O-1602 in the Rat Small Mesenteric Artery. *European Journal of Pharmacology* 2015, 765, 107–114, doi:10.1016/j.ejphar.2015.08.021.
158. Al Suleimani, Y.M.; Hiley, C.R. Characterization of Calcium Signals Provoked by Lysophosphatidylinositol in Human Microvascular Endothelial Cells. *Physiol Res* 2016, 53–62, doi:10.33549/physiolres.932962.
159. Simcocks, A.C.; O’Keefe, L.; Jenkin, K.A.; Mathai, M.L.; Hryciw, D.H.; McAinch, A.J. A Potential Role for GPR55 in the Regulation of Energy Homeostasis. *Drug Discovery Today* 2014, 19, 1145–1151, doi:10.1016/j.drudis.2013.12.005.
160. Simcocks, A.C.; Jenkin, K.A.; O’Keefe, L.; Samuel, C.S.; Mathai, M.L.; McAinch, A.J.; Hryciw, D.H. Atypical Cannabinoid Ligands O-1602 and O-1918 Administered Chronically in Diet-Induced Obesity. *Endocrine Connections* 2019, 8, 203–216, doi:10.1530/EC-18-0535.
161. Simcocks, A.C.; O’Keefe, L.; Jenkin, K.A.; Cornall, L.M.; Grinfeld, E.; Mathai, M.L.; Hryciw, D.H.; McAinch, A.J. The Role of Atypical Cannabinoid Ligands O-1602 and O-1918 on Skeletal Muscle Homeostasis with a Focus on Obesity. *IJMS* 2020, 21, 5922, doi:10.3390/ijms21165922.
162. Vong, C.T.; Tseng, H.H.L.; Kwan, Y.W.; Lee, S.M.-Y.; Hoi, M.P.M. Novel Protective Effect of O-1602 and Abnormal Cannabidiol, GPR55 Agonists, on ER Stress-Induced Apoptosis in Pancreatic β -Cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2019, 111, 1176–1186, doi:10.1016/j.biopha.2018.12.126.
163. Vong, C.T.; Tseng, H.H.L.; Kwan, Y.W.; Lee, S.M.-Y.; Hoi, M.P.M. G-Protein Coupled Receptor 55 Agonists Increase Insulin Secretion through Inositol Trisphosphate-Mediated Calcium Release in Pancreatic β -Cells. *European Journal of Pharmacology* 2019, 854, 372–379, doi:10.1016/j.ejphar.2019.04.050.
164. Romero-Zerbo, S.Y.; Rafacho, A.; Díaz-Arteaga, A.; Suárez, J.; Quesada, I.; Imbernon, M.; Ross, R.A.; Dieguez, C.; Rodríguez de Fonseca, F.; Nogueiras, R.; et al. A Role for the Putative Cannabinoid Receptor GPR55 in the Islets of Langerhans. *Journal of Endocrinology* 2011, 211, 177–185, doi:10.1530/JOE-11-0166.
165. Liu, B.; Song, S.; Ruz-Maldonado, I.; Pingitore, A.; Huang, G.C.; Baker, D.; Jones, P.M.; Persaud, S.J. GPR55-Dependent Stimulation of Insulin Secretion from Isolated Mouse and Human Islets of Langerhans: LIU et Al. *Diabetes Obes Metab* 2016, 18, 1263–1273, doi:10.1111/dom.12780.
166. Ruz-Maldonado, I.; Pingitore, A.; Liu, B.; Atanes, P.; Huang, G.C.; Baker, D.; Alonso, F.J.; Bermúdez-Silva, F.J.; Persaud, S.J. LH-21 and Abnormal Cannabidiol Improve β -Cell Function in Isolated Human and Mouse Islets through GPR55-Dependent and -Independent Signalling. *Diabetes Obes Metab* 2018, 20, 930–942, doi:10.1111/dom.13180.
167. Moreno-Navarrete, J.M.; Catalán, V.; Whyte, L.; Díaz-Arteaga, A.; Vázquez-Martínez, R.; Rotellar, F.; Guzmán, R.; Gómez-Ambrosi, J.; Pulido, M.R.; Russell, W.R.; et al. The L- α -Lysophosphatidylinositol/ GPR55 System and Its Potential Role in Human Obesity. *Diabetes* 2012, 61, 281–291, doi:10.2337/db11-0649.
168. Andradas, C.; Caffarel, M.M.; Pérez-Gómez, E.; Salazar, M.; Lorente, M.; Velasco, G.; Guzmán, M.; Sánchez, C. The Orphan G Protein-Coupled Receptor GPR55 Promotes Cancer Cell Proliferation via ERK. *Oncogene* 2011, 30, 245–252, doi:10.1038/onc.2010.402.

169. Shen, Z.; Wu, M.; Elson, P.; Kennedy, A.W.; Belinson, J.; Casey, G.; Xu, Y. Fatty Acid Composition of Lysophosphatidic Acid and Lysophosphatidylinositol in Plasma from Patients with Ovarian Cancer and Other Gynecological Diseases. *Gynecol Oncol* 2001, 83, 25–30, doi:10.1006/gyno.2001.6357.
170. Kargl, J.; Andersen, L.; Hasenöhrl, C.; Feuersinger, D.; Stančić, A.; Fauland, A.; Magnes, C.; El-Heliebi, A.; Lax, S.; Uranitsch, S.; et al. GPR55 Promotes Migration and Adhesion of Colon Cancer Cells Indicating a Role in Metastasis: GPR55 in Colon Cancer. *British Journal of Pharmacology* 2016, 173, 142–154, doi:10.1111/bph.13345.
171. Ferro, R.; Adamska, A.; Lattanzio, R.; Mavrommati, I.; Edling, C.E.; Arifin, S.A.; Fyffe, C.A.; Sala, G.; Sacchetto, L.; Chiorino, G.; et al. GPR55 Signalling Promotes Proliferation of Pancreatic Cancer Cells and Tumour Growth in Mice, and Its Inhibition Increases Effects of Gemcitabine. *Oncogene* 2018, 37, 6368–6382, doi:10.1038/s41388-018-0390-1.
172. Piñeiro, R.; Maffucci, T.; Falasca, M. The Putative Cannabinoid Receptor GPR55 Defines a Novel Autocrine Loop in Cancer Cell Proliferation. *Oncogene* 2011, 30, 142–152, doi:10.1038/onc.2010.417.
173. Zhou, X.; Guo, X.; Song, Y.; Zhu, C.; Zou, W. The LPI/GPR55 Axis Enhances Human Breast Cancer Cell Migration via HBXIP and p-MLC Signaling. *Acta Pharmacol Sin* 2018, 39, 459–471, doi:10.1038/aps.2017.157.
174. Ford, L.A.; Roelofs, A.J.; Anavi-Goffer, S.; Mowat, L.; Simpson, D.G.; Irving, A.J.; Rogers, M.J.; Rajnicek, A.M.; Ross, R.A. A Role for L- α -Lysophosphatidylinositol and GPR55 in the Modulation of Migration, Orientation and Polarization of Human Breast Cancer Cells: LPI and GPR55 Modulate Breast Cancer Cell Migration. *British Journal of Pharmacology* 2010, 160, 762–771, doi:10.1111/j.1476-5381.2010.00743.x.
175. Henstridge, C.M.; Balenga, N.A.; Schröder, R.; Kargl, J.K.; Platzer, W.; Martini, L.; Arthur, S.; Penman, J.; Whistler, J.L.; Kostenis, E.; et al. GPR55 Ligands Promote Receptor Coupling to Multiple Signalling Pathways: GPR55 Signalling. *British Journal of Pharmacology* 2010, 160, 604–614, doi:10.1111/j.1476-5381.2009.00625.x.
176. Henstridge, C.M.; Balenga, N.A.B.; Ford, L.A.; Ross, R.A.; Waldhoer, M.; Irving, A.J. The GPR55 Ligand L- α -lysophosphatidylinositol Promotes RhoA-dependent Ca²⁺ Signaling and NFAT Activation. *FASEB j.* 2009, 23, 183–193, doi:10.1096/fj.08-108670.
177. Obara, Y.; Ueno, S.; Yanagihata, Y.; Nakahata, N. Lysophosphatidylinositol Causes Neurite Retraction via GPR55, G13 and RhoA in PC12 Cells. *PLoS ONE* 2011, 6, e24284, doi:10.1371/journal.pone.0024284.
178. Waldeck-Weiermair, M.; Zoratti, C.; Osibow, K.; Balenga, N.; Goessnitzer, E.; Waldhoer, M.; Malli, R.; Graier, W.F. Integrin Clustering Enables Anandamide-Induced Ca²⁺ Signaling in Endothelial Cells via GPR55 by Protection against CB1-Receptor-Triggered Repression. *Journal of Cell Science* 2008, 121, 1704–1717, doi:10.1242/jcs.020958.
179. Ross, R.A. The Enigmatic Pharmacology of GPR55. *Trends in Pharmacological Sciences* 2009, 30, 156–163, doi:10.1016/j.tips.2008.12.004.
180. Kapur, A.; Zhao, P.; Sharir, H.; Bai, Y.; Caron, M.G.; Barak, L.S.; Abood, M.E. Atypical Responsiveness of the Orphan Receptor GPR55 to Cannabinoid Ligands. *J Biol Chem* 2009, 284, 29817–29827, doi:10.1074/jbc.M109.050187.
181. Yin, H.; Chu, A.; Li, W.; Wang, B.; Shelton, F.; Otero, F.; Nguyen, D.G.; Caldwell, J.S.; Chen, Y.A. Lipid G Protein-Coupled Receptor Ligand Identification Using Beta-Arrestin PathHunter Assay. *J Biol Chem* 2009, 284, 12328–12338, doi:10.1074/jbc.M806516200.
182. Anavi-Goffer, S.; Baillie, G.; Irving, A.J.; Gertsch, J.; Greig, I.R.; Pertwee, R.G.; Ross, R.A. Modulation of L- α -Lysophosphatidylinositol/GPR55 Mitogen-Activated Protein

- Kinase (MAPK) Signaling by Cannabinoids. *J Biol Chem* 2012, 287, 91–104, doi:10.1074/jbc.M111.296020.
183. Johns, D.G.; Behm, D.J.; Walker, D.J.; Ao, Z.; Shapland, E.M.; Daniels, D.A.; Riddick, M.; Dowell, S.; Staton, P.C.; Green, P.; et al. The Novel Endocannabinoid Receptor GPR55 Is Activated by Atypical Cannabinoids but Does Not Mediate Their Vasodilator Effects: GPR55 and Atypical Cannabinoids. *British Journal of Pharmacology* 2007, 152, 825–831, doi:10.1038/sj.bjp.0707419.
 184. Huang, L.; Ramirez, J.C.; Frampton, G.A.; Golden, L.E.; Quinn, M.A.; Pae, H.Y.; Horvat, D.; Liang, L.; DeMorrow, S. Anandamide Exerts Its Antiproliferative Actions on Cholangiocarcinoma by Activation of the GPR55 Receptor. *Lab Invest* 2011, 91, 1007–1017, doi:10.1038/labinvest.2011.62.
 185. Marc Kolbe Generierung Und Charakterisierung Radio-Chemo-Resistenter Primärer Glioblastomzellen 2018.
 186. Scholzen, T.; Gerdes, J. The Ki-67 Protein: From the Known and the Unknown. *J. Cell. Phys.* 2000, 182, 311–322, doi:10.1002/(SICI)1097-4652(200003)182:3<311::AID-JCP1>3.0.CO;2-9.
 187. Marc Kolbe Charakterisierung Humaner Primärer Glioblastomzellen: Der Einfluss von Cannabinoiden Und Temozolomid. 2016.
 188. Agnes Dorn Immunhistochemische Und Funktionelle Charakterisierung von Zellen Und Gewebekulturen Aus Primären Humanen Glioblastomen. 2018.
 189. Livak, K.J.; Schmittgen, T.D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods* 2001, 25, 402–408, doi:10.1006/meth.2001.1262.
 190. Manoir, S.D.; Guillaud, P.; Camus, E.; Seigneurin, D.; Brugal, G. Ki-67 Labeling in Postmitotic Cells Defines Different Ki-67 Pathways within the 2c Compartment. *Cytometry* 1991, 12, 455–463, doi:10.1002/cyto.990120511.
 191. Bullwinkel, J.; Baron-Lühr, B.; Lüdemann, A.; Wohlenberg, C.; Gerdes, J.; Scholzen, T. Ki-67 Protein Is Associated with Ribosomal RNA Transcription in Quiescent and Proliferating Cells. *J. Cell. Physiol.* 2006, 206, 624–635, doi:10.1002/jcp.20494.
 192. Sobocki, M.; Mrouj, K.; Colinge, J.; Gerbe, F.; Jay, P.; Krasinska, L.; Dulic, V.; Fisher, D. Cell-Cycle Regulation Accounts for Variability in Ki-67 Expression Levels. *Cancer Research* 2017, 77, 2722–2734, doi:10.1158/0008-5472.CAN-16-0707.
 193. Grabiec, U.; Hohmann, T.; Ghadban, C.; Rothgänger, C.; Wong, D.; Antonietti, A.; Groth, T.; Mackie, K.; Dehghani, F. Protective Effect of N-Arachidonoyl Glycine-GPR18 Signaling after Excitotoxic Lesion in Murine Organotypic Hippocampal Slice Cultures. *IJMS* 2019, 20, 1266, doi:10.3390/ijms20061266.
 194. Moreno, E.; Andradas, C.; Medrano, M.; Caffarel, M.M.; Pérez-Gómez, E.; Blasco-Benito, S.; Gómez-Cañas, M.; Pazos, M.R.; Irving, A.J.; Lluís, C.; et al. Targeting CB₂-GPR55 Receptor Heteromers Modulates Cancer Cell Signaling. *J. Biol. Chem.* 2014, 289, 21960–21972, doi:10.1074/jbc.M114.561761.
 195. Balenga, N.A.; Martínez-Pinilla, E.; Kargl, J.; Schröder, R.; Peinhaupt, M.; Platzer, W.; Bálint, Z.; Zamarbide, M.; Dopeso-Reyes, I.G.; Ricobaraza, A.; et al. Heteromerization of GPR55 and Cannabinoid CB₂ Receptors Modulates Signalling: Heteromerization of GPR55 and CB₂ Receptors. *Br J Pharmacol* 2014, 171, 5387–5406, doi:10.1111/bph.12850.
 196. Kargl, J.; Balenga, N.; Parzmair, G.P.; Brown, A.J.; Heinemann, A.; Waldhoer, M. The Cannabinoid Receptor CB₁ Modulates the Signaling Properties of the Lysophosphatidylinositol Receptor GPR55. *J. Biol. Chem.* 2012, 287, 44234–44248, doi:10.1074/jbc.M112.364109.
 197. Mangmool, S.; Kurose, H. Gi/o Protein-Dependent and -Independent Actions of Pertussis Toxin (PTX). *Toxins* 2011, 3, 884–899, doi:10.3390/toxins3070884.

198. Prole, D.L.; Taylor, C.W. Structure and Function of IP₃ Receptors. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2019, 11, a035063, doi:10.1101/cshperspect.a035063.
199. Park, Y.-J.; Yoo, S.-A.; Kim, M.; Kim, W.-U. The Role of Calcium–Calcineurin–NFAT Signaling Pathway in Health and Autoimmune Diseases. *Front. Immunol.* 2020, 11, 195, doi:10.3389/fimmu.2020.00195.
200. Thiel, G.; Schmidt, T.; Rössler, O.G. Ca²⁺ Microdomains, Calcineurin and the Regulation of Gene Transcription. *Cells* 2021, 10, 875, doi:10.3390/cells10040875.
201. Cen, L.; Xing, F.; Xu, L.; Cao, Y. Potential Role of Gene Regulator NFAT5 in the Pathogenesis of Diabetes Mellitus. *Journal of Diabetes Research* 2020, 2020, 1–13, doi:10.1155/2020/6927429.
202. Razani-Boroujerdi, S.; Partridge, L.D.; Sopori, M.L. Intracellular Calcium Signaling Induced by Thapsigargin in Excitable and Inexcitable Cells. *Cell Calcium* 1994, 16, 467–474, doi:10.1016/0143-4160(94)90076-0.
203. Morgan, A.J.; Jacob, R. Ionomycin Enhances Ca²⁺ Influx by Stimulating Store-Regulated Cation Entry and Not by a Direct Action at the Plasma Membrane. *Biochemical Journal* 1994, 300, 665–672, doi:10.1042/bj3000665.
204. Jovčevska, I.; Kočevar, N.; Komel, R. Glioma and Glioblastoma - How Much Do We (Not) Know? *Molecular and Clinical Oncology* 2013, 1, 935–941, doi:10.3892/mco.2013.172.
205. Kolbe, M.R.; Hohmann, T.; Hohmann, U.; Ghadban, C.; Mackie, K.; Zöller, C.; Prell, J.; Illert, J.; Strauss, C.; Dehghani, F. THC Reduces Ki67-Immunoreactive Cells Derived from Human Primary Glioblastoma in a GPR55-Dependent Manner. *Cancers* 2021, 13, 1064, doi:10.3390/cancers13051064.
206. Pertwee, R.G. Ligands That Target Cannabinoid Receptors in the Brain: From THC to Anandamide and beyond: Ligands That Target Cannabinoid Receptors in the Brain. *Addiction Biology* 2008, 13, 147–159, doi:10.1111/j.1369-1600.2008.00108.x.
207. Hillard, C.J.; Manna, S.; Greenberg, M.J.; DiCamelli, R.; Ross, R.A.; Stevenson, L.A.; Murphy, V.; Pertwee, R.G.; Campbell, W.B. Synthesis and Characterization of Potent and Selective Agonists of the Neuronal Cannabinoid Receptor (CB1). *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1999, 289, 1427–1433.
208. Huffman, J.W.; Liddle, J.; Yu, S.; Aung, M.M.; Abood, M.E.; Wiley, J.L.; Martin, B.R. 3-(1',1'-Dimethylbutyl)-1-Deoxy-Delta⁸-THC and Related Compounds: Synthesis of Selective Ligands for the CB2 Receptor. *Bioorg. Med. Chem.* 1999, 7, 2905–2914, doi:10.1016/s0968-0896(99)00219-9.
209. Mallipeddi, S.; Janero, D.R.; Zvonok, N.; Makriyannis, A. Functional Selectivity at G-Protein Coupled Receptors: Advancing Cannabinoid Receptors as Drug Targets. *Biochemical Pharmacology* 2017, 128, 1–11, doi:10.1016/j.bcp.2016.11.014.
210. Glass, M.; Northup, J.K. Agonist Selective Regulation of G Proteins by Cannabinoid CB₁ and CB₂ Receptors. *Mol Pharmacol* 1999, 56, 1362–1369, doi:10.1124/mol.56.6.1362.
211. Laprairie, R.B.; Bagher, A.M.; Kelly, M.E.M.; Denovan-Wright, E.M. Biased Type 1 Cannabinoid Receptor Signaling Influences Neuronal Viability in a Cell Culture Model of Huntington Disease. *Mol Pharmacol* 2016, 89, 364–375, doi:10.1124/mol.115.101980.
212. Diez-Alarcia, R.; Ibarra-Lecue, I.; Lopez-Cardona, Á.P.; Meana, J.; Gutierrez-Adán, A.; Callado, L.F.; Agirregoitia, E.; Urigüen, L. Biased Agonism of Three Different Cannabinoid Receptor Agonists in Mouse Brain Cortex. *Front. Pharmacol.* 2016, 7, doi:10.3389/fphar.2016.00415.
213. Al-Zoubi, M.; Morales, R.; Reggio, R. Structural Insights into CB1 Receptor Biased Signaling. *IJMS* 2019, 20, 1837, doi:10.3390/ijms20081837.
214. Vassilatis, D.K.; Hohmann, J.G.; Zeng, H.; Li, F.; Ranchalis, J.E.; Mortrud, M.T.; Brown, A.; Rodriguez, S.S.; Weller, J.R.; Wright, A.C.; et al. The G Protein-Coupled

- Receptor Repertoires of Human and Mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2003, 100, 4903–4908, doi:10.1073/pnas.0230374100.
215. Tomko, A.; O’Leary, L.; Trask, H.; Achenbach, J.C.; Hall, S.R.; Goralski, K.B.; Ellis, L.D.; Dupré, D.J. Antitumor Activity of Abnormal Cannabidiol and Its Analog O-1602 in Taxol-Resistant Preclinical Models of Breast Cancer. *Front Pharmacol* 2019, 10, 1124, doi:10.3389/fphar.2019.01124.
 216. Qin, Y.; Verdegaal, E.M.E.; Siderius, M.; Bebelman, J.P.; Smit, M.J.; Leurs, R.; Willemze, R.; Tensen, C.P.; Osanto, S. Quantitative Expression Profiling of G-Protein-Coupled Receptors (GPCRs) in Metastatic Melanoma: The Constitutively Active Orphan GPCR GPR18 as Novel Drug Target: GPCR Expression Profiling in Melanoma. *Pigment Cell & Melanoma Research* 2011, 24, 207–218, doi:10.1111/j.1755-148X.2010.00781.x.
 217. Finlay, D.B.; Joseph, W.R.; Grimsey, N.L.; Glass, M. GPR18 Undergoes a High Degree of Constitutive Trafficking but Is Unresponsive to N-Arachidonoyl Glycine. *PeerJ* 2016, 4, e1835, doi:10.7717/peerj.1835.
 218. Tudurí, E.; Imbernon, M.; Hernández-Bautista, R.J.; Tojo, M.; Fernø, J.; Diéguez, C.; Nogueiras, R. GPR55: A New Promising Target for Metabolism? *Journal of Molecular Endocrinology* 2017, 58, R191–R202, doi:10.1530/JME-16-0253.
 219. Yang, H.; Zhou, J.; Lehmann, C. GPR55 – a Putative “Type 3” Cannabinoid Receptor in Inflammation. *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology* 2016, 27, doi:10.1515/jbcpp-2015-0080.
 220. Lingerfelt, M.A.; Zhao, P.; Sharir, H.P.; Hurst, D.P.; Reggio, P.H.; Abood, M.E. Identification of Crucial Amino Acid Residues Involved in Agonist Signaling at the GPR55 Receptor. *Biochemistry* 2017, 56, 473–486, doi:10.1021/acs.biochem.6b01013.
 221. Touat, M.; Idbaih, A.; Sanson, M.; Ligon, K.L. Glioblastoma Targeted Therapy: Updated Approaches from Recent Biological Insights. *Annals of Oncology* 2017, 28, 1457–1472, doi:10.1093/annonc/mdx106.
 222. Akimov, M.G.; Gretskaya, N.M.; Dudina, P.V.; Sherstyanykh, G.D.; Zinchenko, G.N.; Serova, O.V.; Degtyaryova, K.O.; Deyev, I.E.; Bezuglov, V.V. The Mechanisms of GPR55 Receptor Functional Selectivity during Apoptosis and Proliferation Regulation in Cancer Cells. *IJMS* 2023, 24, 5524, doi:10.3390/ijms24065524.
 223. Akimov, M.G.; Gamisonia, A.M.; Dudina, P.V.; Gretskaya, N.M.; Gaydaryova, A.A.; Kuznetsov, A.S.; Zinchenko, G.N.; Bezuglov, V.V. GPR55 Receptor Activation by the N-Acyl Dopamine Family Lipids Induces Apoptosis in Cancer Cells via the Nitric Oxide Synthase (NOS) Over-Stimulation. *IJMS* 2021, 22, 622, doi:10.3390/ijms22020622.
 224. Marzban, H.; Kong, J.; Mehr, S.; Vriend, J.; Li, J.; Guan, T.; Chung, S.; Mirzaei, N.; Marzban, A.; Shojaei, S.; et al. Mevalonate Cascade and Neurodevelopmental and Neurodegenerative Diseases: Future Targets for Therapeutic Application. *CMP* 2017, 10, 115–140, doi:10.2174/1874467209666160112125446.
 225. Ribeiro, C.M.P.; Reece, J.; Putney, J.W. Role of the Cytoskeleton in Calcium Signaling in NIH 3T3 Cells. *Journal of Biological Chemistry* 1997, 272, 26555–26561, doi:10.1074/jbc.272.42.26555.
 226. Sánchez-Zavaleta, R.; Ávalos-Fuentes, J.A.; González-Hernández, A.V.; Recillas-Morales, S.; Paz-Bermúdez, F.J.; Leyva-Gómez, G.; Cortés, H.; Florán, B. Presynaptic Nigral GPR55 Receptors Stimulate [³H]-GABA Release through [³H]-cAMP Production and PKA Activation and Promote Motor Behavior. *Synapse* 2022, 76, doi:10.1002/syn.22246.
 227. Pfeil, E.M.; Brands, J.; Merten, N.; Vögtle, T.; Vescovo, M.; Rick, U.; Albrecht, I.-M.; Heycke, N.; Kawakami, K.; Ono, Y.; et al. Heterotrimeric G Protein Subunit Gαq Is a Master Switch for Gβγ-Mediated Calcium Mobilization by Gi-Coupled GPCRs. *Molecular Cell* 2020, 80, 940-954.e6, doi:10.1016/j.molcel.2020.10.027.

228. Nishida, M.; Suda, R.; Nagamatsu, Y.; Tanabe, S.; Onohara, N.; Nakaya, M.; Kanaho, Y.; Shibata, T.; Uchida, K.; Sumimoto, H.; et al. Pertussis Toxin Up-Regulates Angiotensin Type 1 Receptors through Toll-like Receptor 4-Mediated Rac Activation. *Journal of Biological Chemistry* 2010, 285, 15268–15277, doi:10.1074/jbc.M109.076232.
229. Smrcka, A.V.; Sternweis, P.C. Regulation of Purified Subtypes of Phosphatidylinositol-Specific Phospholipase C Beta by G Protein Alpha and Beta Gamma Subunits. *Journal of Biological Chemistry* 1993, 268, 9667–9674, doi:10.1016/S0021-9258(18)98401-2.
230. Litosch, I. RhoA Co-Ordinates with Heterotrimeric G Proteins to Regulate Efficacy. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2011, 415, 215–219, doi:10.1016/j.bbrc.2011.10.063.
231. Rebres, R.A.; Roach, T.I.A.; Fraser, I.D.C.; Philip, F.; Moon, C.; Lin, K.-M.; Liu, J.; Santat, L.; Cheadle, L.; Ross, E.M.; et al. Synergistic Ca²⁺ Responses by G_{ai}- and G_{aq}-Coupled G-Protein-Coupled Receptors Require a Single PLC β Isoform That Is Sensitive to Both G $\beta\gamma$ and G α_q . *Journal of Biological Chemistry* 2011, 286, 942–951, doi:10.1074/jbc.M110.198200.
232. Philip, F.; Kadamur, G.; Silos, R.G.; Woodson, J.; Ross, E.M. Synergistic Activation of Phospholipase C-B3 by G_{aq} and G $\beta\gamma$ Describes a Simple Two-State Coincidence Detector. *Current Biology* 2010, 20, 1327–1335, doi:10.1016/j.cub.2010.06.013.
233. Tang, W.; Tu, Y.; Nayak, S.K.; Woodson, J.; Jehl, M.; Ross, E.M. G $\beta\gamma$ Inhibits G α GTPase-Activating Proteins by Inhibition of G α -GTP Binding during Stimulation by Receptor. *Journal of Biological Chemistry* 2006, 281, 4746–4753, doi:10.1074/jbc.M510573200.
234. Kargl, J.; Brown, A.J.; Andersen, L.; Dorn, G.; Schicho, R.; Waldhoer, M.; Heinemann, A. A Selective Antagonist Reveals a Potential Role of G Protein–Coupled Receptor 55 in Platelet and Endothelial Cell Function. *J Pharmacol Exp Ther* 2013, 346, 54–66, doi:10.1124/jpet.113.204180.
235. Kissinger, C.R.; Parge, H.E.; Knighton, D.R.; Lewis, C.T.; Pelletier, L.A.; Tempczyk, A.; Kalish, V.J.; Tucker, K.D.; Showalter, R.E.; Moomaw, E.W.; et al. Crystal Structures of Human Calcineurin and the Human FKBP12–FK506–Calcineurin Complex. *Nature* 1995, 378, 641–644, doi:10.1038/378641a0.
236. Jin, L.; Harrison, S.C. Crystal Structure of Human Calcineurin Complexed with Cyclosporin A and Human Cyclophilin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2002, 99, 13522–13526, doi:10.1073/pnas.212504399.
237. Fruman, D.A.; Klee, C.B.; Bierer, B.E.; Burakoff, S.J. Calcineurin Phosphatase Activity in T Lymphocytes Is Inhibited by FK 506 and Cyclosporin A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1992, 89, 3686–3690, doi:10.1073/pnas.89.9.3686.
238. Meyer, S.; Kohler, N.G.; Joly, A. Cyclosporine A Is an Uncompetitive Inhibitor of Proteasome Activity and Prevents NF-KB Activation. *FEBS Letters* 1997, 413, 354–358, doi:10.1016/S0014-5793(97)00930-7.
239. Kar, P.; Parekh, A.B. Distinct Spatial Ca²⁺ Signatures Selectively Activate Different NFAT Transcription Factor Isoforms. *Molecular Cell* 2015, 58, 232–243, doi:10.1016/j.molcel.2015.02.027.
240. Vihma, H.; Luhakooder, M.; Pruunsild, P.; Timmusk, T. Regulation of Different Human NFAT Isoforms by Neuronal Activity. *J. Neurochem.* 2016, 137, 394–408, doi:10.1111/jnc.13568.
241. Yissachar, N.; Sharar Fischler, T.; Cohen, A.A.; Reich-Zeliger, S.; Russ, D.; Shifrut, E.; Porat, Z.; Friedman, N. Dynamic Response Diversity of NFAT Isoforms in Individual Living Cells. *Molecular Cell* 2013, 49, 322–330, doi:10.1016/j.molcel.2012.11.003.
242. Sreaton, R.A.; Conkright, M.D.; Katoh, Y.; Best, J.L.; Canettieri, G.; Jeffries, S.; Guzman, E.; Niessen, S.; Yates, J.R.; Takemori, H.; et al. The CREB Coactivator TORC2

- Functions as a Calcium- and CAMP-Sensitive Coincidence Detector. *Cell* 2004, 119, 61–74, doi:10.1016/j.cell.2004.09.015.
243. Puertollano, R.; Ferguson, S.M.; Brugarolas, J.; Ballabio, A. The Complex Relationship between TFEB Transcription Factor Phosphorylation and Subcellular Localization. *EMBO J* 2018, 37, doi:10.15252/embj.201798804.
 244. Wu, H. Activation of MEF2 by Muscle Activity Is Mediated through a Calcineurin-Dependent Pathway. *The EMBO Journal* 2001, 20, 6414–6423, doi:10.1093/emboj/20.22.6414.
 245. Bito, H.; Deisseroth, K.; Tsien, R.W. CREB Phosphorylation and Dephosphorylation: A Ca²⁺- and Stimulus Duration-Dependent Switch for Hippocampal Gene Expression. *Cell* 1996, 87, 1203–1214, doi:10.1016/S0092-8674(00)81816-4.
 246. Ma, X.; Wu, Y.; Zhang, T.; Song, H.; Jv, H.; Guo, W.; Ren, G. Ki67 Proliferation Index as a Histopathological Predictive and Prognostic Parameter of Oral Mucosal Melanoma in Patients without Distant Metastases. *J. Cancer* 2017, 8, 3828–3837, doi:10.7150/jca.20935.
 247. on behalf of the Transatlantic Prostate Group; Fisher, G.; Yang, Z.H.; Kudahetti, S.; Møller, H.; Scardino, P.; Cuzick, J.; Berney, D.M. Prognostic Value of Ki-67 for Prostate Cancer Death in a Conservatively Managed Cohort. *Br J Cancer* 2013, 108, 271–277, doi:10.1038/bjc.2012.598.
 248. Yan, J.; Liu, X.-L.; Han, L.-Z.; Xiao, G.; Li, N.-L.; Deng, Y.-N.; Yin, L.-C.; Ling, L.-J.; Yu, X.-Y.; Tan, C.-L.; et al. Relation between Ki-67, ER, PR, Her2/Neu, P21, EGFR, and TOP II- α Expression in Invasive Ductal Breast Cancer Patients and Correlations with Prognosis. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 2015, 16, 823–829, doi:10.7314/APJCP.2015.16.2.823.
 249. Artigiani Neto, R.; Logullo, A.F.; Stávale, J.N.; Lourenço, L.G. Ki-67 Expression Score Correlates to Survival Rate in Gastrointestinal Stromal Tumors (GIST). *Acta Cir. Bras.* 2012, 27, 315–321, doi:10.1590/S0102-86502012000500007.
 250. Wong, E.; Nahar, N.; Hau, E.; Varikatt, W.; Gebiski, V.; Ng, T.; Jayamohan, J.; Sundaresan, P. Cut-Point for Ki-67 Proliferation Index as a Prognostic Marker for Glioblastoma. *Asia-Pac J Clin Oncol* 2019, 15, 5–9, doi:10.1111/ajco.12826.
 251. Bredel, M.; Piribauer, M.; Marosi, C.; Birner, P.; Gatterbauer, B.; Fischer, I.; Ströbel, T.; Rössler, K.; Budka, H.; Hainfellner, J.A. High Expression of DNA Topoisomerase II α and Ki-67 Antigen Is Associated with Prolonged Survival in Glioblastoma Patients. *European Journal of Cancer* 2002, 38, 1343–1347, doi:10.1016/S0959-8049(02)00065-5.
 252. Shen, C.; Yang, L.; Yuan, X. Endothelin B Receptor Expression in Human Astrocytoma: Association With Clinicopathological Variables and Survival Outcomes. *International Journal of Neuroscience* 2011, 121, 626–631, doi:10.3109/00207454.2011.602808.
 253. Li, S.; Qiu, X.; Chen, B.; Zhang, W.; Ren, H.; Wang, Z.; Jiang, T. Prognostic Factors Influencing Clinical Outcomes of Glioblastoma Multiforme. *Chin Med J (Engl)* 2009, 122, 1245–1249.
 254. Arshad, H.; Ahmad, Z.; Hasan, S.H. Gliomas: Correlation of Histologic Grade, Ki67 and P53 Expression with Patient Survival. *Asian Pac J Cancer Prev* 2010, 11, 1637–1640.
 255. Okita, Y.; Narita, Y.; Miyakita, Y.; Ohno, M.; Fukushima, S.; Kayama, T.; Shibui, S. Pathological Findings and Prognostic Factors in Recurrent Glioblastomas. *Brain Tumor Pathol* 2012, 29, 192–200, doi:10.1007/s10014-012-0084-2.
 256. Dahlrot, R.H.; Bangsø, J.A.; Petersen, J.K.; Rosager, A.M.; Sørensen, M.D.; Reifemberger, G.; Hansen, S.; Kristensen, B.W. Prognostic Role of Ki-67 in Glioblastomas Excluding Contribution from Non-Neoplastic Cells. *Sci Rep* 2021, 11, 17918, doi:10.1038/s41598-021-95958-9.

257. Jacobsson, S.O.P.; Rongård, E.; Stridh, M.; Tiger, G.; Fowler, C.J. Serum-Dependent Effects of Tamoxifen and Cannabinoids upon C6 Glioma Cell Viability. *Biochemical Pharmacology* 2000, 60, 1807–1813, doi:10.1016/S0006-2952(00)00492-5.
258. White, E.Z.; Pennant, N.M.; Carter, J.R.; Hawsawi, O.; Odero-Marah, V.; Hinton, C.V. Serum Deprivation Initiates Adaptation and Survival to Oxidative Stress in Prostate Cancer Cells. *Sci Rep* 2020, 10, 12505, doi:10.1038/s41598-020-68668-x.
259. Kadonosono, T.; Miyamoto, K.; Sakai, S.; Matsuo, Y.; Kitajima, S.; Wang, Q.; Endo, M.; Niibori, M.; Kuchimaru, T.; Soga, T.; et al. AGE/RAGE Axis Regulates Reversible Transition to Quiescent States of ALK-Rearranged NSCLC and Pancreatic Cancer Cells in Monolayer Cultures. *Sci Rep* 2022, 12, 9886, doi:10.1038/s41598-022-14272-0.
260. Cidado, J.; Wong, H.Y.; Rosen, D.M.; Cimino-Mathews, A.; Garay, J.P.; Fessler, A.G.; Rasheed, Z.A.; Hicks, J.; Cochran, R.L.; Croessmann, S.; et al. Ki-67 Is Required for Maintenance of Cancer Stem Cells but Not Cell Proliferation. *Oncotarget* 2016, 7, 6281–6293, doi:10.18632/oncotarget.7057.
261. Lathia, J.D.; Mack, S.C.; Mulkearns-Hubert, E.E.; Valentim, C.L.L.; Rich, J.N. Cancer Stem Cells in Glioblastoma. *Genes Dev.* 2015, 29, 1203–1217, doi:10.1101/gad.261982.115.
262. Seymour, T.; Nowak, A.; Kakulas, F. Targeting Aggressive Cancer Stem Cells in Glioblastoma. *Front. Oncol.* 2015, 5, doi:10.3389/fonc.2015.00159.
263. Pallini, R.; Ricci-Vitiani, L.; Banna, G.L.; Signore, M.; Lombardi, D.; Todaro, M.; Stassi, G.; Martini, M.; Maira, G.; Larocca, L.M.; et al. Cancer Stem Cell Analysis and Clinical Outcome in Patients with Glioblastoma Multiforme. *Clinical Cancer Research* 2008, 14, 8205–8212, doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-0644.
264. Pallini, R.; Ricci-Vitiani, L.; Montano, N.; Mollinari, C.; Biffoni, M.; Cenci, T.; Pierconti, F.; Martini, M.; De Maria, R.; Larocca, L.M. Expression of the Stem Cell Marker CD133 in Recurrent Glioblastoma and Its Value for Prognosis. *Cancer* 2011, 117, 162–174, doi:10.1002/cncr.25581.
265. Joo, K.M.; Kim, S.Y.; Jin, X.; Song, S.Y.; Kong, D.-S.; Lee, J.-I.; Jeon, J.W.; Kim, M.H.; Kang, B.G.; Jung, Y.; et al. Clinical and Biological Implications of CD133-Positive and CD133-Negative Cells in Glioblastomas. *Lab Invest* 2008, 88, 808–815, doi:10.1038/labinvest.2008.57.
266. Beier, D.; Hau, P.; Proescholdt, M.; Lohmeier, A.; Wischhusen, J.; Oefner, P.J.; Aigner, L.; Brawanski, A.; Bogdahn, U.; Beier, C.P. CD133+ and CD133- Glioblastoma-Derived Cancer Stem Cells Show Differential Growth Characteristics and Molecular Profiles. *Cancer Research* 2007, 67, 4010–4015, doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-4180.
267. Yamada, K.; Tso, J.; Ye, F.; Choe, J.; Liu, Y.; Liau, L.M.; Tso, C.-L. Essential Gene Pathways for Glioblastoma Stem Cells: Clinical Implications for Prevention of Tumor Recurrence. *Cancers* 2011, 3, 1975–1995, doi:10.3390/cancers3021975.
268. Ishii, A.; Kimura, T.; Sadahiro, H.; Kawano, H.; Takubo, K.; Suzuki, M.; Ikeda, E. Histological Characterization of the Tumorigenic “Peri-Necrotic Niche” Harboring Quiescent Stem-Like Tumor Cells in Glioblastoma. *PLoS ONE* 2016, 11, e0147366, doi:10.1371/journal.pone.0147366.
269. Aguado, T.; Carracedo, A.; Julien, B.; Velasco, G.; Milman, G.; Mechoulam, R.; Alvarez, L.; Guzmán, M.; Galve-Roperh, I. Cannabinoids Induce Glioma Stem-like Cell Differentiation and Inhibit Gliomagenesis. *Journal of Biological Chemistry* 2007, 282, 6854–6862, doi:10.1074/jbc.M608900200.
270. Wang, Z.; Zhang, H.; Xu, S.; Liu, Z.; Cheng, Q. The Adaptive Transition of Glioblastoma Stem Cells and Its Implications on Treatments. *Sig Transduct Target Ther* 2021, 6, 124, doi:10.1038/s41392-021-00491-w.
271. Oki, T.; Nishimura, K.; Kitaura, J.; Togami, K.; Maehara, A.; Izawa, K.; Sakaue-Sawano, A.; Niida, A.; Miyano, S.; Aburatani, H.; et al. A Novel Cell-Cycle-Indicator, MVENUS-

- P27K-, Identifies Quiescent Cells and Visualizes G0–G1 Transition. *Sci Rep* 2015, 4, 4012, doi:10.1038/srep04012.
272. Néant, I.; Haiech, J.; Kilhoffer, M.-C.; Aulestia, F.J.; Moreau, M.; Leclerc, C. Ca²⁺-Dependent Transcriptional Repressors KCNIP and Regulation of Prognosis Genes in Glioblastoma. *Front. Mol. Neurosci.* 2018, 11, 472, doi:10.3389/fnmol.2018.00472.
273. Mrouj, K.; Andrés-Sánchez, N.; Dubra, G.; Singh, P.; Sobecki, M.; Chahar, D.; Al Ghoul, E.; Aznar, A.B.; Prieto, S.; Pirot, N.; et al. Ki-67 Regulates Global Gene Expression and Promotes Sequential Stages of Carcinogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2021, 118, e2026507118, doi:10.1073/pnas.2026507118.
274. Devinsky, O.; Cilio, M.R.; Cross, H.; Fernandez-Ruiz, J.; French, J.; Hill, C.; Katz, R.; Di Marzo, V.; Jutras-Aswad, D.; Notcutt, W.G.; et al. Cannabidiol: Pharmacology and Potential Therapeutic Role in Epilepsy and Other Neuropsychiatric Disorders. *Epilepsia* 2014, 55, 791–802, doi:10.1111/epi.12631.
275. Lah, T.T.; Majc, B.; Novak, M.; Sušnik, A.; Breznik, B.; Porčnik, A.; Bošnjak, R.; Sadikov, A.; Malavolta, M.; Halilčević, S.; et al. The Cytotoxic Effects of Cannabidiol and Cannabigerol on Glioblastoma Stem Cells May Mostly Involve GPR55 and TRPV1 Signalling. *Cancers* 2022, 14, 5918, doi:10.3390/cancers14235918.
276. Lai, Y.-T.; Chu, Y.-S.; Lo, J.-C.; Hung, Y.-H.; Lo, C.-M. Effects of Electrode Diameter on the Detection Sensitivity and Frequency Characteristics of Electric Cell-Substrate Impedance Sensing. *Sensors and Actuators B: Chemical* 2019, 288, 707–715, doi:10.1016/j.snb.2019.02.098.

Supplement

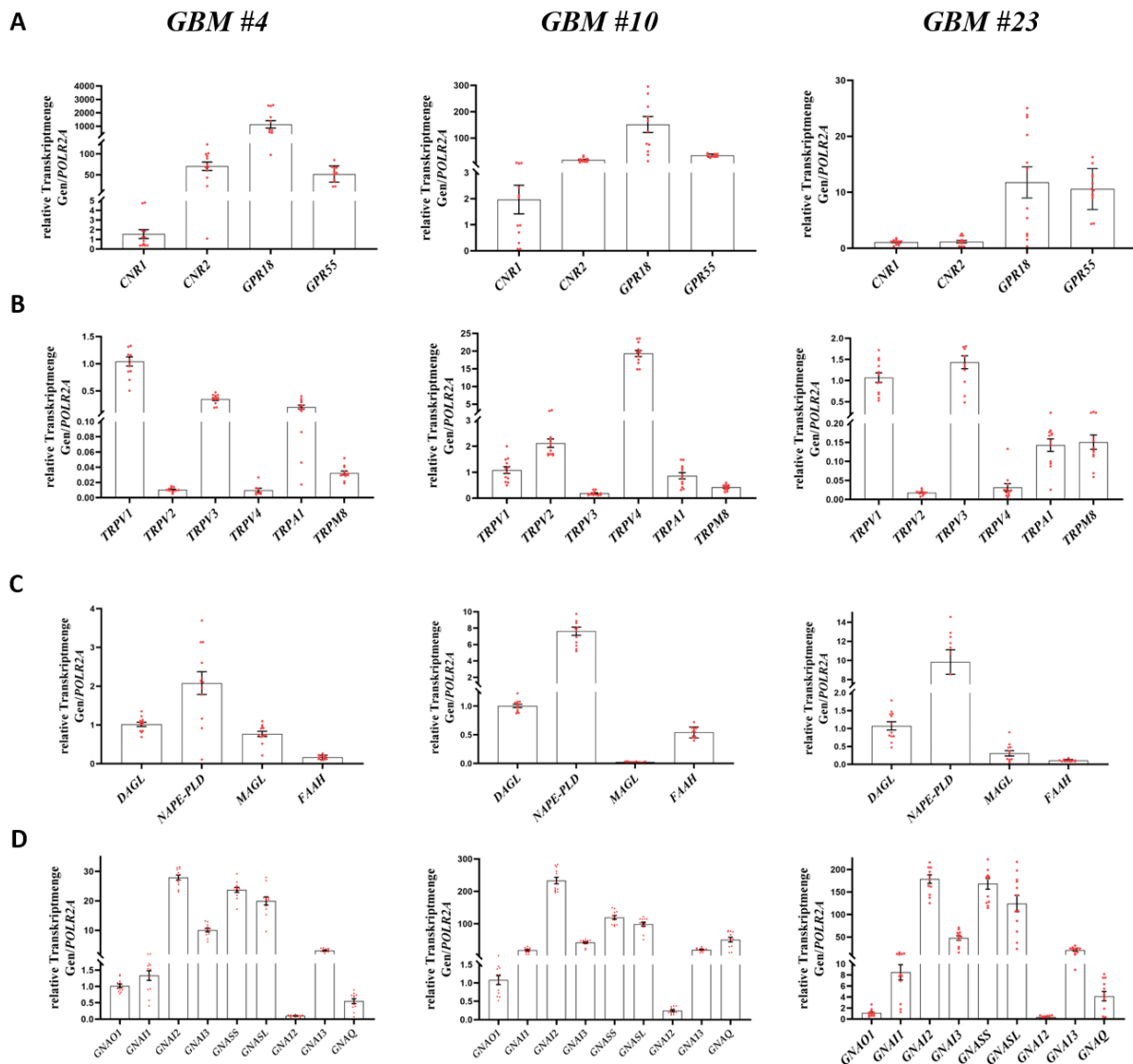


Abbildung 1: Quantitativer Vergleich der Transkriptmengen ECS-assoziiierter Gene. Die Quantifizierung der relativen Transkriptmenge erfolgte mittels *real-time* RT-PCR und der $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Methode. Es wurden unbehandelte Glioblastomzellen verwendet. Es wurde die Expression ECS-assoziiierter Rezeptoren (A), ionotroper Rezeptoren (B) und der ECS-Enzymmaschinerie (C), sowie die Expression von G_α -Untereinheiten Rezeptor-gekoppelter G-Proteine (D) untersucht. Die Daten repräsentieren Mittelwerte \pm SEM (relativ zur Menge von *CNR1*, *TRPV1*, *DAGL* oder *GNAO1*) von $N=4$ unabhängigen Experimenten, die in Dreifachbestimmung durchgeführt wurden.

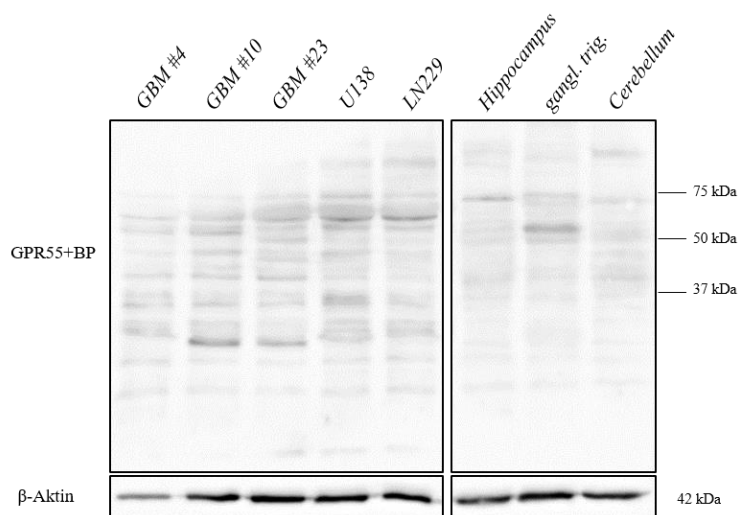


Abbildung 2: Kontrolle der Antikörper-Spezifität zur Untersuchung der Expression des GPR55-Rezeptors mittels Western Blot. Es wurde eine simultane Inkubation mit dem dreifachen Überschuss eines Targetsequenz-gleichen Blocking-peptids durchgeführt. Das erwartete Signal bei 37 kDa und das multiple Bandenmuster waren nach Zugabe des Blockingpeptids nicht evident. Als interne Ladekontrolle diente β -Aktin mit einer Größe von 42 kDa.

STabelle 1: Exakte Messwerte und Stichprobengrößen nach Behandlung mit THC in Gegenwart von AM281, AM630, O-1918 und CID.

Rezeptor	Zelltyp	Behandlung	Mittelwert [%]	SEM [%]	Probengröße
CB ₁ /CB ₂	GBM #4	CTL	0,00	3,17	12
		THC	-27,66	1,36	6
		AM281 + AM630	10,28	0,78	6
		THC + AM281 + AM630	-25,41	1,99	6
GPR18	GBM #10	CTL	0,00	3,06	12
		THC	-21,06	3,08	6
		AM281 + AM630	7,42	2,57	6
		THC + AM281 + AM630	-25,58	2,47	6
GPR55	GBM #4	CTL	0,00	3,36	6
		THC	-19,02	3,70	6
		O-1918	-7,07	3,39	6
		THC + O-1918	-19,58	3,13	6
GPR55	GBM #10	CTL	0,00	1,96	6
		THC	-20,49	4,64	6
		O-1918	-4,118	3,08	6
		THC + O-1918	-27,95	3,69	6
		CTL	0,00	1,56	6
		THC	-11,19	2,36	6
		1 μ M CID	1,60	2,59	6
		5 μ M CID	1,50	1,67	6
	10 μ M CID	1,04	1,92	6	
	THC + 1 μ M CID	-7,85	2,36	6	
	THC + 5 μ M CID	-3,71	3,25	6	
	THC + 10 μ M CID	1,44	2,21	6	
GBM #23	GBM #23	CTL	0,00	2,50	6
		THC	-18,64	1,90	6
		1 μ M CID	1,34	1,24	6
		5 μ M CID	3,91	1,09	5
		10 μ M CID	0,55	1,38	6
		THC + 1 μ M CID	-12,42	3,21	6
		THC + 5 μ M CID	-6,49	2,69	6
		THC + 10 μ M CID	-3,57	1,81	6
GPR55	GBM #23	CTL	0,00	3,97	5
		THC	1,07	11,6	6
		1 μ M CID	-4,99	3,37	5
		5 μ M CID	-5,05	6,69	5
		10 μ M CID	-6,77	2,88	6
		THC + 1 μ M CID	-2,69	6,35	6
		THC + 5 μ M CID	2,85	4,33	6
		THC + 10 μ M CID	-6,77	8,70	6

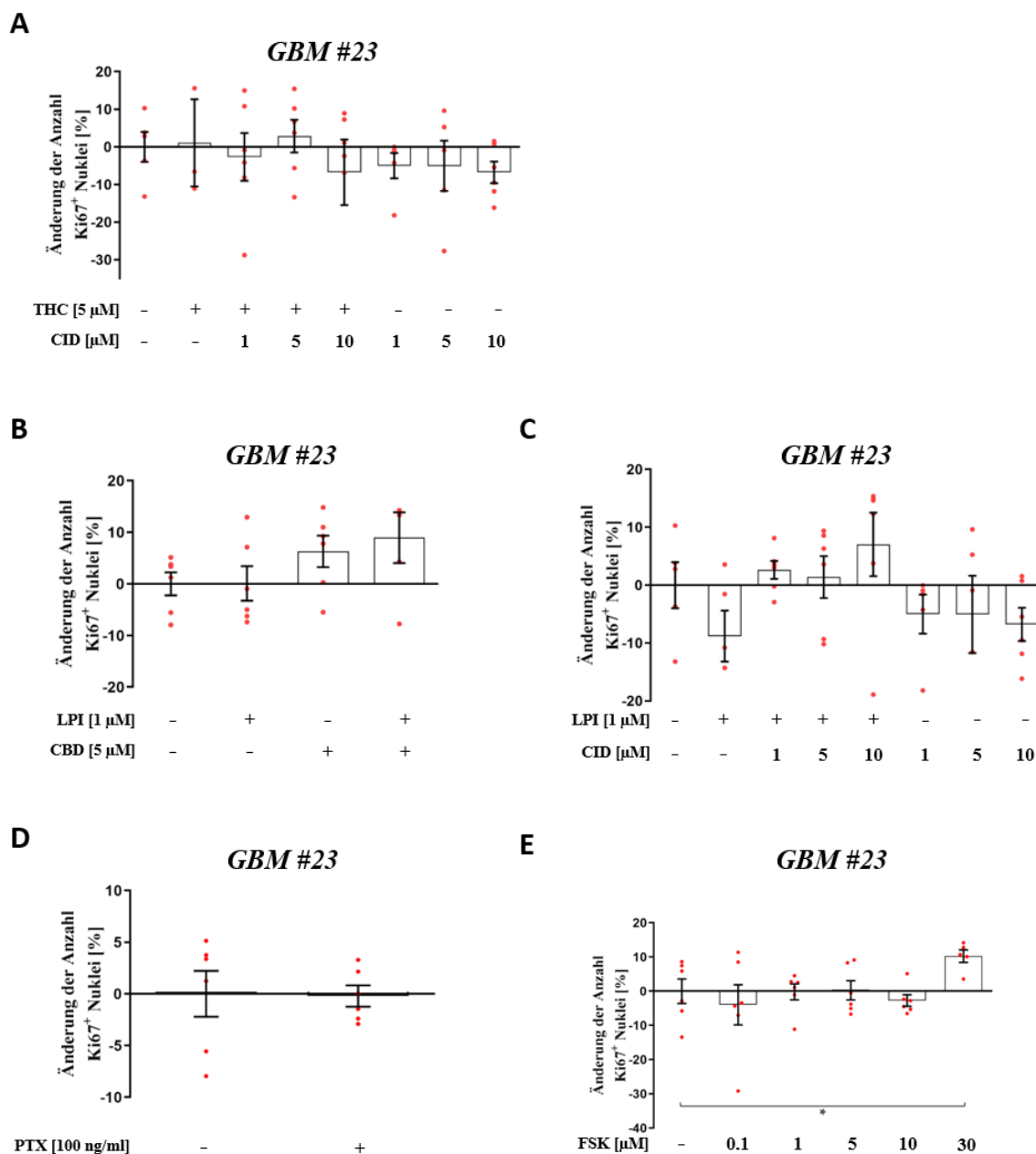


Abbildung 3: Anzahl Ki67⁺ Nuklei in GBM #23. Die prozentuale Änderung der Anzahl Ki67⁺ Nuklei bezogen auf die unbehandelte Kontrollgruppe von GBM #23. Es wurden Effekte auf die Anzahl Ki67⁺ Nuklei von CID (A) in THC-behandelten Zellen, von CBD (B) und CID (C) in LPI-behandelten Zellen, von PTX (D) und von FSK (E) in GBM #23 untersucht. Für die Mehrzahl der Gruppen konnten keine signifikanten Änderungen festgestellt werden. Lediglich 30 μM FSK (E) führte zu einem erhöhten Anteil Ki67⁺ Nuklei. Die Daten repräsentieren Mittelwerte ± SEM von N=3 unabhängigen Experimenten, die in Doppelbestimmung durchgeführt wurden. Signifikanz (*) wurde für p<0,05 gewählt.

STabelle 2: Exakte Messwerte und Stichprobengrößen nach Behandlung mit THC in aufsteigender Konzentration und in Gegenwart von CID.

Zelltyp	Behandlung	Mittelwert [%]	SEM [%]	Probengröße
GBM #4	CTL	0,00	1,36	6
	0,1 μM THC	-8,52	1,62	6
	1 μM THC	-6,45	1,69	6
	5 μM THC	-13,72	3,24	6
	10 μM THC	-12,53	1,56	5
	0,1 μM THC + CID	1,11	0,76	6
	1 μM THC + CID	-0,99	1,28	6
	5 μM THC + CID	2,21	1,22	6
	10 μM THC + CID	0,98	0,79	6
	CID	0,44	0,61	5

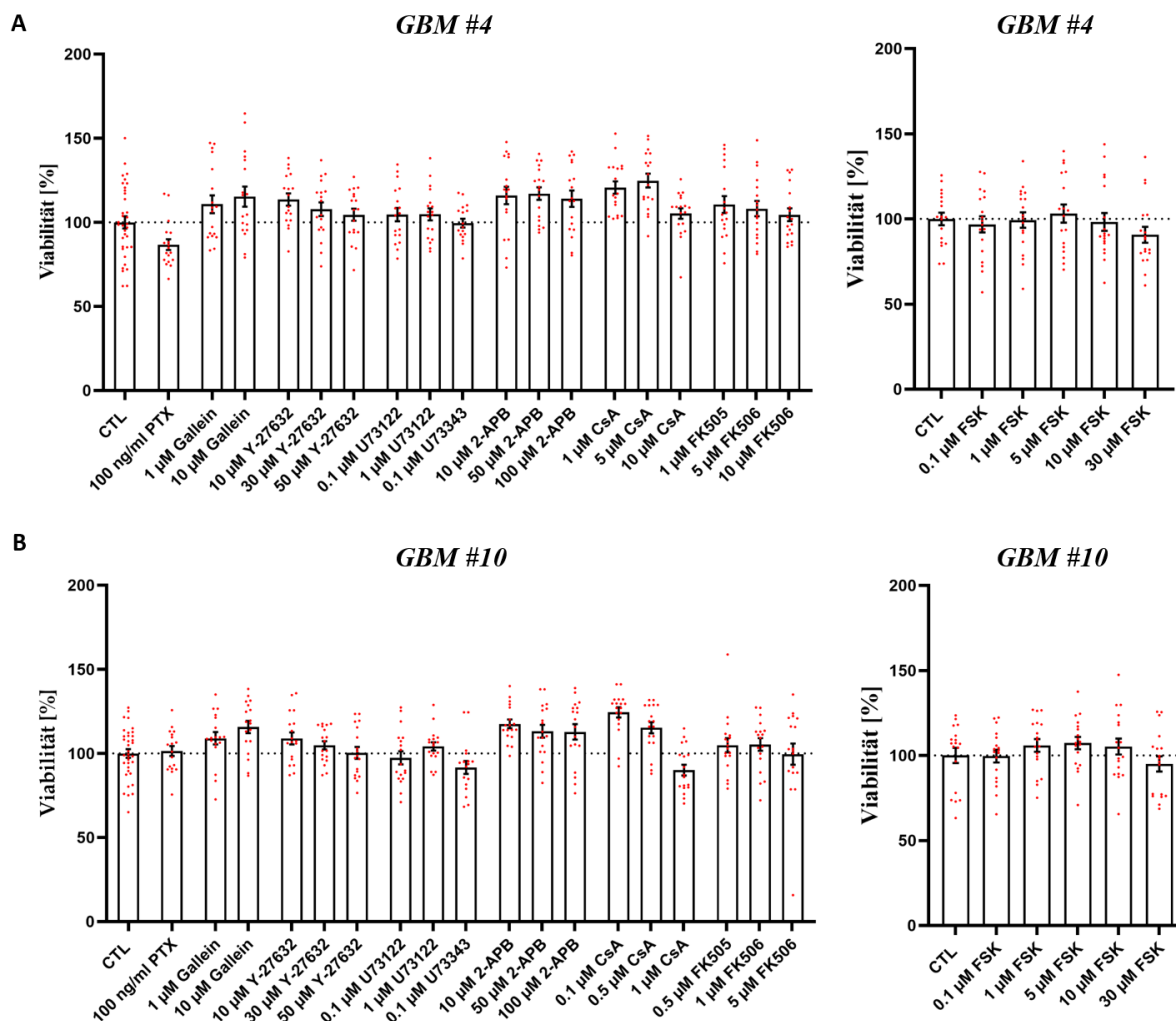
	CTL	0,00	3,14	6
	0,1 μ M THC	-7,04	1,46	6
	1 μ M THC	-8,97	1,95	6
	5 μ M THC	-15,48	3,49	6
	10 μ M THC	-16,92	2,19	5
<i>GBM #10</i>	0,1 μ M THC + CID	-2,65	3,10	6
	1 μ M THC + CID	-2,80	2,66	6
	5 μ M THC + CID	-1,26	1,35	6
	10 μ M THC + CID	-5,42	2,40	6
	CID	4,63	1,45	6

STabelle 3: Exakte Messwerte und Stichprobengrößen nach Behandlung mit LPI in Gegenwart von CBD und CID.

Zelltyp	Behandlung	Mittelwert [%]	SEM [%]	Probengröße
<i>GBM #4</i>	CTL	0,00	2,26	6
	LPI	-13,11	0,82	6
	CBD	-1,70	1,29	6
	LPI + CBD	-1,35	1,75	6
<i>GBM #10</i>	CTL	0,00	3,05	6
	LPI	-13,28	1,72	6
	CBD	2,81	0,54	6
	LPI + CBD	3,66	1,76	6
<i>GBM #23</i>	CTL	0,00	2,22	6
	LPI	0,80	3,36	6
	CBD	6,28	3,06	6
	LPI + CBD	8,95	4,92	5
<i>GBM #4</i>	CTL	0,00	1,56	6
	LPI	-11,07	3,66	6
	1 μ M CID	1,60	2,59	6
	5 μ M CID	1,50	1,67	6
	10 μ M CID	1,04	1,92	6
	LPI + 1 μ M CID	-4,94	1,72	6
	LPI + 5 μ M CID	-1,77	1,95	6
	LPI + 10 μ M CID	-0,01	1,51	6
<i>GBM #10</i>	CTL	0,00	2,50	6
	LPI	-14,29	3,38	6
	1 μ M CID	1,34	1,24	6
	5 μ M CID	3,91	1,09	5
	10 μ M CID	0,55	1,38	6
	LPI + 1 μ M CID	-6,64	1,54	6
	LPI + 5 μ M CID	-0,92	2,22	6
	LPI + 10 μ M CID	1,81	2,20	6
<i>GBM #23</i>	CTL	0,00	3,97	5
	LPI	-8,81	4,41	5
	1 μ M CID	-4,99	3,37	5
	5 μ M CID	-5,05	6,69	5
	10 μ M CID	-6,77	2,88	6
	LPI + 1 μ M CID	2,61	1,55	6
	LPI + 5 μ M CID	1,40	3,62	6
	LPI + 10 μ M CID	7,02	5,48	6

STabelle 4: Exakte Messwerte und Stichprobengrößen nach Behandlung mit THC und LPI.

Zelltyp	Behandlung	Mittelwert [%]	SEM [%]	Probengröße
<i>GBM #4</i>	CTL	0,00	3,36	6
	LPI	-19,02	3,70	6
	THC	-15,55	2,78	5
	LPI + THC ¹	-18,69	2,60	6
	THC + LPI ¹	-19,47	3,15	6
<i>GBM #10</i>	CTL	0,00	1,96	6
	LPI	-20,49	4,64	6
	THC	-14,97	4,32	6
	LPI + THC ¹	-20,78	2,12	6
	THC + LPI ¹	-19,69	4,21	6



SAbbildung 4: Viabilität der Glioblastomzellen nach Behandlung mit den verwendeten Inhibitoren zur Untersuchung GPR55-assoziiertes Signalwege und FSK. Die Untersuchung der Viabilität erfolgte nach 24 h mittels MTT-Viabilitäts-Assays. Die Viabilität von *GBM #4* (A) und *GBM #10* (B) wurde nicht wesentlich durch die Behandlung mit den verwendeten Inhibitoren oder FSK eingeschränkt. Es wurde auf die unbehandelte Kontrollgruppe normiert. Die Daten repräsentieren Mittelwerte ± SEM von N=3-6 unabhängigen Experimenten, die in Sechsfachbestimmung durchgeführt wurden.

STabelle 5: Exakte Messwerte und Stichprobengrößen nach Behandlung mit THC und LPI in Gegenwart von PTX.

Zelltyp	Behandlung	Mittelwert [%]	SEM [%]	Probengröße
<i>GBM #4</i>	CTL	0,00	1,29	6
	THC	-6,72	1,74	5
	PTX	-8,41	1,88	6
	THC + PTX	-14,71	3,27	6
	CTL	0,00	3,36	6
	LPI	-12,48	3,81	6
	PTX	-22,54	3,41	6
	LPI + PTX	-22,54	3,80	6
<i>GBM #10</i>	CTL	0,00	1,96	6
	THC	-20,49	4,64	6
	PTX	-15,63	3,27	6
	THC + PTX	-23,09	3,40	6
	CTL	0,00	1,96	6
	LPI	-14,97	4,32	6
	PTX	-15,63	3,27	6
	LPI + PTX	-18,77	2,31	6
<i>GBM #23</i>	CTL	0,00	2,22	6
	PTX	-0,21	1,03	6

STabelle 6: Exakte Messwerte und Stichprobengrößen nach Behandlung mit FSK in aufsteigender Konzentration.

Zelltyp	Behandlung	Mittelwert [%]	SEM [%]	Probengröße
<i>GBM #4</i>	CTL	0,00	0,79	6
	0,1 µM FSK	-5,39	2,03	6
	1 µM FSK	-10,15	2,55	6
	5 µM FSK	-13,42	1,79	6
	10 µM FSK	-16,74	2,18	6
	30 µM FSK	-11,86	0,87	6
<i>GBM #10</i>	CTL	0,00	1,73	6
	0,1 µM FSK	-3,46	1,93	6
	1 µM FSK	-8,34	1,78	6
	5 µM FSK	-8,01	2,66	6
	10 µM FSK	-7,93	3,63	6
	30 µM FSK	-11,21	2,57	6
<i>GBM #23</i>	CTL	0,00	3,59	6
	0,1 µM FSK	-3,99	5,87	6
	1 µM FSK	-0,22	2,31	6
	5 µM FSK	0,24	2,81	6
	10 µM FSK	-2,73	1,69	6
	30 µM FSK	10,25	1,83	5

STabelle 7: Exakte Messwerte und Stichprobengrößen nach Behandlung mit THC und LPI in Gegenwart von Gallein.

Zelltyp	Behandlung	Mittelwert [%]	SEM [%]	Probengröße
<i>GBM #4</i>	CTL	0,00	1,51	6
	THC	-11,33	1,45	6
	LPI	-9,87	1,40	5
	1 µM Gallein	-1,25	1,44	6
	10 µM Gallein	-1,58	1,05	6
	THC + 1 µM Gallein	-5,61	0,97	6
	THC + 10 µM Gallein	-0,68	0,88	6
	LPI + 1 µM Gallein	-4,37	1,47	6
	LPI + 10 µM Gallein	-1,12	0,72	6
<i>GBM #10</i>	CTL	0,00	2,65	6
	THC	-17,26	1,49	5
	LPI	-12,68	2,10	6
	1 µM Gallein	-0,04	1,83	6
	10 µM Gallein	-0,34	2,37	6
	THC + 1 µM Gallein	-14,55	2,78	6
	THC + 10 µM Gallein	-14,84	2,39	6
	LPI + 1 µM Gallein	-9,09	2,47	6
	LPI + 10 µM Gallein	-10,26	1,87	6

STabelle 8: Exakte Messwerte und Stichprobengrößen nach Behandlung mit THC und LPI in Gegenwart von Y-27632..

Zelltyp	Behandlung	Mittelwert [%]	SEM [%]	Probengröße
<i>GBM #4</i>	CTL	0,00	2,48	6
	THC	-14,36	2,72	6
	LPI	-11,64	1,51	5
	10 µM Y-27632	-2,48	1,72	6
	30 µM Y27632	-7,77	2,29	5
	50 µM -27632	-10,36	3,71	5
	THC + 10 µM Y-27632	-11,15	0,93	6
	THC + 30 µM Y-27632	-18,84	2,31	6
	THC + 50 µM Y-27632	-18,96	2,37	6
	LPI + 10 µM Y-27632	-17,27	4,00	5
	LPI + 30 µM Y-27632	-18,97	0,69	6
	LPI + 50 µM Y-27632	-16,09	2,25	6

	CTL	0,00	3,76	6
	THC	-26,73	4,11	6
	LPI	-21,03	3,44	6
	10 μ M Y-27632	2,63	0,75	6
	30 μ M Y27632	7,57	2,51	6
<i>GBM #10</i>	50 μ M -27632	5,29	1,63	6
	THC + 10 μ M Y-27632	-9,26	1,39	6
	THC + 30 μ M Y-27632	-0,46	3,24	6
	THC + 50 μ M Y-27632	3,96	2,44	6
	LPI + 10 μ M Y-27632	-3,17	1,75	6
	LPI + 30 μ M Y-27632	6,48	3,38	6
	LPI + 50 μ M Y-27632	4,67	2,31	6

STabelle 9: Exakte Messwerte und Stichprobengrößen nach Behandlung mit THC und LPI in Gegenwart von U73122.

Zelltyp	Behandlung	Mittelwert [%]	SEM [%]	Probengröße
	CTL	0,00	2,59	6
	THC	-12,97	2,56	6
	LPI	-12,08	2,85	6
<i>GBM #4</i>	0,1 μ M U73122	-3,50	2,81	6
	1 μ M U73122	-4,89	3,16	6
	THC + 0,1 μ M U73122	-1,10	2,70	6
	THC + 1 μ M U73122	-3,18	2,44	6
	LPI + 0,1 μ M U73122	-1,01	1,88	5
	LPI + 1 μ M U73122	-5,28	2,32	5
	CTL	0,00	2,12	9
	THC	-17,04	2,28	8
	LPI	-16,42	3,56	9
<i>GBM #10</i>	0,1 μ M U73122	1,60	2,87	10
	1 μ M U73122	-2,12	3,33	10
	THC + 0,1 μ M U73122	-5,30	3,26	9
	THC + 1 μ M U73122	-6,53	2,91	10
	LPI + 0,1 μ M U73122	3,65	2,12	9
	LPI + 1 μ M U73122	-0,54	4,06	10

STabelle 10: Exakte Messwerte und Stichprobengrößen nach Behandlung mit THC und LPI in Gegenwart von U73343.

Zelltyp	Behandlung	Mittelwert [%]	SEM [%]	Probengröße
	CTL	0,00	1,01	6
	THC	-17,09	3,63	6
<i>GBM #4</i>	LPI	-15,70	3,85	6
	0,1 μ M U73433	-1,36	1,76	6
	THC + 0,1 μ M U73433	-13,14	1,61	6
	LPI + 0,1 μ M U73433	-14,51	2,98	5
	CTL	0,00	1,25	5
	THC	-19,79	4,30	6
<i>GBM #10</i>	LPI	-19,04	3,22	6
	0,1 μ M U73433	-0,71	1,61	6
	THC + 0,1 μ M U73433	-21,90	4,65	5
	LPI + 0,1 μ M U73433	-15,32	1,82	6

STabelle 11: Exakte Messwerte und Stichprobengrößen nach Behandlung mit THC und LPI in Gegenwart von 2-APB.

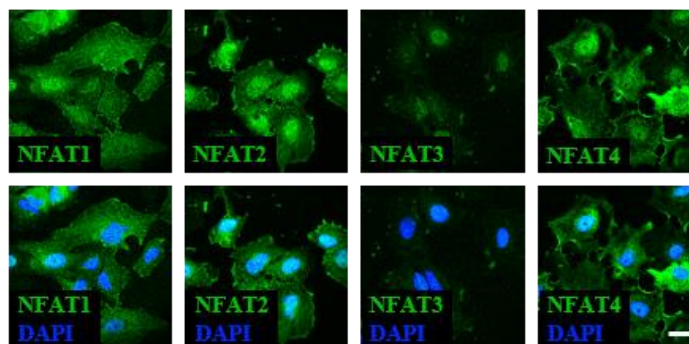
Zelltyp	Behandlung	Mittelwert [%]	SEM [%]	Probengröße
<i>GBM #4</i>	CTL	0,00	0,38	8
	THC	-9,79	2,12	8
	LPI	-11,33	2,66	8
	10 µM 2-APB	-3,16	1,15	8
	50 µM 2-APB	-8,34	1,85	8
	100 µM 2-APB	-13,25	2,36	8
	THC + 10 µM 2-APB	-4,06	0,90	8
	THC + 50 µM 2-APB	-7,13	0,96	8
	THC + 100 µM 2-APB	-12,06	2,12	8
	LPI + 10 µM 2-APB	-4,38	0,92	8
	LPI + 50 µM 2-APB	-8,47	1,36	8
	LPI + 100 µM 2-APB	-11,55	3,89	7
<i>GBM #10</i>	CTL	0,00	1,18	8
	THC	-12,96	2,01	8
	LPI	-11,39	3,24	8
	10 µM 2-APB	0,82	1,59	8
	50 µM 2-APB	-2,48	2,84	8
	100 µM 2-APB	-14,78	2,43	8
	THC + 10 µM 2-APB	3,01	1,89	8
	THC + 50 µM 2-APB	-0,39	2,22	8
	THC + 100 µM 2-APB	-8,93	1,99	8
	LPI + 10 µM 2-APB	0,58	1,98	8
	LPI + 50 µM 2-APB	-0,56	2,50	8
	LPI + 100 µM 2-APB	-10,99	2,61	8

STabelle 12: Exakte Messwerte und Stichprobengrößen nach Behandlung mit THC und LPI in Gegenwart von CsA.

Zelltyp	Behandlung	Mittelwert [%]	SEM [%]	Probengröße
<i>GBM #4</i>	CTL	0,00	1,67	6
	THC	-14,89	2,00	6
	LPI	-18,23	2,59	6
	1 µM CsA	-5,77	1,27	6
	5 µM CsA	-4,54	1,47	6
	10 µM CsA	-5,84	3,82	6
	THC + 1 µM CsA	-8,09	1,73	6
	THC + 5 µM CsA	-4,18	1,81	6
	THC + 10 µM CsA	-7,47	3,37	6
	LPI + 1 µM CsA	-5,16	2,11	6
	LPI + 5 µM CsA	-5,02	2,40	6
	LPI + 10 µM CsA	-10,10	2,15	6
<i>GBM #10</i>	CTL	0,00	1,93	12
	THC	-14,23	1,04	11
	LPI	-13,17	1,97	11
	0,1 µM CsA	-3,86	1,71	6
	0,5 µM CsA	-13,79	2,55	6
	1 µM CsA	-19,96	3,83	6
	THC + 0,1 µM CsA	-18,34	6,13	4
	THC + 0,5 µM CsA	-14,91	2,52	6
	THC + 1 µM CsA	-19,23	1,98	6
	LPI + 0,1 µM CsA	-6,86	2,98	5
	LPI + 0,5 µM CsA	-14,91	2,52	6
	LPI + 1 µM CsA	-19,23	1,98	6

STabelle 13: Exakte Messwerte und Stichprobengrößen nach Behandlung mit THC und LPI in Gegenwart von FK506.

Zelltyp	Behandlung	Mittelwert [%]	SEM [%]	Probengröße
<i>GBM #4</i>	CTL	0,00	2,20	6
	THC	-15,28	2,37	6
	LPI	-17,72	3,66	6
	1 μ M FK506	-3,80	2,67	6
	5 μ M FK506	-9,27	4,91	5
	10 μ M FK506	-3,38	1,99	5
	THC + 1 μ M FK506	0,00	3,13	6
	THC + 5 μ M FK506	-2,61	1,73	6
	THC + 10 μ M FK506	-6,29	3,79	6
	LPI + 1 μ M FK506	-5,48	4,63	5
	LPI + 5 μ M FK506	-1,61	2,00	6
	LPI + 10 μ M FK506	-4,38	1,29	6
<i>GBM #10</i>	CTL	0,00	1,84	6
	THC	-26,52	3,54	6
	LPI	-18,46	2,68	6
	0,5 μ M FK506	2,14	3,84	6
	1 μ M FK506	-2,44	2,31	6
	5 μ M FK506	-10,67	3,04	6
	THC + 0,5 μ M FK506	-10,49	4,15	6
	THC + 1 μ M FK506	-13,54	2,31	6
	THC + 5 μ M FK506	-12,61	6,72	6
	LPI + 0,5 μ M FK506	-10,37	2,20	6
	LPI + 1 μ M FK506	-12,96	2,23	6
	LPI + 5 μ M FK506	-14,52	2,98	6

GBM #23**SAbbildung 5: NFAT1-4 in *GBM #23*.** NFAT1-4 waren in unbehandelten *GBM #23* sowohl im Nukleus als auch im Zytoplasma detektierbar. Die Zellkerne wurden mit DAPI gegengefärbt. Der Maßstab entspricht 25 μ m.

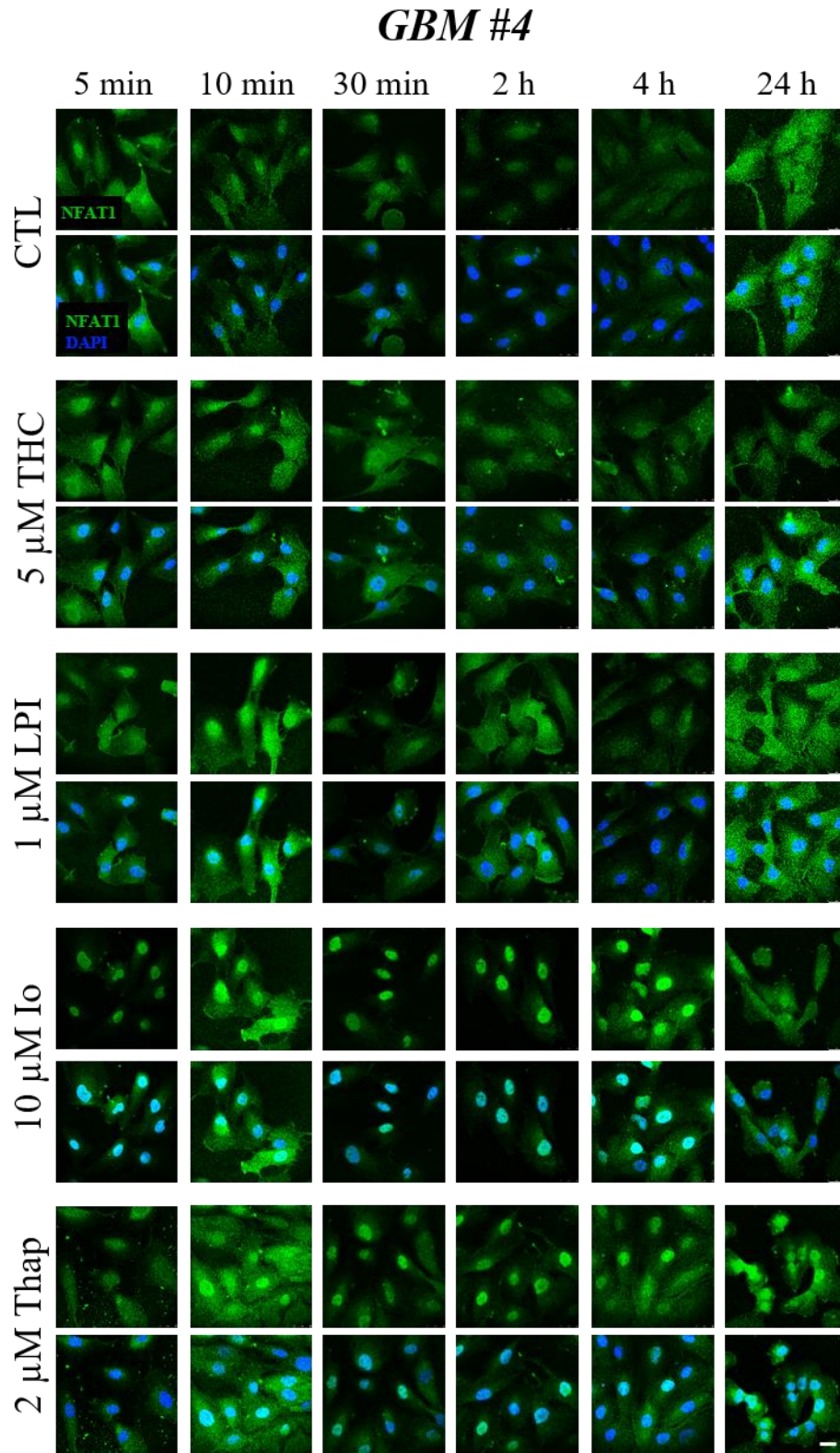


Abbildung 6: Subzelluläre Lokalisation von NFAT1 in GBM #4 nach verschiedenen Zeitpunkten. Repräsentative Fluoreszenzaufnahmen von NFAT1 am Beispiel von unbehandelten und THC (5 μ M)-, LPI (1 μ M)-, Ionomycin (10 μ M)- und Thapsigargin (2 μ M)-behandelten Zellen von GBM #4 nach 5 min; 10 min; 30 min; 2 h; 4 h und 24 h. Residentes NFAT1 ist im Zytoplasma, während aktives NFAT1 im Nukleus lokalisiert ist. Erhöhte NFAT1 Signale im Nukleus wurden in frühen im Vergleich zu späten Behandlungszeitpunkten in den unbehandelten Kontrollgruppen detektiert. Veränderte nukleäre Signale wurden nach Io (ab 5 min) und Thap (ab 10 min) Behandlung im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe festgestellt. THC und LPI zeigten keinen Einfluss. Die Zellkerne wurden mit DAPI gegengefärbt. Der Maßstab entspricht 25 μ m.

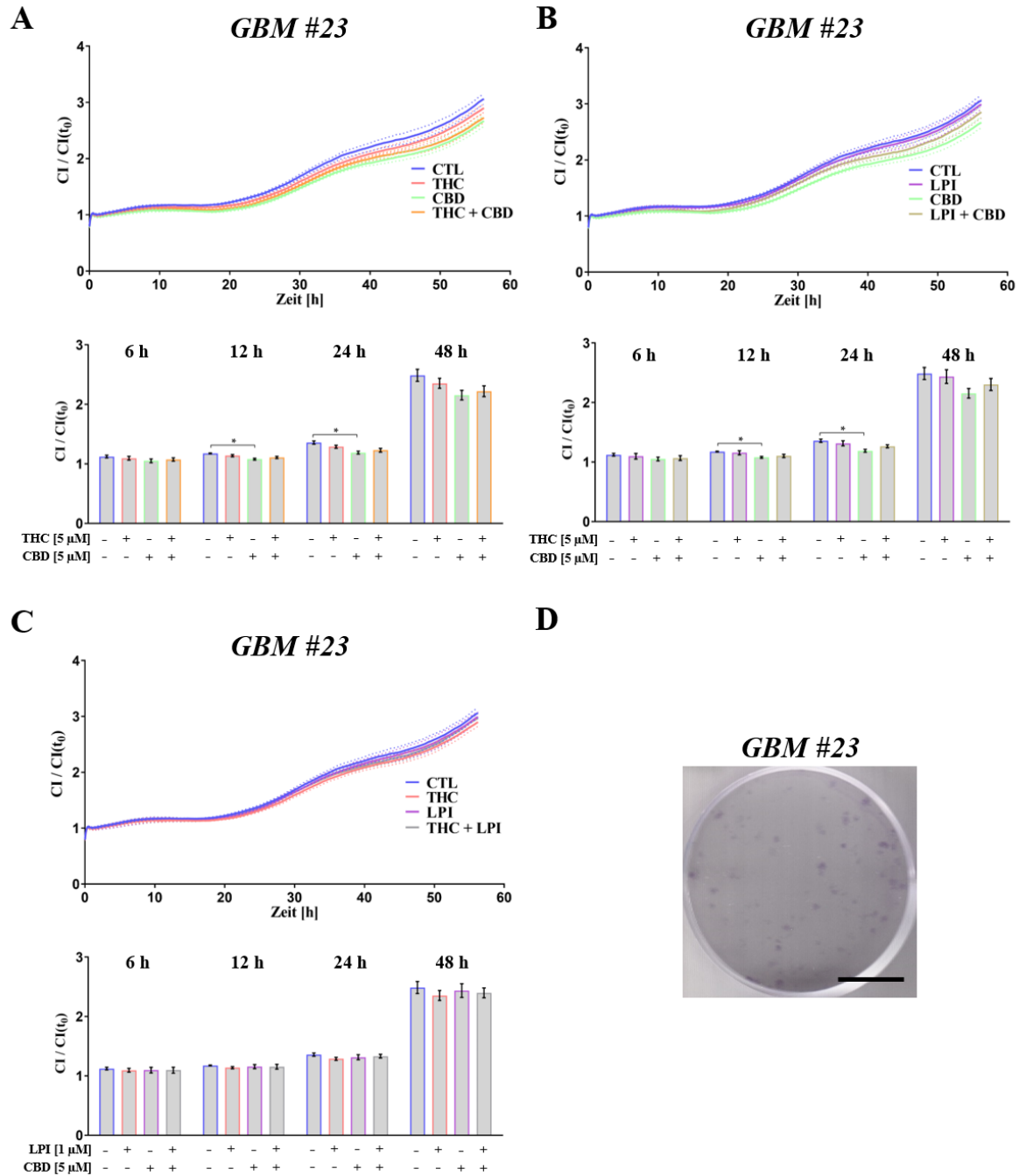


Abbildung 7: Das kollektive und klonogene Wachstum von *GBM #23*. Zeitabhängiger Verlauf der Proliferation von *GBM #23* nach Zugabe von 5 μM THC, 5 μM CBD und 1 μM LPI zum Zeitpunkt Null. Die Änderungen der Impedanz wurden als dimensionsloser Zellindex (CI) angegeben, welche auf den gemessenen Wert zum Zeitpunkt Null normiert wurden. Die statistische Auswertung erfolgte zu den Zeitpunkten 6 h; 12 h; 24 h und 48 h. THC und LPI, sowie eine Kombination nahmen keinen Einfluss auf die Proliferation der Zellen (A-C). CBD führte zu einer signifikanten Verringerung des Zellindex nach 12 h und 24 h in *GBM #23* im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe (A+B). *GBM #23* war kaum fähig Kolonien auszubilden (D). Die Daten repräsentieren Mittelwerte \pm SEM von N=3 unabhängigen Experimenten, die in Doppelbestimmung durchgeführt wurden. In den Graphen, welche die Änderung des CI über die Zeit zeigen, ist der SEM als gepunktete Linien dargestellt. Signifikanz (*) wurde für $p < 0,05$ gewählt. Der Maßstab entspricht 1 cm.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Marc Richard Kolbe, die vorliegende Promotionsarbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt zu haben. Alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß, aus veröffentlichten oder unveröffentlichten Schriften oder Medien entnommen wurden, sind als solche gekennzeichnet. Weiterhin versichere ich, dass die Dissertation ausschließlich der Naturwissenschaftlichen Fakultät I der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg vorgelegt wurde und ich mich erstmals für die Erlangung des Doktorgrades bewerbe.

Halle (Saale), den 25.03.2024

Marc Richard Kolbe

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich nachstehenden Personen meinen Dank entgegenbringen, ohne deren Mithilfe die Anfertigung dieser Promotionsschrift nicht möglich gewesen wäre:

Ein großer Dank gilt vor allem meinem Doktorvater **Prof. Dr. Faramarz Dehghani** für die hervorragende Betreuung der Arbeit und der mannigfachen Ideengebung, die mir einen kritischen Zugang zu dieser Thematik eröffnete. Die zahlreichen Gespräche auf intellektueller und persönlicher Ebene zu jeder Uhrzeit werden mir immer als Quell der Inspiration in Erinnerung bleiben. Ich habe unsere Gespräche stets als ermutigend und motivierend empfunden.

Ein besonderer Dank gilt auch Herrn **apl. Prof. Dr. Ralph Golbik** aus dem Institut für Biochemie und Biotechnologie für die jahrelange Betreuung und Förderung meiner wissenschaftlichen Entwicklung vor und während meiner Promotion mit vielen anregenden und konstruktiven Diskussionen.

Mein Dank gilt der gesamten Arbeitsgruppe. Lieben Dank an **Solveig Stadsholt, Annika Hensel, Miriam Schmidt, Julian Cardinal von Widdern, Christoph Walsleben** und **Joshua Kleine** für amüsante Geschichten inner- und außerhalb des Labors bei köstlichem Kaffee, für viele aufmunternde Worte und das freundliche Miteinander. Weiterhin bedanke ich mich bei **Dr. Urszula Hohmann** und **Dr. Tim Hohmann** für die kritischen und konstruktiven Ratschläge, für die gute Zusammenarbeit und das angenehme Arbeitsumfeld. Ein Dankeschön gilt **Candy Rothgänger-Strube, Chalid Ghadban** und **Liudmila Litvak**, die mich intensiv im Laboralltag unterstützten.

Vielen Dank an alle Mitarbeiter des Instituts für Anatomie und Zellbiologie in Halle für die freundschaftliche und kollegiale Atmosphäre

Prof. Dr. Erik Maronde danke ich für die Unterstützung und die konstruktiven Gespräche hinsichtlich der Aufklärung von Signalkaskaden.

Prof. Dr. Christian Strauss und seinem gesamten Team danke ich für die gute Zusammenarbeit und vor allem für die Bereitstellung von Glioblastom-Proben, ohne diese Arbeit nie zustande gekommen wäre.

Bei **Dr. Ken Macki** möchte ich mich für die Überlassung des Antikörpers gegen GPR18 bedanken.

Tief verbunden und dankbar bin ich meiner Frau **Judith** und unserem Sohn **Arthur** für die unglaublich liebevolle Unterstützung und dem Verständnis bei der Anfertigung dieser Promotionsarbeit. Ihr wart immer für mich da. Danke! Ich liebe euch! Euch sei diese Arbeit gewidmet.

Mein Dank gilt auch meinen Eltern, Großeltern und Schwiegereltern für die Ermöglichung des Studiums und der stetigen Unterstützung und Motivation, die zur Vollendung meiner Dissertation beigetragen haben.

Curriculum Vitae

Persönliche Daten

Name: Marc Richard Kolbe
Staatsangehörigkeit: deutsch
Religion: römisch-katholisch
Geburtsdatum/-ort: 13.06.1995 in Magdeburg

Beruflicher Werdegang

Seit 10/2018 **Doktorand/wissenschaftlicher Mitarbeiter**
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Institut für Anatomie und Zellbiologie der medizinischen Fakultät
Arbeitsgruppe Prof. Dr. Faramarz Dehghani

04/2017-09/2018 **wissenschaftliche Hilfskraft**
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Institut für Anatomie und Zellbiologie der medizinischen Fakultät
Arbeitsgruppe Prof. Dr. Faramarz Dehghani

Akademische Ausbildung

10/2016-10/2018 **Masterstudium Biochemie**
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Abschluss: *M. Sc.* Biochemie

05/2017-09/2017 **Forschungsgruppenpraktikum**
Max-Delbrück Zentrum Berlin
Arbeitsgruppe Prof. Dr. Ulrike Stein

10/2013-10/2016 **Bachelorstudium Biochemie**
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Abschluss: *B.Sc.* Biochemie

Schulische Ausbildung

08/2005-06/2013 Börde-Gymnasium Wanzleben
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Publikationen

Kolbe MR, Hohmann T, Hohmann U, Ghadban C, Mackie K, Zöller C, Prell J, Illert J, Strauss C, Dehghani F. THC Reduces Ki67-Immunoreactive Cells Derived from Human Primary Glioblastoma in a GPR55-Dependent Manner. *Cancers (Basel)*. 2021 Mar 3;13(5):1064. doi: 10.3390/cancers13051064

Hohmann T, Hohmann U, **Kolbe MR**, Dahlmann M, Kobelt D, Stein U, Dehghani F. MACC1 driven alterations in cellular biomechanics facilitate cell motility in glioblastoma. *Cell Commun Signal*. 2020 Jun 5;18(1):85. doi: 10.1186/s12964-020-00566-1.