

**Die Rolle des Endocannabinoidsystems bei der Interaktion von Glioblastom- und  
Melanomzelllinien mit Gliazellen**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt  
der Medizinischen Fakultät  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Christoph Michael Walsleben

Betreuer:

Prof. Dr. med. Faramarz Dehghani

Gutachter:

Prof. Dr. Lars Klimaschewski, Innsbruck

Prof. Dr. Mario Löhr, Würzburg

Datum der Verteidigung: 28.10.2024



## Referat

Glioblastome und Hirnmetastasen des malignen Melanoms sind Erkrankungen mit einer schlechten Prognose, geringen Überlebensrate und schwierigen Behandlung. Die Heterogenität und das Fortschreiten der Erkrankungen hängen von komplexen Wechselwirkungen zwischen den Tumorzellen und der Mikroumgebung ab. Auf zellulärer Ebene können Glioblastome und Hirnmetastasen ca. 30-50 % Makrophagen, Mikroglia und Astrozyten enthalten, die Invasion, Proliferation und Apoptose von Tumorzellen beeinflussen. Die Tumorassoziierten Mikroglia (TAMs) und Astrozyten sind dafür bekannt, durch die Sezernierung verschiedener Interleukine das Tumormikromilieu zu verändern. Des Weiteren wirkt das intrinsische Endocannabinoidsystem auf das Tumormikromilieu und bietet die Möglichkeit, durch den Einsatz von Phytocannabinoiden wie Tetrahydrocannabinol (THC) oder Cannabidiol (CBD) das Mikromilieu zu beeinflussen. Diesen Cannabinoiden wird eine Vielzahl von antitumoralen Wirkungen zugeschrieben, die über die klassischen Cannabinoidrezeptoren CB<sub>1</sub> und CB<sub>2</sub>, aber auch GPR55, vermittelt werden. Auch durch weitere Mechanismen wie Zell-Zell-Interaktionen oder Zellmotilität entstehen komplexe Interaktionen. Die Glioblastomzelllinie LN229 und die Melanomzelllinie A375 wurden stärker durch Mikroglia als durch Astrozyten in ihrer Sphäroidformation behindert. THC und CBD verzögerten die Sphäroidbildung von LN229 und A375 und veränderten insbesondere die mittels Lebendzellmikroskopie beurteilten Parameter Fläche, Zirkularität und Helligkeit. THC und CBD zeigten eine stärkere Wirkung auf Kokulturen aus A375 und Astrozyten als auf LN229 und Astrozyten. Auch auf Kokulturen beider Tumorzelllinien mit Mikroglia riefen Cannabinoide eine signifikante Modifizierung des Aggregationsverhaltens hervor. Die mittels Propidiumiodid in der Durchflusszytometrie untersuchte Todesrate unterschied sich jedoch in den betrachteten Untersuchungsgruppen nicht.

Die *in vitro* erzielten Ergebnisse erweitern einerseits das Verständnis der Interaktionen zwischen Tumorzellen und Gliazellen und unterstreichen andererseits die Effekte von Phytocannabinoiden auf Kokulturen aus Glioblastomzellen und murinen Gliazellen.



<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>I</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>III</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>IV</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>V</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Das Endocannabinoidsystem und seine physiologische Funktion	1
1.1.1 Cannabinoidrezeptoren und ihre Rolle in physiologischem Milieu	1
1.1.2 Die Wirkung von $\Delta^9$ -Tetrahydrocannabinol und Cannabidiol in verschiedenen Systemen	3
1.2 Glioblastome und metastasierende Melanome im Überblick	4
1.2.1 Glioblastome und charakteristische Eigenschaften	5
1.2.2 Gehirnetastasen des malignen Melanoms und charakteristische Eigenschaften	6
1.2.3 Die Wirkung von Cannabinoiden auf Glioblastome und Gehirnetastasen des malignen Melanoms	7
1.3 Tumormikromilieu von Glioblastomen und Gehirnetastasen des malignen Melanoms	9
1.4 Gliazellen	10
1.4.1 Astrozyten und deren Interaktion mit Tumoren	10
1.4.2 Mikroglia und deren Interaktion mit Tumoren	12
<b>2 Zielstellung</b>	<b>15</b>
<b>3 Material und Methoden</b>	<b>16</b>
3.1 Zelllinien	16
3.2 Versuchstiere	16
3.3 Chemikalien	16
3.4 Antikörper	18
3.5 Geräte, Software und weitere Materialien	19
3.6 Zellkultur	20
3.6.1 Präparation und Kultivierung primärer Mischkulturen	20
3.6.2 Herstellung und Kultivierung von 3D-Sphäroiden	21
3.7 Behandlung mit Cannabinoiden	21
3.8 Lebendzellmikroskopie	22
3.9 Durchflusszytometrie	22
3.10 Hellfeld- und Fluoreszenzmikroskopie	23
3.10.1 Fixierung und Anfertigung von Schnitten aus Sphäroidkulturen	23

3.10.2	Fluoreszenzfärbungen	23
3.11	Auswertung	24
3.11.1	Lebendzellmikroskopie	24
3.11.2	Durchflusszytometrie	25
3.11.3	Statistische Auswertung	25
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>26</b>
4.1	LN229 und A375 als geeignete Zelllinien zur Untersuchung der Sphäroidbildung	26
4.1.1	Sphäroidmorphologie und Zelltod	26
4.2	Einfluss von Cannabinoiden auf die Sphäroidbildung und Todesrate von LN229 und A375	29
4.3	Einfluss von Astrozyten auf LN229 und A375 hinsichtlich der Sphäroidbildung und Todesrate	32
4.4	Einfluss von Cannabinoiden auf Kokulturen mit Astrozyten	36
4.5	Einfluss von Mikroglia auf LN229 und A375 hinsichtlich der Sphäroidbildung	40
4.6	Einfluss von Cannabinoiden auf Kokulturen mit Mikroglia	44
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>49</b>
5.1	Astrozyten beeinflussen in Kokultur mit LN229 und A375 nur gering die Sphäroidformation	49
5.2	Mikroglia verzögern initial die Sphäroidbildung von LN229 und A375	51
5.3	Effekte von Cannabinoiden auf 3D-Sphäroide	52
5.3.1	Cannabinoiden verzögern die Sphäroidbildung von LN229 und A375	52
5.3.2	Cannabinoiden haben auf Kokulturen von A375 und Astrozyten einen größeren Einfluss als auf Kokulturen mit LN229	56
5.3.3	Cannabinoiden modifizieren den Einfluss von Mikroglia auf LN229 und A375	59
5.4	Grenzen der Methoden und der verwendeten Parameter	60
5.5	Zusammenfassung	63
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>64</b>
<b>7</b>	<b>Thesen</b>	<b>78</b>

## Abkürzungsverzeichnis

<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
2-AG	2-Arachidonylglycerol
AEA	N-Arachidonylethanolamid/Anandamid
BBB	<i>Blood-brain barrier</i> , Blut-Hirn-Schranke
CAF	Cancer-associated fibroblast, Tumorassoziierter Fibroblast
CB <sub>1</sub>	Cannabinoidrezeptor 1
CB <sub>2</sub>	Cannabinoidrezeptor 2
CBD	Cannabidiol
CCL2	<i>Chemokine ligand 2</i> , CC-Chemokin-Ligand-2
DAG	Diacylglycerol
ECM	<i>Extracellular matrix</i> , Extrazellulärmatrix
ECS	Endocannabinoidsystem
EGF	<i>Epidermal growth factor</i> , Epidermaler Wachstumsfaktor
EVs	Extrazelluläre Vesikel
FAAH	Fettsäureamid-Hydrolase
FGF- $\beta$	<i>Fibroblast growth factor</i> , Fibroblasten-Wachstumsfaktor $\beta$
GBM	Glioblastom
GFAP	<i>Glial fibrillary acidic protein</i> , Saures Gliafaserprotein
GPR18	G-Protein-gekoppelter Rezeptor 18
GRP55	G-Protein-gekoppelter Rezeptor 55
GSC	<i>Glioblastoma stem cell</i> , Glioblastomastammzelle
IDO	<i>Indoleamine 2,3-dioxygenase</i> , Indolamin-2,3-Dioxygenase
IL-2	Interleukin-2
IL-20	Interleukin-20
IL-6	Interleukin-6
IL-8	Interleukin-8
MAGL	Monoacylglycerol-Lipase
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i> , Monozytenkolonien-stimulierender Faktor
MCTS	<i>Multicellular tumour spheroids</i> , Multizelluläre Tumorsphäroide
MMP	Matrix-Metalloprotease
mRNA	<i>Messenger RNA</i>
NAPE	N-Arachidonoylphosphatidylethanolamin
PI3K/Akt	Phosphoinositid-3-Kinase/Akt-Signalweg
RANKL	<i>Nuclear Receptor Activator of NF-<math>\kappa</math>B Ligand</i>
ROCK	Rho-assoziierte Kinasen
ROS	<i>Reactive oxygen species</i> , Reaktive Sauerstoffspezies
TAM	<i>Tumor-associated microglia</i> , Tumorassozierte Mikroglia
TGF- $\beta$	<i>Transforming growth factor <math>\beta</math></i> , Transformierender Wachstumsfaktor $\beta$
THC	$\Delta^9$ -Tetrahydrocannabinol
TRPV1	Transienter Rezeptor-Potenzial-Kationenkanal der Unterfamilie V
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i> , <i>Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor</i>
WHO	Weltgesundheitsorganisation
ZNS	Zentrales Nervensystem

## Abbildungsverzeichnis

Nummer	Titel	Seite
1	Strukturformeln von THC und CBD	4
2	Versuchsaufbau und zeitlicher Ablauf der Versuchsreihe	22
3	FACS-Gating-Strategie	25
4	Zellaggregate der Zelllinien in der Lebendzellmikroskopie	26
5	Modellhafte Darstellung der Zonen von Sphäroiden	27
6	Übersichtsfärbungen von LN229-Sphäroiden und A375-Astrozyten-Sphäroiden	28
7	Qualitative Fluoreszenzfärbung toter Zellen nach Etablierung von LN229-Kokulturen mit Gliazellen	29
8	Änderung der Parameter Fläche, Zirkularität und Helligkeit bei LN229 mit Cannabinoidbehandlung	30
9	Änderung der Parameter Fläche, Zirkularität und Helligkeit bei A375 mit Cannabinoidbehandlung	31
10	Prozentualer Anteil toter LN229- und A375-Zellen nach Cannabinoidbehandlung	32
11	Änderung der Parameter Fläche, Zirkularität und Helligkeit bei LN229 und verschiedenem Astrozyten-Anteil	33
12	Änderung der Parameter Fläche, Zirkularität und Helligkeit bei A375 und verschiedenem Astrozyten-Anteil	34
13	Prozentualer Anteil toter Zellen in LN229- und A375-Astrozyten-Kokultur	35
14	Qualitative Fluoreszenzfärbung von LN229 und A375 in Kokultur mit Astrozyten	35
15	Änderung der Parameter Fläche, Zirkularität und Helligkeit bei LN229 und Astrozyten mit Cannabinoidbehandlung	37
16	Änderung der Parameter Fläche, Zirkularität und Helligkeit bei A375 und Astrozyten mit Cannabinoidbehandlung	38
17	Prozentualer Anteil toter Zellen in LN229- und A375-Astrozyten-Kokultur mit Cannabinoidbehandlung	39
18	Qualitative Fluoreszenzfärbung von LN229 und A375 in Kokultur und Astrozyten mit Cannabinoidbehandlung	39
19	Änderung der Parameter Fläche, Zirkularität und Helligkeit bei LN229 und Mikroglia	41
20	Änderung der Parameter Fläche, Zirkularität und Helligkeit bei A375 und Mikroglia	42
21	Prozentualer Anteil toter Zellen in LN229- und A375-Mikroglia-Kokultur	43
22	Qualitative Fluoreszenzfärbung von LN229 und A375 in Kokultur mit Mikroglia	44
23	Änderung der Parameter Fläche, Zirkularität und Helligkeit bei LN229 und Mikroglia mit Cannabinoidbehandlung	45
24	Änderung der Parameter Fläche, Zirkularität und Helligkeit bei A375 und Mikroglia mit Cannabinoidbehandlung	46
25	Prozentualer Anteil toter Zellen in LN229- und A375-Mikroglia-Kokultur und Mikroglia separat	47
26	Qualitative Fluoreszenzfärbung von LN229 und A375 in Kokultur und Mikroglia mit Cannabinoidbehandlung	48



## Tabellenverzeichnis

<b>Nummer</b>	<b>Titel</b>	<b>Seite</b>
1	Aktivität von THC und CBD an unterschiedlichen Rezeptoren	4
2	Chemikalien und Reagenzien	16
3	Medien	17
4	Puffer und Lösungen	18
5	Primäre Antikörper und Lektine	18
6	Sekundäre Antikörper	18
7	Geräte	19
8	Software	19
9	Weitere Materialien	19
10	Übersicht der verwendeten Antikörper und Lektine	24
11	Bedeutung der in der Lebendzellmikroskopie verwendeten Parameter	24



# 1 Einleitung

## 1.1 Das Endocannabinoidsystem und seine physiologische Funktion

Jahrtausende lang schon dienen Bestandteile von Cannabis als Heilmittel. Dabei liegen die ältesten geschichtlichen Erwähnungen 5000 Jahre zurück, wobei Extrakte und Öle der *Cannabis sativa* zur Behandlung chronischer Schmerzen und Appetitstimulation verwendet wurden [1,2]. Seit den 1970er Jahren wurde Cannabis intensiver wissenschaftlich untersucht und zu palliativen Zwecken sowie bei Chemotherapie-bedingter Übelkeit und Erbrechen eingesetzt [2]. Seine Bedeutung für den Stoffwechsel und Regulationsprozesse sowie die Vielfalt an Anwendungsmöglichkeiten rückten das Endocannabinoidsystem (ECS) weiter in den Mittelpunkt der Forschung [3,4].

Das ECS ist ein neuromodulatorisches System, das sich aus einer Reihe körpereigener Liganden (Endocannabinoide) und deren Abbaustoffen, den dazugehörigen Enzymen der Biosynthese, Transportmolekülen sowie den spezifischen Cannabinoidrezeptoren (CB) zusammensetzt [5]. Zu den am besten beschriebenen Endocannabinoiden gehören Arachidonylethanolamid (Anandamid, AEA) sowie 2-Arachidonylglycerol (2-AG), beides Derivate der Arachidonsäure [6,7]. Synthetisiert wird AEA durch direkte Hydrolyse des membranständigen N-Arachidonoyl Phosphatidylethanolamin (NAPE) [8] und 2-AG durch Hydrolyse von Diacylglycerol (DAG) [9]. Abgebaut wird AEA vorwiegend über die Fettsäureamid-Hydrolase (FAAH) und 2-AG über die Monoacylglycerol-Lipase (MAGL) [7,10,11].

Das System ist für die Regulation einer Vielzahl physiologischer Prozesse von essentieller Bedeutung. So beeinflusst es die Gedächtnisfunktion, die neuronale Entwicklung, das Schmerzempfinden, die Appetitregulation, den Schlafrhythmus sowie Stressempfinden und Emotionen [12]. Aber auch der Energiemetabolismus, der kardiovaskuläre Tonus, das Immunsystem und das Fortpflanzungsverhalten werden durch das ECS reguliert [13]. Bei Störungen des ECS kann es zu Depressionen oder anderen neuropsychiatrischen Erkrankungen kommen [14]. Insgesamt weist das ECS eine große Plastizität auf, durch die auch die synaptische Aktivität reguliert wird [14]. Auch konnte in verschiedenen Tumoren eine Dysregulation des ECS beobachtet werden [15]. Wegen antitumoröser Wirkungen spielen Substanzen der Pflanze *Cannabis sativa* und das Endocannabinoidsystem eine zunehmende Rolle in der Therapie von Tumorerkrankungen [16].

### 1.1.1 Cannabinoidrezeptoren und ihre Rolle in physiologischem Milieu

Das Endocannabinoidsystem zeichnet sich durch komplexe intrazelluläre Vorgänge aus. Zu den am besten charakterisierten Rezeptoren gehören CB<sub>1</sub> und CB<sub>2</sub> [13]. Der CB<sub>1</sub> wird

vor allem im zentralen Nervensystem (ZNS) exprimiert, und dort überwiegend auf diversen Neuronentypen, welche in Basalganglien, Cortex und Hippocampus lokalisiert sind [5]. CB<sub>2</sub> ist hingegen verstärkt auf Immunzellen und in peripheren Organen wie der Milz oder dem Thymus zu finden [9]. Mikroglia sind die Immunzellen des ZNS und exprimieren CB<sub>2</sub> verstärkt und besonders in pathologischen Milieus [17].

CB<sub>1</sub> und CB<sub>2</sub> sind G-Protein-gekoppelte 7-transmembran-Rezeptoren [7], die eine Homologie von ca. 44 % aufweisen [17–19]. Durch die Inhibition der Adenylatzyklase mittels der inhibitorischen G<sub>i</sub>- und G<sub>o</sub>-Proteinklassen werden Signalwege wie der MAPK-Kinase-Signalweg (MAPK) oder der Phosphoinositid-3-Kinase/Akt-Signalweg (PI3K/Akt) aktiviert [19]. In den letzten Jahren ergaben sich jedoch Hinweise, dass Rezeptoren in unterschiedlichen Systemen und Zellen unterschiedliche Effekte über verschiedene Signalwege auslösen können, möglicherweise durch den Anschluss an den G<sub>s</sub>-oder G<sub>q</sub>-gekoppelten CB<sub>1</sub> [20]. Im Fall von CB<sub>1</sub> bewirken unterschiedliche Liganden unterschiedliche Rezeptorkonformationen, was in der Aktivierung verschiedener Untereinheiten und damit unterschiedlichen Effekten resultieren kann [21]. Eine Besonderheit weisen CB<sub>1</sub> auf Astrozyten auf [22], denn sie können den Kalziumeinstrom erhöhen [23]. Im Normalzustand können dadurch Langzeitpotenziale positiv wie negativ beeinflusst werden [14].

Die erwähnten gekoppelten Signalwege modulieren eine Reihe von physiologischen Funktionen wie die Zellproliferation, Differenzierung oder Apoptose, die auch für die Tumorbologie von großer Bedeutung sind [20]. Aufgrund der Größe von CB<sub>1</sub> und CB<sub>2</sub> ist Homodimerisierung oder Multimerisierung mit beispielsweise dem Dopamin-D2-Rezeptor [24] nicht unwahrscheinlich, was auch auf diesem Wege zu einer vielfältigen Aktivierung von Signalwegen und damit verschiedenen Effekten führen kann [20].

Daneben gibt es auch Wirkungen von Cannabinoiden, die unabhängig von CB<sub>1</sub> oder CB<sub>2</sub> eintreten. Interaktionen von AEA mit dem Transienten Rezeptor-Potenzial-Kationenkanal der Unterfamilie V (TRPV1-Rezeptor) wurden nachgewiesen [19]. Außerdem steht der G-Protein-gekoppelte Rezeptor 55 (GPR55) zunehmend in der Diskussion, Wirkungen von  $\Delta$ 9-Tetrahydrocannabinol (THC) als auch Cannabidiol (CBD) zu vermitteln [25,26]. GPR55 befindet sich im ZNS, der Milz und im Gastrointestinaltrakt und wurde auch in Glioblastomen (GBM), Melanomen und auf Mikroglia exprimiert [27], sodass eine Einflussnahme auf die jeweiligen Systeme ermöglicht und „off-targets“ von Cannabinoiden vermittelt werden könnten [28]. Als ebenfalls nicht-klassischer Rezeptor scheint der G-Protein-gekoppelte Rezeptor 18 (GRP18) auch eine Rolle in der Vermittlung von Effekten zu spielen [29]. Insgesamt zeigt sich ein breites wie komplexes Spektrum von Möglichkeiten der Wirkungsweise von Liganden [12,30].

### 1.1.2 Die Wirkung von $\Delta^9$ -Tetrahydrocannabinol und Cannabidiol in verschiedenen Systemen

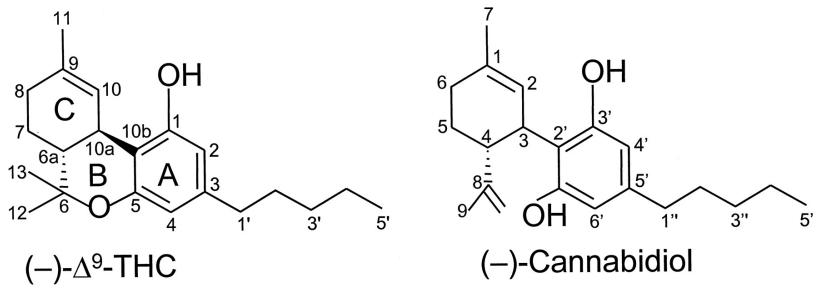
Sowohl THC als auch CBD gehören zu den klassischen Cannabinoiden, die zusammen mit über hundert weiteren biologisch aktiven Substanzen in *Cannabis sativa* vorkommen (Abb. 1) [13]. Zunächst wurde der Schwerpunkt der Forschung aufgrund der psychoaktiven Wirkung auf THC gelegt [19,31]. Inzwischen wird jedoch vermutet, dass auch CBD in hohen Konzentrationen Intoxikationen, bemerkbar als dissoziativer Zustand, bewirken kann [32]. Die meisten der Effekte von THC werden durch CB<sub>1</sub> vermittelt, jedoch weist es auch zu CB<sub>2</sub> eine vergleichbare Affinität auf (Tab. 1) [17].

Dank der Verteilung von Cannabinoidrezeptoren in vielen Bereichen des Körpers kann THC auf verschiedene Systeme wirken. THC ist in der Lage, die Wirkung der körpereigenen Endocannabinoide zu imitieren, da viele von ihnen strukturelle Übereinstimmungen aufweisen und damit ähnliche Ziele haben [33].

Auf psychischer Ebene sind der exzessive Cannabis-Konsum und die Wirkung von THC mit der Entwicklung von Psychosen [34] und kognitiven Defiziten vor allem bei Jugendlichen assoziiert [35]. Einige Studien der letzten Jahrzehnte geben Hinweise darauf, dass in tumor-assoziierten, chronisch-neuropathischen Schmerzen THC, aber auch CBD eine lindernde Wirkung erzielen kann [36,37]. Dabei beruht diese Wirkung auf dem Vorhandensein von Cannabinoidrezeptoren im deszendenden inhibitorischen System des ZNS, wodurch weniger Transmitter des glutamatergen und des GABAergen Systems gebildet werden [38,39]. Früh erkannte man auch die Wirkung von THC- bzw. THC-ähnlichen Präparaten (z. B. Dronabinol oder Nabilone) gegen Chemotherapie-induzierte Übelkeit und Erbrechen. Sie wurden in randomisierten kontrollierten Studien untersucht und führten zu besseren Ergebnissen im Vergleich zu herkömmlichen Antiemetika sowie Placebo [40]. Dabei werden die Effekte über den CB<sub>1</sub>-Rezeptor vermittelt [41], wohingegen bei CBD ein anderer Mechanismus vermutet wird [42].

Auf der einen Seite gibt es Hinweise, dass Effekte von THC durch CBD antagonisiert werden [43], und zwar durch negative allosterische Modulation von CB<sub>1</sub> [44–46]. Auf der anderen Seite gibt es auch Anzeichen, dass CBD die Effekte von THC verbessern oder gar nicht verändern könnte, wobei die zugrundeliegenden Mechanismen komplexer erscheinen [32]. In einer Studie konnte an Probanden eine Verstärkung der Intoxikation durch THC durch eine geringe Dosis CBD festgestellt werden, während eine gleichermaßen hohe Dosis CBD die Intoxikation verringerte [32]. Dieser Umstand wird bei Patienten mit multipler Sklerose genutzt, die das antispasmodisch wirkende Medikament Nabiximol erhalten, das sich durch CBD-vermittelte Unterdrückung von

unerwünschten kognitiven Effekten von THC auszeichnet [47]. Es zeigen sich demnach vielversprechende therapeutische Ansätze, die weiterer Forschung bedürfen [48].



**Abbildung 1** Strukturformeln von THC und CBD modifiziert nach Howlett et al. [49]

**Tabelle 1** Aktivität von THC und CBD an unterschiedlichen Rezeptoren

Cannabinoid	Rezeptoren	Aktivität	Literaturangabe
THC	CB <sub>1</sub>	Agonist (K <sub>i</sub> =5.05–80.3 nM)	[50]
	CB <sub>2</sub>	Agonist (K <sub>i</sub> =3.13–75.3 nM)	[50]
	GPR55	Agonist (K <sub>i</sub> =EC <sub>50</sub> = 8 ± 1 nM)	[51]
	TRPV1	Keine Affinität	[52]
CBD	CB <sub>1</sub>	Schwacher Antagonist (K <sub>i</sub> =120–1130 nM)	[50]
	CB <sub>2</sub>	Schwacher Antagonist (6–301 nM)	[50]
	GPR55	Antagonist IC <sub>50</sub> =445 nM	[51]
	TRPV1	Agonist (K <sub>i</sub> =3612 nM, EC <sub>50</sub> = 1.0 ± 0.1 nM)	[53,54]

## 1.2 Glioblastome und metastasierende Melanome im Überblick

Gehirntumoren und Hirnmetastasen gehören aufgrund der Lage in einem empfindlichen, immunprivilegierten Organ - dem ZNS - zu den am schwierigsten zu therapierenden Erkrankungen mit häufig geringer Aussicht auf Heilung [55].

Zu den hirneigenen und malignen Tumoren gehören die GBM, die die WHO als Grad 4 Gehirntumor einstuft [56]. Dennoch ist die Inzidenz mit unter 5-7 von 100 000 Einwohnern vergleichsweise gering. Zugleich, mit etwa 25 %, sind sie der häufigste primäre Tumor des Gehirns, wobei sie nur ca. 2 % der Gesamtmenge der primären Tumoren ausmachen [57,58]. Das GBM kommt häufiger bei Männern vor, wobei das mediane Erkrankungsalter bei 64 Jahren liegt und 5 % der Patienten ein GBM in der Familienanamnese bestätigen [59]. An einem solchen Tumor erkrankte Patienten leiden

u. a. an Kopfschmerzen, epileptischen Anfällen, Verwirrung und Gedächtnisverlust [59]. Derzeitige Standardtherapien bei Patienten jünger als 60-65 Jahre sind die chirurgische Resektion, Bestrahlung sowie die Gabe des zytostatisch wirkenden Chemotherapeutikums Temozolomid, während älteren Patienten entweder Bestrahlung oder Chemotherapie angeboten wird [60,61]. Die mediane Überlebenszeit beträgt 15 Monate [62], was sich in den letzten Dekaden nicht deutlich verbessert hat [63].

Beim malignen Melanom handelt es sich um die aggressivste und die am häufigsten zum Tode führende Form von Hautkrebs, wobei Metastasen des Gehirns eine entscheidende Rolle spielen [48]. Die mittlere Überlebenszeit beträgt bei einem ins Gehirn metastasierten Melanom zwischen acht und zehn Monaten [64]. Die Inzidenz ist sehr unterschiedlich und liegt beim Vergleich der Mittelmeerstaaten mit Australien und Neuseeland zwischen 3-100/100.000 [65]. In den letzten Jahrzehnten ist die Überlebenszeit stetig gestiegen, was sich auf bessere Früherkennung zurückführen lässt [65,66]. Nicht schnell genug therapiert kann das Melanom in weitere periphere Organe metastasieren, wobei Gehirnmetastasen als prognostisch ungünstig gelten und die hohe Letalität erklären [67,68]. Bei sogar 5-20 % der Metastasen im Gehirn ist der Primarius ein Melanom, es ist damit drittgrößter Primarius bei Hirnmetastasen [68]. Bei 70-90 % der Obduktionen von Patienten werden Melanommetastasen gefunden [69]. Als Erstlinientherapie des metastasierten Melanoms wird die Kombination der monoklonalen Antikörper Nivolumab und Ipilimumab, die zur Aktivierung der T-Lymphozyten führen, angesehen [65].

### **1.2.1 Glioblastome und charakteristische Eigenschaften**

Die schlechte Prognose und die wenig erfolgreiche Therapie des GBM wird auf die inter- und intratumorale Heterogenität, diffuses hochinfiltratives Wachstum, einen hohen Grad an Vaskularisierung und die Instabilität des Genoms zurückgeführt [18,70].

Die Heterogenität von GBM hat genetische und epigenetische Gründe. In der genetischen Analyse wird unter anderem unterschieden nach IDH-Wildtyp bzw. -Mutation, BRAFV600E-Mutation, Bestandteilen neuronaler Differenzierung oder der neu hinzugekommenen epitheloiden GBM-Variante [71,72]. Eine häufige Lokalisation von GBM ist der Frontallappen [73]. Häufige Vorläuferzellen von GBM sind Astrozyten, die neben den Mikroglia und Oligodendrozyten zu den Gliazellen des ZNS gehören [74]. Auch gibt es Hinweise auf den Ursprung des GBM aus neuronalen Stammzellen [59]. Histopathologisch ist das GBM aus wenig differenzierten pleomorphen Zellen mit hoher mitotischer Aktivität aufgebaut und weisen Zeichen von Mikrovaskularisierung und Nekrosen auf [73]. Zu den die Tumorausbreitung modifizierenden Faktoren gehört auch die Zusammensetzung des Tumormikromilieus aus zellulären und nicht zellulären

Bestandteilen [75,76]. Die für GBM typische Invasion in gesundes Hirngewebe ist ein komplizierter Prozess, der von Interaktionen zwischen Tumorzellen und der Extrazellulärmatrix, aber auch zwischen Tumorzellen bestimmt wird, die untereinander über „*tumor microtubes*“ verbunden sind und über Connexin 43 kommunizieren [77,78]. Bei der Invasion geben anatomische Strukturen wie myelinisierte Axone oder Basalmembranen von Gefäßen die Richtung der Migration von Tumorzellen vor [79–81]. Für den Prozess der Migration ist Adhäsion an Strukturen der Extrazellulärmatrix (ECM) unter Beteiligung von Integrinen [82] notwendig und schließlich eine Loslösung der hinteren Zellfortsätze, wobei Myosin II, ein Motorprotein, für die Fortbewegung sowie die Größenanpassung der GBM besonders wichtig ist [83,84]. Durch GBM sezernierte Matrix-Metalloproteasen (MMPs) helfen bei der Durchdringung der festen ECM. Eine Form- und Volumenänderung der Zelle wird durch das Gewebshormon Bradykinin begünstigt, sodass eine Anpassung an den zur Verfügung stehenden Interzellularraum erfolgt, durch den die Tumorzellen sonst nicht hindurchpassen würden [84,85]. Durch diese Mechanismen können GBM die Extrazellulärmatrix demnach dahingehend verändern, dass die Invasion erleichtert wird [73,80]. Trotz der invasiven Eigenschaften und des hohen Grades an Vaskularisierung metastasieren Glioblastome nur äußerst selten in die Peripherie [86].

Die Heterogenität von GBM und die Diversität des Tumormikromilieus führen zu hoher Chemo- und Strahlenresistenz [72] und damit verbundener erschwerter Behandlung. Selten kann Heilung durch totale Resektion mit gesundem Restgewebe am Rand des Herds erzielt werden. Die außerordentlich starke Invasion führt häufig zu einem Rezidiv der Erkrankung, zumal die Tumoren schwer abzugrenzen sind. Auch limitieren diverse Arten von Resistenzen, insbesondere von Glioblastomstammzellen (GSC), derzeit die Behandlungsmöglichkeiten und führen zu Rezidiven [62].

### **1.2.2 Gehirnetastasen des malignen Melanoms und charakteristische Eigenschaften**

An Tumoren erkrankte Patienten sterben vor allem an Metastasen, die vom Primarius ausgehen [87–89] – so auch 54 % der Patienten mit malignem Melanom [90], welches von allen Tumorarten die größte Affinität zum Gehirn aufweist [91]. Um bis ins Gehirn zu gelangen, müssen Melanomzellen vom Primarius oder peripher gelegenen Metastasen das Immunsystem überwinden und durch das Blutgefäßsystem bis zur Blut-Hirn-Schranke (BBB) vordringen, um von dort aus ins Gehirnparenchym zu transmigrieren [69,92]. Neben Perizyten mit ihren Endfüßchen und der Basalmembran spielen Astrozyten bei der Bildung der Barriere eine entscheidende Rolle, indem protoplasmatische Astrozyten mit langen Fortsätzen die *Membrana glialis limitans*



*vascularis* bilden [93,94]. Die Gliagrenzmembran blockiert im intakten Zustand den Durchtritt von 98 % der Moleküle [94]. Die Chance für die Interaktion zwischen Tumorzellen und Endothelzellen der BBB wird erhöht, wenn sich die Zellen in Aggregaten zusammenfinden, wobei eine geringe mechanische Spannung des Zytoskeletts bei der schnellen Aggregation hilft [95]. Studien geben auch Hinweise darauf, dass Melanomzellen in Anwesenheit von Endothelzellen Serinproteasen sowie Heparanase sezernieren, sodass die Transmigration erleichtert wird [96,97]. Einmal transmigriert, sind Melanomzellen für die Proliferation auf engen Kontakt zu den Endothelzellen der Gehirnkapillaren angewiesen und migrieren auch entlang diesen weiter ins Parenchym [89]. Im Abstand von bis zu 100 µm von einem Blutgefäß sind Tumorzellen in der Lage zu überleben [98]. Charakteristischerweise lassen sich multiple Lokalisationen von Gehirnetastasen dadurch identifizieren, dass sich Tumorzellen durch den passiven Transport über den Liquor sowie aktive Migration entlang den Gefäßen sowie anatomischen Strukturen bewegen [99]. Eine Schädigung der BBB, wie beispielsweise im Tumormikromilieu, ermöglicht auch das Eindringen peripherer Zellen (z. B. peripherer Makrophagen) [100]. Dabei kann die BBB beispielsweise durch invasive Glioblastomzellen beeinträchtigt werden [101], aber auch Tumorzellen eines in der Peripherie gelegenen Primus können eine Läsion hervorrufen. Während des Metastasierungsprozesses ist die Funktion der BBB vorübergehend eingeschränkt [92]. Tumorzellen zeichnen sich *per definitionem* durch genetische Instabilität aus [102], und Melanome weisen unter allen Tumoren die höchsten Mutationsraten auf [103]. Aufgrund der intra- und intertumoralen Heterogenität müssen Möglichkeiten gefunden werden, diese tumorfördernden Wege zu unterbinden, wobei das Endocannabinoidsystem als Ansatz dienen könnte. Wichtig in diesem Zusammenhang ist die Beeinflussung von Gliazellen durch das Endocannabinoidsystem [17], welche in der vorliegenden Arbeit näher erläutert werden soll.

### **1.2.3 Die Wirkung von Cannabinoiden auf Glioblastome und Gehirnetastasen des malignen Melanoms**

Das Endocannabinoidsystem nimmt im physiologischen Milieu an diversen Regulationsprozessen teil. Im pathologischen Milieu kommt es zur Anpassung des Endocannabinoidsystems, wobei eine Hochregulierung der Rezeptoren und Endocannabinoide eintritt [30].

Auf Glioblastomen befinden sich CB-Rezeptoren [17], deren Expression therapeutische Ansätze mit Cannabinoiden ermöglichte [18,104]. CB<sub>1</sub> und CB<sub>2</sub> werden auf Glioblastomen exprimiert, wobei der Anteil an CB<sub>2</sub> mit der Malignität positiv korrelierte [86].

Die meisten Studien zeigen, dass Cannabinoide antitumorale Effekte besitzen [105–107], jedoch wurden auch einige wenige für Tumorzellen förderliche Effekte beobachtet [108,109]. Die Behandlung von Glioblastomzellen mit THC löste deren Zelltod aus [86]. Mögliche Mechanismen sind die Hochregulation von Ceramiden (Sphingolipiden) sowie des stress-assoziierten Gens p8, verantwortlich für die pro-apoptotische und antitumorale Wirkung durch Aktivierung der *Cystein-dependent Aspartate-specific Protease 3* (Caspase 3) [110], oder die Hochregulation von ERK [111]. Auch das nicht psychoaktive CBD wirkte auf Tumorzellen allgemein zytotoxisch [112], und in Glioblastomzellen konnte Apoptose durch Aktivierung von Caspasen induziert werden [18]. Die Migration wurde CB<sub>1</sub>/CB<sub>2</sub>-unabhängig, aber konzentrationsabhängig vermindert, wobei der Mechanismus ungeklärt blieb [113]. CBD verringerte bei Glioblastomen die Fähigkeit der Invasion [86] und Metastasierung [13]. Bei gleichzeitiger Behandlung mit THC und CBD wurde das Glioblastomzellwachstum inhibiert, indem der Anteil der in der G<sub>1</sub>/G<sub>0</sub>-Phase befindlichen Zellen gesteigert wurde, wobei der entscheidende Mechanismus die Aktivierung von Caspasen war [114].

Das Endocannabinoidsystem kann ebenfalls zur Behandlung von Melanommetastasen genutzt werden, da die auf Melanomzellen befindlichen CB als Ansatz dienen können [115]. In mehreren Studien wurde ein positiver, Melanomzellen schädigender und damit antitumoraler Effekt durch Cannabinoide beschrieben [13]. Ähnlich wie bei Glioblastomen wurde auch in Melanomen mit CB<sub>1</sub>-Agonisten wie WIN-55,212-2 eine Apoptose-induzierende Wirkung über die Aktivierung von AKT/ERK-Signalwegen erzielt. Dies wurde mit gleichzeitiger Akkumulation von Ceramiden auch für THC nachgewiesen [116]. Eine weitere Studie zeigte nach Behandlung mit THC einen Zelluntergang über einen Autophagie-bedingenden Mechanismus von Melanomzellen [117]. Bei Applikation von THC wurde in Abhängigkeit von der Konzentration ein Arrest in den G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-Phasen des Zellzyklus oder Apoptose festgestellt [115]. THC verringerte zudem die Tumorgenese *in vivo* in Ratten [111].

Für CBD war in verschiedenen Studien ein antitumoraler Effekt erkennbar, zum Beispiel in Form anti-proliferativer und pro-apoptotischer Wirkungen, die vorwiegend CB<sub>1</sub>/CB<sub>2</sub>-Rezeptorunabhängig funktionieren [113,118]. Allerdings ist zum Effekt der Behandlung von Melanomzellen mit CBD bisher wenig bekannt. In einer Pilotstudie konnte ein längeres Überleben von Mäusen mit Melanom durch Gabe von CBD erreicht werden, was durch Hemmung des Wachstums erklärt wurde [119]. Auch scheint durch CBD die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) stimuliert zu werden, die für die Induktion von Apoptose in Mammakarzinomzellen sorgen [120]. Bei äquimolarer Behandlung von Melanomzellen mit THC und CBD wurde die Zellviabilität reduziert, vermutlich durch Stimulation von Autophagie- und Apoptose-fördernden Signalwegen,

wobei der Einsatz von CBD die nötige Dosis von THC verringert und die Kombination beider Cannabinoide ebenso effektiv wie die alleinige THC-Behandlung war [117]. Die Gabe von CBD parallel zur Radiotherapie führte ebenso zur Verringerung der Tumormasse, und auch die Kombination beider Cannabinoide mit dem Chemotherapeutikum Temozolomid scheint therapeutische Erfolge zu zeigen [121]. Hinsichtlich der Invasion gibt es einige Hinweise in anderen Tumorentitäten, dass CBD einen negativen Effekt auf die Invasion besitzt, beispielsweise durch Inhibition von MMPs [113,122,123]. Insgesamt zeigen sich erfolgversprechende Möglichkeiten für therapeutische Ansätze.

### **1.3 Tumormikromilieu von Glioblastomen und Gehirnmetastasen des malignen Melanoms**

Das Tumormikromilieu ist eine heterogene Umgebung, zu der eine Reihe von Zellen und Faktoren gehört. Unter anderem Epithelzellen, tumorassoziierte Fibroblasten (CAFs), eingewanderte Immunzellen (z. B. neutrophile Granulozyten, Mastzellen und T-Zellen) oder Endothelzellen sorgen für eine komplexe Struktur des Tumormikromilieus [101,124]. Neutrophile Granulozyten, aber auch CAFs können dabei die Tumorphysion unterstützen [94,125]. Gleichzeitig wird der Tumor samt Mikromilieu vor dem Immunsystem geschützt [118]. Antiinflammatorische Zytokine werden von Glioblastomen sezerniert. Dazu gehören beispielweise Interleukin-10 (IL-10) [126,127] oder der *Growth/differentiation factor 15* (GDF-15) [128]. Auch der *transformierende Wachstumsfaktor*  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) sorgt für eine Immunsuppression im Tumormikromilieu, indem er die T-Zell-Aktivierung blockiert, die Interleukin-2 (IL-2) Produktion vermindert, dabei gleichzeitig Invasion, Wachstum und Angiogenese durch Stimulation des Endothelwachstumsfaktors (VEGF) fördert und dadurch mit der Malignität des Tumors korreliert [75,129]. Des Weiteren ist Hypoxie ein starker Stimulus für Angiogenese ebenso wie eine Reihe von immunsuppressiven Signalwegen inklusive des *Signal Transducer and Activator of Transcription 3* (STAT3) [129,130]. Eine Anpassung des Glioblastoms an Hypoxie ist zudem möglich durch das von Astrozyten sezernierte *Chemokine ligand 20*, was wiederum die Freisetzung des Hypoxie-induzierten Faktors 1 $\alpha$  bewirkt [126].

Die Regulierung der Immunantwort durch Immuncheckpoint-Inhibitoren ist in den letzten Jahren als erfolgversprechender Therapieansatz in den Fokus gerückt, so auch beim metastasierten Melanom. Doch das Potenzial dieser Ansätze ist aufgrund neuer Resistenzmechanismen, beispielsweise durch den *Programmed cell death ligand 1*, in Melanommetastasen limitiert [131].

Eine immer bedeutendere Rolle kommt auch der gegenseitigen Beeinflussung von Astrozyten und Mikroglia zu. In pathologischen Zuständen unterliegen Astrozyten und Mikroglia einer gegenseitigen und vielfältigen Beeinflussung, indem Mikroglia Astrozyten zur Erhaltung der physiologischen Funktion aktivieren können [132]. Aktivierte Mikroglia, wozu auch tumorassoziierte Mikroglia (TAMs) gehören, exprimieren IL-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$  und das zum Komplement gehörige C1q. Durch diese Faktoren entstehen reaktive Astrozyten. Diese Astrozyten wirken toxisch auf Synapsen und sind an der Entwicklung und Progression vieler neurodegenerativer Erkrankungen beteiligt [133].

Es gilt nun besser zu verstehen, welche Rolle Gliazellen, also Astrozyten und Mikroglia, als Teil des komplexen Tumormikromilieus spielen könnten.

## **1.4 Gliazellen**

### **1.4.1 Astrozyten und deren Interaktion mit Tumoren**

Astrozyten kommt im ZNS eine zentrale Rolle in der Regulation der Homöostase, im Blutfluss im Gehirn [134], der Immunfunktion und auch der Aufrechterhaltung der synaptischen Funktionalität zu [112]. Sie machen in etwa 50 % der Zellmasse im ZNS aus [77] und sind damit die häufigsten Zellen des ZNS [112]. Morphologisch betrachtet zeichnen sich Astrozyten durch lange und verzweigte Fortsätze aus, die von einem zentralen Zellkörper ausgehen, und werden deshalb „Sternzellen“ genannt [132]. Astrozyten zeigen eine bemerkenswerte Heterogenität, die an den speziellen Funktionen, der Lokalisation innerhalb des ZNS sowie dem Einfluss im jeweiligen Mikromilieu erkennbar ist [135]. Dabei unterscheidet man unter anderem einen protoplasmatischen und einen fibrillären Typ [135–137]. Astrozyten sind mit ihren Fortsätzen maßgeblich an der Funktion der BBB beteiligt, wobei es zu Interaktion mit Endothelzellen und Perizyten kommt [76].

Gemeinsam mit Mikroglia sind sie an der Entstehung der Gliose (charakteristische Hochregulierung von saurem Gliafaserprotein (GFAP) und anderer Entzündungsmediatoren) bei Erkrankungen oder Traumata beteiligt und ändern dabei ihren Funktionszustand zu reaktiven Astrozyten [112,128]. Dabei können unreife reaktive Astrozyten das Ausmaß der sonst durch Gliose hervorgerufenen Schädigung eingrenzen und sind für die Erhaltung der Homöostase und Reparaturprozesse verantwortlich [128,138,139]. Auch in Anwesenheit von Mikroglia können sich Astrozyten zu reaktiven Astrozyten transformieren und verlieren dabei einen Großteil ihrer physiologischen Funktionen wie beispielsweise den Unterhalt von Synapsen [133]. Reaktive Astrozyten zeichnen sich durch Hypertrophie, gesteigerte Migration sowie Zellproliferation aus [140].

Ebenso haben die in großer Menge vorkommenden Astrozyten ähnlich wie Mikroglia eine für den Tumor nützliche, also für die Prognose schlechte Eigenschaft, indem sie Invasivität, Wachstum und Vaskularisierung steigern [76,128,141,142]. Nach Kontakt mit Glioblastomzellen werden sie zu reaktiven Astrozyten und sezernieren MMP-2 [141]. In einer Studie mit Kokulturen aus der Glioblastomzelllinie U87 und Astrozyten wurde gezeigt, dass Astrozyten große Mengen an pro-MMP-2 produzieren, welches darauffolgend zum aktiven MMP-2 wird [143]. Ein weiterer wichtiger Faktor für die Beeinflussung von Astrozyten durch Glioblastomzellen ist das Osteonectin, wodurch die Produktion von MMP-2 durch Astrozyten gesteigert wird [144]. MMPs helfen Glioblastomen bei der Invasion in gesundes Gewebe, indem sie durch ihre proteolytische Aktivität extrazelluläre Matrix zersetzen. MMPs verschlechtern die Prognose von Tumorpatienten [145]. Auch der von reaktiven Astrozyten sezernierte *Stromal cell-derived factor 1* kann die unkontrollierte Proliferation von Glioblastomzellen durch Aktivierung von ERK1/2 fördern [146]. Eine Rolle bei der Interaktion und Manipulation von Glioblastomzellen spielen zudem Ionenkanäle [141]. Sie tragen zur Beeinflussung des Zytoskeletts sowie zur Migration bei [147].

Die Invasion von Stammzellen wird durch Interaktionen von Glioblastomzellen zwischen der Extrazellulärmatrix und normalen Zellen der Umgebung sowie von im Tumormikromilieu befindlichen Astrozyten produzierten Mediatoren wie dem TGF- $\beta$  oder IL-6 und IL-8 gefördert [77]. Glioblastomzellen produzieren auch Faktoren, die ihre Invasion in das umliegende Gewebe erleichtern. Dazu gehören IL-6 [128], IL-8, *chemokine ligand 2 (CCL2)* und VEGF, die in größerer Menge unter dem Einfluss von Astrozyten sezerniert werden [77]. Der von Glioblastomzellen gebildete Faktor *Nuclear Receptor Activator of NF- $\kappa$ B Ligand (RANKL)* aktiviert Astrozyten [148]. Durch RANKL aktivierte Astrozyten sezernieren TGF- $\beta$ , Fibroblasten-Wachstumsfaktor  $\beta$  (FGF- $\beta$ ) sowie Hepatozyten-Wachstumsfaktor (HGF), die charakteristisch für erhöhte Tumorenvasion sind [148]. Astrozyten scheinen Melanomzellen vor dem Zelltod durch Chemotherapeutika zu schützen, wobei ein Zusammenhang mit der Tumor-Glia-Kommunikation über Connexin 43 vermutet wird [149]. Astrozyten können die Tumorzellen ebenfalls vor zytotoxischen Chemotherapeutika schützen.[98]. Für die Aggressivität von Melanomzellen spielen auch Zytokine und Enzyme im Tumormikromilieu eine Rolle. Melanomzellen beeinflussten Astrozyten so, dass diese das pro-inflammatorische Zytokin IL-23 exprimierten, welches dann eine verstärkte Produktion von MMP-2 bewirkte und die Invasion von Melanomzellen förderte [68]. IL-23 und weitere von Astrozyten sezernierte Faktoren können auch das sonst tumorsuppressive *Phosphatase and tensin homolog (PTEN)* fördern (durch die Unterdrückung verschiedener microRNA), sodass die Migration von Melanomzellen gesteigert wird [150].

Wie oben beschrieben scheint es eine gegenseitige Beeinflussung von Astrozyten und Tumorzellen zu geben, und die Frage stellt sich, inwiefern auch das Cannabinoidsystem auf diese Interaktionen Einfluss nimmt. Die Hinweise in der Literatur zu dieser konkreten Fragestellung sind rar, denn hierzu wurden in erster Linie neurodegenerative Erkrankungen untersucht [112]. In Astrozyten wird sowohl CB<sub>1</sub> als auch CB<sub>2</sub> exprimiert, letzterer in pathologischen Zuständen [112]. Es ist bereits bekannt, dass Cannabinoide pro-inflammatorische Zytokine in Astrozyten inhibieren [151]. Die pro-inflammatorischen Zytokine TNF- $\alpha$  und IFN $\gamma$  können normalerweise Astrozyten aktivieren. THC kann den Grad der Astrozytenaktivierung verringern, indem beispielsweise weniger IL-6 sezerniert wird [152], das normalerweise ein invasions- und proliferationsförderndes Zytokin ist [128].

In Astrozyten verringert CBD die Produktion von GFAP, was eine geringere Proliferation von Astrozyten zur Folge hatte [112], wodurch die absolute Zytokinproduktion gesenkt und die tumorunterstützende Wirkung gemindert wurde. Ebenso wird von Astrozyten mit hohem GFAP-Anteil CCL2 sezerniert, was zur Anlockung von Immunzellen führt. Die Produktion von CCL2 wird durch CBD reduziert [112]. GBM-Zellen kommunizieren über extrazelluläre Vesikel (EVs) und über diese mit Zellen des Tumormikromilieus. Mit Hilfe der EVs fördern sie die Motilität von TAMs [126].

Insgesamt ist die Rolle von Astrozyten und Cannabinoiden bei der Tumorprogression noch sehr wenig verstanden [112].

#### **1.4.2 Mikroglia und deren Interaktion mit Tumoren**

Mikroglia wurden erstmals als eigenständige Zellpopulation des Gehirns 1919 von Del Rio Hortega beschrieben [153]. Sie stammen von im Dottersack befindlichen primitiven Makrophagen ab [75,154] und machen 5-20 % der Zellen des Gehirns aus [155]. Im Gehirn befinden sich Makrophagen in den Meningen und im perivaskulären Raum. Mikroglia hingegen sind residente Makrophagen mit phagozytotischen Funktionen, wobei sie ein weites Spektrum an Immunrezeptoren exprimieren [156,157]

Die physiologische Funktion besteht des Weiteren in der Kontrolle der synaptischen Übertragung, der Modulation überaktiver Neurone und dem Formen von Synapsen während des Lernens [158].

Mit langen Fortsätzen tasten sie dazu ständig ihre Umgebung ab. Sie können Antigene, die eine Transformation in den aktiven Zustand ermöglichen, erkennen [75]. Je nach Aktivierungszustand kann sich sowohl die Länge der Fortsätze als auch die amöboide Beweglichkeit stark verändern. Im aktivierten Zustand verlieren sie ihre langen Fortsätze und erlangen große Beweglichkeit [159]. Zur Charakterisierung des Aktivitätszustandes wurden pro-inflammatorische und reparative Mikroglia Typen vorgeschlagen [156]. Es

handelt sich jedoch um hoch dynamische Übergänge mit breitem Spektrum an Aktivitätszuständen, weshalb eine klare Trennung nicht zielführend erscheint [156,160]. Dennoch können verschiedene Marker und Stimulationsfaktoren den Aktivitätszuständen zugeordnet werden [101,161].

Mikroglia spielen bei neurodegenerativen Erkrankungen wie der Alzheimer-Demenz, dem idiopathischen Parkinson-Syndrom, der Amyotrophen Lateralsklerose und pathologischen Zuständen wie ZNS-Traumata oder Neoplasien eine wichtige Rolle [162]. In Glioblastomen wurden Mikroglia erstmals 1925 beschrieben [163]. Im Tumormikromilieu befinden sich bis zu 50 % Mikroglia und Makrophagen [100,101]. In einem Implantationsmodell mit Glioblastomzellen in Mäusen konnte gezeigt werden, dass der perivaskulären Nische für die Aktivität und Motilität von Mikroglia und der Interaktion mit dem Tumorgewebe eine bedeutende Rolle zukommt [164].

Glioblastomzellen können Mikroglia mit Hilfe verschiedener Zytokine, beispielsweise Koloniestimulierender Faktor 1 [75,161], rekrutieren und sie so beeinflussen, dass sie ihre physiologischen Funktionen verlieren, aktiviert werden und eine erhöhte Toleranz gegenüber T-Zellen aufweisen [101,164,165]. Außerdem sezernieren sie proinflammatorische Zytokine wie TGF- $\beta$  [94,166] und sind zudem in der Lage, CCL2 zu produzieren [157], welches die Infiltration von Mikrogliazellen in GBM stark erhöht [167]. TAMs unterstützen die Freisetzung weiterer MMPs durch die Expression von *membrane-type MMPs* (MT1-MMPs) [161], sodass die reziproke Interaktion von Glioblastomzellen und Mikroglia deutlich wird. Die tumorassoziierten Mikroglia sezernieren Faktoren, die das Tumorwachstum sowie die Versorgung mit Gefäßen positiv beeinflussen und mit diesen assoziiert sind [164]. Zu den sezernierten Faktoren gehören auch VEGF oder IL-6 [75], das für eine Abnahme der Zell-Zell-Kontakte sorgt und die Invasion von Glioblastomzellen verstärkt [168]. Bereits ab dem dritten Tag nach einer Tumorimplantation umgeben die Mikroglia den Tumor und zeichnen sich durch Fortsätze und amöboide Beweglichkeit aus [161]. Je mehr TAMs vorhanden sind, desto schlechter die Prognose für den Patienten [75]. Zudem korreliert der prozentuale Anteil von Mikroglia im Tumorgewebe mit der Tumorklassifikation der WHO [78].

Auch im Tumormikromilieu von Melanomzellen sind den Tumor infiltrierende Mikroglia zu finden, die durch Kontakt mit Melanomzellen, ähnlich wie mit Glioblastomen, eine aktivierte Morphologie annehmen und in metastatischem Gewebe massiv akkumulieren [169]. Das für Migration wichtige MMP-2 konnte nach Zugabe von Melanom-konditioniertem Medium durch TAMs verstärkt sezerniert werden, aber Mikroglia-konditioniertes Medium verstärkte auch die MMP-2-Sekretion in Melanomzellen, was für eine positive Feedbackschleife spricht [165]. Ein möglicher Mechanismus könnte die Aktivierung von STAT3 sein, das neben der MMP-2 Sekretion auch die Bildung von

Metastasen und Invasion begünstigt [170,171]. Auch gibt es Hinweise darauf, dass Mikroglia die Bildung von Sphäroiden, also dreidimensionalen Tumorzellaggregaten, fördern [165].

Eine wichtige Rolle für die in Tumoren herrschende Immunsuppression spielt die *Indoleamine 2,3-dioxygenase* (IDO), ein in TAMs stark exprimiertes Enzym [172], das für eine Unterdrückung der Immunantwort durch Inhibition von Immunzellen sorgt [173]. Die Menge an IDO in Wächterlymphknoten des malignen Melanoms korreliert mit einer negativen Prognose [174].

Insgesamt gibt es also Hinweise darauf, dass Mikroglia auf die Tumorprogression einen entscheidenden Einfluss nehmen, sodass Mikroglia und Gliazellen allgemein als therapeutisches Ziel für Cannabinoide vielversprechend erscheinen.

Mikroglia exprimieren CB<sub>2</sub>, dessen Expression in Abhängigkeit vom Mikromilieu herauf- oder herabreguliert wird [17,175]. In einer Studie konnte in murinen Mikroglia jedoch auch CB<sub>1</sub> *messenger RNA* (mRNA) identifiziert werden [176]. Die Aktivierung von CB<sub>2</sub> führte zu gesteigerter MAPK-Phosphorylierung und damit zu erhöhter Proliferation [177], sodass durch CB<sub>2</sub>-Agonisten wie THC auch Mikroglia beeinflusst werden könnten. Es konnte gezeigt werden, dass THC und CBD die Ausbildung von für die Migration dienlichen Lamellopodien von Mikroglia unterstützen, [178]. Für CBD konnte gezeigt werden, dass die Aktivität von TAMs über die vermehrte Produktion des anti-inflammatorisch wirkenden IL-10 verringert wird [112]. Auch der CB<sub>1</sub>-Agonist WIN55,212-2 verhindert die *Ceramide*-induzierte Apoptose mittels PI3K-Signalkaskadenaktivierung [179].

Wie oben beschrieben, weist CBD nur eine vernachlässigbare Affinität zu den klassischen Cannabinoidrezeptoren auf, sodass die Beteiligung weiterer CB-Rezeptoren nicht ausgeschlossen werden kann.



## 2 Zielstellung

Die zu betrachtenden GBM und Melanome gehören zu den schwer therapiebaren Tumorarten. Weder operativ noch mit Medikamenten ist das Gehirn einfach zu erreichen, sodass gegenwärtige Therapieansätze nur eingeschränkt wirksam sind und die Prognose der Erkrankungen bisher kaum verbessert werden konnte. In dieser Arbeit soll sich mithilfe komplexer Modelle der *in vivo* Situation angenähert werden. Mittels Tumorsphäroiden verschiedener Zusammensetzung und Behandlung mit den Cannabinoiden THC und CBD *in vitro* sollte die Aggregationsdynamik durch Beobachtung in der Lebendzellmikroskopie erfasst werden. Zudem sollte mittels FACS die Todesrate gemessen und durch Fluoreszenzfärbungen verifiziert werden. Vielfältige antitumorale Wirkungen von Phytocannabinoiden, insbesondere hinsichtlich Apoptose, waren bereits bekannt, jedoch wurde den Wirkungen auf Tumor-Glia-Kokulturen bisher kaum nachgegangen. Von Gliazellen ist ein zumeist protumoraler Einfluss bekannt, über den Einfluss von THC und CBD auf diese für den Tumor förderlichen Wirkungen liegen jedoch bisher wenig Erkenntnisse vor.

Wie sich die Veränderung verschiedener Faktoren, also die Zusammensetzung der Kokulturen sowie die Behandlung mit THC und/oder CBD, auf Sphäroidbildung und Todesrate auswirken, sollte näher thematisiert werden. Anhand der Parameter Sphäroidgröße, Zirkularität und Helligkeit sollten in der Lebendzellmikroskopie mögliche Interaktionspotenziale zwischen den Zelltypen identifiziert werden. Ferner sollte ein möglicher Zusammenhang mit der Zelltodesrate untersucht werden. Für THC und CBD bestehen mittels des Endocannabinoidsystems mit seinen Rezeptoren vielfältige Möglichkeiten der Einflussnahme, wobei die möglichen zellulären Abläufe bisher nur teilweise geklärt sind. Schlussendlich sollte ein Beitrag zum besseren Verständnis des Einflusses von Gliazellen und Phytocannabinoiden auf Glioblastom- und Melanomzellen mit dem Entwicklungsziel neuer Therapieansätze geleistet werden.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Zelllinien

In der vorliegenden Arbeit wurden die Zelllinien LN229 (ATCC®CRL-2611) verwendet, die von der American Type Culture Collection (ATCC) erworben wurden. MCF-7 wurde von Prof. Dr. Tobias Pukrop (Universität Regensburg) und A375 und MeWo freundlicherweise von Dr. Simon Jasinski-Bergner (MLU) zur Verfügung gestellt. LN229 wurde mittels Multiplex Cell Authentication [180] authentifiziert.

Bei LN229 handelt es sich um eine Glioblastozelllinie [181] und bei A375 [182] um eine Melanomzelllinie. Die Isolation von LN229 erfolgte aus einem männlichen 61-jährigen Patienten mit rechtseitigem Glioblastom [181]. A375 wurde aus intraoperativen Proben einer weiblichen 54-jährigen Patientin gewonnen [182].

#### 3.2 Versuchstiere

Die Experimente wurden unter Beachtung der Richtlinien des Rates der Europäischen Union durchgeführt (Direktive 2010/63/EU). Die Tiere wurden im Zentrum für Medizinische Grundlagenforschung der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg gezüchtet und gehalten. Für die Versuche lag zu jedem Zeitpunkt eine FELASA-B-Zertifizierung vor.

Es wurden 1-3 Tage alte Mäuse vom Stamm C57BL/6J oder CX3CR1<sup>Δwt</sup>-Mäuse [183] verwendet, um Astrozyten oder Mikroglia für die Primärkultur zu gewinnen.

In CX3CR1<sup>Δwt</sup>-Mäusen ist das Gen, das den Fraktalkine-Rezeptor kodiert, gegen das grün fluoreszierende Protein (GFP) ausgetauscht [184].

#### 3.3 Chemikalien

*Tabelle 2 Chemikalien und Reagenzien*

Bezeichnung	Hersteller
Agarose	Peqlab, Erlangen
Aqua dest.	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Cannabidiol	Tocris Cookson Ltd., Bristol, Großbritannien
D (+)-Saccharose	Sigma-Aldrich, Steinheim
DAB (3,3-Diaminobenzidin)	Sigma-Aldrich, Steinheim
DAPI (4',6-Diamin-2-phenylindol)	Sigma-Aldrich, Steinheim
DNase	Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, New Jersey, USA
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) 4,5 g/l Glucose	Gibco™, Lifetechnologies™, Carlsbad, Kalifornien, USA
Entellan® Rapid Mounting Medium	Merck KGaA, Darmstadt
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Merck KGaA, Darmstadt
Ethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim
ExtrAvidin®-Peroxidase	Sigma-Aldrich, Steinheim

Fetal Bovine Serum (FBS)	Gibco™, Lifetechnologies™, Carlsbad, Kalifornien, USA
Fluorescence Mounting Medium	Dako, Glostrup, Dänemark
Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS) mit Ca <sup>2+</sup> und Mg <sup>2+</sup>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS) ohne Ca <sup>2+</sup> und Mg <sup>2+</sup>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
KH <sub>2</sub> O <sub>4</sub> (Kaliumdehydrogenphosphat)	AppliChem GmbH, Darmstadt
MACSQuant Calibration Beads 130-093-607	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
Mayers Hämalaun	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Natriumchlorid (NaCl)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (Natriumhydrogenphosphat)	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumhydroxid (NaOH)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
NGS (normal goat serum)	Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, Pennsylvania, USA
Penicillin/ Streptomycin	Gibco™, Lifetechnologies™, Carlsbad, Kalifornien, USA
Paraformaldehyd (PFA)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	Merck KGaA, Darmstadt
Propidiumiodid (PI)	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
Poly-L-Lysin (PLL)	Merck KGaA, Darmstadt
Roswell Park Memorial Institute-Medium (RPMI)	Gibco™, Lifetechnologies™, Carlsbad, Kalifornien, USA
Saccharose	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Salzsäure (HCL)	Merck KGaA, Darmstadt
SYTOX™ Green	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Δ <sup>9</sup> -trans-Tetrahydrocannabinol (THC)	THC pharm. GmbH, Frankfurt
Tissue-Tek® O.C.T.™ Compound	Sakura Finetek, Hatfield, Pennsylvania, USA
Tris	Tris Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Triton X100	AppliChem GmbH, Darmstadt
Trypsin (2,5 %)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Trypsin/EDTA	Merck KGaA, Darmstadt
Wasserstoffperoxid (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Xylol	Sigma-Aldrich, Steinheim

**Tabelle 3 Medien**

Medium	Substanzen	Bemerkung
DMEM 10 % FBS für A375	89 ml DMEM 4,5g/l Glucose	pH-Einstellung auf 7,37-7,40, sterile Filtration
	10 ml FBS	
	1 ml Penicillin/Streptomycin	
RPMI 10 % FBS für LN229	89 ml RPMI	
	10 ml FBS	
	1 ml Penicillin/Streptomycin	

**Tabelle 4** Puffer und Lösungen

Puffer oder Lösung	Substanzen	Bemerkung
Poly-L-Lysin-Lösung	1 mg Poly-L-Lysin 9 ml Aqua dest.	Für Präparation von Primärkulturen
Trypsin-DNase-Lösung	3 ml HBSS ohne Ca <sup>2+</sup> und Mg <sup>2+</sup> 2 ml 0,25 % Trypsin 500 µl DNase	
DNase-Lösung	100 mg DNase-Pulver 20 ml HBSS ohne Ca <sup>2+</sup> und Mg <sup>2+</sup>	
Phosphatpuffer (PB) 0,2 M	22,72 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 5,44 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1000 ml Aqua dest. pH=7,4	Verwendung bei Immunfluoreszenz-Färbungen
PBS 0,2 M	9 g NaCl 2,27 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,54 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1000 ml Aqua dest. pH=7,4	
PBS/Triton	3 ml Triton X100 1000 ml PBS 0,02 M Einstellung auf pH=7,4	
Tris-Puffer	6,06 g Tris 1000 ml Aqua dest. pH=7,4	
Paraformaldehyd-Lösung (4 % (w/v))	40 g PFA 500 ml 0,2 M PBS 500 ml Aqua dest. pH=7,4	

### 3.4 Antikörper

**Tabelle 5** Primäre Antikörper und Lektine

Antikörper/Lektin	Spezies	Verdünnung	Hersteller
Isolektin B4 (IB4)		1:50	Vector Laboratories, Burlingame, Kalifornien, USA
Anti-Nuclei clone 235-1	Maus	1:500	Merck KGaA, Darmstadt
Anti-Tyrosine Hydroxylase AB152	Kaninchen	1:500	Merck KGaA, Darmstadt

**Tabelle 6** Sekundäre Antikörper

Antikörper	Spezies	Verdünnung	Hersteller
Anti-Kaninchen, Alexa Fluor 350	Ziege	1:200	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Anti-Maus, Alexa Fluor 350			
Anti-Kaninchen, Alexa Fluor 488			
Anti-Maus, Alexa Fluor 488			
Anti-Kaninchen, Alexa Fluor 568			
Anti-Maus, Alexa Fluor 568			

### 3.5 Geräte, Software und weitere Materialien

**Tabelle 7** Geräte

Bezeichnung	Hersteller
Brutschrank Heracell™ 150i CO <sub>2</sub> -Inkubator	Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Feinwaage	OHAUS, Parsippany-Troy Hills, USA
Lebendzellmikroskop Leica DMI8	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
MACS Quant 10	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
Mikroskop Axioplan	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Mikroskop Olympus CX2	Olympus Australia Pty Ltd, Notting Hill, Australien
pH-Meter	Mettler-Toledo, Columbus, USA
Sicherheitswerkbank HERAsafe™	Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
ThermoShaker TSC	Biometra, Göttingen
Vortex-Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, New York, USA
Wasserbad	Varialux, Arnsdorf
Zentrifuge Biofuge™ Primo	Heraeus, Hanau
Zentrifuge Fresco™ 21	Heraeus, Hanau

**Tabelle 8** Software

GraphPad Prism® 6 und 8	Graph Pad Software, San Diego, USA
Leica Application Suite X	Leica Mikrosysteme, Wetzlar
Microsoft Office Paket	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Mendeley Literaturverwaltung	Elsevier B.V., Amsterdam, Niederlande
MATLAB-basiertes Programm zur Auswertung der Daten der Lebendzellmikroskopie	MathWorks, Natick, USA (in Kooperation mit Dr. Tim Hohmann für das Versuchskonzept entwickelte Software)

**Tabelle 9** Weitere Materialien

Bezeichnung	Hersteller
CELLSTAR® (96-Well-Zellkultur-Mikroplatte)	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Österreich
DAKO mounting medium	DAKO, Santa Clara, USA
Deckgläser	Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH, Sandheim
Einmalspritzen 20 ml	B. Braun, Melsungen
Neubauer-Zählkammer	Brand, Wertheim
Objekträger SuperFrost Plus und StarFrost ADHÄSIV	Engelbrecht GmbH, Edermünde
Parafilm M	Bemis Company, Inc., Neenah, USA
Pasteur Glaspipette	Carl Roth, Karlsruhe
Pipettenspitzen (verschiedene Größen)	Eppendorf AG, Hamburg
Pasteur-Pipette aus Kunststoff	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Österreich
Präparierbesteck	Carl Roth, Karlsruhe
Vakuumfilter	Sarstedt, Newton, USA
Zellkulturflaschen (250 ml)	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Zentrifugenröhrchen (15- und 50 ml)	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Österreich

## 3.6 Zellkultur

### 3.6.1 Präparation und Kultivierung primärer Mischkulturen

Zur Vorbereitung wurden Zellkulturflaschen (75 cm<sup>2</sup>) mit 1 ml Poly-L-Lysin (0,1 mg/ml) beschichtet und mit Zusatz von 9 ml Aqua dest. bei 37° C und 5 % (v/v) CO<sub>2</sub> 90 min inkubiert. Anschließend wurden die Flaschen dreimal mit Aqua dest. gewaschen und mit 9 ml Kulturmedium befüllt.

Die Tiere wurden mit einer Schere tierschutzgesetzeskonform dekapitiert und der Kopf auf einer Platte fixiert. Unter aseptischen Bedingungen wurden nacheinander die Kopfhaut und die Schädelkalotte entfernt und das Gehirn in eine Petrischale mit eiskühlem HBSS mit Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup> gegeben. Anschließend wurden das Kleinhirn abgetrennt und die Hirnhäute abgezupft. Je 3-5 Gehirne wurden in 15 ml-Röhrchen mit HBSS mit Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup> (4° C) gesammelt.

Anschließend wurden diese dreimal mit HBSS ohne Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup> gespült und mit 1 ml Trypsin (2,5 %)/DNase-Lösung bei 37° C 5 min inkubiert, um die Kontakte der Zellen zueinander zu lösen. Danach wurde HBSS ohne Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup> hinzugegeben, abgesaugt und 100 µl DNase hinzugegeben. Durch mehrfaches Pipettieren mittels Pasteurpipette wurden die Gehirne in Suspension gebracht und nach Zugabe von HBSS mit Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup> zentrifugiert (10 min, 800 x g). Die Suspension wurde in die mit Poly-L-Lysin beschichteten Kulturflaschen mit 9 ml Medium überführt.

Um den Detritus zu entfernen, wurde die Kultur zwei Tage nach der Präparation dreimal mit HBSS ohne Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup> gespült und neues Medium hinzugegeben. Aufgrund der gewählten Kulturbedingungen konnten so selektiv Astrozyten und Mikroglia angereichert werden. Nach ca. 10 Tagen waren Mikroglia in ausreichender Zahl vorhanden und konnten mechanisch von dem Astrozytenrasen abgeschüttelt werden. Dieser Vorgang wurde nach einigen Tagen wiederholt.

Die Kultivierung von A375, Mikroglia und Astrozyten erfolgte in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)-Kulturmedium. Die Glioblastomzelllinie LN229 wurde in RPMI-Medium kultiviert. Der pH-Wert der verwendeten Medien wurde auf 7.36 bis 7.4 eingestellt. Die Lagerung der Zellen erfolgte im Brutschrank bei 37° C und 5 % (v/v) CO<sub>2</sub>. Bei 80-90 % Konfluenz wurden die Zellen passagiert. Zunächst wurde das Medium abgesaugt und die Zellen anschließend mit 7 ml phosphatgepufferter Salzlösung (DPBS, Dulbeccos's Balanced Salt Solution) gewaschen, um Mediumrückstände und Zellreste zu entfernen. Anschließend wurden 2 ml Trypsin/EDTA-Lösung gleichmäßig verteilt und bei 37° C 5 min inkubiert, wodurch die Zellen abgelöst werden konnten. Nachfolgend wurde 5 ml Kulturmedium hinzugegeben, auf der Oberfläche verbliebene Zellen durch mehrfaches Hochpipettieren des Mediums abgelöst und in 15-ml-Röhrchen zentrifugiert (5 min, 800 x g). Das Zellpellet wurde nach Absaugen des Überstandes in 1 ml

Kulturmedium resuspendiert und die gewünschte Zelldichte in eine neue mit 10 ml Medium gefüllte Kulturflasche hinzugegeben.

### **3.6.2 Herstellung und Kultivierung von 3D-Sphäroiden**

Für die Bildung von Sphäroiden wurde die *Liquid-overlay*-Methode verwendet, in der die Zellen in eine Vertiefung mit einer non-adhärenenten Oberfläche (hier: 4 % Agarose) gegeben wurden [185]. Hierzu wurden zunächst Vertiefungen einer 96-Lochplatte-Platte mit 4 %iger (w/v) Agarose unter sterilen Bedingungen beschichtet. Der Zellbestand einer Kulturflasche (Zelllinie oder Astrozyten) wurde hierzu gelöst, in 15 ml-Röhrchen 5 min bei 800 x g zentrifugiert, in Medium gelöst und in der Neubauer-Zählkammer die Zellzahl bestimmt. Abgeschüttelte Mikroglia wurden von ihrer Zellkultur getrennt und mit dem Medium in 15-ml-Röhrchen überführt und anschließend zentrifugiert. Da die Mikroglia sich nicht als sichtbares Pellet absetzen, wurde das Medium bis auf 1 ml abgesaugt und auch mittels Zählkammer die Zellzahl bestimmt.

Anlehnend an die Angaben aus der Literatur wurde für die Versuche eine definierte Zellzahl prozentual mit 5, 10, 15 und 30 % Astrozyten oder Mikroglia gemischt [77,155]. Insgesamt wurde eine Zellzahl von 20 000 Zellen für die Versuche der Lebendzellmikroskopie und Durchflusszytometrie und 100 000 Zellen pro Vertiefung für die Schnitte und Färbungen erzielt. Die Vertiefungen wurden anschließend auf 200 µl mit Medium aufgefüllt.

### **3.7 Behandlung mit Cannabinoiden**

Für die Behandlung der Kokulturen aus Tumorzelllinie und Astrozyten bzw. Mikroglia wurden THC (5 µM), CBD (5 µM) und eine äquimolare Kombination beider Cannabinoide verwendet [186]. Die Cannabinoide wurden vor dem Ausplattieren zur Zell-Suspension hinzugegeben. Die gewählten Konzentrationen wurden in früheren Untersuchungen etabliert [26] (Abb. 2).

Ebenso wurden unbehandelte Kontrollgruppen mitgeführt, in denen sowohl Zelllinien mit Gliazellen als auch reine Astrozyten unbehandelt blieben. Aus Vorarbeiten war bekannt, dass Mikroglia ohne Kontakt zu Astrozyten nicht länger als 72 h überleben, sodass reine Mikroglia nicht als Kontrollgruppe mitgeführt werden konnten.

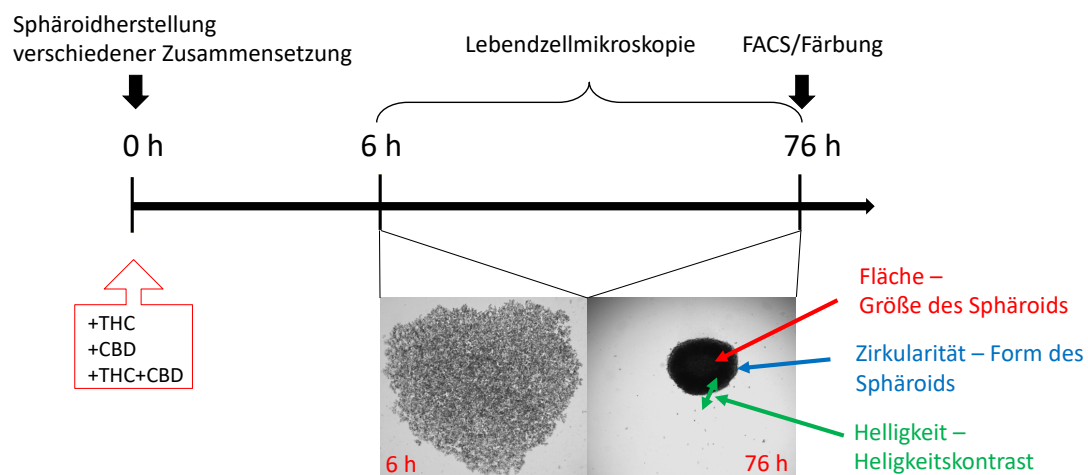
### 3.8 Lebendzellmikroskopie

Die Lebendzellmikroskopie wurde mit dem Mikroskop Leica DMi8 durchgeführt, welches über den gesamten Aufnahmezeitraum konstante Inkubationsbedingungen von 37° C und 5 % (v/v) CO<sub>2</sub> gewährleistet. Es wurde ein 4-Fach-Phasenkontrast-Objektiv verwendet. Nach einer 6-stündigen Vorinkubation wurden die Positionen der einzelnen Zellaggregate markiert. Von den markierten Positionen wurden schließlich im Abstand von 15 min über 72 h Aufnahmen generiert.

### 3.9 Durchflusszytometrie

Zur Vorbereitung wurden die Sphäroide in ein 15-ml-Röhrchen übertragen. Anschließend wurden 3 ml PBS hinzugegeben und nach Zentrifugation bei 800 x g (5 min) der Überstand abgesaugt. Zum Lösen der Zellkontakte wurde dann 1 ml Trypsin/EDTA hinzugegeben und 5 min bei 37° C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und mit 1 ml PBS in ein FACS-Röhrchen übertragen. Die Messung erfolgte am MACS Quant® 10.

Zur Identifizierung von toten Zellen wurde direkt vor Messung der Probe automatisiert 1 µl/ml Propidiumiodid (PI) hinzugegeben. PI dringt nur in Zellen mit perforierter Membran ein und färbt Zellen in der Spätphase der Apoptose oder gar Nekrose.



**Abbildung 2** Zeitlicher Ablauf und Aufbau des Versuchs. Mit dem Ausplattieren der Zellen wurden Cannabinoide hinzugegeben und die Aufnahme nach sechsstündiger Inkubationszeit in der Lebendzellmikroskopie gestartet. Nach 76 h erfolgte dann die Analyse mittels FACS und/oder die Fixierung für die Fluoreszenzfärbung. In farbiger Schrift sind die für die Lebendzellmikroskopie wichtigen Parameter skizziert.



### **3.10 Hellfeld- und Fluoreszenzmikroskopie**

#### **3.10.1 Fixierung und Anfertigung von Schnitten aus Sphäroidkulturen**

Zur Vorbereitung des Schneidens der Sphäroide wurde nach Absaugen des Überstandes am Ende der 72-stündigen Aggregationszeit in jede Vertiefung der Lochplatte vorsichtig Paraformaldehyd (PFA) (4 % (v/v)) gegeben und die Platte luftdicht mit Parafilm verschlossen. Die Lagerung konnte daraufhin bei 4° C erfolgen.

Zur Anfertigung der Kryoschnitte wurde die PFA-Lösung sukzessive (jeweils nach 24 h) durch eine 10, 20 bzw. 30 %ige (w/v) Saccharose-Lösung ersetzt.

Anschließend wurden die Sphäroide in Tissue-Tek® bei -21° C eingebettet. Mittels eines Kryomikrotoms wurden bis zu drei Schnitte mit einer Dicke von 12 µm angefertigt und auf einem Adhäsions-Objektträger fixiert. Die Lagerung erfolgte bei -20° C.

#### **3.10.2 Fluoreszenzfärbungen**

Für die Färbungen wurden die Objektträger ca. 20 min bei Raumtemperatur aufgetaut und getrocknet, bevor sie für 10 min mit PBS/Triton gespült wurden. Anschließend wurde 1:20 in PBS/Triton verdünntes *normal goat serum* (NGS) für 30 min auf die Schnitte pipettiert. Danach wurden die Schnitte mit dem primären Antikörper (ggf. auch gleichzeitig mit einem zweiten primären Antikörper), verdünnt in 0,5 % (w/v) BSA in 0,02 M PBS/Triton, über Nacht bei Raumtemperatur lichtgeschützt inkubiert (Tab. 10). Am darauffolgenden Tag wurde dreimalig für 10 min mit PBS/Triton gespült und der entsprechende sekundäre Antikörper (mit Fluoreszenzfarbstoff konjugiert) bzw. ein zweiter Primärantikörper (bei A375) hinzugegeben (Tab. 10).

In Abhängigkeit vom Ziel der aktuellen Färbung wurden nach jeweils dreimaliger Spülung mit PBS/Triton dann PI und DAPI für 30 bzw. 5 min auf die Schnitte gegeben und anschließend in *Fluorescence Mounting Medium* eingedeckt. PI dient der Darstellung von Zellkernen toter Zellen, und DAPI erlaubt eine Kernmarkierung aller Zellen. Die Lagerung erfolgte lichtgeschützt bei 4° C.

##### Färbung der Mikroglia mittels Isolektin B4 (IB4)

Die Visualisierung der Mikroglia erfolgte mittels Isolektin B4 (IB4). IB4 bindet an α-D-Galaktosylreste auf der Oberfläche von Mikroglia. Es wurde in einer Verdünnung von 1:50 in PBS/Triton auf die Schnitte pipettiert.

**Tabelle 10** Übersicht der verwendeten Antikörper und Lektine bei den Versuchsgruppen

Versuch	Primäre Antikörper	Sekundäre Antikörper	Sonstige Markierungen
LN229 und Astrozyten	anti-Nukleus clone 235-1	Alexa 488	PI DAPI
A375 und Astrozyten	anti-GFAP Anti-Tyrosin-Hydroxylase	Alexa 633 Alexa 488	PI DAPI
LN229 und Mikroglia	Anti-Nukleus clone 235-1 IB4	Alexa 568 (bei Bestimmung der Verteilung) Alexa 350 (bei Bestimmung der Todesrate)	DAPI (bei Bestimmung der Verteilung) PI (bei Bestimmung der Todesrate und Morphologie)
A375 und Mikroglia	Anti-Tyrosine-Hydroxylase	Alexa 568 (bei Bestimmung der Verteilung) Alexa 350 (bei Bestimmung der Todesrate) IB4	DAPI (bei Bestimmung der Verteilung) PI (bei Bestimmung der Todesrate und Morphologie)

### 3.11 Auswertung

#### 3.11.1 Lebendzellmikroskopie

Die Auswertung der Lebendzellmikroskopieaufnahmen wurde in Kooperation mit Dr. Tim Hohmann durchgeführt. Mit Hilfe eines mit MatLab (The Math Works, Natick, USA) geschriebenen Programmes wurden Fläche, Zirkularität und Helligkeit der Sphäroide analysiert. Das Programm ermöglicht die Kantendetektion mithilfe der Chan-Vese-Bildsegmentierung [187], sodass die Größenänderung des Sphäroids über den Zeitverlauf beobachtet werden konnte. Hierbei ergibt sich die Fläche aus der Anzahl der vom Sphäroid eingenommenen Pixel. Die Zirkularität beschreibt die Form eines Sphäroids, wobei das Verhältnis zwischen Sphäroid und der Kreisform errechnet wurde als:

$$c = 4 \cdot \pi \cdot A / U^2$$

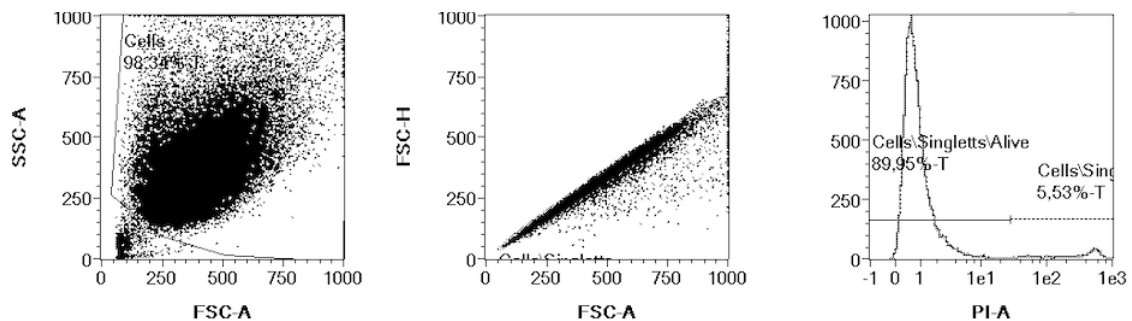
Mit der Zirkularität  $c$ , der Sphäroidfläche  $A$  und dem assoziierten Umfang  $U$ . Für die Helligkeit wurde der Kontrast zum Hintergrund als Norm genommen, welcher als Grundlage für die Berechnung diente. Diese Analyse gibt Aufschluss über die Zellbeschaffenheit und Aggregationsdynamik der Sphäroide sowie die damit verbundene Kompaktheit. Als Grundlage für die Berechnung der Parameter gilt die Arbeit von Hohmann et al. [188]. Tab. 11 gibt Aufschluss über die mögliche Bedeutung der Parameter.

**Tabelle 11** Bedeutung der in der Lebendzellmikroskopie verwendeten Parameter

Parameter	Interpretation
Fläche	Zelladhäsion, Zellmigration
Zirkularität	Zelladhäsion
Helligkeit	Zelldichte, Zytoplasmabeschaffenheit

### 3.11.2 Durchflusszytometrie

Im FACS wurden zunächst das Vorwärtsstreulicht (Forward Scatter, FSC) und das Seitwärtsstreulicht (Side Scatter, SSC) so eingestellt, dass die Zellpopulation zentral im Plot dargestellt wurde. Anschließend wurden die Einzelzellen ermittelt und nach dem Kriterium der PI-Positivität sortiert sowie dank der GFP-Markierung Mikroglia identifiziert (Abb. 3). Signale, die aus dem *Gating* fielen, wurden als Detritus eingestuft. Sowohl tote als auch lebendige Mikroglia konnten zudem gesondert erfasst und von der Zelllinie unterschieden werden. Eine Unterscheidung von Astrozyten und Tumorzelllinie mittels FACS allein anhand der Populationsaufteilung war nicht möglich.



**Abbildung 3** Exemplarische Gating-Strategie. Darstellung der Identifizierung von lebendigen und toten (PI-positiven) Einzelzellen in einem Versuch mit A375 und Astrozyten mit Cannabinoidbehandlung. Exkludierung von Detritus, Identifizierung von Zellen, dann PI-positiver Zellen (von links nach rechts).

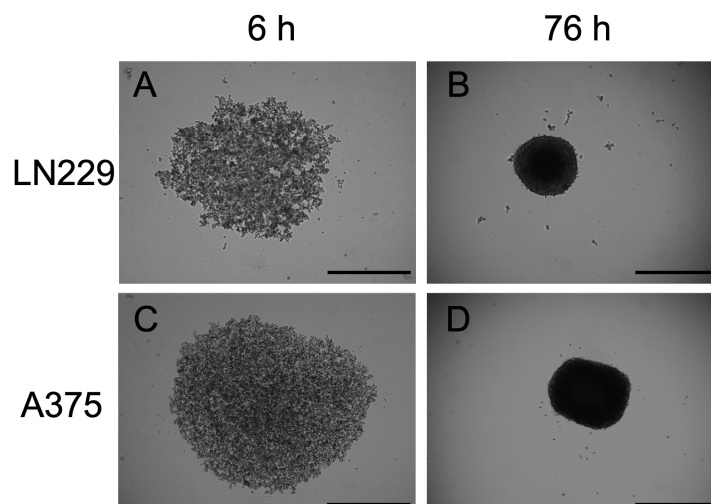
### 3.11.3 Statistische Auswertung

Die Daten stammen aus mindestens drei unabhängigen Versuchen. Mittels GraphPad wurden die Mittelwerte und der Standardfehler des arithmetischen Mittels (SEM) berechnet und angegeben sowie Graphen erstellt. Der statistische Unterschied zwischen mehreren nicht verbundenen Datensätzen wurde mit dem einseitigen ANOVA-Test und dem Tukey-Post-Test ermittelt, was die hier zugrunde liegende ähnliche Gruppengröße voraussetzte. Als Voraussetzung für die Auswertung wurde mittels Bartlett-Tests auch die Varianzhomogenität geprüft. Ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen wurde angenommen, wenn der  $\alpha$ -Fehler kleiner als 5 % war ( $p < 0,05$ ). Die Kennzeichnung signifikanter Unterschiede erfolgte mittels eines Sterns (\*). Relative Änderungen sind in den Graphiken immer auf die Kontrollgruppe normiert. Die angegebenen exakten p-Werte und Grenzwerte ( $p < 0,05$  und  $p \geq 0,05$ ) sind nicht als binäre Aussagen bezüglich einer inhaltlichen Signifikanz zu interpretieren, sondern als Hinweise, die eine tiefere Untersuchung als nützlich erscheinen lassen [189,190].

## 4 Ergebnisse

### 4.1 LN229 und A375 als geeignete Zelllinien zur Untersuchung der Sphäroidbildung

In der vorliegenden Arbeit gelang eine Etablierung von Kokulturen aus humanen Zelllinien und murinen Gliazellen. Dabei wurden die Glioblastomzelllinie LN229 und die Melanomzelllinie A375 verwendet. Die humane Melanomzelllinie A375 exprimiert sowohl CB<sub>1</sub> als auch CB<sub>2</sub> [115], und selbiges gilt auch für die Glioblastomzelllinie LN229 [191,192]. Beide Zelllinien hatten die Fähigkeit, über drei Tage zu aggregieren und Sphäroide mit vitalen Zellen zu bilden. In dem Versuchsmodell befanden sich die meisten Zellen in der G<sub>0</sub>-Phase, sodass Proliferation keinen Einfluss auf die Beobachtungen hatte [193]. Betrachtet man die Unterschiede zwischen den Zelllinien hinsichtlich der Sphäroidbildung, fällt auf, dass LN229 sich dreidimensional anordneten, während A375-Zellen sich zwar ebenso verhielten, jedoch tendenziell eine diskusartige Struktur formten (Abb. 4 A-D).



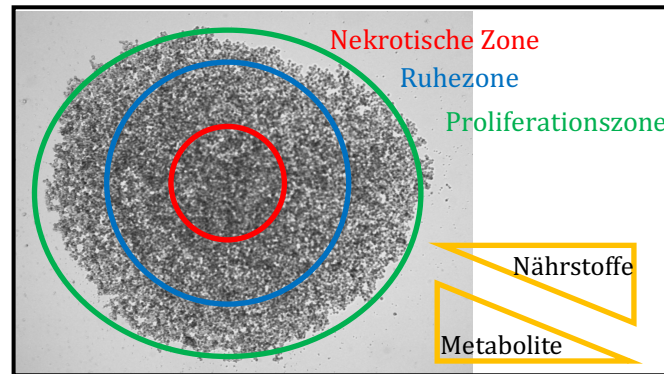
**Abbildung 4** Zellaggregate der Zelllinien in der Lebendzellmikroskopie. Aggregate aus 20 000 Zellen von LN229 (A, B) und A375 (C, D) nach 6 bzw. 76 h in der Lebendzellmikroskopie. LN229 und A375 bildeten Sphäroide, die im weiteren Verlauf genauer untersucht werden konnten. Maßstab=50 µm.

#### 4.1.1 Sphäroidmorphologie und Zelltod

Zur Beurteilung der Morphologie und Todesrate wurden aus Sphäroiden mit 100 000 Zellen Schnitte und anschließend Fluoreszenzfärbungen angefertigt. Dabei wurden repräsentative Schnitte gewählt, die in etwa den Querschnitt des Zentrums eines Sphäroids enthielten. Zwischen den verschiedenen Versuchsgruppen derselben Zelllinie konnten keine eindeutigen Unterschiede oder übereinstimmende Muster festgestellt werden (Abb. 6).

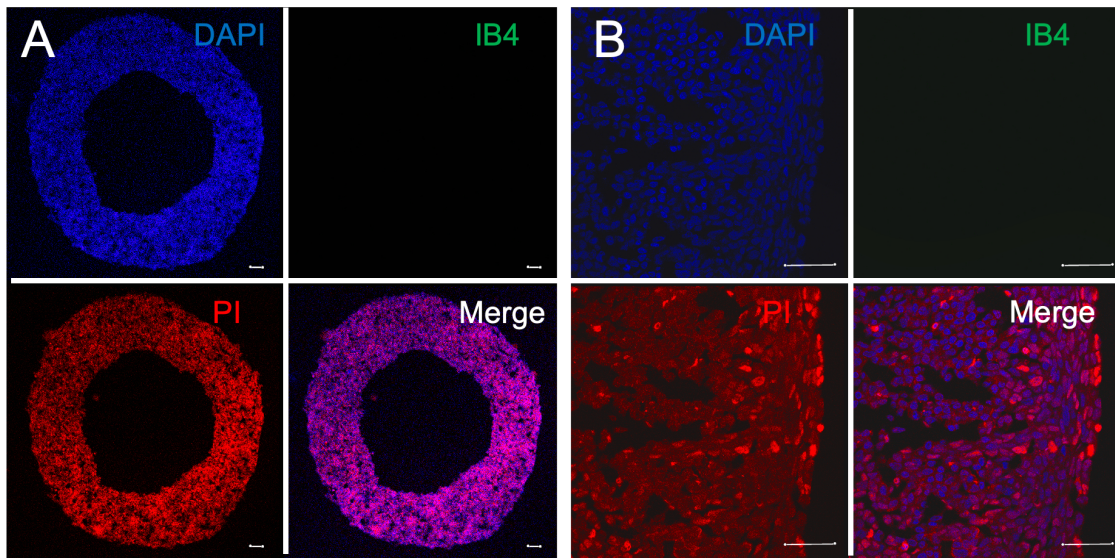
In den Versuchen mit LN229 fand sich ein in der Regel gut erhaltener Zellverband. Auffallend war zudem das häufig vorkommende nekrotische Zentrum, in dem keine

Zellen mehr vorhanden waren (Abb. 5). Dies wurde bereits beschrieben [194]. Bei Sphäroiden mit der Melanomzelllinie A375 konnten weder abgeflachte Zellen am Rand noch ein hohles Zentrum beobachtet werden (Abb. 6). Allerdings bestand ein wesentlicher Unterschied in der im Vergleich zu den Sphäroiden mit LN229 lockereren Zellformation.

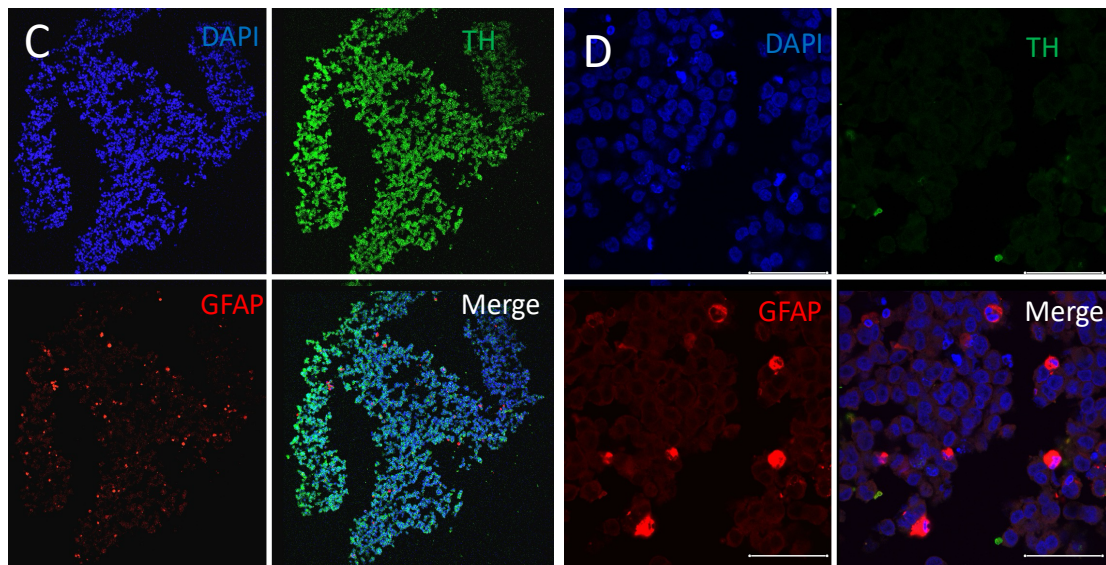


**Abbildung 5** Modellhafte Darstellung eines Sphäroids mit nekrotischer Zone (rot), Ruhezone (blau) und Proliferationszone (grün). Die Verteilung von Metaboliten und Nährstoffen ist von innen nach außen inhomogen. Metaboliten sind zentral am stärksten vertreten, während Nährstoffe peripher in höherer Konzentration vorkommen.

## LN229



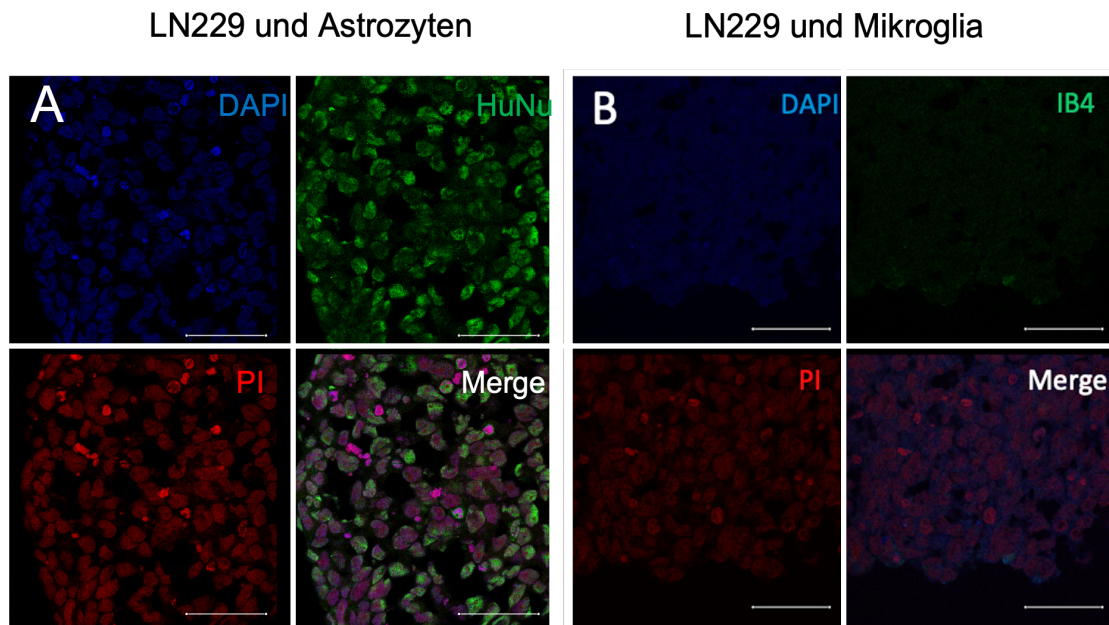
## A375



**Abbildung 6** Fluoreszenzfärbung aus Schnitten der Tumorzellen. LN229 zeichnet sich durch ein nekrotisches Zentrum aus (A). In größerer Vergrößerung wurden PI-positive, teilweise abgeflachte Zellen identifiziert (B). A375 zeichnet sich durch einen lockereren Zellverband (C) aus, und Astrozyten (GFAP-positive Zellen) sind vorzufinden (D). Maßstab=50  $\mu\text{m}$ .

Dank der verwendeten PI-Färbung konnten tote Zellen identifiziert und auch das überwiegende Überleben der Zellen in Kokultur und unter den Versuchsbedingungen bestätigt werden. Die PI-Markierung ermöglichte eine qualitative Analyse. Die PI-Färbung zeigte keinen signifikanten Einfluss der verschiedenen Behandlungen. Insgesamt bestätigte das verwendete Versuchsmodell ein Überleben der Mehrheit der Zellen, sowohl der Zelllinien als auch der aus Mäusen gewonnenen Gliazellen.

In den Versuchen mit LN229 wurden tote Zellen klar identifiziert (Abb. 7). Allerdings befanden sich in Sphäroiden aus A375 keine PI positiven Nuklei.



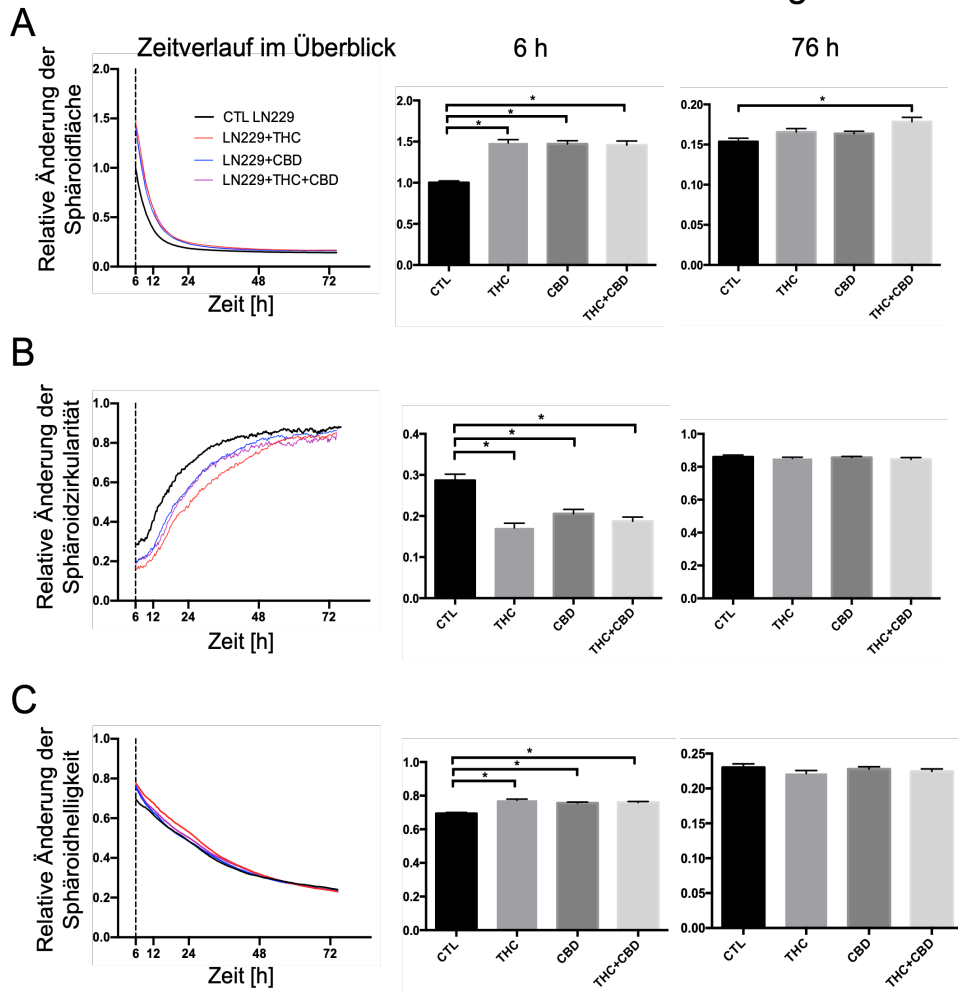
**Abbildung 7** Fluoreszenzfärbungen nach Etablierung von LN229-Kokulturen mit Gliazellen. In LN229-Astrozyten-Kokulturen (A) überlebten die meisten Zellen, da die überwiegende Mehrheit der Zellen nicht PI-positiv war. Ein ähnliches Bild ergab sich bei LN229-Mikroglia-Kokulturen (B). Maßstab=50  $\mu$ m.

#### 4.2 Einfluss von Cannabinoiden auf die Sphäroidbildung und Todesrate von LN229 und A375

Um den Einfluss von Cannabinoiden auf die Sphäroidbildung von LN229 und A375 zu untersuchen, wurden die Zellen über den gesamten Betrachtungszeitraum mit THC oder CBD einzeln oder in äquimolarer Kombination behandelt. Die Sphäroidfläche von LN229 vergrößerte sich zu Beginn der Messungen (6 h) durch Zugabe von THC, CBD und die Kombination aus THC und CBD signifikant, blieb jedoch nur für die Kombinationsbehandlung nach 76 h erhalten (Abb. 8A). Die Zirkularität wurde durch alle Behandlungen signifikant reduziert, wobei dieser Effekt bei 76 h nicht erkennbar war (Abb. 8B). Auch die Helligkeit war durch THC und CBD nach 6 h erhöht, jedoch nicht nach 76 h (Abb. 8C).

Bei der Behandlung von A375 mit Cannabinoiden zeigte sich ebenso eine Vergrößerung der Fläche nach 6 h bei sämtlichen Behandlungsgruppen (Abb. 9A). Nach 76 h war der Effekt bei der Behandlung mit CBD allein und in Kombination mit THC erhalten, wobei es zu einer Verstärkung des Effektes bei der äquimolaren Behandlung kam (Abb. 9A). Keine Veränderungen zeigten sich nach 6 h bei der Zirkularität und nach 76 h, außer bei simultaner Behandlung mit THC und CBD nach 76 h (Abb. 9B). Bezüglich der Helligkeit gab es zu keinem der Zeitpunkte signifikante Veränderungen (Abb. 9C).

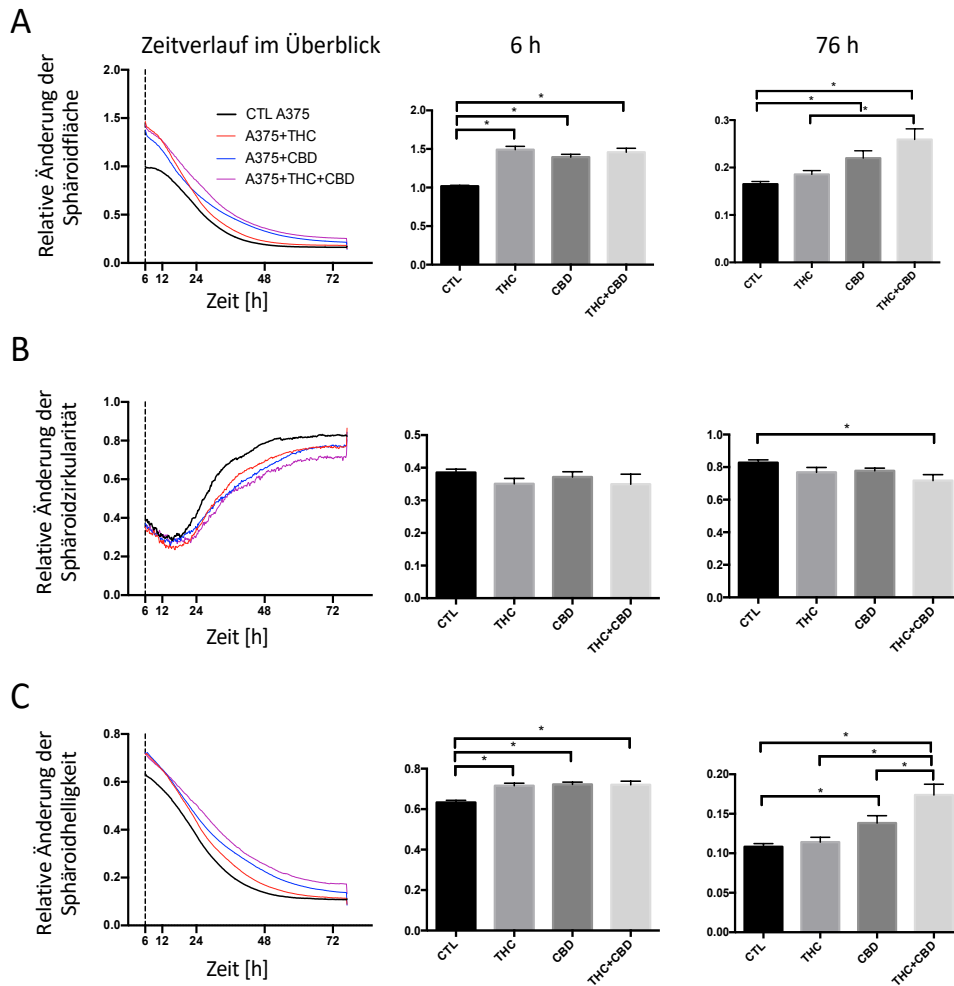
## LN229 mit Cannabinoidbehandlung



**Abbildung 8** LN229 mit Cannabinoidbehandlung; Relative Änderung (A) der Sphäroidfläche, (B) der Sphäroidzirkularität, (C) der Sphäroidhelligkeit; jeweils Darstellung der Zeitpunkte nach 6 und 76 h. Signifikante Ergebnisse zeigten sich zu Beginn des Versuches nach 6 h bei allen Parametern und bei allen Cannabinoidbehandlungen. Der Stern (\*) markiert signifikante Effekte ( $p < 0,05$ ).

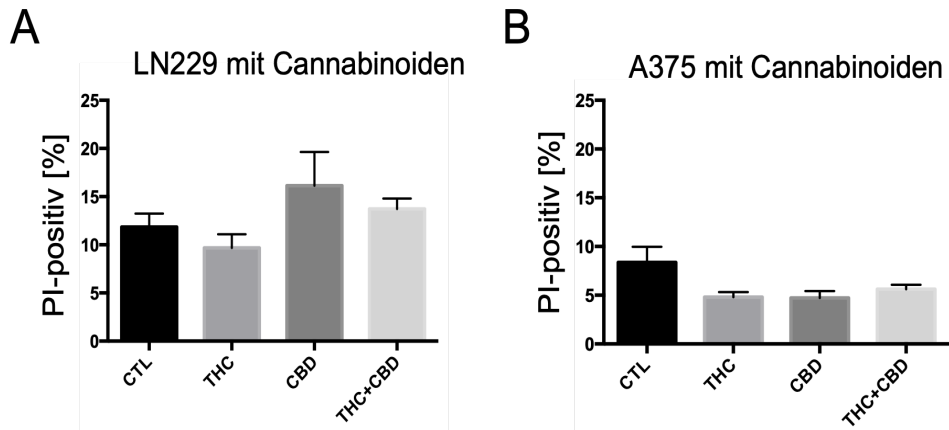


## A375 mit Cannabinoidbehandlung



**Abbildung 9** A375 mit Cannabinoidbehandlung; Relative Änderung (A) der Sphäroidfläche, (B) der Sphäroidzirkularität, (C) der Sphäroidhelligkeit; jeweils Darstellung der Zeitpunkte nach 6 und 76 h. Signifikante Effekte zeigten sich insbesondere bei Fläche und Helligkeit zu beiden Beobachtungszeitpunkten. Der Stern (\*) markiert signifikante Effekte ( $p < 0,05$ ).

Da die Sphäroidgröße abhängig von der Zellzahl ist, wurden zusätzlich Effekte auf das Zellüberleben analysiert. Insgesamt sorgte die Behandlung mit Cannabinoiden bei der Melanomzelllinie A375 und Glioblastomzelllinie LN229 für keine signifikanten Effekte auf den Anteil der PI-positiven Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abb. 10). Die Kontrollgruppen der Glioblastomzelllinie LN229 und der Melanomzelllinie A375 hatten einen Anteil von ca. 12 % (Abb. 10A) beziehungsweise 8 % (Abb. 10B) PI-positiven Zellen. Die nicht signifikant veränderte niedrigere Todesrate zog sich durch die gesamte Versuchsreihe. Auffallend war zudem, dass die Gruppen mit A375 eine geringere Todesrate aufwiesen im Vergleich zu den Gruppen mit LN229 (Abb. 10).



**Abbildung 10** Prozentualer Anteil PI-positiver Tumorzellen nach Cannabinoidbehandlung (A) in LN229-Zellen; (B) in A375-Zellen. In keiner der Gruppen zeigten sich signifikante Effekte.

### 4.3 Einfluss von Astrozyten auf LN229 und A375 hinsichtlich der Sphäroidbildung und Todesrate

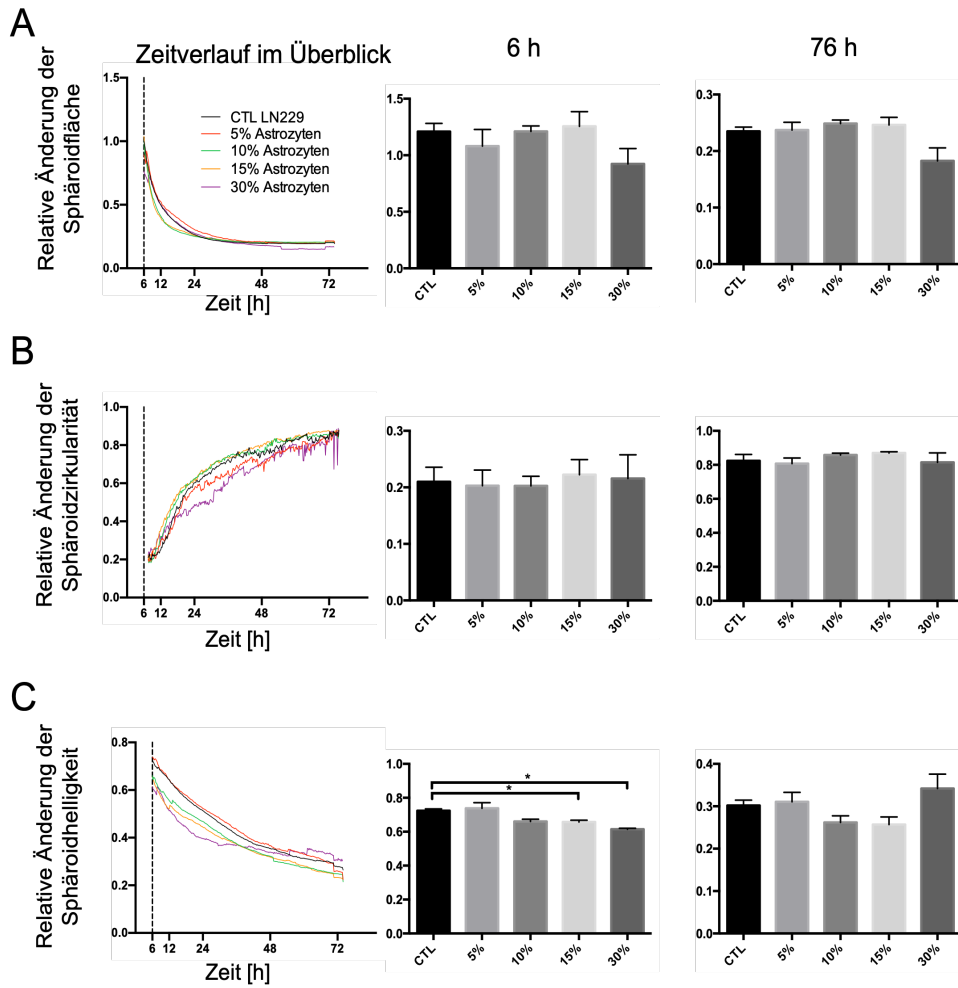
In der vorliegenden Arbeit wurden unterschiedliche prozentuale Anteile (5, 10, 15, und 30 %) an Astrozyten gewählt und deren Einfluss auf die Sphäroidbildung mittels Lebendzellmikroskopie und FACS untersucht.

Bei der Glioblastomzelllinie LN229 waren bezüglich der Helligkeit bei 6 h bei einem Astrozytenanteil von 15 und 30 % signifikante Unterschiede im Vergleich zur Kontrollgruppe zu erkennen (Abb. 11C). Dieser Unterschied zwischen den Gruppen war nach 76 h nicht mehr festzustellen (Abb. 11C). Ohne Veränderung blieben die Parameter Fläche und Zirkularität über den gesamten Beobachtungszeitraum (Abb. 11A und B).

Hingegen traten in Kokulturen von A375 und Astrozyten, unabhängig von ihrem Anteil, keine Effekte auf (Abb. 12). Lediglich eine erhöhte Helligkeit der Sphäroide konnte in Anwesenheit von Astrozyten nach 76 h festgestellt werden (Abb. 12C).

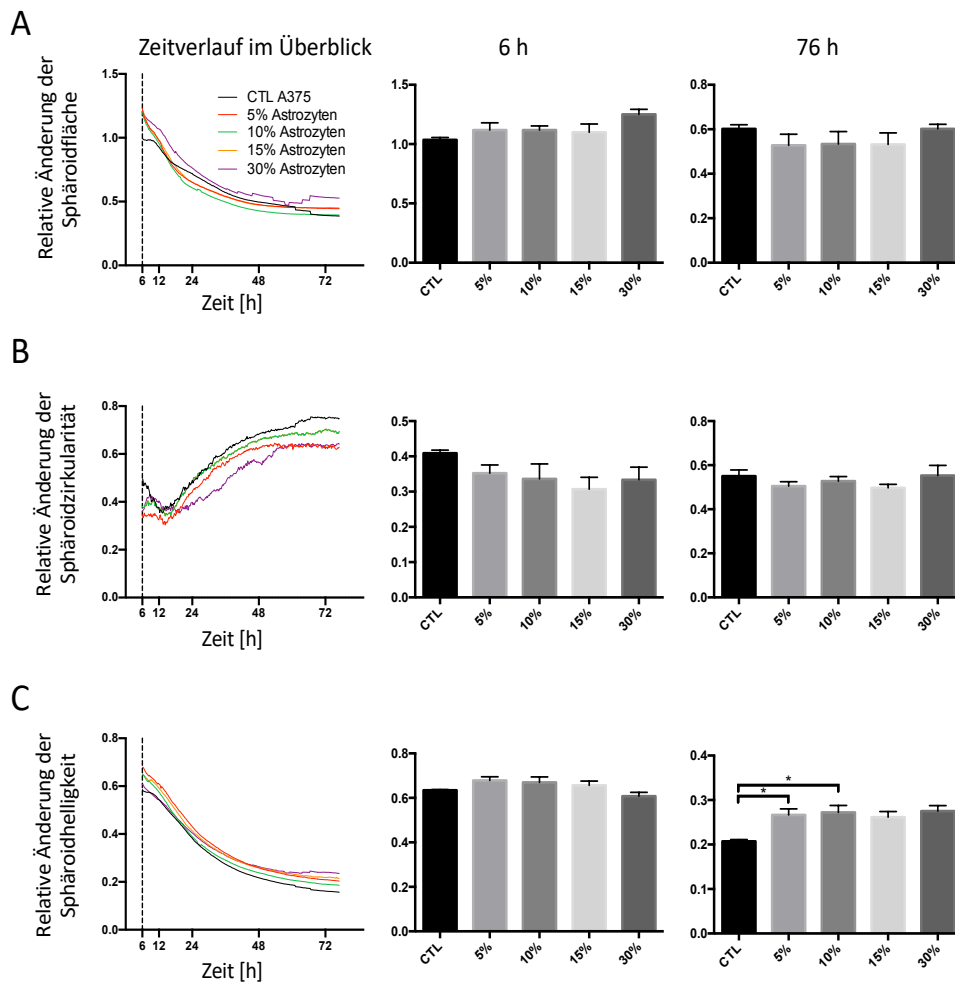
Aufgrund der erhobenen Ergebnisse und der sichtbaren Effekte in Bezug auf die Helligkeit bei LN229 und des Einflusses von 30 % Astrozyten im Vergleich zu den Ergebnissen bei 5 und 10 % wurde für beide Zelllinien ein Astrozytenanteil von 30 % für die nachfolgenden Versuche mit Cannabinoiden gewählt.

## LN229 und Astrozyten



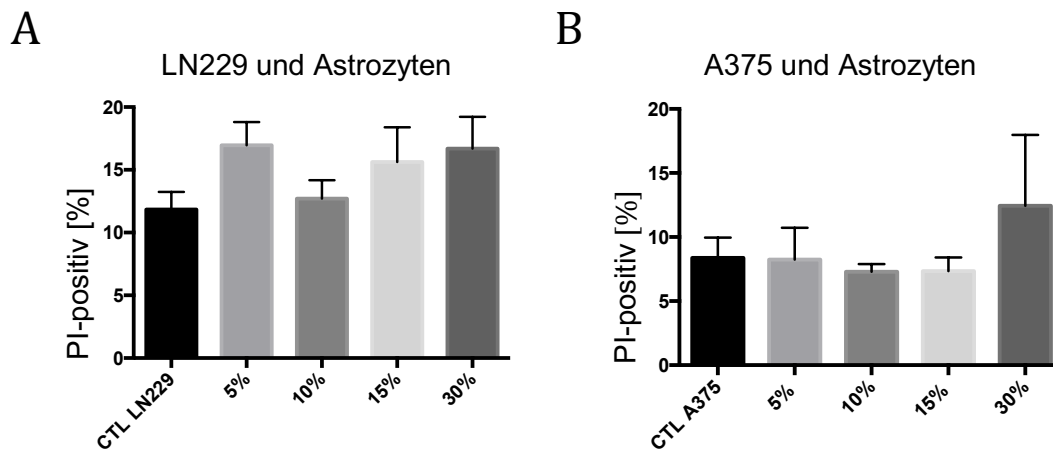
**Abbildung 11** LN229 und unterschiedliche Konzentrationen von Astrozyten; Relative Änderung (A) der Sphäroidfläche, (B) der Sphäroidzirkularität, (C) der Sphäroidhelligkeit; jeweils Darstellung der Zeitpunkte nach 6 und 76 h. Allein bei der Helligkeit bei 6 h zeigten sich signifikante Effekte bei 15 und 30 % Astrozyten. Der Stern (\*) markiert signifikante Effekte ( $p < 0,05$ ).

## A375 und Astrozyten



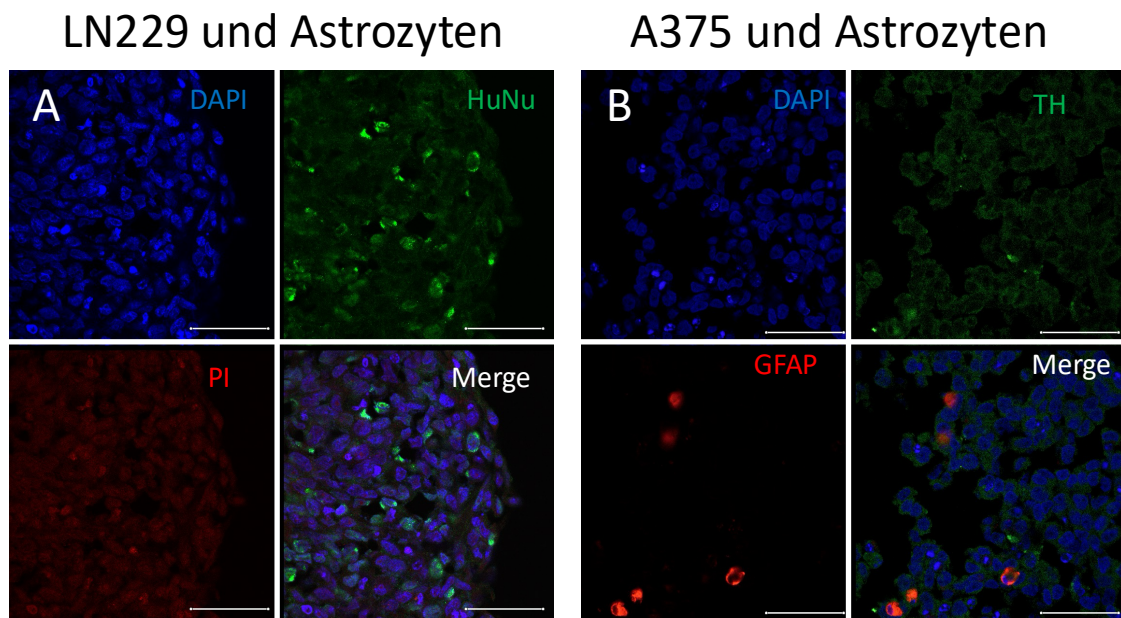
**Abbildung 12** A375 und unterschiedliche Konzentrationen von Astrozyten; Relative Änderung (A) der Sphäroidfläche, (B) der Sphäroidzirkularität, (C) der Sphäroidhelligkeit; jeweils Darstellung der Zeitpunkte nach 6 und 76 h. Alleinige bei der Helligkeit bei 76 h zeigten sich signifikante Effekte bei Zugabe von 5 und 10 % Astrozyten. Der Stern (\*) markiert signifikante Effekte ( $p < 0,05$ ).

Um zu überprüfen, ob unterschiedliche Anteile von Gliazellen direkte Effekte auf das Zellüberleben der untersuchten Tumor Zelllinien entfalten, wurden die Todesraten der Zellen in Sphäroiden analysiert. Insgesamt ergaben sich bei Zugabe verschiedener Konzentrationen keine signifikanten Veränderungen beim Anteil PI-positiver Zellen (Abb. 13). Im Vergleich zu den anderen Astrozytenkonzentrationen fällt bei A375 und 30 % Astrozyten ein Anteil von 13 % Todesrate auf, ohne allerdings das Signifikanzniveau zu erreichen (Abb. 13B).



**Abbildung 13** LN229 und A375 in Kokultur mit Astrozyten. Anteil der PI-positiven Zellen in (A) LN229 und (B) A375 mit verschiedenen Konzentrationen von Astrozyten. Hierbei konnten in keiner der Versuchsgruppen signifikante Unterschiede gemessen werden.

In den Versuchen mit LN229 wurden Astrozyten anhand ihrer Morphologie von Tumorzellen unterschieden, denn eine Identifizierung mittels eines spezifischen Antikörpers gelang nicht. Andererseits konnten in den Versuchen mit A375 GFAP als spezifischer Antikörper für Astrozyten verwendet und vergrößerte Somata identifiziert werden (Abb. 14B).



**Abbildung 14** Fluoreszenzfärbungen aus Tumorzellen und Astrozyten. (A) Bei der Kokultur aus LN229 und Astrozyten erfolgte ein indirekter Nachweis von Astrozyten allein über die DAPI-Färbung. (B) In Kokultur aus A375 und Astrozyten erfolgte der Nachweis von Astrozyten über GFAP. Maßstab=50  $\mu$ m.

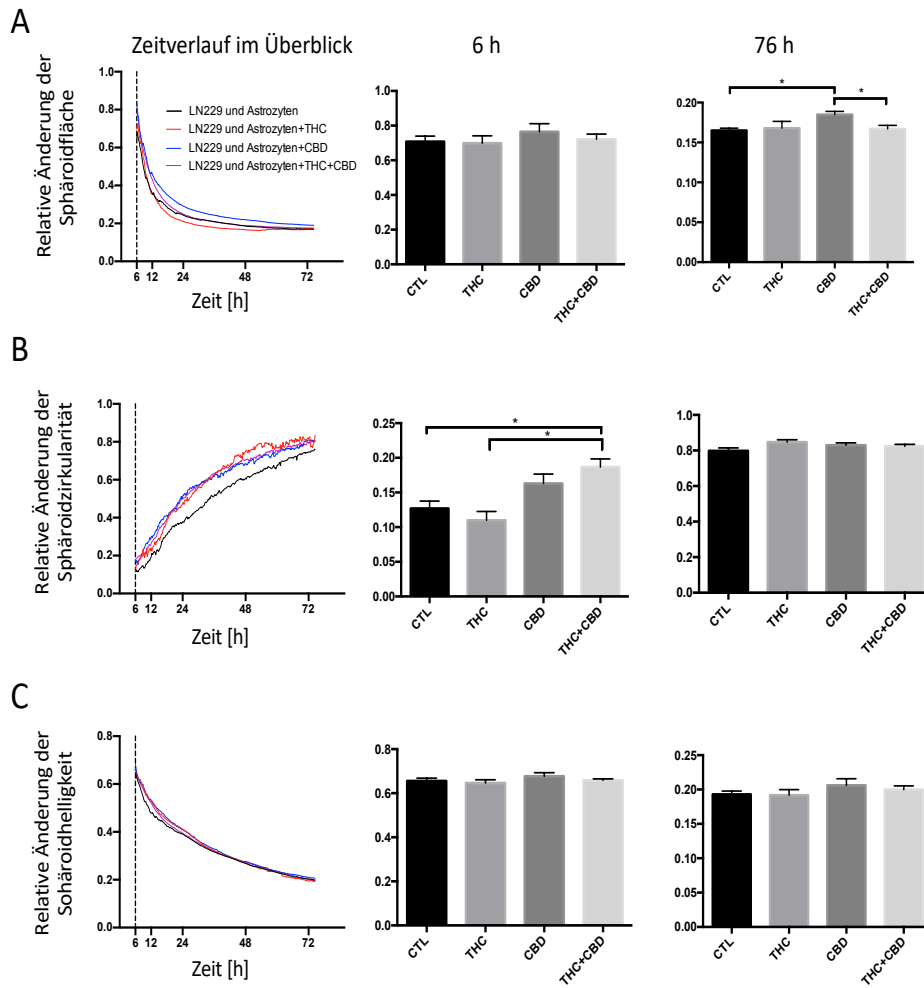
#### **4.4 Einfluss von Cannabinoiden auf Kokulturen mit Astrozyten**

Des Weiteren wurde untersucht, ob Cannabinoide auf Tumorzellen und Astrozyten einen Einfluss hinsichtlich der Sphäroidbildung haben.

Auf die Fläche der Kokultur aus LN229 und 30 % Astrozyten hatte die Behandlung mit Cannabinoiden bei 6 h keinen signifikanten Einfluss (Abb. 15A). Erst bei 76 h vergrößerte sich die Fläche von Sphäroiden, welche mit CBD behandelt wurden (Abb. 15A). Der Effekt von CBD wurde jedoch bei kombiniertem Einsatz mit THC signifikant aufgehoben (Abb. 15A). Bei der Zirkularität hingegen kam es nach 6 h bei simultaner Behandlung mit THC und CBD zu einer deutlichen Erhöhung (Abb. 15B). Die alleinige Applikation von THC oder CBD erzielte jedoch keinerlei Wirkung (Abb. 15B). Nach 76 h war dieser Effekt nicht mehr zu beobachten. Auf die Helligkeit der Sphäroide konnten keine Effekte beobachtet werden (Abb. 15C).

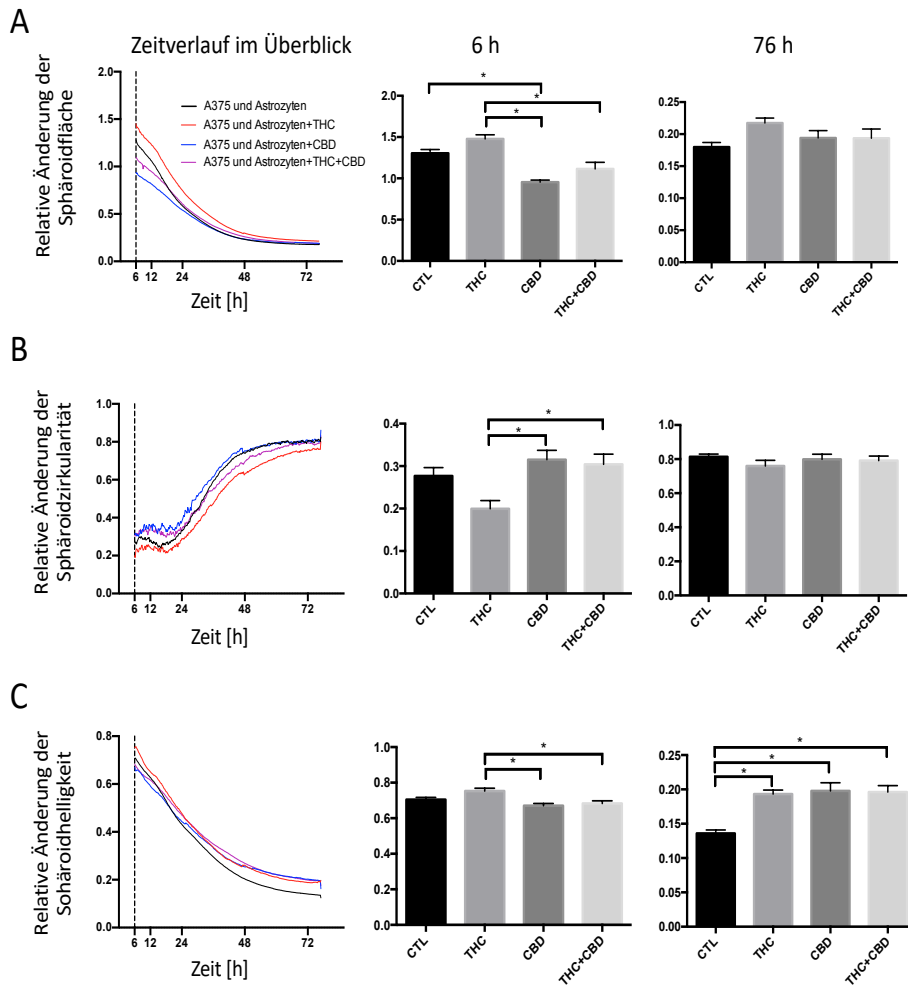
Bei A375 und 30 % Astrozyten in Kokultur verkleinerte sich bei der Behandlung mit CBD die Fläche signifikant im Vergleich zur Kontrollgruppe, was nach 76 h nicht mehr erkennbar war (Abb. 16A). Ebenso fand sich ein signifikanter Unterschied zwischen THC-Behandlung und Kombinationsbehandlung bei 6 h (Abb. 16A). Die Effekte waren nach 76 h nicht mehr vorhanden (Abb. 16A). Bei der Zirkularität waren sowohl nach 6 h als auch 76 h keine signifikanten Ergebnisse im Vergleich zur Kontrollgruppe vorhanden (Abb. 16B). Einzig die THC-Behandlung nach 6 h zeichnete sich durch eine signifikante Verringerung der Zirkularität im Vergleich zur CBD- und Kombinationsbehandlung aus (Abb. 16B). Ähnliche abnehmende Effekte wurden auch bei der Helligkeit beobachtet (Abb. 16C). Jedoch wurden in sämtlichen Behandlungsgruppen nach 76 h signifikant höhere Werte für die Helligkeit im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt (Abb. 16C).

## LN229 und Astrozyten mit Cannabinoidbehandlung



**Abbildung 15** LN229 und Astrozyten mit Cannabinoidbehandlung; Relative Änderung (A) der Sphäroidfläche, (B) der Sphäroidzirkularität, (C) der Sphäroidhelligkeit; jeweils Darstellung der Zeitpunkte nach 6 und 76 h. Signifikante Ergebnisse zeigten sich bei der Fläche nach 76 h sowie bei der Zirkularität zu Beginn der Beobachtung. Der Stern (\*) markiert signifikante Effekte ( $p < 0,05$ ).

## A375 und Astrozyten mit Cannabinoidbehandlung

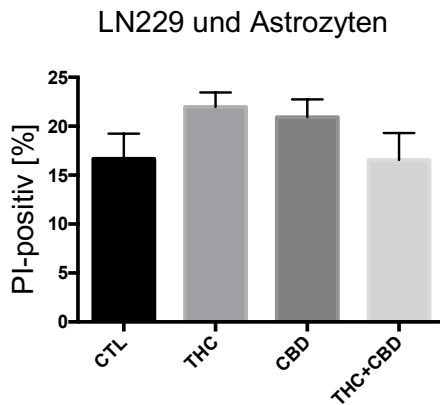


**Abbildung 16** A375 und Astrozyten mit Cannabinoidbehandlung; Relative Änderung (A) der Sphäroidfläche, (B) der Sphäroidzirkularität, (C) der Sphäroidhelligkeit; jeweils Darstellung der Zeitpunkte nach 6 und 76 h. Bei allen Parametern zeigten sich nach 6 h signifikante Effekte, und bei der Helligkeit waren auch nach 76 h signifikante Effekte in allen Behandlungsgruppen zu erkennen. Der Stern (\*) markiert signifikante Effekte ( $p < 0,05$ ).

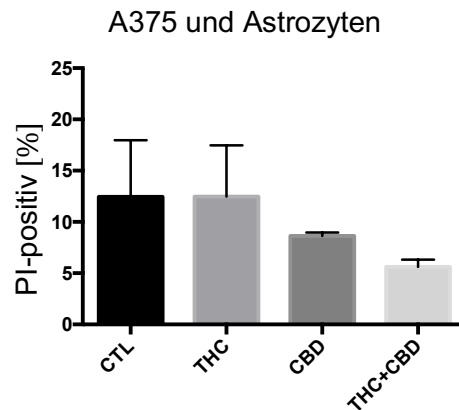
In der Kokultur aus LN229 und Astrozyten sowie A375 und Astrozyten hatte keine der Cannabinoidbehandlungen einen signifikanten Einfluss auf die Todesrate (Abb. 17).



A



B

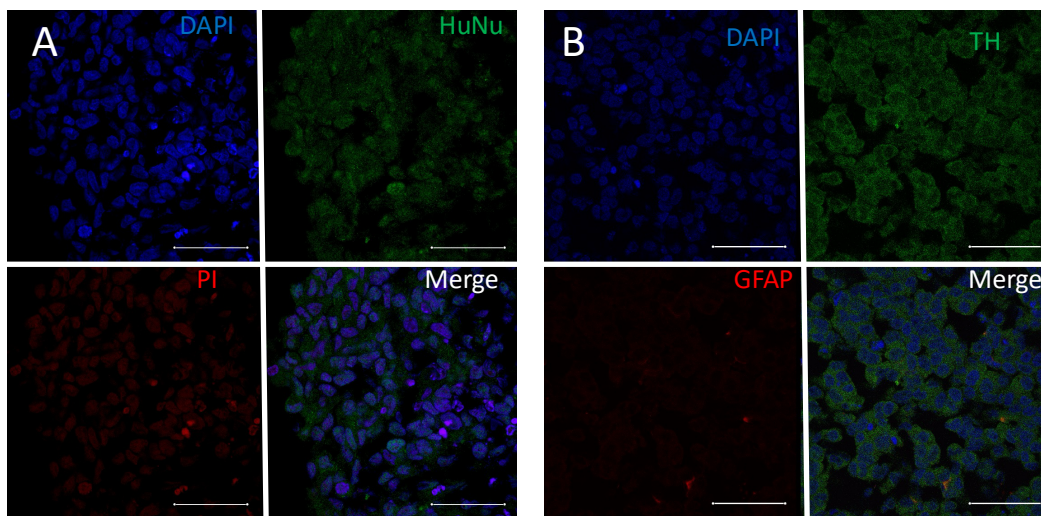


**Abbildung 17** FACS-Ergebnisse von Tumorzellen und Astrozyten nach Cannabinoidbehandlung; Ergebnisse der Kokultur aus (A) LN229 und aus (B) A375 mit Astrozyten und Cannabinoiden. Keine signifikanten Ergebnisse konnten beobachtet werden.

In Versuchen mit der Melanomzelllinie A375 wurden ebenfalls Astrozyten identifiziert (Abb. 18B). Dabei handelte es sich um reaktive GFAP-positive Astrozyten (Abb. 18B).

LN229 und Astrozyten+CBs

A375 und Astrozyten+CBs



**Abbildung 18** Fluoreszenzfärbungen von Tumorsphäroiden mit 100 000 Zellen nach Cannabinoidbehandlung. (A) Bei der Kokultur aus LN229 und Astrozyten mit Cannabinoiden (CBs) erfolgte ein indirekter Nachweis von Astrozyten über alleinige DAPI-Färbung, da Astrozyten durch HuNu nicht angefärbt wurden. (B) In Kokultur aus A375 und Astrozyten erfolgte der Nachweis von Astrozyten über GFAP. Maßstab=50  $\mu$ m.

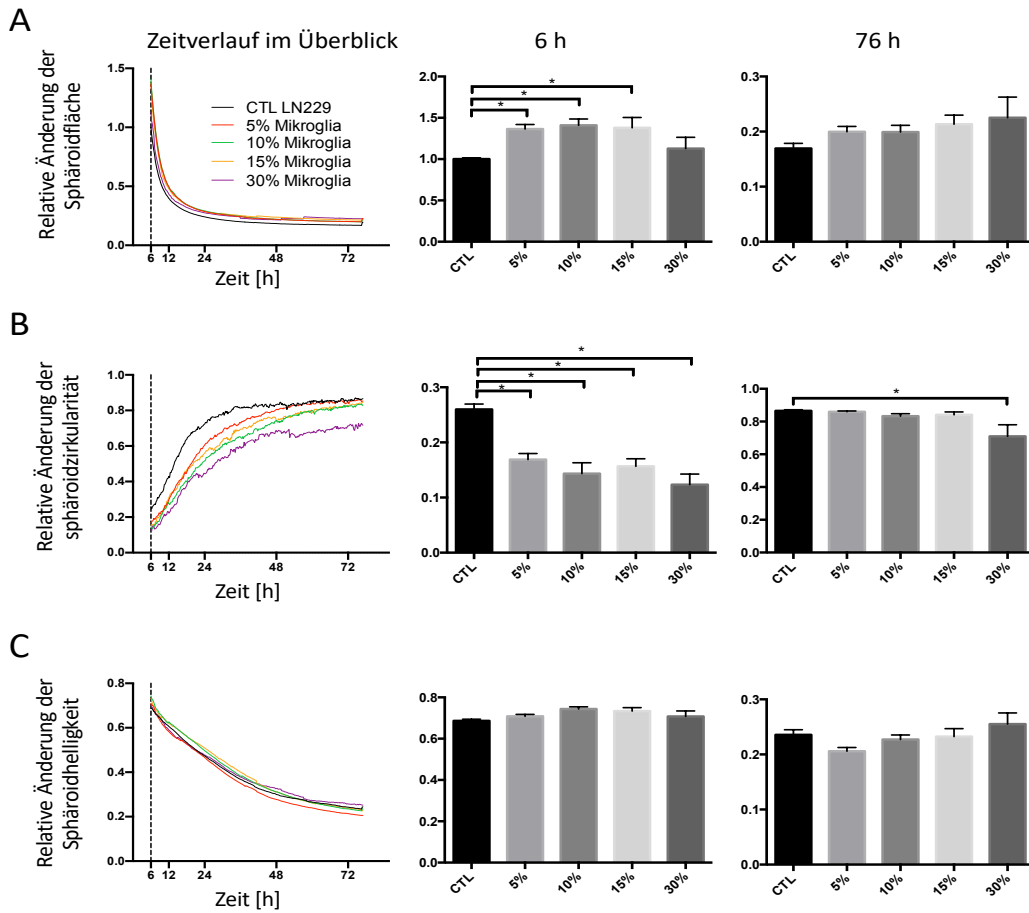
#### **4.5 Einfluss von Mikroglia auf LN229 und A375 hinsichtlich der Sphäroidbildung**

Genauso wie bei den Versuchen mit Astrozyten wurden in Versuchen mit Mikroglia die Mengen 5, 10, 15 und 30 % Mikroglia untersucht. Ein Mikrogliaanteil von 5, 10 und 15 % mit LN229 führte zu einer signifikanten Vergrößerung der Fläche nach 6 h im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abb. 19A). Nach 76 h war dieser Effekt nicht mehr zu beobachten (Abb. 19A). Jeder verwendete Mikrogliaanteil hatte einen signifikanten Einfluss auf die Verringerung der Zirkularität nach 6 h, wobei der Effekt mit 30 % Mikroglia auch nach 76 h bestehen blieb (Abb. 19B). Unbeeinflusst blieb die Helligkeit (Abb. 19C).

Ein Mikrogliaanteil von 5 % in Kokultur mit A375 führte zu einer größeren Fläche nach 6 h, wohingegen 30 % zum selben Zeitpunkt eine Verkleinerung der Fläche zur Folge hatten (Abb. 20A). Nach 76 h waren die signifikanten Effekte nicht mehr zu erkennen (Abb. 20A). Bei der Zirkularität zeigte sich bei 6 h ab einem Anteil von 10 % eine signifikante Verringerung im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abb. 20B). Eine signifikante Abnahme der Zirkularität bei 30 % Mikroglia zeigte sich im Vergleich zur Kontrollgruppe auch nach 76 h (Abb. 20B). Bezüglich der Helligkeit war nur nach 6 h ein signifikanter Unterschied bei einem Anteil von 30 % Mikroglia zu erkennen, wohingegen auch nach 76 h kein Unterschied bestand (Abb. 20C).

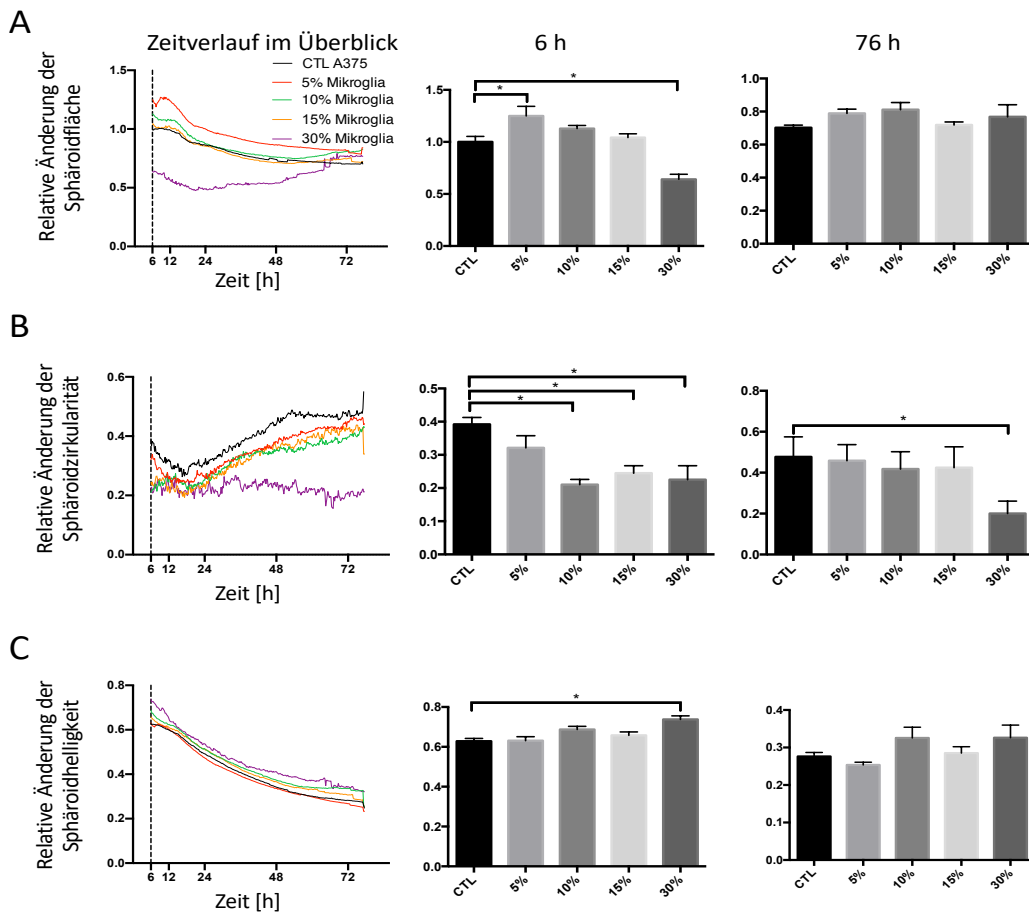
Mikroglia machen in physiologischem Zustand in etwa 10-15 % der Gehirnzellen aus, während der Anteil im Tumorgewebe auf bis zu 30 % steigen kann [128].

## LN229 und Mikroglia



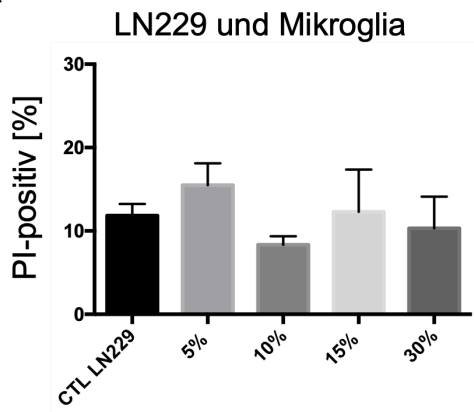
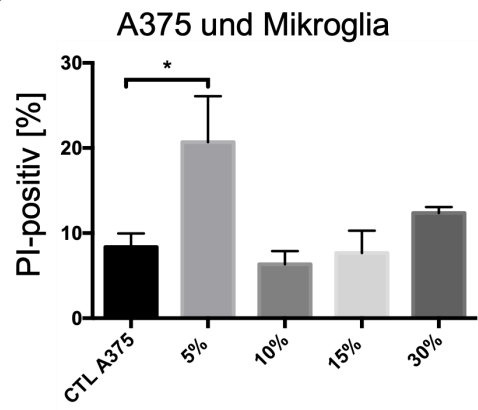
**Abbildung 19** LN229 und unterschiedliche Konzentrationen von Mikroglia; Relative Änderung (A) der Sphäroidfläche, (B) der Sphäroidzirkularität, (C) der Sphäroidhelligkeit; jeweils Darstellung der Zeitpunkte nach 6 und 76 h. Bei der Fläche und Zirkularität konnten zu Beginn der Beobachtung signifikante Ergebnisse erzielt werden, die größtenteils nach 76 h nicht mehr vorzufinden waren. Der Stern (\*) zeigt signifikante Effekte ( $p < 0.05$ ).

## A375 und Mikroglia



**Abbildung 20** A375 und unterschiedliche Konzentrationen von Mikroglia; Relative Änderung (A) der Sphäroidfläche, (B) der Sphäroidzirkularität, (C) der Sphäroidhelligkeit; jeweils Darstellung der Zeitpunkte nach 6 und 76 h. Bei allen betrachteten Parametern konnten signifikante Ergebnisse zu Beginn der Beobachtung erzielt werden. Nur bei der Zirkularität war bei 30 % Mikrogliaanteil noch nach 76 h eine signifikante Beobachtung zu machen. Der Stern (\*) markiert signifikante Effekte ( $p < 0,05$ ).

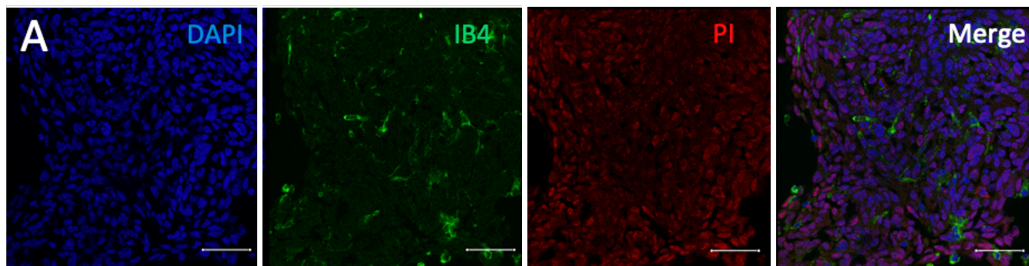
Bei Zugabe verschiedener Konzentrationen an Mikroglia zu Kokulturen mit LN229 und A375 traten im Wesentlichen keine Unterschiede hinsichtlich der Todesrate auf (Abb. 21). Einzig die Signifikanz zwischen der Kontrollgruppe A375 und der Gruppe mit 5 % Mikroglia war hier zu bemerken (Abb. 21A).

**A****B**

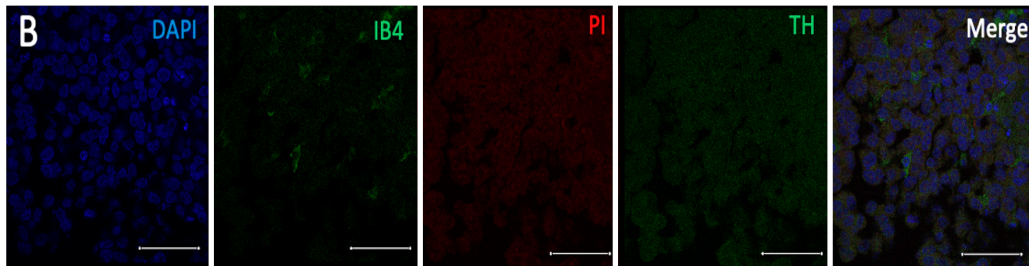
**Abbildung 21** FACS-Ergebnisse von Tumorzellen in Kokultur mit Mikroglia hinsichtlich der Todesrate. FACS-Ergebnisse der Kokultur aus (A) LN229 und aus (B) A375 mit Mikroglia. Es konnten keine signifikanten Ergebnisse erzielt werden. Die Kokultur aus 5 % Mikroglia und A375 zeigte eine signifikant erhöhte Todesrate im Vergleich zur Kontrollgruppe. Der Stern (\*) markiert signifikante Effekte ( $p < 0,05$ ).

Die Analyse der Versuche mit Mikroglia erfolgte anhand zweier unterschiedlicher Färbeprotokolle, wobei Mikroglia mittels IB4 detektiert wurden. Der Fokus der Versuche mit Mikroglia lag darauf, das Überleben von Mikroglia zu zeigen, sowie auf der qualitativen Analyse des Zellverbandes. In allen Versuchsgruppen wurden zentral häufiger PI-positive tote Zellen gefunden (Abb. 22). Aktivierte Mikroglia unterschiedlicher Morphologie wurden mittels IB4 identifiziert (Abb. 22B).

## LN229 und MG



## A375 und MG



**Abbildung 22** Fluoreszenzfärbungen von Kokulturen aus (A) LN229 und (B) A375 und Mikroglia. In beiden Färbungen lassen sich Mikroglia mit Fortsätzen unterschiedlicher Ausprägung identifizieren. Sie betten sich zwischen die Tumorzellen.

Aus den Ergebnissen aller Versuchsgruppen, insbesondere anhand der Befunde zu Änderungen der Sphäroidgrößen und Zirkularität (Abb. 19 und 20) wurde die 10 % Mikroglia- Gruppe für die weiteren Versuche *in vitro* ausgewählt.

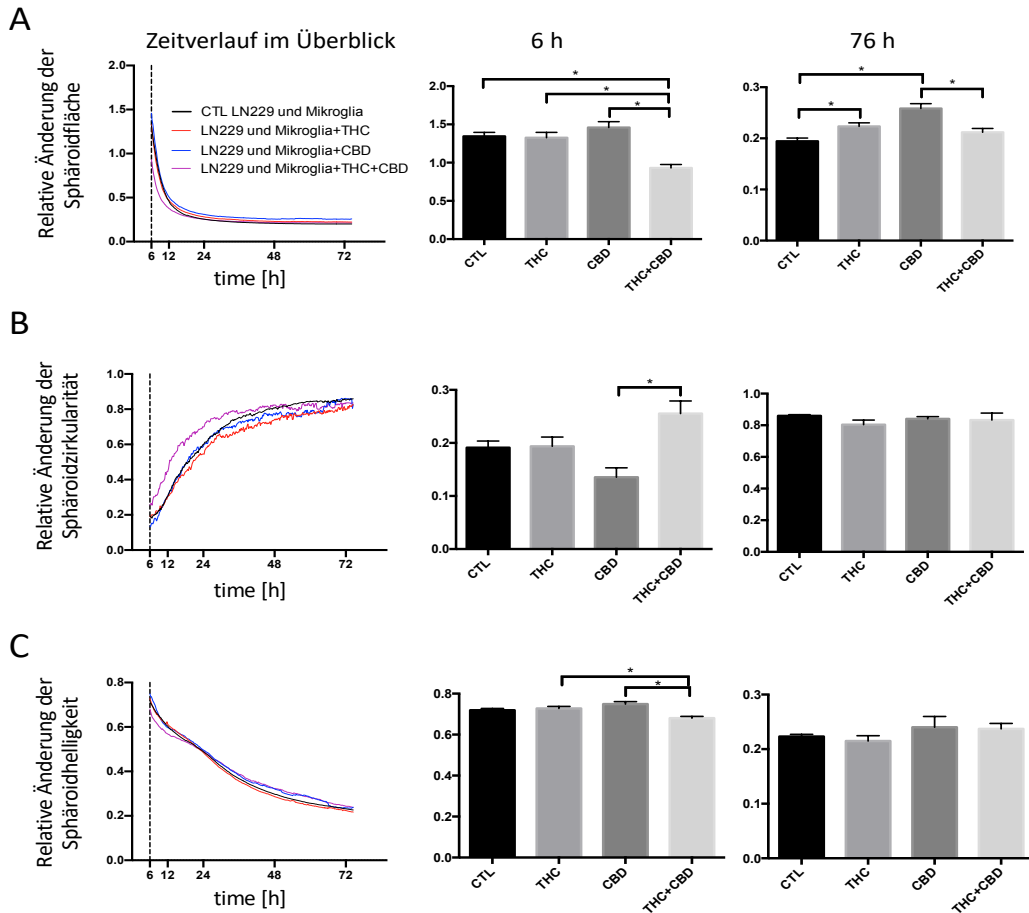
### 4.6 Einfluss von Cannabinoiden auf Kokulturen mit Mikroglia

In der mit Cannabinoiden behandelten Kokultur aus LN229 und 10 % Mikroglia wurde eine signifikant verkleinerte Sphäroidfläche nach 6 h bei der gleichzeitigen Behandlung mit THC und CBD beobachtet (Abb. 23A). Auch im Vergleich zur alleinigen Behandlung mit THC oder CBD zeichnete sich die Kombinationsbehandlung durch eine signifikant verkleinerte Fläche aus (Abb. 23A). Nach 76 h zeigte sich jedoch eine signifikante Vergrößerung der Fläche bei Behandlung mit THC oder CBD im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abb. 23A). Im Vergleich zur CBD-Behandlung blieb die signifikant verkleinerte Fläche bei Kombinationsbehandlung erhalten (Abb. 23A). Hinsichtlich der Zirkularität kam es nach 6 h zu einer signifikanten Zunahme nach der Kombinationsbehandlung im Vergleich zur CBD-Gruppe, während dieser Unterschied nach 76 h nicht persistierte (Abb. 23B). Bei der Helligkeit war nach 6 h eine signifikante Erhöhung bei Einzelbehandlung mit THC oder CBD im Vergleich zur Kombinationsbehandlung zu erkennen (Abb. 23C).

Die Behandlung von A375 und Mikroglia mit Cannabinoiden führte nach 6 h zu keinen signifikanten Effekten bezogen auf die Fläche (Abb. 24A). Nach 76 h zeigte sich eine signifikant vergrößerte Fläche nach Zugabe von THC oder CBD (Abb. 24A). Die

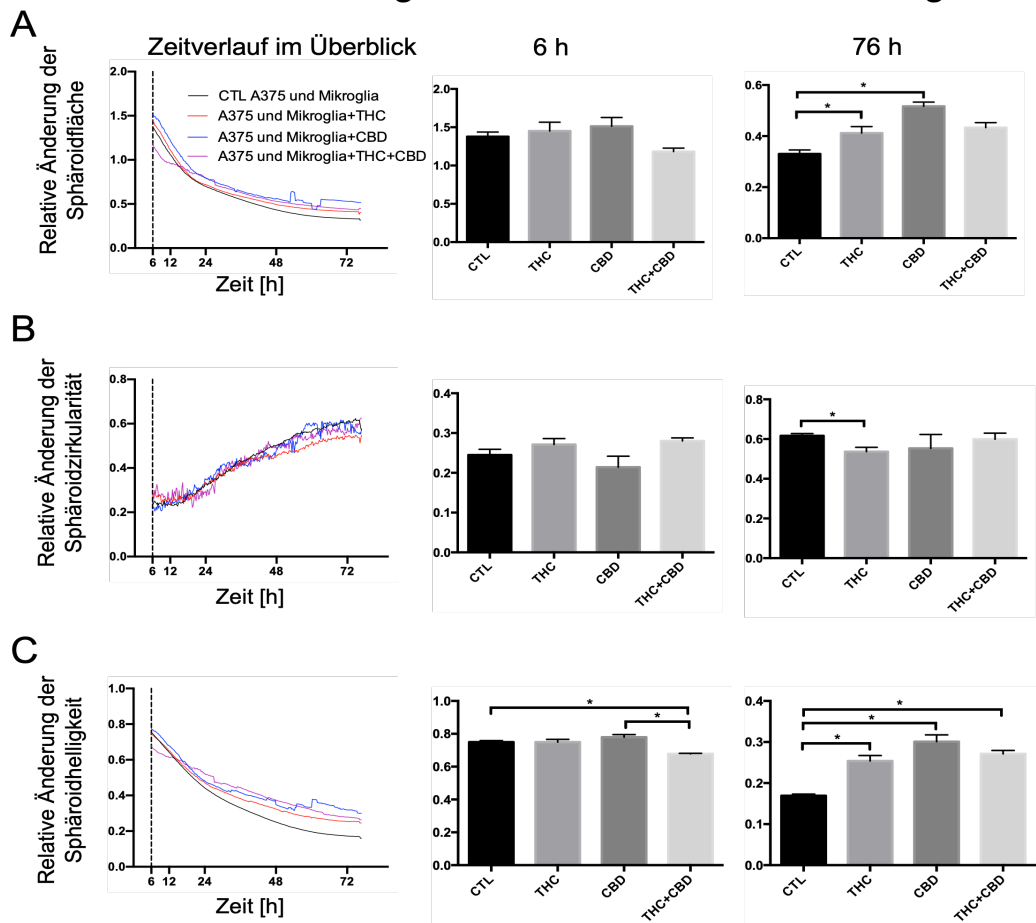
Veränderungen waren in der CBD-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe am größten (Abb. 24A). Während nach 6 h signifikante Effekte bezüglich der Zirkularität ausblieben, zeigte sich nach 76 h eine Verringerung der Werte nach Behandlung mit THC im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abb. 24B). Eine signifikante Abnahme der Helligkeit fand sich nach 6 h bei der Kombinationsbehandlung im Vergleich zu CBD- und Kontrollgruppen (Abb. 24C). Nach 76 h war die Helligkeit bei allen behandelten Gruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht (Abb. 24C).

### LN229 und Mikroglia mit Cannabinoidbehandlung



**Abbildung 23** LN229 und Mikroglia mit Cannabinoidbehandlung; Relative Änderung (A) der Sphäroidfläche, (B) der Sphäroidzirkularität, (C) der Sphäroidhelligkeit; jeweils Darstellung der Zeitpunkte nach 6 und 76 h. Signifikante Effekte zeigen sich insbesondere bei Kombinationsbehandlungen und der Fläche. Der Stern (\*) markiert signifikante Effekte ( $p < 0,05$ ).

## A375 und Mikroglia mit Cannabinoidbehandlung

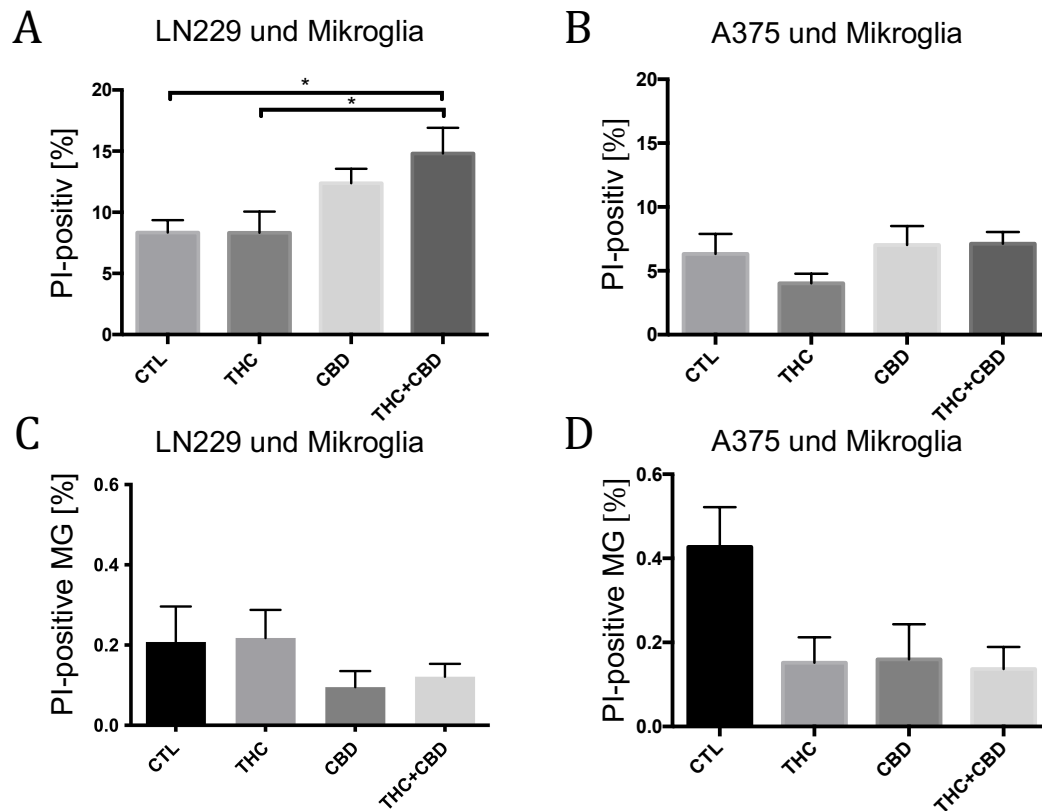


**Abbildung 24** A375 und Mikroglia mit Cannabinoidbehandlung; Relative Änderung (A) der Sphäroidfläche, (B) der Sphäroidzirkularität, (C) der Sphäroidhelligkeit; jeweils Darstellung der Zeitpunkte nach 6 und 76 h. Fast ausschließlich fallen signifikante Ergebnisse bei der Helligkeit bei 6 und 76 h auf. Der Stern (\*) markiert signifikante Effekte ( $p < 0,05$ ).

In FACS-Versuchen der Kokultur aus der Glioblastomzelllinie LN229 mit 10 % Mikroglia wurde bei der Kombinationsbehandlung eine signifikant erhöhte Todesrate im Vergleich sowohl zur Kontrollgruppe als auch zur THC-Gruppe beobachtet (Abb. 25A).

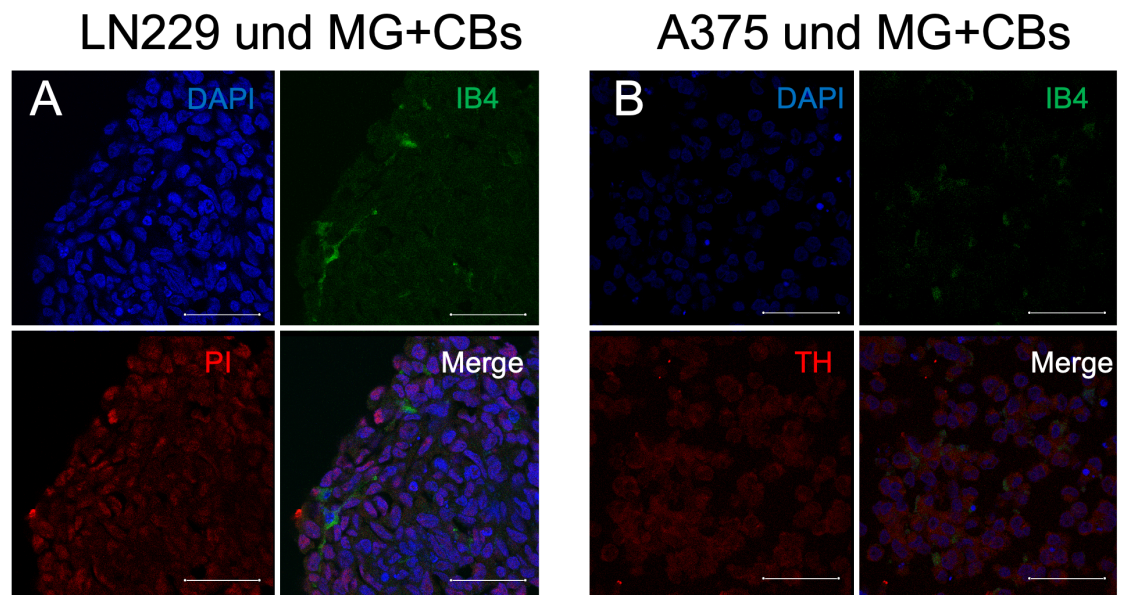
In der Versuchsgruppe der A375 und Mikroglia wurde durch Cannabinoidbehandlung keine signifikante Veränderung der Zelltodesrate gefunden (Abb. 25B). Zwischen den Behandlungsgruppen gab es weder bei LN229 noch A375 signifikante Unterschiede hinsichtlich der Todesrate der Mikroglia (Abb. 25C, D).





**Abbildung 25** (A) Prozentualer Anteil PI-positiver Zellen in der Kokultur aus (A) LN229 und Mikroglia nach Behandlung mit Cannabinoiden; (B) aus A375 und Mikroglia nach Behandlung mit Cannabinoiden; (C) aus LN229 und Mikroglia; (D) aus A375 und Mikroglia. Allein die Behandlung von (A) LN229 und Mikroglia von äquimolarer Menge beider Cannabinoide und die Zugabe von CBD zu THC ergaben signifikante Ergebnisse. Der Stern (\*) markiert signifikante Effekte ( $p < 0,05$ ).

In Kokulturen von Tumorzellen und Mikroglia, die mit Cannabinoiden behandelt wurden, fanden sich intakte Mikroglia mit Fortsätzen und einige randständige tote Zellen in der LN229- (Abb. 26A) und in der A375-Versuchsgruppe (Abb. 26B).



**Abbildung 26** Fluoreszenzfärbung von Kokulturen aus (A) LN229 und (B) A375 und Mikroglia mit Cannabinoidbehandlung. In beiden Färbungen lassen sich Mikroglia mit Ausläufern identifizieren und betten sich zwischen die Tumorzellen.

## 5 Diskussion

Glioblastome und Metastasen des malignen Melanoms im Gehirn stellen die moderne Medizin noch immer vor große Herausforderungen. Die vorgestellten Ergebnisse bieten Anlass dazu, über mögliche neue Behandlungsansätze zu diskutieren.

Die in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Tumorzelllinien LN229 und A375 bildeten Sphäroide und somit 3D-Kulturen. Es wurden zum einen der Einfluss von Gliazellen, nämlich Astrozyten, aber auch Mikroglia auf die 3D-Kulturen und zum anderen die Effekte der als antitumorös geltenden Phytocannabinoide THC und CBD untersucht.

### 5.1 Astrozyten beeinflussen in Kokultur mit LN229 und A375 nur gering die Sphäroidformation

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Astrozyten die Tumorzelllinien LN229 und A375 nur gering in ihrer Aggregationsdynamik beeinflussten.

So zeigten sich bei der Fläche und Zirkularität auf beide Zelllinien keine signifikanten Effekte. Jedoch kam es zu einer signifikanten Abnahme der Helligkeit bei 6 h in der LN229-Kokultur mit 15 oder 30 % Astrozyten.

Die Gestalt von Sphäroiden wird insbesondere durch Zell-Zell-Kontakte und Zell-Matrix-Adhäsionskräfte bestimmt [195]. Es ist naheliegend, dass die Zugabe von Gliazellen zu einer deutlichen Behinderung der o. g. Kräfte führen würde. Der Zellverband der LN229-Astrozyten-Kokultur wird womöglich durch neu entstehende Tumor-Gliazellkontakte verdichtet [196]. Dabei können *Gap junctions* wesentlich zur Interaktion beitragen, wobei insbesondere Connexin 43 einen entscheidenden Beitrag leistet [142,197]. Glioblastomzellen sind in der Lage, die physiologische Funktion der Astrozyten zu manipulieren und diese für ihre Zwecke zu rekrutieren [101]. Dabei könnten verschiedene auf Signalwege Einfluss nehmende Faktoren eine Rolle spielen. Es ist bereits bekannt, dass sowohl durch Astrozyten freigesetzte Zytokine wie IL-6 und IL-8 als auch direkter Zell-Zell-Kontakt über CD44 zwischen Astrozyten und Tumorstammzellen eine Zytoskelettumorganisation hervorrufen können [77,198]. Sowohl Glioblastomzellen als auch Astrozyten sezernierten MMP-9 [76,128,165], aber auch Astrozyten setzen in Anwesenheit von Glioblastomzellen pro-MMP-2 frei, das in aktives MMP-2 umgewandelt werden kann. Beide Enzyme können die extrazelluläre Matrix und die Zell-Matrix-Kontakte verändern [143,199] und so möglicherweise Einfluss auf die dreidimensionale Struktur der Sphäroide nehmen.

Die Abnahme der Helligkeit nach 6 h spricht für eine Verdichtung der Sphäroide, woraus sich eine für *in vivo* relevante Modifizierung der Zellinvasivität vermuten lässt. Ein Erklärungsansatz dafür ist, dass eine hohe Expression von RANKL in LN229 zur

Aktivierung von Astrozyten führt, wodurch die Invasion *in vivo*, aber nicht *in vitro* über die Modulierung der Mikroumgebung gefördert wird. Die RANKL-Expression korreliert hier mit dem Anteil an Astrozyten am Tumorrand *in vivo* und aktiviert diese auch [148]. Die spontane Todesrate in Kokulturen mit Astrozyten blieb unverändert, was für die Intaktheit des Zellverbandes nach Astrozytenzugabe spricht. Eine mögliche Erklärung für die in der Kokultur geringe Todesrate ist, dass Glioblastomzellen eine Herabregulierung von p53 verursachen [76]. Somit müsste die Todesrate innerhalb der Kokultur bei Zugabe von Astrozyten sogar erniedrigt sein, denn Astrozyten könnten auch protektiv im Zellverband wirken [200]. Die nur geringen Parameterveränderungen spiegeln sich auch in einer morphologisch unauffälligen Fluoreszenzfärbung der Kokulturen wider.

In Kokulturen von A375 und Astrozyten traten wiederum in Lebendzellmikroskopie nur geringfügige Effekte und im FACS keine signifikanten Effekte auf. Auch in dieser Versuchsreihe waren beim Parameter „Helligkeit“, allerdings nach 76 h, signifikante Ergebnisse zu verzeichnen, während andere Parameter unbeeinflusst blieben. Die Effekte sind auch hier auf ähnliche Mechanismen der Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakte wie in der Versuchsgruppe mit LN229 zurückzuführen. In einer Studie mit der YDFR.CB3-Melanomzelllinie in Kokultur mit Astrozyten wurde festgestellt, dass durch Astrozyten vermehrt IL-23 produziert wurde, was sich durch MMP-2-Sezernierung verstärkend auf Migration und Invasion von Melanomzellmetastasen auswirkte [68]. Weiterführende Untersuchungen zeigten auch, dass kollektive Zellmigration durch Astrozyten erleichtert wurde [193]. Dies steht im Einklang zu einer signifikant erhöhten Helligkeit nach Zugabe von 5 und 10 % Astrozyten. Zu erwarten wäre zudem eine verringerte Sphäroidfläche und erhöhte Zirkularität gewesen. Laut Literatur tragen Astrozyten in diesem Zusammenhang trotzdem zur Invasivität von Melanommetastasen bei, denn dies sind die Zellen, die aufgrund der Beteiligung an der BBB mit als erste mit metastasierenden Zellen interagieren [200,201]. Deutlich ausgeprägte GFAP-positive Astrozyten ließen in den A375-Versuchen auf reaktive Astrozyten im hier *in vitro* modellierten Tumormikromilieu schließen. Tumorassoziierte Astrozyten können im pathologischen Milieu diverse Faktoren sezernieren, die das Verhalten der Tumorzellen mitbestimmen [202,203]

Insgesamt ist nur ein geringer Effekt auf die Sphäroidbildung nach der Zugabe von Astrozyten zu beiden Tumorzelllinien vorhanden. In der Literatur gibt es jedoch Hinweise auf eine Veränderung der invasiven Eigenschaften [76,128,204]. Das hier verwendete *in vitro* Modell erlaubt aber nur eine eingeschränkte Vergleichbarkeit.

## 5.2 Mikroglia verzögern initial die Sphäroidbildung von LN229 und A375

Auf LN229 hatten Mikroglia bei den meisten Versuchsgruppen einen signifikanten Einfluss durch eine Vergrößerung der Fläche und Beeinträchtigung der Zirkularität zu Beginn des Versuchs. Dabei fand insgesamt unabhängig von der Konzentration an Mikroglia eine verzögerte Sphäroidbildung statt. Hier lässt sich vermuten, dass Mikroglia die Adhäsion der Zellen stören, sodass die Sphäroidbildung negativ beeinflusst wird.

Ähnlich wie bei Astrozyten spielen TAMs eine große Rolle bei der Invasion von Glioblastomzellen ins umliegende gesunde Gewebe [101,205] und nehmen Einfluss auf die Zell-Matrix- und Zell-Zell-Kontakte. Die große Anzahl der im FACS als lebendig identifizierter Mikroglia spricht für eine derartige Einflussnahme. TAMs tragen damit zur protumorösen Mikroumgebung bei [75,206]. Der Einfluss von Mikroglia auf die verschiedenen Parameter der Lebendzellmikroskopie scheint im Vergleich zu Versuchen mit Astrozyten ausgeprägter zu sein. Ein dazu beitragender Faktor im Tumormikromilieu ist die CCL2/CCR2/IL-6-Achse, die zum Verlust von Zell-Zell-Kontakten aufgrund von epithelio-mesenchymaler Transition (Kapitel 1.1.4.) führt [166,207]. CCL2 wird hierbei von Glioblastomzellen LN229 sezerniert und CCR2 auf Mikroglia exprimiert, wodurch diese vermehrt IL-6 sezernieren [168,198]. Die Glioblastomzellen lösen sich aus dem Zellverband und sind dadurch in der Lage, den Zellverband zu lockern und als Korrelat die Fläche zu vergrößern und die Zirkularität einzuschränken. Ursächlich dazu beitragen kann, dass Glioblastomzellen, aktiviert durch TAMs, TGF- $\beta$ , EGF und IL-6 sezernieren, was als invasionsfördernd gilt [75,79,208]. Hinsichtlich der Todesrate gab es hier keine Unterschiede zwischen den Gruppen, was bestätigt, dass höhere Konzentrationen an TAMs (bis zu 50 %) keinen schädigenden Einfluss auf Glioblastomzellen haben [75,209]. Eine Studie zeigte in diesem Zusammenhang, dass die Viabilität von Glioblastomzellen durch Mikroglia unbeeinflusst blieb, wobei wie in dieser Studie Kokultur-Modelle zum Einsatz kamen [209].

Im Gegenteil kann ein hoher Prozentsatz an Mikroglia das Wachstum des Tumors fördern [159], weshalb bei einem Anteil von 30 % Mikroglia im Vergleich zur Kontrollgruppe eine ähnliche Sphäroidkonfiguration zu finden war. Nach 76 h war wohl die insgesamt kleinstmögliche Fläche erreicht, und die Flächen glichen sich an. Mikroglia sorgten in jeder hinzugegebenen Konzentration, so auch bei 30 %, für eine Einschränkung der Zirkularität, was ebenso mit der Einschränkung der Sphäroidbildung zusammenhängen könnte.

In Versuchen mit A375 führte die Zugabe von Mikroglia insgesamt zu ähnlichen Ergebnissen. TAMs sind dafür bekannt, dass auch sie TGF- $\beta$  und EGF-Rezeptor-Liganden ausschütten, sodass hierdurch eine Beeinflussung der Zytoskelettorganisation wahrscheinlich erscheint und dadurch eine Vergrößerung der Fläche begründbar wäre

[193]. Bei einem Anteil von 30 % Mikroglia kam es hingegen zu einer signifikanten Verkleinerung der Fläche. Betrachtet man Brustkrebsmetastasen, so sind dort Adhäsionsmoleküle in TAMs stark hochreguliert. TAMs machten in diesem Fall einen höheren Anteil am Tumormikromilieu aus [92], was dem hier verwendeten Anteil von 30 % Mikroglia nahe kommt.

Die geringe Fläche bei gleichzeitig gering ausgeprägter Zirkularität kann Hinweise auf eine große Aggressivität geben. Mikroglia begünstigten nämlich die Bildung von Melanom-Sphäroiden, was mit der Malignität korrelieren könnte [165]. Cystatin C, ein Cysteinproteaseinhibitor, kann die Formation von Melanom-Sphäroiden beschleunigen und gilt als verstärkend bezüglich der Bösartigkeit [210]. Sowohl Melanom-Zellen als auch Mikroglia fördern in Kokultur gegenseitig die Sekretion von Cystatin C [210], sodass die geringste Fläche bei 6 h bei einem Anteil von 30 % Mikroglia dadurch gut zu erklären ist. Eine weitere mögliche Erklärung wäre eine Schrumpfung der Fläche durch die geringere Größe und Proliferationsrate der Mikroglia als A375. Dagegen spräche jedoch, dass die Effekte nach 76 h wieder aufgehoben waren. Ähnlich zu Astrozyten können TAMs MMPs sezernieren, sodass die Zirkularität dadurch beeinträchtigt wird [165,211]. Nach 76 h war die Zirkularität noch bei der höchsten Konzentration von 30 % signifikant eingeschränkt, was für eine starke Interaktion hoher Mikrogliaanteile mit A375 spräche. Die Anzahl toter Zellen war bei 5 % Mikroglia-Anteil signifikant erhöht. Womöglich gab es noch nicht ausreichend Mikroglia, damit diese, analog zu der Darstellung in der LN229-Versuchsgruppe, protektiv auf A375 hätten wirken können. Bei Neuronen in 2D-Kultur gibt es jedoch einen Hinweis darauf, dass durch Mikroglia sezerniertes NO und ROS neurotoxisch wirken könnten [212]. Allerdings widerspricht dieser Erklärungsansatz der Tatsache, dass bei der geringsten MikrogliaKonzentration eine signifikant erhöhte Todesrate auftrat. Dabei ist wichtig zu betonen, dass sich die Untersuchungsmodelle der Studien erheblich unterscheiden und dadurch nur eine bedingte Vergleichbarkeit gegeben ist.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sowohl bei der Kokultur aus Mikroglia und LN229 als auch der Kokultur aus Mikroglia und A375 die Zell-Zell-Interaktion beeinflusst wurde. Zudem wurde wahrscheinlich auch auf die Substanzsezernierung der unterschiedlichen Zelllinien eingewirkt, wodurch insgesamt signifikante Effekte hinsichtlich der Fläche und Zirkularität auftraten.

### **5.3 Effekte von Cannabinoiden auf 3D-Sphäroide**

#### **5.3.1 Cannabinoide verzögern die Sphäroidbildung von LN229 und A375**

In zahlreichen Studien wurden Effekte von THC und CBD auf Glioblastom- und Melanomzellen bereits festgestellt [117,213,214]. Hierbei wurden meistens Auswirkungen auf

die Zelltodesrate und die Verringerung der Tumorgröße sowohl *in vivo* als auch *in vitro* beobachtet [20,120,187, 212–214]. Ein Schwerpunkt dieser Arbeit war die Untersuchung des Einflusses von THC und CBD auf die Aggregationsdynamik der Glioblastomzellen LN229 und der Melanomzellen A375.

Bei der Behandlung von LN229 mit Cannabinoiden war die Fläche nach 6 h vergrößert und gleichzeitig im Vergleich zur Kontrollgruppe die Zirkularität geringer. Dies könnte für eine geringere Ausprägung von Adhäsionskräften sprechen. Ebenso könnte die Kontraktilität innerhalb des Zellverbandes verringert oder die Zellgröße verändert gewesen sein. Eine Erhöhung der „Helligkeit“ zu Beginn der Versuche könnte im Zusammenhang mit der größeren Ausdehnung der Fläche stehen, denn dann sind pro Flächeneinheit bei gleicher dreidimensionaler Struktur weniger Zellen zu finden. Die CB<sub>1</sub>-vermittelte Kontraktion (beispielsweise durch THC) des Aktomyosin-Zytoskeletts in Neuronen deutet auch in anderen Zelltypen darauf hin, dass die Zellgröße verringert sein könnte, was die erhöhte „Helligkeit“ erklären würde [217]. Auch werden Zytoskelettveränderungen, vermittelt durch GPR55 über die ERK1/2-Signalkaskade, in unterschiedlichen Glioblastomzelllinien vermutet [218]. Diese Zytoskelettveränderungen könnten zum Verlust der Adhäsionskräfte beitragen und hier auch ursächlich für die Vergrößerung der Fläche und Abnahme der Zirkularität nach Cannabinoidbehandlung gewesen sein. In einer Studie zeigte sich eine Verminderung der Zellaggregation nach Verlust von nicht-muskulärem Myosin II als Bestandteil des Zytoskeletts, was auch in diesem Versuch Konsequenz einer Reorganisation sein könnte [95].

Eine weitere Möglichkeit wäre, dass durch die Cannabinoidbehandlung Rho-assoziierte Kinasen (ROCK) verändert wurden. Beschrieben ist eine verminderte Adhäsion bei Funktionsverlust von ROCK [219]. Aus unveröffentlichten Daten unserer Arbeitsgruppe geht hervor, dass GPR55 in LN229 und A375 nachgewiesen werden konnte. Da THC als GPR55-Agonist und CBD als GPR55-Antagonist in HEK293-Zellen agieren können, sind unterschiedliche Effekte hinsichtlich der Aktivierung von ROCK zu erwarten [25]. In einigen soliden Tumorentitäten, wie Kolon- oder Mammakarzinomen, ist eine Überexpression mit Metastasierung assoziiert [220]. Beschrieben ist eine verminderte Adhäsion durch Funktionsverlust von ROCK [219]. In diesem Fall greift verstärkt die differenzielle Adhäsionshypothese, nach der Zellen dazu tendieren, zueinander die möglichst größte Bindungsenergie zu entwickeln, um bei Verminderung sonstiger Adhäsionsmechanismen die größtmögliche Stabilität beizubehalten [221]. Dies hilft bei der Auflockerung des ursprünglichen Zellverbandes und könnte im klinischen Sinne ein Indiz für die Erleichterung der Dissemination sein. Für Zelllinien des nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms bewirkten CB<sub>1</sub>-Agonisten eine Reduktion der Adhäsion [222], was jedoch den gleichförmigen Effekt des von den klassischen CBs unabhängig wirkenden

CBD nicht erklärt. Eine Reduktion der Adhäsion könnte jedoch sogar zu einer erhöhten Invasionsfähigkeit von Glioblastomzellen beitragen [95].

Auch konnte der absolute Endpunkt der Aggregation bereits vor 76 h erreicht worden und somit die Effekte von THC und CBD nicht mehr messbar gewesen sein. Bei äquimolarer Behandlung kam es womöglich zu einem synergistischen Effekt beider Cannabinoide, wodurch die Wirkung potenziert wurde [114] und die Signifikanz im Vergleich zur Kombinationsbehandlung bei der Fläche bestehen blieb. Die Kombination beider Cannabinoide führte womöglich auch zur größeren Modulation des Zellzyklus als bei alleiniger Zugabe, was in anderen Studien anhand einer erhöhten Anzahl an in der G0/G1-Phase befindlichen Zellen im FACS nachgewiesen wurde [114]. Eine weiterführende Studie zeigte hingegen einen nur geringen Anteil Ki76-positiver proliferationsfähiger Zellen bei Zugabe von Cannabinoiden [193]. Unter Betrachtung dieses Aspekts ist eine nach 76 Stunden weiterhin vergrößerte Fläche im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht zu erklären, denn es wäre eine Verkleinerung des Sphäroids anzunehmen.

Die intratumorale Applikation von 20-100 µg THC über durchschnittlich etwa einen Monat zeigte sich bei Patienten als effizient in Bezug auf Apoptose und Verringerung von Proliferation [223]. Durch THC konnte in C6-Glioblastomzellen auch ein erhöhter oxidativer Metabolismus in den Mitochondrien erzielt werden, was auch zum zeitversetzten Zelltod durch Apoptose führte [224]. Diese Effekte waren in den hier durchgeführten FACS-Messungen nicht zu erkennen. Dies ist nicht verwunderlich, da in diesen Versuchen 2D-Kulturen die Grundlage für Messungen darstellten [224]. In einer 3D-Kultur, wie im präsentierten Versuchsmodell, können mehr Zellkontakte entstehen, wodurch das Überleben gesteigert und kein signifikanter Anstieg apoptotischer Zellen im FACS zu erkennen war [78]. Beispielsweise ist der Verlust der Integrin-Funktion in anderen Glioblastomzelllinien mit dem Übergang in Apoptose bekannt [225].

Für die Zugabe von CBD (24 µM) ist beschrieben, dass bei U87-Glioblastomzellen von 17-24 h die höchste Konzentration an Caspase 3 vorlag und dies zur Apoptose führen kann [226]. Die FACS-Analyse bestätigte dies abermals nicht. Die dort verwendeten Konzentrationen und Zeiträume unterschieden sich deutlich von denen in der vorliegenden Arbeit. Denkbar wäre, dass während des Beobachtungszeitraums bereits tote Zellen abgebaut wurden. Dagegen spricht allerdings, dass es zu keiner statistisch relevanten kleineren Sphäroidfläche gekommen war. Bei der Kombinationsbehandlung der GBM-Zelllinie U251 wurde bereits eine Hochregulation von Caspase 3, 7 und 9 im Western Blot beobachtet, wobei die Zugabe von Cannabinoiden in höheren Konzentrationen alle 24 h erfolgte, sodass die Effekte womöglich darauf zurückzuführen sind [114].



Bei A375 scheinen, ähnlich wie bei LN229, Adhäsionskräfte und Kontraktilität eingeschränkt zu sein, wodurch es zu Beginn der Beobachtung bei 6 h zu signifikanten Effekten bei allen behandelten Gruppen hinsichtlich der Fläche und „Helligkeit“ kam. THC vermittelt antitumoröse Effekte über CB<sub>1</sub> und CB<sub>2</sub> [121], und beide Rezeptoren wurden in A375 gefunden [115]. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen für 5 µM THC konnte kein Effekt in HcMel12- und B16-Melanomzellen *in vitro* nachgewiesen werden, was in diesem Falle jedoch mit der niedrigen Expression an CBs begründet wurde [227]. *In vivo* wurde eine Größenreduktion des nach Implantation von HcMel12-Zellen entstandenen Tumors durch THC erzielt [227], aber dieser Effekt lässt sich aufgrund methodischer Unterschiede nur schwer vergleichen. Auch nach 76 h wurde in A375 noch kein dynamisches Gleichgewicht erreicht. Weiterhin waren signifikante Effekte aller Parameter zu beobachten. Die Adhärenz von Zellen unter Cannabinoidbehandlung hat Einfluss auf die Kontaktfläche der Zellen [218] und könnte deshalb auch die Fläche eines Sphäroiden modulieren. Im Zusammenhang mit der vergrößerten Fläche könnte zudem die Einschränkung der Zirkularität nach 76 h bei der Kombinationsbehandlung stehen. Insgesamt scheint A375 homogener zu Sphäroiden zu adhären, worauf das Nichtvorhandensein von Effekten nach 6 h bezüglich der Zirkularität hinweist. Hierbei könnte die unterschiedliche Dynamik eine Rolle spielen, denn A375 weist eine diskusartige Form der Sphäroide auf, während LN229 wesentlich stärker dazu in der Lage zu sein scheint, dreidimensionale Strukturen auszubilden.

Hinsichtlich der Sphäroidmorphologie wurde an den Sphäroidrändern von LN229 eine abgeflachte Form angenommen. Bei Sphäroiden der Melanomzelllinie A375 wurden weder abgeflachte, lebendige Zellen am Rand noch ein hohles Zentrum beobachtet. Dies widerspricht der Beobachtung von Chen et al., bei der ein nekrotisches Zentrum und nicht lebendige Zellen am Sphäroidrand beobachtet wurden [228]. Allerdings bestand ein wesentlicher Unterschied in der im Vergleich zu den Sphäroiden mit LN229 lockereren Zellformation. Dies könnte wesentlich mit der Sauerstoff- oder Nährstoffabnahme bzw. der Zunahme von Metaboliten zum Sphäroidzentrum zusammenhängen [194]. Dennoch scheint eine ausreichende Versorgung in A375 möglich gewesen zu sein, da ein intakter Zellverband mit überwiegend lebendigen Zellen erkennbar war. Dabei gelang auch der Nachweis toter Zellen in nahezu allen behandelten Gruppen [229]. Da in den FACS-Versuchen, die ein Abbild der Situation des gesamten Sphäroids darstellen, auch keine signifikanten Unterschiede vorzufinden waren, darf angenommen werden, dass dies in den ebenfalls hier untersuchten repräsentativen Schnitten größerer Sphäroide auch nicht der Fall sein würde. Diese unabhängigen Analysen bestätigen den insgesamt vitalen Zustand der Zellen.

Insgesamt wirkten sich die verschiedenen Cannabinoidbehandlungen auf LN229 ähnlich auf die verschiedenen Parameter aus. Hierbei war der Einfluss bei 6 h nach Behandlung am größten und nach 76 h nicht mehr zu erkennen, sodass Cannabinoide insbesondere zu Beginn der Beobachtung einen modulierenden Einfluss zu hatten. Bei A375 hingegen zeigte sich ein heterogeneres Bild, und es kam vorwiegend zu verstärkten Effekten nach 76 h, wobei die Kombinationsbehandlung von THC und CBD den größten Einfluss auf die Parameter hatte. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass GBM womöglich schneller auf die Behandlung mit Cannabinoiden ansprechen als Melanomzellen. Ebenso lässt sich vermuten, dass bei der Behandlung von Melanomen ein länger anhaltender Effekt, über 76 h hinaus, der Cannabinoide auf die Tumorbiologie eintritt.

### **5.3.2 Cannabinoide haben auf Kokulturen von A375 und Astrozyten einen größeren Einfluss als auf Kokulturen mit LN229**

Für weiterführende Versuche zur Erforschung der Cannabinoideffekte wurde für beide Zelllinien ein Anteil von 30 % Astrozyten gewählt, da dieser am ehesten den Bedingungen *in vivo* entspricht [77].

Bei der Behandlung der Kokulturen aus LN229 und Astrozyten entfaltet sich die Wirkung der Cannabinoide hinsichtlich der Fläche erst gegen Ende des beobachteten Zeitraums. Es bestand ein signifikanter Unterschied zwischen Kontrollgruppe und CBD-Behandlungsgruppe nach 76 h. Die CBD-Behandlung könnte in diesem Fall eine Verschiebung des Gleichgewichtes bewirkt und auch den Aggregationsprozess verlangsamt haben. CBD bindet nur mit geringer Affinität an CB<sub>1</sub> und CB<sub>2</sub> [53], sodass eine andere Vermittlung des Effektes denkbar erscheint. CBD ist ein Antagonist des GPR55 [230], während THC diesen aktiviert [231]. Eine agonistische Wirkung auf GPR55 fördert die Tumorzellmigration und Metastasierung in Brustkrebszellen [232], da beispielsweise Rho-abhängig Aktin polymerisiert wird und dadurch die für Migration wichtige fokale Migration erleichtert wird [233]. Die Blockierung von GPR55 durch die antagonistische Wirkung von CBD könnte eine Abschwächung dieses GPR55-vermittelten Effektes bewirken, sodass hierdurch die Vergrößerung der Fläche nach 76 h zu erklären wäre. In einer Studie mit einer Prostatakarzinomzelllinie LNCaP wurde durch Zugabe einer größeren Menge CBD in ebenfalls non-adhärenter Umgebung die Sphäroidformation sogar verhindert, aber das Ablesen der Endpunkte erfolgte erst nach 14 Tagen [234], sodass auch metabolische Produkte in dieser Studie Grund für die gescheiterte Sphäroidbildung sein könnten. Ein möglicher Erklärungsansatz für die Wirkung der Kombinationsbehandlung wäre die agonistische THC-Wirkung auf GPR55, da dieser Rezeptor auch in GBM exprimiert wird [27] und für die Aufhebung des Effektes von CBD bei gleichzeitiger Gabe von THC verantwortlich sein könnte.

Bezüglich der Zirkularität zeigte die Behandlung der Kombination mit THC und CBD gleich zu Beginn bei 6 h einen signifikanten Effekt, nicht jedoch die Behandlung mit THC oder CBD alleine, was gegen die Vermittlung des Effektes über GPR55 spricht. Zu den Interaktionen zwischen den beiden Phytocannabinoiden existiert bisher nur eine unzureichende Datenlage, sodass die anscheinende gegenseitige Aufhebung noch nicht vollständig erklärbar ist. Hinweise auf eine Modulation der Proliferation in 2D-GBM Kulturen in Verbindung mit GPR55 und der Interaktion von THC und CBD wurden in einer aktuellen Studie gefunden. Dabei wurde die Reduzierung von Ki-67-positiven Zellen nach Zugabe von THC zu GBM durch das an GPR55 antagonistisch wirkende CBD verhindert [26].

In den FACS-Versuchen wurde keine Änderung der Todesrate durch THC und CBD alleine oder in Kombination in LN229-Kokulturen festgestellt. CBD und THC gelten als zytotoxisch für GBM, sodass eine signifikant erhöhte Todesrate zu erwarten gewesen wäre [105]. Die eingesetzten höheren Cannabinoidkonzentrationen in einer früheren Studie mögen den toxischen Effekt erklären. Allerdings konnten die Konzentrationen die maximale *in vivo* erreichbare Konzentration überstiegen haben [235]. Die Apoptoserate beim Einsatz von THC wird durch CBD in der Glioblastomzelllinie U251 Caspasen-abhängig verstärkt [114]. Allerdings wurde keine erhöhte Zahl an PI-positiven Zellen detektiert, was in der Fluoreszenzfärbung auch bestätigt wurde [236]. Unter den hier herrschenden Versuchsbedingungen kam es insgesamt zu einer geringen Apoptoserate [193].

Die CBD-Gabe zur Kokultur aus A375 und Astrozyten führte zu einer signifikanten Verkleinerung der Fläche bei 6 h im Vergleich zur Kontrollgruppe, während THC diesen Effekt bei den Versuchen mit der Melanomzelllinie auch hier aufzuheben schien. In einer *in vivo* Studie an Mäusen konnte eine signifikante Reduktion der Tumorgöße durch die Applikation von CBD erzielt werden [119]. Die Reduktion der Sphäroidfläche könnte hierbei für eine Verringerung der Zellzahl und die damit verbundene Reduktion der Fläche sprechen. In diesem Zusammenhang konnte eine Studie eine Hemmung des Wachstums durch CBD in verschiedenen Glioblastomzelllinien in Kultur im MTT-Assay zeigen [114]. Keine signifikanten Effekte verblieben nach Ende der Beobachtungszeit nach 76 h. Auffällig war die sehr kompakte Fläche und ausgeprägte Zirkularität nach 6 h im Vergleich zur Behandlungsgruppe mit THC. Dies widerspricht jedoch der Beobachtung, dass bei Kolonkarzinomzellen nach der Behandlung mit CBD eine reduzierte Adhäsion festgestellt wurde [27]. Diese müsste bei einer solchen kompakten Sphäroidformation sogar erhöht sein. Nach 76 h ist dieser Effekt bei Fläche und Zirkularität mit CBD-Gabe nicht mehr zu erkennen.

Bei den Versuchen mit A375 entsteht die größte Sphäroidfläche mit der geringsten Zirkularität bei der Behandlung mit THC, was im Kontrast zu den Ergebnissen bei LN229 steht. Das AEA-Analogen Met-F-AEA sorgte in Brustkrebszellen für eine verminderte Phosphorylierung von FAK über CB<sub>1</sub>, was zu verminderter Zell-Matrix-Adhäsion führt [237]. Durch verminderte Adhäsionskräfte kommt es dabei zu einer vergrößerten Fläche einhergehend mit geringerer Zirkularität. Da auch THC über CB<sub>1</sub> wirkt, kann dies die Erklärung für die im vorliegenden Versuch sichtbaren Effekte sein.

Im Gegensatz zu LN229 kommt es bei der Behandlung von A375 mit Cannabinoiden zu einer signifikanten Erhöhung der „Helligkeit“ nach 76 h in allen behandelten Gruppen und dies, obwohl in den Untersuchungen der anderen Parameter keine Unterschiede festzustellen waren. Eine Modifizierung von Zell-Zell-Kontakten und der Adhäsion könnte sich hierbei auf die Dichte des Zellverbandes auswirken. Zusätzlich könnten Metaboliten oder lösliche Faktoren Einfluss auf die „Helligkeit“ haben. Interessanterweise ist die Zelltodesrate bei der CBD-Behandlung und der Kombinationsbehandlung im Vergleich zur Kontrollgruppe und zur THC-Behandlungsgruppe nicht signifikant verändert. Anscheinend wirken sich CBD- und Kombinationsbehandlung protektiv auf die Sphäroidstruktur aus, sodass eine höhere Adhärenz mit hohem Grad an Zirkularität und niedriger Todesrate die Konsequenz ist. In A375 führte WIN55-212, ein CB<sub>1</sub>-Agonist, zur Reduktion der Anzahl apoptotischer Zellen und schränkte die Proliferation ein [115]. Letzteres könnte auch die im Vergleich geringere Fläche nach 6 h mit erklären. Insgesamt konnte in diversen Studien eine proliferationshemmende Wirkung von CBD nachgewiesen werden [238]. Hervorzuheben gilt, dass in Mäusen *in vivo* auch gezeigt werden konnte, dass CBD das Tumorwachstum verringert und das Überleben der Tiere erhöht [119,239].

Einen gegenteiligen Effekt bewirkte in dieser Arbeit die Behandlung mit THC, indem die Fläche nach 6 h vergrößert und die Zirkularität verringert war. Dadurch wäre auch die höhere Todesrate im Vergleich zur CBD- und Kombinationsbehandlung zu erklären. Dies steht im Einklang mit einer Studie zur THC-induzierten Apoptose derselben Zelllinie unter Verwendung ähnlicher Dosierungen wie in unserer Studie. Apoptose durch Autophagie konnte in dieser Studie durch THC induziert und die Lebensfähigkeit von Melanomzellen reduziert werden [117]. Interessanterweise haben verschiedene Studien gezeigt, dass THC weder auf gesundes umliegendes Gewebe, nicht-transformierte Astrozyten oder Neurone proapoptotisch wirkt und auch durch andere Cannabinoide das Wachstum von Tumorzellen *in vitro* und Tumoren *in vivo* eingeschränkt wird [111,224]. Dabei ist die Unversehrtheit umliegender gesunder Gewebe und Zellen durch die Selektivität von sowohl THC als auch CBD eine wegweisende Eigenschaft für das

therapeutische Potenzial von Cannabinoiden bei der Behandlung von GBM [2], demnach jedoch auch von Metastasen des malignen Melanoms.

Auffällig ist insgesamt, dass die durch Cannabinoide erzielten Effekte durch Zugabe von Astrozyten nicht mehr zu bemerken waren. Ein Grund dafür könnte ein chemoprotektiver, Kalziumkanal-vermittelter Effekt von Astrozyten sein [128,149].

### **5.3.3 Cannabinoide modifizieren den Einfluss von Mikroglia auf LN229 und A375**

Auch Mikroglia können einen hohen Anteil der Tumormasse ausmachen und zeichnen sich durch die Expression von CBs aus [17,100].

Die signifikante Reduktion der Fläche in Kokulturen aus LN229 und 10 % Mikroglia bei Behandlung mit THC und CBD in Kombination zu Beginn der Beobachtung war möglicherweise der Effekt von THC. Der Unterschied in der Flächengröße bestand zwischen der Gruppe mit der alleinigen Behandlung mit CBD im Vergleich zur Kombinationsbehandlung. Hier scheint es auch zu einem synergistischen Effekt der beiden Cannabinoide gekommen zu sein. Bezüglich der Inhibition der Proliferation wurde an anderen Glioblastomzelllinien ein durch CBD verstärkter Effekt von THC nachgewiesen [114]. Mikroglia sollten diesen Effekt durch ihre tumorproliferationsfördernde Wirkung bei beispielsweise Freisetzung von IL-6 hemmen, sodass die Fläche nicht signifikant reduziert sein sollte [240]. In diesem Zusammenhang sollte die Anzahl von Mikroglia durch CB<sub>2</sub> sogar erhöht sein [17]. Die Freisetzung des proliferationsfördernden IL-6 konnte durch THC und CBD jedoch verringert werden, wodurch also die signifikant verringerte Fläche zu erklären wäre [240,241]. Demnach könnte die Kombinationsbehandlung auf die Sphäroidbildung einen positiven Effekt haben, und es besteht die Möglichkeit, dass die Adhäsionskräfte verstärkt wurden. Es ist bekannt, dass Mikroglia als Teil der Sphäroide konstant TNF $\alpha$  produzierten [242,243]. CBD induzieren ihrerseits als Antioxidans TNF $\alpha$  [53], wohingegen THC TNF $\alpha$  negativ moduliert [243]. Trotz dieser Widersprüchlichkeit scheint eine synergistische Wirkung zu einer stabilen und kompakten Sphäroidbildung zu führen. Eine zusätzliche Erklärungsmöglichkeit für eine geringere Fläche wäre eine erhöhte Todesrate, jedoch sprachen die FACS-Ergebnisse dagegen. Eine neuroprotektive Funktion von Mikroglia ist bekannt, wobei auch TNF $\alpha$  eine Rolle spielt, sodass dies auch einen Einfluss auf die Apoptoserate im Tumormikromilieu haben kann [244]. In organotypischen hippocampalen Schnittkulturen konnte THC in mit dieser Studie vergleichbarer Konzentration die Anzahl der Mikroglia reduzieren, die über CB<sub>2</sub> vermittelt wurden [245]. Dies kann auch zu einer Reduktion der Fläche beigetragen haben.

Analog zu den Beobachtungen der Entwicklung der Fläche zeigte sich infolge der Kombinationsbehandlung eine im Vergleich zur CBD-Behandlung geringere Zirkularität. Dies spricht für die Verminderung der Zelladhäsion bei Kombinationsbehandlung, stand allerdings im Widerspruch dazu, dass eine gute Sphäroidbildung in anderen Teilversuchen mit einem hohen Grad an Zirkularität einherging. Durch die kleine Fläche beim Zeitpunkt von 6 h ergab sich bei der Kombinationsbehandlung auch womöglich eine geringere Helligkeit im Vergleich zur Behandlung mit THC oder CBD. Das von TAMs sezernierte TGF- $\beta$  konnte in Studien eine Veränderung des Zytoskeletts nach sich ziehen und auf die Adhäsion durch Hochregulierung von Integrinen Einfluss nehmen [166,246]. Die Wirkung von CB<sub>1</sub> und CB<sub>2</sub> auf das Zytoskelett könnte auch einen Anteil an der Veränderung der Parameter haben [218].

In Versuchen mit A375 kam es erst nach 76 h zu signifikanten Effekten hinsichtlich der Fläche im Vergleich zur Kontrollgruppe, sodass zu vermuten ist, dass Mikroglia durch gegenseitige Wechselwirkungen, also direkte Zell-Zell-Kontakte, Zytokine sowie Chemokine den Effekt der Cannabinoide verlängern, verstärken oder sogar verzögern. Dazu passt die Beobachtung, dass die THC-Behandlung erst nach 76 h signifikant die Zirkularität einschränkte. Aufgrund der kleinen Fläche war bei der Kombinationsbehandlung die „Helligkeit“ bei 6 h am größten. Jedoch hob sich dieser Effekt wieder auf, und alle Behandlungen mit Cannabinoiden wiesen eine signifikant erhöhte „Helligkeit“ nach 76 h auf. Eine mögliche Erklärung ist der Einfluss von Cannabinoiden auf die Adhäsion. Im Gegensatz zu der Beobachtung bei LN229 besteht zudem kein Unterschied zwischen den Cannabinoidgruppen und der Kontrollgruppe hinsichtlich der Todesrate.

Insgesamt betrachtet sind in den Kokulturversuchen mit LN229 als auch A375 jeweils die Effekte der Kombinationsbehandlungen mit Cannabinoiden hervorzuheben, die den größten Einfluss auf die Sphäroidformation hatten.

#### **5.4 Grenzen der Methoden und der verwendeten Parameter**

Tumoren in Lebewesen sind hochkomplexe, organähnliche Strukturen [124], weshalb es schwierig ist, geeignete *in vitro* Modelle zu finden. In unserem Versuchsmodell wurden humane Tumorzelllinien und murine Gliazellen verwendet, sodass Kokulturen aus Zellen verschiedener Spezies hergestellt wurden. Die Verwendung immortalisierter Zellen wurde für die vorliegende Arbeit nicht in Betracht gezogen, da viele Eigenschaften primärer Zellen durch den Immortalisierungsvorgang irreversibel verändert werden und nur bedingt der *in vivo* Situation entsprechen [247,248]. Es scheint also sinnvoll, auf primär gewonnene Gliazellen zurückzugreifen, da diese in ihren Eigenschaften den Gliazellen im Gewebeverband eher entsprechen. Im Rahmen dieser Arbeit ist es

gelingen, ein solches Kokultur-Modell zu etablieren, um damit die Grundlagen der Interaktionen zu verstehen und den Einfluss von Cannabinoiden zu evaluieren. Aufgrund der geringen Verfügbarkeit humaner primärer Astrozyten, limitierter Möglichkeiten zur Gewinnung (hauptsächlich aus Autopsie- oder Biopsieproben) und der ethischen Vertretbarkeit wurden in dieser Arbeit Gliazellen aus Gehirnen neonataler Mäuse verwendet [183].

Die hier verwendete *Liquid-overlay*-Methode gewährleistet eine gute Vergleichbarkeit zwischen den Multizellulären Tumorsphäroiden (MCTS) im Zeitverlauf [185,249] und ermöglicht kontrollierte Bedingungen, die bei der Implantation von Tumorzellen in Tiere nicht gegeben wären. Diese dreidimensionalen, kompakten und kugelförmigen MCTS eignen sich zur experimentellen Anwendung aufgrund des *in vivo* ähnlichen Aufbaus [250,251].

Die Lebendzellmikroskopie eignet sich ausgezeichnet zur Beobachtung von Sphäroiden über ein Zeitintervall, um davon ausgehend auf Eigenschaften der Zellen *in vivo* zu schließen. Neue Therapiemöglichkeiten von Tumorerkrankungen, wie in unserem Fall die Cannabinoidbehandlung der Zellen, können erforscht werden [252]. Dies wurde schon in den verschiedensten Kombinationen von Tumorzellen und beispielsweise Endothelzellen getan [251]. Zudem entstehen auch in Sphäroiden natürliche Zell-Zell-Interaktionen, und auch die vom Zytoskelett abhängige Kontraktion und Spannung wird in Sphäroiden ausgebildet [196]. Allerdings sind die Ergebnisse nicht mit den *in vivo* Bedingungen gleichzusetzen, sodass die Limitationen der Methodik wahrscheinlich zum Scheitern weiterführender klinischer Studien führen würden [252]. Dies lässt sich mit der komplexen Tumornatur begründen [253]. *In vitro* fehlte die Vaskularisierung, aber auch die Einbettung zwischen physiologischen Zellen, sodass das mechanische und chemische Mikromilieu modifiziert war. Für die vorliegende Untersuchung wurden bei den Versuchen mittels Lebendzellmikroskopie die Sphäroidfläche, die Sphäroidzirkularität und die „Helligkeit“ als Parameter gewählt. Hierbei handelt es sich um Parameter, die über die Zell-Zell-Interaktion eine Aussage ermöglichen. Erhöhte Adhäsion sowie Kontraktilität führen zu einer Verringerung der Fläche, wodurch auch die Helligkeit abnehmen kann. Über die Qualität der Adhäsion wiederum gibt die Zirkularität Aufschluss. Die Erhebung dieser Kenngröße erlaubt die Vergleichbarkeit der verschiedenen Gruppen. Jedoch ist es möglich, dass bei einem kürzeren Beobachtungszeitraum weitere signifikante Ergebnisse hinzugekommen wären, da vor dem Ende des Beobachtungszeitraums bereits die kleinste mögliche Fläche erreicht worden wäre.

Die mittels FACS bestimmte Todesrate kann durch methodenbedingten Verlust von Zellen bei der Isolation der Sphäroids aus den Löchern der Lochplatte und in der Vor-

bereitung der Zellen variieren [251]. Ebenso könnte es zu Variationen der Zelltodesrate durch die mechanische Handhabung und die Zentrifugationsschritte bei der Vorbereitung gekommen sein. Gerade bei A375 Zellen zeigte sich jedoch eine – im Rahmen biologischer Systeme – gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse, die an den geringen Varianzen zwischen verschiedenen Experimenten sichtbar wurde.

Als eine Bestätigung der Ergebnisse der FACS-Versuche können die Immunfluoreszenzfärbungen gesehen werden. Hierbei wurde zum einen das Überleben der überwiegenden Mehrzahl an Zellen bestätigt und zum anderen auch tote Zellen erkannt. Die Unsicherheit der Schnittebene ermöglichte keinen standardisierten Vergleich zwischen den Schnitten, was allerdings kein Nachteil hinsichtlich der Beantwortung der Fragestellung war. Eine Vergleichbarkeit ließ sich auch durch die veränderte Zellzahl (Lebendzellmikroskopie und FACS 20 000 Zellen) von 100 000 Zellen/Sphäroid für Färbungen nicht vollständig erreichen, da die Diffusionsstrecke entsprechend länger war und dadurch keine gleichwertige Versorgung zentral gelegener Zellen erfolgte.

In größeren Sphäroiden ist das Milieu zentral gelegener Zellen durch weniger Sauerstoff, Nährstoffe sowie die Ansammlung von Metaboliten charakterisiert. Dadurch entsteht ein nekrotisches Zentrum, welches in unseren Versuchen mit 100 000 Zellen/Sphäroid beobachtet wurde [251,254]. Jedoch lassen sich die entsprechend größeren Sphäroide, die für die Färbungen verwendet wurden, besser in Beziehung setzen zu größeren Tumoren *in vivo* und stellen somit ein realistischeres Modell als kleinere Sphäroide dar [255].

Die Komplexität des Tumormikromilieus wird durch Verfahren wie die hier verwendete *Liquid-overlay*-Methode zur Herstellung von Tumorsphäroiden stark vereinfacht. Dabei konnte die wichtige Rolle von T-Zellen, aber auch Endothelzellen, Perizyten oder eingewanderten Makrophagen nicht ausreichend berücksichtigt werden [256]. MCTS, wie sie hier hergestellt wurden, sind allerdings gut geeignet für die Erforschung und Simulation der mechanischen Eigenschaften und Interaktionen zwischen Zellen [250,257]. In diesen 3D-Modellen lassen sich Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen sowie die Mikroumgebung gut untersuchen, ohne Versuchstiere in *in vivo* Experimenten verwenden zu müssen [250,251]. Die Anzahl der Tiere für die Gewinnung von Gliazellen für diese Arbeit wurde im Sinne von 3R reduziert.

In den 3D-Modellen kann auch die Organisation besser beurteilt werden als in 2D-Modellen, und insgesamt entspricht die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix mehr der *in vivo* Situation [250,258]. Im nächsten Schritt wäre es dann möglich, primäre Tumor- und Gliazellen desselben Tumors zu isolieren und zu kultivieren oder Tumorzellen in Tiere zu implantieren.



## 5.5 Zusammenfassung

GBM und Metastasen des malignen Melanoms sind Erkrankungen mit schlechter Prognose. Es hat sich herauskristallisiert, dass Astrozyten und Mikroglia eine wichtige Rolle im Tumormikromilieu innehaben [75,101]. Durch ihren Anteil von bis zu 50 % der Tumormasse sind Gliazellen in der Lage, auf Tumorzellen über diverse Stoffe und mechanischen Kontakt einzuwirken [77]. In den Versuchen zeigte sich, dass Astrozyten und Mikroglia die Sphäroidbildung sowohl von A375 als auch LN229 verlangsamen konnten. Da Bestandteile des Endocannabinoidsystems auf den verschiedenen Zellarten vorhanden sind, bieten Cannabinoide eine gute Möglichkeit der Einflussnahme auf Tumorzellen, Astrozyten und Mikroglia [193]. Sie beeinträchtigen die Tumorprogression unter anderem durch die Auslösung von Apoptose [30]. Mittels Lebendzellmikroskopie (Aggregationsverhalten), FACS (Todesrate) und Immunfluoreszenzfärbungen (Morphologie) wurden die Tumorzelllinien LN229 und A375 auf Wechselwirkungen mit Astrozyten und Mikroglia untersucht und der Einfluss der Phytocannabinoide THC und CBD betrachtet [86]. Für beide Phytocannabinoide war ein antitumoraler Effekt bekannt [105,106]. Die Phytocannabinoide THC und CBD führten bei beiden Zelllinien zu einer verzögerten Sphäroidbildung, wobei die Effekte durch die Zugabe von Astrozyten teilweise aufgehoben wurden.

Unterschiedliche Einflüsse wie mechanischer Zell-Zell-Kontakt oder MMPs ließen sich als mögliche Einflussfaktoren auf die verschiedenen Parameter der Lebendzellmikroskopie eruieren. Kein Einfluss hingegen wurde auf die Todesrate der Zelltypen in Kokulturen und nach Behandlung mit THC und/oder CBD festgestellt. Mit Hilfe der Immunfluoreszenzfärbungen wurden sowohl ein intakter Zellverband mit den betrachteten Zelltypen sichtbar gemacht als auch tote Zellen identifiziert.

Die Untersuchung von Invasionseigenschaften von Einzelzell- und kollektiver Migration wurde in unserer Arbeitsgruppe durchgeführt [193]. Zukünftig könnte eine Quantifizierung von im Mikromilieu vorhandenen Zytokinen mittels ELISA-Untersuchungen ergänzt werden. Des Weiteren wäre der Einsatz von Chemotherapeutika wie Temozolomid oder Radiotherapie in dem Versuchsmodell denkbar, um die womöglich protektive Wirkung von Gliazellen auf Tumorzellen zu erforschen. Die gezielte örtliche Applikation mit dem Ziel der Verkleinerung des Tumors, Verringerung der Invasivität sowie Verhinderung von Metastasen und Angiogenese und damit der Aggressivität sind langfristig therapeutisch erstrebenswerte Ziele. Anhand der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit ist zu erwarten, dass auch THC und CBD zukünftig einen Beitrag zu effektiveren Therapien leisten können.

## 6 Literaturverzeichnis

1. B. Petrovska, "Historical review of medicinal plants' usage," *Pharmacogn. Rev.*, vol. 6, no. 11, p. 1, 2012.
2. Parolaro D, Massi P. Cannabinoids as potential new therapy for the treatment of gliomas. *Expert Rev Neurother.* 2008 Jan;8(1):37-49.
3. E. B. Russo, "Beyond Cannabis: Plants and the Endocannabinoid System," *Trends Pharmacol. Sci.*, vol. 37, no. 7, pp. 594–606, 2016.
4. S. A. Bonini *et al.*, "Cannabis sativa: A comprehensive ethnopharmacological review of a medicinal plant with a long history," *J. Ethnopharmacol.*, vol. 227, no. May, pp. 300–315, 2018.
5. H.-C. Lu and K. Mackie, "Review of the Endocannabinoid System," *Biol. Psychiatry Cogn. Neurosci. Neuroimaging*, no. 24, pp. 1–9, 2020.
6. H. Horn, B. Böhme, L. Dietrich, and M. Koch, "Endocannabinoids in body weight control," *Pharmaceuticals*, vol. 11, no. 2, 2018.
7. H. C. Lu and K. Mackie, "An introduction to the endogenous cannabinoid system," *Biological Psychiatry*, vol. 79, no. 7. pp. 516–525, 2016.
8. V. Di Marzo *et al.*, "Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons," *Nature*, vol. 372, no. 6507. pp. 686–691, 1994.
9. F. A. Iannotti, V. Di Marzo, and S. Petrosino, "Endocannabinoids and endocannabinoid-related mediators: Targets, metabolism and role in neurological disorders," *Prog. Lipid Res.*, vol. 62, pp. 107–128, 2016.
10. J. Guindon and A. G. Hohmann, "The endocannabinoid system and cancer: Therapeutic implication," *Br. J. Pharmacol.*, vol. 163, no. 7, pp. 1447–1463, 2011.
11. A. Chicca, J. Marazzi, S. Nicolussi, and J. Gertsch, "Evidence for bidirectional endocannabinoid transport across cell membranes," *J. Biol. Chem.*, vol. 287, no. 41, pp. 34660–34682, 2012.
12. O. Aizpurua-Olaizola, I. Elezgarai, I. Rico-Barrio, I. Zarandona, N. Etxebarria, and A. Usobiaga, "Targeting the endocannabinoid system: future therapeutic strategies," *Drug Discov. Today*, vol. 22, no. 1, pp. 105–110, 2017.
13. G. Velasco, S. Hernández-Tiedra, D. Dávila, and M. Lorente, "The use of cannabinoids as anticancer agents," *Prog. Neuro-Psychopharmacology Biol. Psychiatry*, vol. 64, pp. 259–266, 2015.
14. P. E. Castillo, T. J. Younts, A. E. Chávez, Y. Hashimoto-dani, D. P. Purpura, and A. Einstein, "Endocannabinoid signaling and synaptic function," *Neuron*, vol. 76, no. 1, pp. 70–81, 2013.
15. S. Pisanti, P. Picardi, A. D'Alessandro, C. Laezza, and M. Bifulco, "The endocannabinoid signaling system in cancer," *Trends Pharmacol. Sci.*, vol. 34, no. 5, pp. 273–282, 2013.
16. G. Wilkie, B. Sakr, and T. Rizack, "Medical marijuana use in oncology," *JAMA Oncol.*, vol. 2, no. 5, pp. 670–675, 2016.
17. N. Stella, "Cannabinoid and cannabinoid-like receptors in microglia, astrocytes, and astrocytomas," *Glia*, vol. 58, no. 9, pp. 1017–1030, 2010.
18. B. Chakravarti, J. Ravi, and R. K. Ganju, "Cannabinoids as therapeutic agents in cancer: current status and future implications.,", *Oncotarget*, vol. 5, no. 15, pp. 5852–72, 2014.
19. F. A. Javid, R. M. Phillips, S. Afshinjavid, R. Verde, and A. Ligresti, "Cannabinoid pharmacology in cancer research: A new hope for cancer patients?," *Eur. J. Pharmacol.*, vol. 775, pp. 1–14, 2016.
20. M. S. Ibsen, M. Connor, and M. Glass, "Cannabinoid CB 1 and CB 2 Receptor Signaling and Bias," *Cannabis Cannabinoid Res.*, vol. 2, no. 1, pp. 48–60, 2017.

21. M. Glass and J. K. Northup, "Agonist selective regulation of G proteins by cannabinoid CB1 and CB2 receptors," *Mol. Pharmacol.*, vol. 56, no. 6, pp. 1362–1369, 1999.
22. J. J. Rodríguez, K. Mackie, and V. M. Pickel, "Ultrastructural localization of the CB1 cannabinoid receptor in  $\mu$ -opioid receptor patches of the rat caudate putamen nucleus," *J. Neurosci.*, vol. 21, no. 3, pp. 823–833, 2001.
23. M. Navarrete and A. Araque, "Endocannabinoids Mediate Neuron-Astrocyte Communication," *Neuron*, vol. 57, no. 6, pp. 883–893, 2008.
24. D. Wootten, A. Christopoulos, M. Marti-Solano, M. M. Babu, and P. M. Sexton, "Mechanisms of signalling and biased agonism in G protein-coupled receptors," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 19, no. 10, pp. 638–653, 2018.
25. H. Sharir and M. E. Abood, "Pharmacological characterization of GPR55, a putative cannabinoid receptor," *Pharmacol. Ther.*, vol. 126, no. 3, pp. 301–313, 2010.
26. M. R. Kolbe *et al.*, "Thc reduces ki67-immunoreactive cells derived from human primary glioblastoma in a gpr55-dependent manner," *Cancers (Basel)*, vol. 13, no. 5, pp. 1–21, 2021.
27. J. Kargl *et al.*, "GPR55 promotes migration and adhesion of colon cancer cells indicating a role in metastasis," *Br. J. Pharmacol.*, vol. 173, no. 1, pp. 142–154, 2016.
28. C. M. Henstridge, "Off-target cannabinoid effects mediated by GPR55," *Pharmacology*, vol. 89, no. 3–4, pp. 179–187, 2012.
29. D. McHugh, J. Page, E. Dunn, and H. B. Bradshaw, " $\Delta$  9-tetrahydrocannabinol and N-arachidonyl glycine are full agonists at GPR18 receptors and induce migration in human endometrial HEC-1B cells," *Br. J. Pharmacol.*, vol. 165, no. 8, pp. 2414–2424, 2012.
30. O. Kovalchuk and I. Kovalchuk, "Cannabinoids as anticancer therapeutic agents," *Cell Cycle*, vol. 19, no. 9, pp. 961–989, 2020.
31. L. De Petrocellis and V. Di Marzo, "An introduction to the endocannabinoid system: from the early to the latest concepts," *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 23, no. 1, pp. 1–15, 2009.
32. N. Solowij *et al.*, "A randomised controlled trial of vaporised  $\Delta$  9 -tetrahydrocannabinol and cannabidiol alone and in combination in frequent and infrequent cannabis users: acute intoxication effects," *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.*, vol. 269, no. 1, pp. 17–35, 2019.
33. M. Maccarrone, "Phytocannabinoids and endocannabinoids: different in nature," *Rend. Lincei*, vol. 31, no. 4, pp. 931–938, 2020.
34. J. K. Burns, "Pathways from Cannabis to Psychosis: A Review of the Evidence," *Front. Psychiatry*, vol. 4, no. October, pp. 1–12, 2013.
35. Y. Chye, R. Kirkham, V. Lorenzetti, E. McTavish, N. Solowij, and M. Yücel, "Cannabis, Cannabinoids, and Brain Morphology: A Review of the Evidence," *Biol. Psychiatry Cogn. Neurosci. Neuroimaging*, 2020.
36. A. Blake *et al.*, "A selective review of medical cannabis in cancer pain management," *Ann. Palliat. Med.*, vol. 6, pp. S215–S222, 2017.
37. M. A. Überall, "A review of scientific evidence for THC:CBD oromucosal spray (nabiximols) in the management of chronic pain," *J. Pain Res.*, vol. 13, pp. 399–410, 2020.
38. R. Maldonado, J. E. Baños, and D. Cabañero, "The endocannabinoid system and neuropathic pain," *Pain*, vol. 157, no. 2, pp. S23–S32, 2016.
39. A. F. Hoffman and C. R. Lupica, "Synaptic targets of  $\Delta$ 9-tetrahydrocannabinol in the central nervous system," *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, vol. 3, no. 8, 2013.
40. Tramèr MR, Carroll D, Campbell FA, Reynolds DJ, Moore RA, McQuay HJ. Cannabinoids for control of chemotherapy induced nausea and vomiting: quantitative systematic review. *BMJ*. 2001 Jul 7;323(7303):16-21.

41. Darmani NA. Delta-9-tetrahydrocannabinol differentially suppresses cisplatin-induced emesis and indices of motor function via cannabinoid CB(1) receptors in the least shrew. *Pharmacol Biochem Behav.* 2001 May-Jun;69(1-2):239-49.
42. Rock EM, Bolognini D, Limebeer CL, Cascio MG, Anavi-Goffer S, Fletcher PJ, Mechoulam R, Pertwee RG, Parker LA. Cannabidiol, a non-psychoactive component of cannabis, attenuates vomiting and nausea-like behaviour via indirect agonism of 5-HT(1A) somatodendritic autoreceptors in the dorsal raphe nucleus. *Br J Pharmacol.* 2012 Apr;165(8):2620-34.
43. A. Thomas, G. L. Baillie, A. M. Phillips, R. K. Razdan, R. A. Ross, and R. G. Pertwee, "Cannabidiol displays unexpectedly high potency as an antagonist of CB 1 and CB 2 receptor agonists in vitro," *Br. J. Pharmacol.*, vol. 150, no. 5, pp. 613–623, 2007.
44. A. Straiker, M. Dvorakova, A. Zimmowitch, and K. MacKie, "Cannabidiol inhibits endocannabinoid signaling in autaptic hippocampal neurons," *Mol. Pharmacol.*, vol. 94, no. 1, pp. 743–748, 2018.
45. R. B. Laprairie, A. M. Bagher, M. E. M. Kelly, and E. M. Denovan-Wright, "Cannabidiol is a negative allosteric modulator of the cannabinoid CB1 receptor," *Br. J. Pharmacol.*, vol. 172, no. 20, pp. 4790–4805, 2015.
46. Tham M, Yilmaz O, Alaverdashvili M, Kelly MEM, Denovan-Wright EM, Laprairie RB. Allosteric and orthosteric pharmacology of cannabidiol and cannabidiol-dimethylheptyl at the type 1 and type 2 cannabinoid receptors. *Br J Pharmacol.* 2019 May;176(10):1455-1469.
47. D. L. Boggs, J. D. Nguyen, D. Morgenson, M. A. Taffe, and M. Ranganathan, "Clinical and Preclinical Evidence for Functional Interactions of Cannabidiol and  $\Delta^9$ -Tetrahydrocannabinol," *Neuropsychopharmacology*, vol. 43, no. 1, pp. 142–154, 2018.
48. A. Karz *et al.*, "Melanoma central nervous system metastases: An update to approaches, challenges, and opportunities," *Pigment Cell Melanoma Res.*, vol. 35, no. 6, pp. 554–572, 2022.
49. A. C. Howlett *et al.*, "International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors," *Pharmacol. Rev.*, vol. 54, no. 2, pp. 161–202, 2002.
50. R. G. Pertwee *et al.*, "International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXIX. Cannabinoid receptors and their ligands: Beyond CB1 and CB2," *Pharmacol. Rev.*, vol. 62, no. 4, pp. 588–631, 2010.
51. E. Ryberg *et al.*, "The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor," *Br. J. Pharmacol.*, vol. 152, no. 7, pp. 1092–1101, 2007.
52. L. E. Filipciuc *et al.*, "Major Phytocannabinoids and Their Related Compounds: Should We Only Search for Drugs That Act on Cannabinoid Receptors?," *Pharmaceutics*, 2021.
53. J. M. McPartland, M. Duncan, V. Di Marzo, and R. G. Pertwee, "Are cannabidiol and  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabivarin negative modulators of the endocannabinoid system? A systematic review," *Br. J. Pharmacol.*, vol. 172, no. 3, pp. 737–753, 2015.
54. C. Muller, P. Morales, and P. H. Reggio, "Cannabinoid ligands targeting TRP channels," *Front. Mol. Neurosci.*, vol. 11, no. January, pp. 1–15, 2019.
55. A. F. Tamimi and M. Juweid, "Epidemiology and Outcome of Glioblastoma," *Glioblastoma*, pp. 143–153, 2017.
56. D. N. Louis *et al.*, "The 2021 WHO classification of tumors of the central nervous system: A summary," *Neuro. Oncol.*, vol. 23, no. 8, pp. 1231–1251, 2021.
57. A. Pellerino, M. Caccese, M. Padovan, G. Cerretti, and G. Lombardi, "Epidemiology, risk factors, and prognostic factors of gliomas," *Clin. Transl. Imaging*, vol. 10, no. 5, pp. 467–475, 2022.
58. Ma R, Taphoorn MJB, Plaha P. Advances in the management of glioblastoma. *J Neuroil Neurosurg Psychiatry.* 2021 Oct;92(10):1103-1111.
59. C. A. Lawton, "Malignant Gliomas in Adults," *Yearb. Oncol.*, vol. 2009, p. 145, 2009.

60. F. Hanif, K. Muzaffar, K. Perveen, S. M. Malhi, and S. U. Simjee, "Glioblastoma multiforme: A review of its epidemiology and pathogenesis through clinical presentation and treatment," *Asian Pacific J. Cancer Prev.*, vol. 18, no. 1, pp. 3–9, 2017.
61. Weller M, van den Bent M, Hopkins K, Tonn JC, Stupp R, Falini A, Cohen-Jonathan-Moyal E, Frappaz D, Henriksson R, Balana C, Chinot O, Ram Z, Reifenberger G, Soffietti R, Wick W; European Association for Neuro-Oncology (EANO) Task Force on Malignant Glioma. EANO guideline for the diagnosis and treatment of anaplastic gliomas and glioblastoma. *Lancet Oncol.* 2014 Aug;15(9):e395-403.
62. S. Osuka and E. G. Van Meir, "Overcoming therapeutic resistance in glioblastoma: The way forward," *J. Clin. Invest.*, vol. 127, no. 2, pp. 415–426, 2017.
63. K. Anjum *et al.*, "Current status and future therapeutic perspectives of glioblastoma multiforme (GBM) therapy: A review," *Biomed. Pharmacother.*, vol. 92, pp. 681–689, Aug. 2017.
64. E. Maverakis *et al.*, "Metastatic melanoma – A review of current and future treatment options," *Acta Derm. Venereol.*, vol. 95, no. 5, pp. 516–524, 2015.
65. O. Michielin, A. C. J. Van Akkooi, P. A. Ascierto, R. Dummer, U. Keilholz, and G. Committee, "Cutaneous melanoma : ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis , treatment and follow-up †," *Cancer-related Cogn. Impair.*, vol. 30, no. 12, pp. 1884–1901, 2019.
66. B. Bandarchi, L. Ma, R. Navab, A. Seth, and G. Rasty, "From melanocyte to metastatic malignant melanoma," *Dermatol. Res. Pract.*, vol. 2010, no. 1, 2010.
67. M. Tio *et al.*, "Survival and prognostic factors for patients with melanoma brain metastases in the era of modern systemic therapy," *Pigment Cell Melanoma Res.*, vol. 31, no. 4, pp. 509–515, 2018.
68. Klein A, Schwartz H, Sagi-Assif O, Meshel T, Izraely S, Ben Menachem S, Bengaiev R, Ben-Shmuel A, Nahmias C, Couraud PO, Witz IP, Erez N. Astrocytes facilitate melanoma brain metastasis via secretion of IL-23. *J Pathol.* 2015 May;236(1):116-27.
69. T. Redmer, "Deciphering mechanisms of brain metastasis in melanoma - the gist of the matter," *Mol. Cancer*, vol. 17, no. 1, pp. 1–17, 2018.
70. S. Grochans *et al.*, "Epidemiology of Glioblastoma Multiforme—Literature Review," *Cancers (Basel)*, vol. 14, no. 10, 2022.
71. D. N. Louis *et al.*, "The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary," *Acta Neuropathol.*, vol. 131, no. 6, pp. 803–820, 2016.
72. Jiang Y, Marinescu VD, Xie Y, Jarvius M, Maturi NP, Haglund C, Olofsson S, Lindberg N, Olofsson T, Leijonmarck C, Hesselager G, Alafuzoff I, Fryknäs M, Larsson R, Nelander S, Uhrbom L. Glioblastoma Cell Malignancy and Drug Sensitivity Are Affected by the Cell of Origin. *Cell Rep.* 2017 Jan 24;18(4):977-990. Erratum in: *Cell Rep.* 2017 May 2;19(5):1080-1081.
73. Perrin SL, Samuel MS, Koszyca B, Brown MP, Ebert LM, Oksdath M, Gomez GA. Glioblastoma heterogeneity and the tumour microenvironment: implications for preclinical research and development of new treatments. *Biochem Soc Trans.* 2019 Apr 30;47(2):625-638.
74. P. Kleihues, F. Soylemezoglu, B. Schäuble, B. W. Scheithauer, and P. C. Burger, "Histopathology, classification, and grading of gliomas," *Glia*, vol. 15, no. 3, pp. 211–221, 1995.
75. S. Roesch, C. Rapp, S. Dettling, and C. Herold-Mende, "When immune cells turn bad—tumor-associated microglia/macrophages in glioma," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 19, no. 2, 2018.
76. M. Brandao, T. Simon, G. Critchley, and G. Giamas, "Astrocytes, the rising stars of the glioblastoma microenvironment," *Glia*, no. April 2018, pp. 779–790, 2018.
77. Rath BH, Fair JM, Jamal M, Camphausen K, Tofilon PJ. Astrocytes enhance the invasion potential of glioblastoma stem-like cells. *PLoS One.* 2013;8(1):e54752.

78. M. Osswald *et al.*, "Brain tumour cells interconnect to a functional and resistant network," *Nature*, vol. 528, no. 7580, pp. 93–98, 2015.
79. D. B. Hoelzinger, T. Demuth, and M. E. Berens, "Autocrine factors that sustain glioma invasion and paracrine biology in the brain microenvironment," *J. Natl. Cancer Inst.*, vol. 99, no. 21, pp. 1583–1593, 2007.
80. M. C. de Gooijer, M. Guillén Navarro, R. Bernards, T. Wurdinger, and O. van Tellingen, "An Experimenter's Guide to Glioblastoma Invasion Pathways," *Trends Mol. Med.*, vol. 24, no. 9, pp. 763–780, 2018.
81. H. J. Scherer, "The forms of growth in gliomas and their practical significance," *Brain*, vol. 63, no. 1, pp. 1–35, 1940.
82. H. Wolfenson, I. Lavelin, and B. Geiger, "Dynamic Regulation of the Structure and Functions of Integrin Adhesions," *Dev. Cell*, vol. 24, no. 5, pp. 447–458, 2013.
83. C. Beadle, M. C. Assanah, P. Monzo, R. Vallee, S. S. Rosenfeld, and P. Canoll, "The Role of Myosin II in Glioma Invasion of the Brain," *Mol. Biol. Cell*, vol. 20, no. May, pp. 3357–3368, 2008.
84. V. A. Cuddapah, S. Robel, S. Watkins, and H. Sontheimer, "A neurocentric perspective on glioma invasion," *Nat. Rev. Neurosci.*, vol. 15, no. 7, pp. 455–465, 2014.
85. V. Montana and H. Sontheimer, "Bradykinin promotes the Chemotactic invasion of primary brain tumors," *J. Neurosci.*, vol. 31, no. 13, pp. 4858–4867, 2011.
86. C. A. Dumitru, I. E. Sandalcioglu, and M. Karsak, "Cannabinoids in Glioblastoma Therapy: New Applications for Old Drugs," *Front. Mol. Neurosci.*, vol. 11, no. May, pp. 1–7, 2018.
87. A. Wells, J. Grahovac, S. Wheeler, B. Ma, and D. Lauffenburger, "Targeting tumor cell motility as a strategy against invasion and metastasis," *Trends Pharmacol. Sci.*, vol. 34, no. 5, pp. 283–289, 2013.
88. P. S. Steeg, "Tumor metastasis: Mechanistic insights and clinical challenges," *Nat. Med.*, vol. 12, no. 8, pp. 895–904, 2006.
89. Y. Kienast *et al.*, "Real-time imaging reveals the single steps of brain metastasis formation," *Nat. Med.*, vol. 16, no. 1, pp. 116–122, 2010.
90. I. C. Glitza, A. B. Heimberger, E. P. Sulman, M. A. Davies, *Brain Metastases from Primary Tumors*, Volume 3, Academic Press, pp. 267–297, 2016.
91. Ostrom QT, Wright CH, Barnholtz-Sloan JS. *Brain metastases: epidemiology. Handb Clin Neurol.* 2018;149:27–42.
92. Soto MS, Sibson NR. The Multifarious Role of Microglia in Brain Metastasis. *Front Cell Neurosci.* 2018 Nov 12;12:414.
93. S. Kuchler-Bopp, J. P. Delaunoy, J. C. Artault, M. Zaepfel, and J. B. Dietrich, "Astrocytes induce several blood-brain barrier properties in non-neural endothelial cells," *Neuroreport*, vol. 10, no. 6, pp. 253–257, 1986.
94. D. F. Quail and J. A. Joyce, "The Microenvironmental Landscape of Brain Tumors," *Cancer Cell*, vol. 31, no. 3, pp. 326–341, 2017.
95. L. Saias, A. Gomes, M. Cazales, B. Ducommun, and V. Lobjois, "Cell-cell adhesion and cytoskeleton tension oppose each other in regulating tumor cell aggregation," *Cancer Res.*, vol. 75, no. 12, pp. 2426–2433, 2015.
96. C. Fazakas *et al.*, "Transmigration of melanoma cells through the blood-brain barrier: Role of endothelial tight junctions and melanoma-released serine proteases," *PLoS One*, vol. 6, no. 6, 2011.
97. B. P. Murry, B. E. Blust, A. Singh, T. P. Foster, and D. Marchetti, "Heparanase mechanisms of melanoma metastasis to the brain: Development and use of a brain slice model," *J. Cell. Biochem.*, vol. 97, no. 2, pp. 217–225, 2006.
98. I. J. Fidler, "The role of the organ microenvironment in brain metastasis," *Semin. Cancer Biol.*, vol. 21, no. 2, pp. 107–112, 2011.

99. T. G. Simonsen, J. V. Gaustad, and E. K. Rofstad, "Intracranial tumor cell migration and the development of multiple brain metastases in malignant melanoma," *Transl. Oncol.*, vol. 9, no. 3, pp. 211–218, 2016.
100. D. Hambardzumyan, D. H. Gutmann, and H. Kettenmann, "The role of microglia and macrophages in glioma maintenance and progression," *Nat. Neurosci.*, vol. 19, no. 1, pp. 20–27, 2015.
101. M. L. Broekman, S. L. N. Maas, E. R. Abels, T. R. Mempel, A. M. Krichevsky, and X. O. Breakefield, "Multidimensional communication in the microenvirons of glioblastoma," *Nat. Rev. Neurol.*, vol. 14, no. 8, pp. 482–495, 2018.
102. A. Boire, P. K. Brastianos, L. Garzia, and M. Valiente, "Brain metastasis," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 20, no. 1, pp. 4–11, 2020.
103. B. Moran, R. Silva, A. S. Perry, and W. M. Gallagher, "Epigenetics of malignant melanoma," *Semin. Cancer Biol.*, vol. 51, pp. 80–88, 2018.
104. C. Costas-Insua and M. Guzmán, "Endocannabinoid signaling in glioma," *Glia*, no. January 2022, pp. 127–138, 2022.
105. S. D. McAllister *et al.*, "Cannabinoids selectively inhibit proliferation and induce death of cultured human glioblastoma multiforme cells," *J. Neurooncol.*, vol. 74, no. 1, pp. 31–40, 2005.
106. R. Ramer and B. Hinz, "Antitumorigenic targets of cannabinoids – current status and implications," *Expert Opin. Ther. Targets*, vol. 20, no. 10, pp. 1219–1235, 2016.
107. B. Hinz and R. Ramer, "Cannabinoids as anticancer drugs: current status of preclinical research," *Br. J. Cancer*, vol. 127, no. 1, pp. 1–13, 2022.
108. L. X. Zhu *et al.*, "Δ-9-Tetrahydrocannabinol Inhibits Antitumor Immunity by a CB2 Receptor-Mediated, Cytokine-Dependent Pathway," *J. Immunol.*, vol. 165, no. 1, pp. 373–380, 2000.
109. R. J. McKallip, M. Nagarkatti, and P. S. Nagarkatti, "Δ-9-Tetrahydrocannabinol Enhances Breast Cancer Growth and Metastasis by Suppression of the Antitumor Immune Response," *J. Immunol.*, vol. 174, no. 6, pp. 3281–3289, 2005.
110. F. Hashemi, M. Hashemi, and A. R. Zali, "Cannabinoids as a Promising Therapeutic Approach for the Treatment of Glioblastoma Multiforme : A Literature Review," *Int. Clin. Neurosci. J.*, vol. 3, no. 3, pp. 138–143, 2016.
111. I. Galve-Roperh, C. Sánchez, M. L. Cortés, T. G. Del Pulgar, M. Izquierdo, and M. Guzmán, "Anti-tumoral action of cannabinoids: Involvement of sustained ceramide accumulation and extracellular signal-regulated kinase activation," *Nat. Med.*, vol. 6, no. 3, pp. 313–319, 2000.
112. E. Kozela, A. Juknat, and Z. Vogel, "Modulation of astrocyte activity by cannabidiol, a nonpsychoactive cannabinoid," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 18, no. 8, 2017.
113. A. Vaccani, P. Massi, A. Colombo, T. Rubino, and D. Parolaro, "Cannabidiol inhibits human glioma cell migration through a cannabinoid receptor-independent mechanism," *Br. J. Pharmacol.*, vol. 144, no. 8, pp. 1032–1036, 2005.
114. J. P. Marcu *et al.*, "Cannabidiol Enhances the Inhibitory Effects of 9-Tetrahydrocannabinol on Human Glioblastoma Cell Proliferation and Survival," *Mol. Cancer Ther.*, vol. 9, no. 1, pp. 180–189, 2010.
115. Blázquez C, Carracedo A, Barrado L, Real PJ, Fernández-Luna JL, Velasco G, Malumbres M, Guzmán M. Cannabinoid receptors as novel targets for the treatment of melanoma. *FASEB J.* 2006 Dec;20(14):2633-5.
116. A. Ellert-Miklaszewska, B. Kaminska, and L. Konarska, "Cannabinoids down-regulate PI3K/Akt and Erk signalling pathways and activate proapoptotic function of Bad protein," *Cell. Signal.*, vol. 17, no. 1, pp. 25–37, 2005.
117. J. L. Armstrong *et al.*, "Exploiting cannabinoid-induced cytotoxic autophagy to drive melanoma cell death," *J. Invest. Dermatol.*, vol. 135, no. 6, pp. 1629–1637, 2015.

118. Seltzer ES, Watters AK, MacKenzie D Jr, Granat LM, Zhang D. Cannabidiol (CBD) as a Promising Anti-Cancer Drug. *Cancers (Basel)*. 2020 Oct 30;12(11):3203.
119. E. Simmerman, X. Qin, J. C. Yu, and B. Baban, "Cannabinoids as a Potential New and Novel Treatment for Melanoma: A Pilot Study in a Murine Model," *J. Surg. Res.*, vol. 235, pp. 210–215, 2019.
120. A. Shrivastava, P. M. Kuzontkoski, J. E. Groopman, and A. Prasad, "Cannabidiol induces programmed cell death in breast cancer cells by coordinating the cross-talk between apoptosis and autophagy," *Mol. Cancer Ther.*, vol. 10, no. 7, pp. 1161–1172, 2011.
121. D. A. Ladin, E. Soliman, L. T. Griffin, and R. Van Dross, "Preclinical and clinical assessment of cannabinoids as anti-cancer agents," *Front. Pharmacol.*, vol. 7, no. OCT, pp. 1–18, 2016.
122. S. D. McAllister *et al.*, "Pathways mediating the effects of cannabidiol on the reduction of breast cancer cell proliferation, invasion, and metastasis," *Breast Cancer Res. Treat.*, vol. 129, no. 1, pp. 37–47, 2011.
123. R. Ramer, J. Merkord, H. Rohde, and B. Hinz, "Cannabidiol inhibits cancer cell invasion via upregulation of tissue inhibitor of matrix metalloproteinases-1," *Biochem. Pharmacol.*, vol. 79, no. 7, pp. 955–966, 2010.
124. M. Chatzinikolaidou, "Cell spheroids: the new frontiers in in vitro models for cancer drug validation," *Drug Discov. Today*, vol. 21, no. 9, pp. 1553–1560, 2016.
125. N. Dumont *et al.*, "Breast fibroblasts modulate early dissemination, tumorigenesis, and metastasis through alteration of extracellular matrix characteristics," *Neoplasia (United States)*, vol. 15, no. 3, pp. 249–262, 2013.
126. D. Matias *et al.*, "Microglia/Astrocytes–Glioblastoma Crosstalk: Crucial Molecular Mechanisms and Microenvironmental Factors," *Front. Cell. Neurosci.*, vol. 12, no. August, pp. 1–22, 2018.
127. S. K. Mittal and P. A. Roche, "Suppression of antigen presentation by IL-10," *Curr. Opin. Immunol.*, vol. 34, pp. 22–27, 2015.
128. A. L. Placone, A. Quiñones-Hinojosa, and P. C. Searson, "The role of astrocytes in the progression of brain cancer: complicating the picture of the tumor microenvironment," *Tumor Biol.*, vol. 37, no. 1, pp. 61–69, 2015.
129. S. M. Razavi, K. E. Lee, B. E. Jin, P. S. Aujla, S. Gholamin, and G. Li, "Immune Evasion Strategies of Glioblastoma," *Front. Surg.*, vol. 3, no. March, pp. 1–9, 2016.
130. J. Wei *et al.*, "Hypoxia potentiates glioma-mediated immunosuppression," *PLoS One*, vol. 6, no. 1, 2011.
131. T. N. Gide, J. S. Wilmott, R. A. Scolyer, and G. V. Long, "Primary and acquired resistance to immune checkpoint inhibitors in metastatic melanoma," *Clin. Cancer Res.*, vol. 24, no. 6, pp. 1260–1270, 2018.
132. A. Matejuk and R. M. Ransohoff, "Crosstalk Between Astrocytes and Microglia: An Overview," *Front. Immunol.*, vol. 11, no. July, pp. 1–11, 2020.
133. S. A. Liddelow *et al.*, "Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia," *Nature*, vol. 541, no. 7638, pp. 481–487, 2017.
134. B. A. Macvicar and E. A. Newman, "Astrocyte regulation of blood flow in the brain," *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, vol. 7, no. 5, pp. 1–15, 2015.
135. J. G. Emsley and J. D. Macklis, "Astroglial heterogeneity closely reflects the neuronal-defined anatomy of the adult murine CNS," *Neuron Glia Biol.*, vol. 2, no. 3, pp. 175–186, 2006.
136. S. Liddelow, B. Barres, and B. Barrier, "SnapShot: Astrocytes in Health and Disease," *Cell*, vol. 162, no. 5, pp. 1170–1170.e1, 2015.
137. L. Ben Haim and D. H. Rowitch, "Functional diversity of astrocytes in neural circuit regulation," *Nat. Rev. Neurosci.*, vol. 18, no. 1, pp. 31–41, 2016.



138. J. S. Rudge and J. Silver, "Inhibition of neurite outgrowth on astroglial scars in vitro," *J. Neurosci.*, vol. 10, no. 11, pp. 3594–3603, 1990.
139. J. Silver and J. H. Miller, "Regeneration beyond the glial scar," *Nat. Rev. Neurosci.*, vol. 5, no. 2, pp. 146–156, 2004.
140. M. Faiz, A. Nagy, and C. M. Morshead, "Response to: Where do you come from and what are you going to become, reactive astrocyte?," *Stem Cell Investig.*, vol. 3, pp. 32–32, 2016.
141. Guan X, Hasan MN, Maniar S, Jia W, Sun D. Reactive Astrocytes in Glioblastoma Multiforme. *Mol Neurobiol.* 2018 Aug;55(8):6927-6938.
142. J. I. Erices *et al.*, "Glioblastoma Microenvironment and Invasiveness: New Insights and Therapeutic Targets," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 24, no. 8, 2023.
143. Le DM, Besson A, Fogg DK, Choi KS, Waisman DM, Goodyer CG, Rewcastle B, Yong VW. Exploitation of astrocytes by glioma cells to facilitate invasiveness: a mechanism involving matrix metalloproteinase-2 and the urokinase-type plasminogen activator-plasmin cascade. *J Neurosci.* 2003 May 15;23(10):4034-43.
144. N. Gagliano, F. Costa, and C. Cossetti, "Glioma-astrocyte interaction modifies the astrocyte phenotype in a co-culture experimental model," *Oncol. Rep.*, vol. 25, pp. 223–230, 2009.
145. C. Blázquez *et al.*, "Cannabinoids inhibit glioma cell invasion by down-regulating matrix metalloproteinase-2 expression," *Cancer Res.*, vol. 68, no. 6, pp. 1945–1952, 2008.
146. S. Barbero *et al.*, "Expression of the chemokine receptor CXCR4 and its ligand stromal cell-derived factor 1 in human brain tumors and their involvement in glial proliferation in vitro," *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 973, pp. 60–69, 2002.
147. F. Li, N. Abuarab, and A. Sivaprasadarao, "Reciprocal regulation of actin cytoskeleton remodelling and cell migration by Ca<sup>2+</sup> and Zn<sup>2+</sup>: Role of TRPM2 channels," *J. Cell Sci.*, vol. 129, no. 10, pp. 2016–2029, 2016.
148. J. Kim *et al.*, "Tumoral RANKL activates astrocytes that promote glioma cell invasion through cytokine signaling," *Cancer Lett.*, vol. 353, no. 2, pp. 194–200, 2014.
149. Q. Lin *et al.*, "Reactive Astrocytes Protect Melanoma Cells from Chemotherapy by Sequestering Intracellular Calcium through Gap Junction Communication Channels," *Neoplasia*, vol. 12, no. 9, pp. 748–754, 2010.
150. L. Zhang *et al.*, "Microenvironment-induced PTEN loss by exosomal microRNA primes brain metastasis outgrowth," *Nature*, vol. 527, no. 7576, pp. 100–104, 2015.
151. W. S. Sheng, S. Hu, X. Min, G. A. Cabral, J. R. Lokensgard, and P. K. Peterson, "Synthetic cannabinoid WIN55,212-2 inhibits generation of inflammatory mediators by IL-1 $\beta$ -stimulated human astrocytes," *Glia*, vol. 49, no. 2, pp. 211–219, 2005.
152. J. E. Henriquez, A. P. Bach, K. M. Matos-Fernandez, R. B. Crawford, and N. E. Kaminski, " $\Delta$ 9-Tetrahydrocannabinol (THC) Impairs CD8<sup>+</sup> T Cell-Mediated Activation of Astrocytes," *J. Neuroimmune Pharmacol.*, vol. 1, 2020.
153. P. del Río Hortega, "Sobre la verdadera significación de las células neuróglas llamadas amiboides," *Junta para Ampliación Estud. e Investig. Científicas*, 1919.
154. F. Ginhoux *et al.*, "Fate Mapping Analysis Reveals That Adult Microglia Derive from Primitive Macrophages," *Science (80-. )*, vol. 701, no. November, pp. 841–845, 2010.
155. J. J. Watters, J. M. Schartner, and B. Badie, "Microglia function in brain tumors," *J. Neurosci. Res.*, vol. 81, no. 3, pp. 447–455, 2005.
156. M. Colonna and O. Butovsky, "Microglia function in the central nervous system during health and neurodegeneration," *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 35, no. January, pp. 441–468, 2017.
157. I. Yang, S. J. Han, G. Kaur, C. Crane, and A. T. Parsa, "The role of microglia in central nervous system immunity and glioma immunology," *J. Clin. Neurosci.*, vol. 17, no. 1, pp. 6–10, 2010.

158. R. M. Ransohoff, "A polarizing question: Do M1 and M2 microglia exist," *Nat. Neurosci.*, vol. 19, no. 8, pp. 987–991, 2016.
159. L. Annovazzi, M. Mellai, E. Bovio, S. Mazzetti, B. Pollo, and D. Schiffer, "Microglia immunophenotyping in gliomas," pp. 998–1006, 2018.
160. J. Xue *et al.*, "Transcriptome-Based Network Analysis Reveals a Spectrum Model of Human Macrophage Activation," *Immunity*, vol. 40, no. 2, pp. 274–288, 2014.
161. C. Russo, L. Lisi, L. Tentori, P. Navarra, G. Graziani, and C. Combs, "Exploiting Microglial Functions for the Treatment of Glioblastoma," *Curr. Cancer Drug Targets*, vol. 17, no. 3, pp. 267–281, 2017.
162. M. B. Graeber and W. J. Streit, "*Microglia : biology and pathology*" pp. 89–105, 2009.
163. W. Penfield, "Microglia and the Process of Phagocytosis in Gliomas\*," *Am. J. Pathol.*, vol. 1, no. 1, pp. 77-90.15, 1925.
164. S. H. Bayerl *et al.*, "Time lapse in vivo microscopy reveals distinct dynamics of microglia-tumor environment interactions-a new role for the tumor perivascular space as highway for trafficking microglia," *Glia*, vol. 64, no. 7, pp. 1210–1226, 2016.
165. S. Izraely *et al.*, "The metastatic microenvironment: Melanoma–microglia cross-talk promotes the malignant phenotype of melanoma cells," *Int. J. Cancer*, vol. 144, no. 4, pp. 802–817, 2019.
166. A. C. Carvalho Da Fonseca and B. Badie, "Microglia and macrophages in malignant gliomas: Recent discoveries and implications for promising therapies," *Clin. Dev. Immunol.*, vol. 2013, 2013.
167. M. Platten *et al.*, "Monocyte chemoattractant protein-1 increases microglial infiltration and aggressiveness of gliomas," *Ann. Neurol.*, vol. 54, no. 3, pp. 388–392, 2003.
168. J. Zhang, S. Sarkar, R. Cua, Y. Zhou, W. Hader, and V. Wee Yong, "A dialog between glioma and microglia that promotes tumor invasiveness through the CCL2/CCR2/interleukin-6 axis," *Carcinogenesis*, vol. 33, no. 2, pp. 312–319, 2012.
169. S. Qiao, Y. Qian, G. Xu, Q. Luo, and Z. Zhang, "Long-term characterization of activated microglia/macrophages facilitating the development of experimental brain metastasis through intravital microscopic imaging," *J. Neuroinflammation*, vol. 16, no. 1, pp. 1–14, 2019.
170. T. X. Xie *et al.*, "Activation of Stat3 in human melanoma promotes brain metastasis," *Cancer Res.*, vol. 66, no. 6, pp. 3188–3196, 2006.
171. I.-J. A. K. Stat *et al.*, "The Vicious Cycle of Melanoma-Microglia Crosstalk : Inter-Melanoma Variations in the Brain-Metastasis-Promoting," *Cells*, vol. 12, no. 1513, 2023.
172. D. Herrera-Rios *et al.*, "Macrophages/Microglia Represent the Major Source of Indoleamine 2,3-Dioxygenase Expression in Melanoma Metastases of the Brain," *Front. Immunol.*, vol. 11, no. February, pp. 1–15, 2020.
173. T. S. Johnson and D. H. Munn, "Host indoleamine 2,3-dioxygenase: Contribution to systemic acquired tumor tolerance," *Immunol. Invest.*, vol. 41, no. 6–7, pp. 765–797, 2012.
174. R. Speeckaert *et al.*, "Indoleamine 2,3-dioxygenase, a new prognostic marker in sentinel lymph nodes of melanoma patients," *Eur. J. Cancer*, vol. 48, no. 13, pp. 2004–2011, 2012.
175. M. Mecha, A. Feliú, L. Mestre, and C. Guaza, "Pharmacology & Therapeutics Microglia activation states and cannabinoid system : Therapeutic implications," *Pharmacol. Ther.*, vol. 166, pp. 40–55, 2016.
176. S. J. Carlisle, F. Marciano-Cabral, A. Staab, C. Ludwick, and G. A. Cabral, "Differential expression of the CB2 cannabinoid receptor by rodent macrophages and macrophage-like cells in relation to cell activation," *Int. Immunopharmacol.*, vol. 2, no. 1, pp. 69–82, 2002.

177. E. J. Carrier *et al.*, "Cultured Rat Microglial Cells Synthesize the Endocannabinoid 2-Arachidonylglycerol, Which Increases Proliferation via a CB2 Receptor-Dependent Mechanism," *Mol. Pharmacol.*, vol. 65, no. 4, pp. 999–1007, 2004.
178. L. Walter *et al.*, "Nonpsychotropic cannabinoid receptors regulate microglial cell migration," *J. Neurosci.*, vol. 23, no. 4, pp. 1398–1405, 2003.
179. T. G. Del Pulgar, M. L. De Ceballos, M. Guzmán, and G. Velasco, "Cannabinoids protect astrocytes from ceramide-induced apoptosis through the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B pathway," *J. Biol. Chem.*, vol. 277, no. 39, pp. 36527–36533, 2002.
180. F. Castro, W. G. Dirks, S. Fährnich, A. Hotz-Wagenblatt, M. Pawlita, and M. Schmitt, "High-throughput SNP-based authentication of human cell lines," *Int. J. Cancer*, vol. 132, no. 2, pp. 308–314, 2013.
181. A. C. Diserens *et al.*, "Characterization of an Established Human Malignant Glioma Cell Line : LN-18 \*," *Acta Neuropathol.*, pp. 21–28, 1981.
182. D. J. Giard, S. A. Aaronson, G. J. Todaro, P. Arnstein, J. H. Kersey, and W. P. Parks, "In vitro cultivation of human tumors: Establishment of cell lines derived from a series of solid tumors," *J. Natl. Cancer Inst.*, vol. 51, no. 5, pp. 1417–1423, 1973.
183. S. Jung *et al.*, "Analysis of Fractalkine Receptor CX3CR1 Function by Targeted Deletion and Green Fluorescent Protein Reporter Gene Insertion," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 20, no. 11, pp. 4106–4114, 2000.
184. A. Nimmerjahn, F. Kirchhoff, and F. Helmchen, "Resting Microglial Cells Are Highly Dynamic Surveillants of Brain Parenchyma in Vivo". *Science*, vol. 308, no. 5726, pp. 1314–1319, 2005.
185. Carlsson J, Yuhas JM. Liquid-overlay culture of cellular spheroids. *Recent Results Cancer Res.* 1984;95:1-23.
186. M. Salazar *et al.*, "Cannabinoid action induces autophagy-mediated cell death through stimulation of ER stress in human glioma cells," *J. Clin. Invest.*, vol. 119, no. 5, pp. 1359–1372, 2009.
187. B. Song and T. Chan, "A Fast Algorithm for Level Set Based Optimization," *Cam-Ucla*, vol. 68, pp. 1–20, 2002.
188. T. Hohmann *et al.*, "MACC1 driven alterations in cellular biomechanics facilitate cell motility in glioblastoma," *Cell Commun. Signal.*, vol. 18, no. 1, pp. 1–13, 2020.
189. V. Amrhein, S. Greenland, and B. McShane, "Retire statistical significance," *Nature*, vol. 567, pp. 880–883, 2019.
190. R. L. Wasserstein, A. L. Schirm, and N. A. Lazar, "Moving to a World Beyond 'p < 0.05,'" *American Statistician*, vol. 73, no. sup1, pp. 1–19, 2019.
191. T. Hohmann, U. Grabiec, C. Ghadban, K. Feese, and F. Dehghani, "The influence of biomechanical properties and cannabinoids on tumor invasion," *Cell Adhes. Migr.*, vol. 11, no. 1, pp. 54–67, 2016.
192. M. Krishnamurthy, S. Gurley, and B. M. Moore, "Exploring the substituent effects on a novel series of C1'-dimethyl-aryl  $\Delta$ 8-tetrahydrocannabinol analogs," *Bioorganic Med. Chem.*, vol. 16, no. 13, pp. 6489–6500, 2008.
193. U. Hohmann, C. Walsleben, C. Ghadban, F. Kirchhoff, F. Dehghani, and T. Hohmann, "Interaction of Glia Cells with Glioblastoma and Melanoma Cells under the Influence of Phytocannabinoids," *Cells*, vol. 11, no. 1, 2022.
194. X. Cui, Y. Hartanto, and H. Zhang, "Advances in multicellular spheroids formation," *J. R. Soc. Interface*, vol. 14, no. 127, 2017.
195. G. Frasca, V. Du, J. C. Bacri, F. Gazeau, C. Gay, and C. Wilhelm, "Magnetically shaped cell aggregates: From granular to contractile materials," *Soft Matter*, vol. 10, no. 28, pp. 5045–5054, 2014.

196. A. P. Napolitano, P. Chai, D. M. Dean, and J. R. Morgan, "Dynamics of the self-assembly of complex cellular aggregates on micromolded nonadhesive hydrogels," *Tissue Eng.*, vol. 13, no. 8, pp. 2087–2094, 2007.
197. W. C. Sin, Q. Aftab, J. F. Bechberger, J. H. Leung, H. Chen, and C. C. Naus, "Astrocytes promote glioma invasion via the gap junction protein connexin43," *Oncogene*, vol. 35, no. 12, pp. 1504–1516, 2016.
198. S. Tamai *et al.*, "Tumor Microenvironment in Glioma Invasion," *Brain Sci.*, vol. 12, no. 4, 2022.
199. M. Lorgier, "Tumor microenvironment in the brain," *Cancers (Basel)*, vol. 4, no. 1, pp. 218–243, 2012.
200. E. R. O'Brien, C. Howarth, and N. R. Sibson, "The role of astrocytes in CNS tumors: pre-clinical models and novel imaging approaches," *Front. Cell. Neurosci.*, vol. 7, no. April, pp. 1–13, 2013.
201. H. Niessner *et al.*, "Targeting hyperactivation of the AKT survival pathway to overcome therapy resistance of melanoma brain metastases," *Cancer Med.*, vol. 2, no. 1, pp. 76–85, 2013.
202. D. Henrik Heiland *et al.*, "Tumor-associated reactive astrocytes aid the evolution of immunosuppressive environment in glioblastoma," *Nat. Commun.*, vol. 10, no. 1, 2019.
203. M. V. Sofroniew, "Astrocyte Reactivity: Subtypes, States, and Functions in CNS Innate Immunity," *Trends Immunol.*, vol. 41, no. 9, pp. 758–770, 2020.
204. D. Marchetti, J. Li, and R. Shen, "Astrocytes contribute to the brain-metastatic specificity of melanoma cells by producing heparanase," *Cancer Res.*, vol. 60, no. 17, pp. 4767–4770, 2000.
205. C. C. Poon, S. Sarkar, V. W. Yong, and J. J. P. Kelly, "Glioblastoma-associated microglia and macrophages: Targets for therapies to improve prognosis," *Brain*, vol. 140, no. 6, pp. 1548–1560, 2017.
206. M. D. Sørensen, R. H. Dahlrot, H. B. Boldt, S. Hansen, and B. W. Kristensen, "Tumour-associated microglia/macrophages predict poor prognosis in high-grade gliomas and correlate with an aggressive tumour subtype," *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, vol. 44, no. 2, pp. 185–206, 2018.
207. W. Chen, Q. Gao, S. Han, F. Pan, and W. Fan, "The CCL2/CCR2 axis enhances IL-6-induced epithelial-mesenchymal transition by cooperatively activating STAT3-Twist signaling," *Tumor Biol.*, vol. 36, no. 2, pp. 973–981, 2015.
208. A. Buonfiglioli and D. Hambardzumyan, "Macrophages and microglia: the cerberus of glioblastoma," *Acta Neuropathol. Commun.*, vol. 9, no. 1, pp. 1–21, 2021.
209. D. M. Leite, B. Zvar Baskovic, P. Civita, C. Neto, M. Gumbleton, and G. J. Pilkington, "A human co-culture cell model incorporating microglia supports glioblastoma growth and migration, and confers resistance to cytotoxics," *FASEB J.*, vol. 34, no. 1, pp. 1710–1727, 2020.
210. A. Moshe *et al.*, "Cystatin C takes part in melanoma-microglia cross-talk: possible implications for brain metastasis," *Clin. Exp. Metastasis*, vol. 35, no. 5–6, pp. 369–378, 2018.
211. I. Yang, S. J. Han, G. Kaur, C. Crane, and A. T. Parsa, "The role of microglia in central nervous system immunity and glioma immunology," *J. Clin. Neurosci.*, vol. 17, no. 1, pp. 6–10, 2010.
212. K. M. Boje and P. K. Arora, "Microglial-produced nitric oxide and reactive nitrogen oxides mediate neuronal cell death," *Brain Res.*, vol. 587, no. 2, pp. 250–256, 1992.
213. A. Carracedo *et al.*, "Cannabinoids induce apoptosis of pancreatic tumor cells via endoplasmic reticulum stress-related genes," *Cancer Res.*, vol. 66, no. 13, pp. 6748–6755, 2006.

214. P. Massi *et al.*, "5-Lipoxygenase and anandamide hydrolase (FAAH) mediate the antitumor activity of cannabidiol, a non-psychoactive cannabinoid," *J. Neurochem.*, vol. 104, no. 4, pp. 1091–1100, 2008.
215. L. Soroceanu *et al.*, "Id-1 is a key transcriptional regulator of glioblastoma aggressiveness and a novel therapeutic target," *Cancer Res.*, vol. 73, no. 5, pp. 1559–1569, 2013.
216. P. Massi, A. Vaccani, S. Bianchessi, B. Costa, P. Macchi, and D. Parolaro, "The non-psychoactive cannabidiol triggers caspase activation and oxidative stress in human glioma cells," *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 63, no. 17, pp. 2057–2066, 2006.
217. A. B. Roland *et al.*, "Cannabinoid-induced actomyosin contractility shapes neuronal morphology and growth," *Elife*, vol. 3, p. e03159, 2014.
218. T. Hohmann, K. Feese, C. Ghadban, F. Dehghani, and U. Grabiec, "On the influence of cannabinoids on cell morphology and motility of glioblastoma cells," *PLoS One*, vol. 14, no. 2, pp. 1–18, 2019.
219. F. E. Lock, K. R. Ryan, N. S. Poulter, M. Parsons, and N. A. Hotchin, "Differential regulation of adhesion complex turnover by ROCK1 and ROCK2," *PLoS One*, vol. 7, no. 2, 2012.
220. J. Wang, X. H. Liu, Z. J. Yang, B. Xie, and Y. S. Zhong, "The effect of ROCK-1 activity change on the adhesive and invasive ability of Y79 retinoblastoma cells," *BMC Cancer*, vol. 14, no. 1, pp. 1–7, 2014.
221. R. A. Foty and M. S. Steinberg, "The differential adhesion hypothesis: A direct evaluation," *Dev. Biol.*, vol. 278, no. 1, pp. 255–263, 2005.
222. A. Preet *et al.*, "Cannabinoid receptors, CB1 and CB2, as novel targets for inhibition of non-small cell lung cancer growth and metastasis," *Cancer Prev. Res.*, vol. 4, no. 1, pp. 65–75, 2010.
223. M. Guzmán *et al.*, "A pilot clinical study of  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol in patients with recurrent glioblastoma multiforme," *Br. J. Cancer*, vol. 95, no. 2, pp. 197–203, 2006.
224. C. Sánchez, I. Galve-Roperh, C. Canova, P. Brachet, and M. Guzmán, " $\Delta^9$ -Tetrahydrocannabinol induces apoptosis in C6 glioma cells," *FEBS Lett.*, vol. 436, no. 1, pp. 6–10, 1998.
225. L. Oliveira-Ferrer *et al.*, "Cilengitide induces cellular detachment and apoptosis in endothelial and glioma cells mediated by inhibition of FAK/src/AKT pathway," *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, vol. 27, no. 1, pp. 1–13, 2008.
226. P. Massi, A. Vaccani, S. Ceruti, A. Colombo, M. P. Abbracchio, and D. Parolaro, "Antitumor Effects of Cannabidiol, a Nonpsychoactive Cannabinoid, on Human Glioma Cell Lines," *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, vol. 308, no. 3, pp. 838–845, 2004.
227. N. Glodde, M. Jakobs, T. Bald, T. Tüting, and E. Gaffal, "Differential role of cannabinoids in the pathogenesis of skin cancer," *Life Sci.*, vol. 138, pp. 35–40, 2015.
228. F. M. Chen, E. B. Hansen, C. R. Taylor, and A. L. Epstein, "Diffusion and binding of monoclonal antibody TNT-1 in multicellular tumor spheroids," *J. Natl. Cancer Inst.*, vol. 83, no. 3, pp. 200–205, 1991.
229. C. Brana, C. Benham, and L. Sundstrom, "A method for characterising cell death in vitro by combining propidium iodide staining with immunohistochemistry," *Brain Res. Protoc.*, vol. 10, no. 2, pp. 109–114, 2002.
230. N. A. B. Balenga *et al.*, "GPR55 regulates cannabinoid 2 receptor-mediated responses in human neutrophils," *Cell Res.*, vol. 21, no. 10, pp. 1452–1469, 2011.
231. P. Morales, D. P. Hurst, and P. H. Reggio, "Molecular Targets of the Phytocannabinoids: A Complex Picture," *Prog. Chem. Org. Nat. Prod.*, vol. 103, pp. 103–131, 2017.
232. L. A. Ford *et al.*, "A role for L- $\alpha$ -lysophosphatidylinositol and GPR55 in the modulation of migration, orientation and polarization of human breast cancer cells," *Br. J. Pharmacol.*, vol. 160, no. 3, pp. 762–771, 2010.

233. J. Juneja and P. J. Casey, "Role of G12 proteins in oncogenesis and metastasis," *Br. J. Pharmacol.*, vol. 158, no. 1, pp. 32–40, 2009.
234. M. Sharma, J. B. Hudson, H. Adomat, E. Guns, and M. E. Cox, "In Vitro Anticancer Activity of Plant-Derived Cannabidiol on Prostate Cancer Cell Lines," *Pharmacol. & Pharm.*, vol. 05, no. 08, pp. 806–820, 2014.
235. S. D. McAllister, L. Soroceanu, and P. Y. Desprez, "The antitumor activity of plant-derived non-psychoactive cannabinoids," *J. Neuroimmune Pharmacol.*, vol. 10, no. 2, pp. 255–267, 2015.
236. Y. M. Morizawa *et al.*, "Reactive astrocytes function as phagocytes after brain ischemia via ABCA1-mediated pathway," *Nat. Commun.*, vol. 8, no. 1, pp. 1–14, 2017.
237. C. Grimaldi *et al.*, "Anandamide inhibits adhesion and migration of breast cancer cells," *Exp. Cell Res.*, vol. 312, no. 4, pp. 363–373, 2006.
238. P. Massi, M. Solinas, V. Cinquina, and D. Parolaro, "Cannabidiol as potential anticancer drug," *Br. J. Clin. Pharmacol.*, vol. 75, no. 2, pp. 303–312, 2013.
239. B. Kis *et al.*, "Cannabidiol—from plant to human body: A promising bioactive molecule with multi-target effects in cancer," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 20, no. 23, 2019.
240. D. H. Gutmann and H. Kettenmann, "Microglia/Brain Macrophages as Central Drivers of Brain Tumor Pathobiology," *Neuron*, vol. 104, no. 3, pp. 442–449, 2019.
241. E. Kozela, M. Pietr, A. Juknat, N. Rimmerman, R. Levy, and Z. Vogel, "Cannabinoids  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol and cannabidiol differentially inhibit the lipopolysaccharide-activated NF- $\kappa$ B and interferon- $\beta$ /STAT proinflammatory pathways in BV-2 microglial cells," *J. Biol. Chem.*, vol. 285, no. 3, pp. 1616–1626, 2010.
242. S. J. Coniglio and J. E. Segall, "Review: Molecular mechanism of microglia stimulated glioblastoma invasion," *Matrix Biol.*, vol. 32, no. 7–8, pp. 372–380, 2013.
243. F. Facchinetti, E. Del Giudice, S. Furegato, M. Passarotto, and A. Leon, "Cannabinoids ablate release of TNF $\alpha$  in rat microglial cells stimulated with lipopolysaccharide," *Glia*, vol. 41, no. 2, pp. 161–168, 2003.
244. A. Masuch, C. H. Shieh, N. van Rooijen, D. van Calker, and K. Biber, "Mechanism of microglia neuroprotection: Involvement of P2X7, TNF $\alpha$ , and valproic acid," *Glia*, vol. 64, no. 1, pp. 76–89, 2016.
245. S. Kreutz, M. Koch, C. Ghadban, H. W. Korf, and F. Dehghani, "Cannabinoids and neuronal damage: Differential effects of THC, AEA and 2-AG on activated microglial cells and degenerating neurons in excitotoxically lesioned rat organotypic hippocampal slice cultures," *Exp. Neurol.*, vol. 203, no. 1, pp. 246–257, 2007.
246. R. T. Sataloff, M. M. Johns, and K. M. Kost, "Effects of Transforming Growth Factor- $\beta$ 1 on Collagen Synthesis, Integrin Expression, Adhesion and Invasion of Glioma Cells," *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, vol. 54, no. 2, pp. 236–244, 1995.
247. K. Nagamoto-Combs, J. Kulas, and C. K. Combs, "A novel cell line from spontaneously immortalized murine microglia," *J. Neurosci. Methods*, vol. 233, pp. 187–198, 2014.
248. R. Timmerman, S. M. Burm, and J. J. Bajramovic, "An overview of in vitro methods to study microglia," *Front. Cell. Neurosci.*, vol. 12, no. August, pp. 1–12, 2018.
249. G. Y. Lee, P. A. Kenny, E. H. Lee, and M. J. Bissell, "Three-dimensional culture models of normal and malignant breast epithelial cells," *Nat. Methods*, vol. 4, no. 4, pp. 359–365, 2007.
250. M. E. Katt, A. L. Placone, A. D. Wong, Z. S. Xu, and P. C. Searson, "In Vitro Tumor Models: Advantages, Disadvantages, Variables, and Selecting the Right Platform," *Front. Bioeng. Biotechnol.*, vol. 4, no. February, 2016.
251. F. Hirschhaeuser, H. Menne, C. Dittfeld, J. West, W. Mueller-Klieser, and L. A. Kunz-Schughart, "Multicellular tumor spheroids: an underestimated tool is catching up again.," *J. Biotechnol.*, vol. 148, no. 1, pp. 3–15, 2010.

252. C. Lorenzo *et al.*, "SPIM imaging of live cell division dynamics in 3D in large spheroid tumor models," *Mol. Biol. Cell*, vol. 22, pp. 1–8, 2011.
253. C. G. Begley and L. M. Ellis, "Raise standards for preclinical cancer research," *Nature*, vol. 483, no. 997, p. 10, 2012.
254. J. Friedrich, R. Ebner, and L. A. Kunz-Schughart, "Experimental anti-tumor therapy in 3-D: Spheroids - Old hat or new challenge?," *Int. J. Radiat. Biol.*, vol. 83, no. 11–12, pp. 849–871, 2007.
255. M. Zanoni *et al.*, "3D tumor spheroid models for in vitro therapeutic screening: A systematic approach to enhance the biological relevance of data obtained," *Sci. Rep.*, vol. 6, no. August 2015, pp. 1–11, 2016.
256. J. T. Neal *et al.*, "Organoid Modeling of the Tumor Immune Microenvironment," *Cell*, vol. 175, no. 7, pp. 1972–1988.e16, 2018.
257. A. Blumlein, N. Williams, and J. J. McManus, "The mechanical properties of individual cell spheroids," *Sci. Rep.*, vol. 7, no. 1, pp. 1–10, 2017.
258. E. C. Costa, D. de Melo-Diogo, A. F. Moreira, M. P. Carvalho, and I. J. Correia, "Spheroids Formation on Non-Adhesive Surfaces by Liquid Overlay Technique: Considerations and Practical Approaches," *Biotechnol. J.*, vol. 13, no. 1, pp. 1–12, 2018.

## 7 Thesen

1. Astrozyten beeinflussen in Kokultur mit LN229 und A375 nur gering die Aggregationsdynamik.
2. Mikroglia verzögern in den ersten 6 Stunden des Beobachtungszeitraumes die Sphäroidbildung und nehmen Einfluss auf die Aggregationsdynamik.
3. Cannabinoide verzögern die Sphäroidbildung bei der Glioblastomzelllinie LN229 und der Melanomzelllinie A375, wobei LN229 schneller beeinflusst wird.
4. Cannabinoide verzögern die Aggregation von Kokulturen aus A375 und Astrozyten stärker als die Kokulturen aus LN229 und Astrozyten.
5. Astrozyten verringern den Einfluss von Cannabinoiden auf die Aggregationsdynamik von LN229 und A375.
6. Kokulturen aus den Tumorzelllinien LN229 und A375 mit Mikroglia werden am stärksten von der Kombinationsbehandlung aus THC und CBD beeinflusst.
7. Die Todesrate wird in keiner Versuchskonstellation beeinflusst.



## **Eidesstattliche Erklärungen**

(1) Ich erkläre, dass ich mich an keiner anderen Hochschule einem Promotionsverfahren unterzogen bzw. eine Promotion begonnen habe.

(2) Ich erkläre, die Angaben wahrheitsgemäß gemacht und die wissenschaftliche Arbeit an keiner anderen wissenschaftlichen Einrichtung zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht zu haben.

(3) Ich erkläre an Eides statt, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Alle Regeln der guten wissenschaftlichen Praxis wurden eingehalten; es wurden keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht.

.....



## **Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Professor Dr. Faramarz Dehghani, der mich in seine Forschungsgruppe aufgenommen, mich durchgehend inspiriert und mir mit seinem Rat zur Seite gestanden hat. Ebenfalls danke ich Dres. Urszula und Tim Hohmann für die zuverlässige Begleitung meines Projektes. Chalid Ghadban und Ludmilla Litvak danke ich für die Unterstützung und Präzision im Labor. Zahlreiche bereichernde Fachgespräche konnte ich mit Marc Kolbe führen. Ich danke auch allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe und allen weiteren Institutsmitarbeitern für die angenehme Atmosphäre.

Außerdem danke ich meinen Freunden Dres. Anton Hoffmann und Paul Ohlmeier für ihre zahlreichen Ratschläge. Ich danke desgleichen Eva Lippold, Juliane Neumann, Laura Krebs, Nathalie Auer und allen anderen Freunden, die mich in den letzten fünf Jahren unterstützt haben.

Nicht zuletzt danke ich meinen Eltern Dres. Joanna und Albrecht Walsleben, meiner Schwester Karolina, meiner Tante und meinem Onkel Dres. Agnes Walsleben und Klaus Stedingk, meinem Großvater Dietrich Walsleben sowie meiner Verlobten Lena Ladenthin für ihren zuverlässigen Rückhalt und die mannigfache Bestätigung während meines gesamten Studiums.