

Medizinische Fakultät  
der  
Universität Duisburg-Essen

Kinderklinik III

Untersuchung der zytotoxischen Effekte von Cannabidiol auf pädiatrische  
Medulloblastomzelllinien

I n a u g u r a l d i s s e r t a t i o n  
zur  
Erlangung des Doktorgrades der Medizin  
durch die Medizinische Fakultät  
der Universität Duisburg-Essen

Vorgelegt von  
Antoniou, Evangelia  
aus Katerini, Griechenland  
2020

# DuEPublico

Duisburg-Essen Publications online

UNIVERSITÄT  
DUISBURG  
ESSEN

*Offen im Denken*

ub | universitäts  
bibliothek

Diese Dissertation wird via DuEPublico, dem Dokumenten- und Publikationsserver der Universität Duisburg-Essen, zur Verfügung gestellt und liegt auch als Print-Version vor.

**DOI:** 10.17185/duepublico/74439

**URN:** urn:nbn:de:hbz:464-20210621-090859-3

Alle Rechte vorbehalten.

Dekan: Herr Univ.-Prof. Dr. med. J. Buer

1. Gutachter: Herr Prof. Dr. med. T. J. Zuzak

2. Gutachter: Herr Priv.-Doz. Dr. med. P. R. Dammann

Tag der mündlichen Prüfung: 14. April 2021

# INHALTSVERZEICHNIS

Seite

1	EINLEITUNG .....	1
1.1	Medulloblastom.....	1
1.1.1	Epidemiologie .....	1
1.1.2	Definition und Klassifikation .....	1
1.1.3	Histologische Klassifikation .....	1
1.1.4	Molekulargenetische Klassifikation .....	3
1.1.5	Symptomatik .....	6
1.1.6	Diagnostik und Therapie .....	6
1.1.7	Prognose .....	8
1.2	Cannabidiol .....	9
1.2.1	Definition .....	9
1.2.2	Wirkmechanismus .....	9
1.2.3	Klinische Anwendung .....	10
1.3	Antitumorale Wirkung-Forschung .....	11
1.4	Pharmakokinetik- Nebenwirkungen.....	12
2	FRAGESTELLUNG.....	14
3	MATERIAL.....	15
3.1	Verbrauchsmaterialien.....	15
3.2	Chemikalien .....	15
3.3	Enzyme.....	16
3.4	Kits .....	16
3.5	Antikörper .....	17
3.5.1	Primäre Antikörper.....	17
3.5.2	Sekundäre Antikörper .....	17

3.6	Inhibitoren .....	17
3.7	Primer .....	17
3.8	Geräte .....	18
3.9	Zelllinien .....	19
<b>4</b>	<b>METHODEN .....</b>	<b>20</b>
4.1	Zellkultur .....	20
4.1.1	Auftauen den verwendeten Zelllinien .....	20
4.1.2	Passagierung und Kultivierung .....	20
4.2	Bestimmung der Zellviabilität.....	21
4.2.1	Bestimmung des IC <sub>50</sub> -Wertes.....	22
4.2.2	Behandlung nach Gabe von Inhibitoren.....	23
4.2.3	Toxizitätskontrolle .....	24
4.3	Expression von Rezeptoren auf mRNA Ebene .....	25
4.3.1	RNA-Isolation und cDNA Synthese .....	25
4.3.2	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	26
4.3.3	Agarose Gelelektrophorese .....	27
4.4	Durchflusszytometrische Zellzyklusanalyse .....	27
4.5	BrDU-Assay .....	28
4.6	Immundetektion von Proteinen .....	28
4.6.1	Zellyse .....	29
4.6.2	Proteinquantifizierung.....	29
4.6.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page).....	30
4.6.4	Western Blot.....	30
4.6.5	Ponceau-Färbung.....	32
4.6.6	Abbildungen und statistische Auswertungen .....	32
<b>5</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>33</b>
5.1	Expression von CBD-Rezeptoren in Medulloblastomzelllinien .....	33
5.1.1	Expression von mRNA.....	33
5.1.2	Expression von Proteinen.....	34

5.2	Zytotoxische Effekte von CBD .....	35
5.2.1	Bestimmung der optimalen Zellzahl .....	35
5.2.2	Toxizität des Lösungsmittels.....	36
5.2.3	Hemmende Wirkung von CBD auf die Zellviabilität .....	36
5.2.4	Bestimmung der IC <sub>50</sub> .....	37
5.2.5	Korrelation der Rezeptorexpression und der IC <sub>50</sub> Werte.....	38
5.3	Auswirkungen von CBD auf die Proliferationsrate, (BrdU).....	39
5.4	Zellzyklus-Analyse nach Behandlung mit CBD .....	40
5.5	Effekt der Wirkung von CBD während der Inhibition der Rezeptoren .....	41
6	DISKUSSION.....	43
6.1	Nachweis von CBD und Vanilloid Rezeptoren auf Tumorzelllinien.....	43
6.2	Effekt von CBD als anti-tumorales Arzneimittel und Induktion von Apoptose .....	44
6.3	Verwendung von Inhibitoren gegen CBD-Rezeptoren .....	46
6.4	Potentieller Wirkmechanismus durch CBD .....	46
6.5	Ausblick .....	48
7	ZUSAMMENFASSUNG .....	49
8	LITERATURVERZEICHNIS.....	50
9	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	58
10	DANKSAGUNG .....	59
11	LEBENS LAUF.....	60

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Medulloblastom

### 1.1.1 Epidemiologie

Obwohl Krebserkrankungen bei Kindern und Jugendlichen nur 1 % aller Erkrankungen in diesem Lebensabschnitt ausmachen, werden in Deutschland jedes Jahr rund 1800 Neudiagnosen maligner Neoplasien gestellt. Bei einem Fünftel davon handelt es sich um bösartige Erkrankungen des Zentralnervensystems (ZNS). Das Medulloblastom (MB), welches aus embryonalen Zellen des Cerebellums entsteht, stellt mit circa 20-25% der kindlichen Hirntumore den häufigsten malignen Hirntumor dar (Kaatsch P, 2018, Rutkowski S, 2016). Der Altersgipfel liegt zwischen dem 5. und 8. Lebensjahr, wobei Jungen 1,9-mal häufiger betroffen sind als Mädchen.

### 1.1.2 Definition und Klassifikation

Der Begriff Medulloblastom wurde 1925 von Bailey und Cushing für einen soliden infiltrierenden Kleinhirntumor, der aus kleinen runden Zellen besteht, eingeführt (Percival Bailey, 1925). Nach der derzeitigen WHO-Klassifikation für Tumoren des ZNS werden Medulloblastome dem Grad IV mit der höchsten Malignität zugeordnet (David N. Louis, 2016). Diese Tumoren entstehen aus undifferenzierten embryonalen, neuroektodermalen Zellen und infiltrieren vom Dach des vierten Ventrikels andere Gewebe, wobei es jedoch selten zu extraneuronalen Fernmetastasen kommt.

### 1.1.3 Histologische Klassifikation

In der aktuellen Version der WHO-Klassifikation für Tumoren des ZNS (5. Auflage 2016) werden für die Systematisierung und Differenzierung von Hirntumorentitäten zu den traditionellen histologischen Befunden zusätzlich immunhistochemische und molekulargenetische Befunde einbezogen (Tab. 1) (David N. Louis, 2016). Es folgt die Einteilung der Medulloblastome nach der Histologie in vier Gruppen.

### 1. Klassisches MB

Das klassische MB ist gekennzeichnet durch das Auftreten pleomorpher, kleiner, runder oder ovaler Zellen, welche typischerweise eine hohe Kern-Plasma-Relation aufweisen. Diese, meist in der Vermisregion des Cerebellums entstehenden Tumoren, treten gehäuft bei zehn- bis zwanzigjährigen Patienten und selten bei Kindern unter drei Jahren auf. Der klassische Typ wird in rund 70 % der Fälle von MB beschrieben (Ellison, 2010).

### 2. Desmoplastisch/noduläres MB

Als zweitgrößte histologische Gruppe werden desmoplastisch/nodulären Medulloblastome in circa 25 % aller Fälle von MB beobachtet. Sie ist gekennzeichnet durch Retikulin-freie noduläre, differenzierte Regionen mit geringerer Wachstumsintensität, welche von undifferenzierten proliferierenden Zellen umgeben sind (Ellison, 2010). Dieser Subtyp des MBs tritt meist bei Kindern unter 3 Jahren auf und entsteht in den Hemisphären (Rutkowski et al., 2009).

### 3. Extensiv noduläres MB

Die extensiv noduläre Variante des MBs ist durch eine extreme Nodularität mit intranodulärer Gleichmäßigkeit und niedrigem Proliferationsindex sowie einem hohen Differenzierungsgrad gekennzeichnet. Die internodulären Zonen sind dabei extrem zellreich und bestehen aus undifferenzierten, mitotisch aktiven Zellen. Diese Gruppe ist mit einer sehr guten Prognose assoziiert und tritt in etwa bei 5 % aller MBs, oft bei Patienten, die jünger als 3 Jahre sind, auf (Giangaspero et al., 1999).

### 4. Großzelliges anaplastisches MB

Die histologische Variante des großzelligen anaplastischen MBs besteht aus zwei verschiedenen Gruppen, deren Übergänge fließend sind und daher in der Literatur oft zu einer Gruppe zusammengefasst werden. Sie ist durch das gehäufte Auftreten von großen, runden Zellen mit prominenten Nukleoli gekennzeichnet. Diese Zellen dominieren jedoch selten und die Tumoren enthalten häufig breite Bereiche mit einem anaplastischen Phänotyp (Giangaspero et al., 1992). Auffällig bei diesem Subtyp des MBs, der in ca. 4 % aller Fälle diagnostiziert wird und mit einer schlechten Prognose korreliert, ist ferner ein ausgeprägter Kernpleomorphismus und Regionen mit einer hohen Mitoserate sowie das Auftreten vieler apoptotischer Zellen. Bei

der Erstdiagnose sind bei dieser Form des MBs oft bereits Metastasen nachweisbar (Giangaspero et al., 1992).

**Tabelle 1** Übersicht der Klassifikation des MBs laut WHO 2016 (David N. Louis, 2016)

<b>Medulloblastom-Klassifikation</b>
<p><b>Histologische Klassifikation:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- klassisches MB</li> <li>- desmoplastisch/noduläres MB</li> <li>- extensiv noduläres MB</li> <li>- großzellig/anaplastisches MB</li> </ul>
<p><b>Genetische Klassifikation:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Medulloblastom mit WNT-Aktivierung</li> <li>- Medulloblastom mit SHH-Aktivierung, TP53 Wildtyp</li> <li>- Medulloblastom mit SHH-Aktivierung, TP53 mutiert</li> <li>- Medulloblastom, nicht-WNT/nicht-SHH aktiviert</li> </ul> <p>Varianten: - Gruppe 3 Medulloblastom</p> <p style="padding-left: 40px;">- Gruppe 4 Medulloblastom</p>

#### 1.1.4 Molekulargenetische Klassifikation

Im Jahr 2006 wurde für die Klassifikation des MBs von Thompson *et al.* ein neues Konzept mit Untergruppen, deren Einleitung auf molekulargenetischen Unterschieden basiert, vorgeschlagen. In einer Kohorte, die 46 Fälle umfasst, wurden aufgrund verschiedener Merkmale der Signalwegaberration und unter Zugrundelegung von Genexpressionsdaten, fünf verschiedene Untergruppen (A – E) festgelegt (Thompson et al., 2006). Kurz darauf wurde eine gleich große Kohorte von Kool *et al.* beschrieben, die ebenfalls in fünf Untergruppen unterteilt werden konnte (Kool et al., 2008). Eine nachfolgende Publikation von Northcott *et al.* beschrieb schließlich vier unterschiedliche Gruppen, die als WNT, SHH, Gruppe 3 und Gruppe 4 bezeichnet wurden (Northcott et al., 2011b) und im Jahr 2012 unter der Bezeichnung WNT, SHH, Gruppe 3 und Gruppe 4 Anerkennung fanden (Taylor et al., 2012, Cho et al., 2011). Die Charakteristika dieser vier Gruppen des MBs wurden in der Tabelle 2 zusammengefasst.



### 1. MB mit WNT-Aktivierung

Diese Untergruppe umfasst MBs mit einer meist klassischen Histologie und in seltenen Fällen auch großzellig-anaplastische MBs. Diese MBs mit einer konstitutiven Aktivierung des WNT(wingless)-Signalwegs, die meist auf einer zur Überexpression von  $\beta$ -Catenin führenden somatischen Mutation im Exon 3 von *CTNNB1* beruht, treten zwar nur in 10 % aller MBs auf, besitzen jedoch die beste Prognose mit 5-Jahresüberlebensraten von 95 % (David N. Louis, 2016). Es betrifft meist Kinder und nur selten Erwachsene. Zudem fällt bei MBs mit WNT-Aktivierung eine Monosomie 6 als häufige chromosomale Aberration auf (Clifford et al., 2006).

### 2. MB mit SHH-Aktivierung

Tumoren mit Mutationen im SHH (sonic hedgehog)-Signalweg schließen zwei Untergruppen ein, welche sich durch den genetischen *TP53*-Status unterscheiden. Es lassen sich hierbei alle vier histologischen Gruppen nachweisen (Kool et al., 2012). Während MBs mit mutiertem *TP53* vor allem bei älteren Kindern vorkommen und mit einer schlechten Prognose assoziiert sind, treten MBs mit aktiviertem SHH-Signalweg aber *TP53*-wildtyp meist bei jungen Erwachsenen oder sehr jungen Kindern sowie Säuglingen auf und zeigen ein gutes Therapieansprechen. Oft lässt sich die Aktivierung des SHH-Signalwegs auf *PTCH/SMO/SUFU* Mutationen zurückführen. Auch eine Deletion von Chromosom 9q scheint ein typisches Merkmal dieser Gruppe zu sein (Northcott et al., 2011b). Zusätzlich können weitere chromosomale Veränderungen, wie der Gewinn der Chromosomen 2 und 3 und der Deletion der Chromosomen 10q und 20p beobachtet werden (Northcott et al., 2011a).

### 3. Gruppe 3

MBs der Gruppe 3 machen etwa 25 % aller MBs aus und haben mit 5-Jahres-Überlebensraten von 50 % die schlechteste Prognose aller Subgruppen, wobei die Prognose abhängig vom Metastasierungsstatus und dem Vorliegen von *MYC*-Amplifikationen ist. Gruppe 3 MBs kommen vorwiegend bei Säuglingen und Kleinkindern vor und sind zum Diagnosezeitpunkt häufig metastasiert (40-50 %). Histologisch findet man vor allem klassische oder großzellig/anaplastische MBs. Die Amplifikation von Onkogenen der *MYC*-Familie scheint entscheidend für die Tumorbiologie zu sein und wird vor allem in dieser MB Gruppe nachgewiesen (Korshunov et al., 2012). Häufig werden Metastasen bei Tumoren der Gruppe 3 beobachtet, weshalb sie unter anderem mit einer schlechteren Prognose assoziiert sind (Northcott et al., 2011b).

4. Gruppe 4

Gruppe 4 ist mit 35% aller Fälle die häufigste MB-Untergruppe. Diese MBs machen einen großen prozentualen Anteil der Nicht-WNT/ Nicht-SHH- Medulloblastom bezeichneten MB aus. Tumoren der Gruppe 4 haben im Vergleich zu den anderen Untergruppen eine intermediäre Prognose (Cho et al., 2011, Northcott et al., 2011b).

**Tabelle 2** Charakteristika den vier Untergruppen des MBs, IM= intermediär (Taylor et al., 2012)

	WNT	SHH	Gruppe 3	Gruppe 4
Alter	Kinder und Erwachsene; selten Kleinkinder	Klein Kinder und Erwachsene	Klein und ältere Kinder; Sehr selten Erwachsene	Am meistens Kinder aber auch klein Kinder und Erwachsene
Geschlecht	♀ :♂	♀ :♂	♀ < ♂	♀ < ♂
Histologie	Klassische Selten Großzellig/Anaplastisch	Oft nodulär Klassisch Großzellig/Anaplastisch	Klassisch Großzellig/Anaplastisch	Klassisch Großzellig/Anaplastisch
Metastasen	-	+	+++	++
Prognose	Sehr gut	Bei klein Kinder gut, Ansonsten IM	schlecht	IM
Genetische Daten	Monosomie 6 CTNNB1 Mutation	3q+; 9q-; 10q- PTCH1/SMO/SUFU Mutationen  GLI2 Amplifikation MYCN Amplifikation	1q+; 5q-; 7+; 8-;10q-; 11p-; 16q-; 17q+;i17q; 18q+ Mutationen  MYC Amplifikation	X-; 7+; 8-; 11p-; 17q+; i17q; 18q+  CDK6 undMYCN Amplifikationen  MYCN Amplifikation
Expression von Genen	WTN Signalweg  MYC +	SHH Signalweg  MYCN +	Photorezeptor/ GABAerg  MYC +++	Neurorezeptor/ Glutamaerg  Wenig MYC/MYCN

Zusätzlich werden die MB laut Chang (Tabelle 3) abhängig von der Tumorgroße, der Lokalisation des Tumors und der Metastasierung klassifiziert (Chang et al., 1969).

**Tabelle 3** Klassifizierung laut Chang (Chang et al., 1969)

T Stadien

T1	Tumor mit einem Durchmesser < 3 cm und Begrenzung durch Kleinhirnsphären
T2	Tumor ≥ 3 cm und Eindringen in benachbarte Strukturen

T3a	Tumor dringt weiter in zwei benachbarte Strukturen ein oder füllt vollständig den vierten Ventrikel aus mit Verlängerung in dem Aquädukt Sylvius, Foramen Magendie oder Foramen Luschka verursacht ein ausgeprägter Hydrozephalus
T3b	Tumor, der vom Boden des vierten Ventrikels ausgeht und den Hirnstamm und den vierten Ventrikel füllt
T4	Der Tumor breitete sich durch das Aquädukt von Sylvius aus und betrifft den dritten Ventrikel, das Mittelhirn oder das oberen Zervikalmark

#### M Stadien

M0	Kein Hinweis auf Subarachnoidal- oder hämatogene Metastasierung
M1	Mikroskopische Tumorzellen im Liquor
M2	Supratentorielle Metastasierung
M3	Spinale Metastasierung
M4	Metastasierung außerhalb des ZNS

### 1.1.5 Symptomatik

Die ersten Symptome sind meist unspezifisch und sehr heterogen, sodass lange Latenzen zwischen den Erstsymptomen und der Diagnosestellung vorkommen. Die häufigsten Symptome bei MB sind Hirndruckzeichen. Eine intrakranielle Drucksteigerung ist Folge der Tumormasse, eines peritumoralen Ödems oder einer Liquorzirkulationsstörung mit Aufstau. Hierdurch können Lokalsymptome oder erweiterte neurologische Auffälligkeiten wie Paresen, Hirnnervenparesen, Ataxie, auftreten. Krampfanfälle werden bei 9-14% der Patienten als Erstsymptom beschrieben. Zusätzlich werden Wachstumsstörungen und endokrinologische Ausfälle sowie Stauungspapillen beschrieben. Die Symptome sind von der Lokalisation des Tumors abhängig. Zudem sind Fälle ohne das Auftreten klassischer Hirndruckzeichen möglich.

### 1.1.6 Diagnostik und Therapie

Initial erfolgt die Risikostratifizierung in zwei Gruppen. Die Patienten werden klinisch durch das Vorhandensein oder Fehlen von Metastasen, basierend auf dem Chang-System (Tabelle 3), und dem Grad des Resttumors nach der Resektion stratifiziert (Chang et al., 1969).

Das Staging umfasst die prä- und postoperative kraniale MRT, die spinale MRT und die Bewertung des Liquors, um einen Liquorbefall auszuschließen. Es wird empfohlen, eine

postoperative Bildgebung innerhalb von 48 Stunden nach der ersten Tumorresektion durchzuführen. Eine Lumbalpunktion zur Liquorkontrolle ist mindestens 14 Tage nach der Operation aber vor Beginn der Chemotherapie empfohlen. Die histologischen Daten der Patienten werden zusätzlich evaluiert.

Die Therapie des MBs besteht aus einer Kombination von Chemotherapeutika, Operationen und Bestrahlung. Die lokale Raumforderung und die dadurch bedingte Liquorzirkulationsstörung führen zu lebensbedrohlichen Situationen, sodass die primäre Resektion des Tumors eine lebensrettende Maßnahme sein kann. Eine totale Resektion führt zu einem niedrigeren Rezidivrisiko, wobei das Risiko durch die Resektion neurologische Schäden zu verursachen oft hoch ist (Zeltzer et al., 1999). In diesen Fällen wird ein Tumorrest belassen und, wenn möglich nach postoperativer Behandlung, Strahlen- oder Chemotherapie, entfernt. Bei den Patienten mit MB ist eine externe Drainage einem Liquorshuntsystem vorzuziehen. In der Literatur wurden systemische Metastasierungen durch den ventrikuloperitoneale Shunt (VP-Shunt) beschrieben (Jamjoom et al., 1993). Es gibt als alternative Möglichkeit eine endoskopische Drittenventrikulostomie.

Den ersten Teil der Therapie stellt die operative Resektion des Tumors dar. Bei Patienten ohne Metastasierung die älter als 3 Jahre sind, wird eine primäre Resektion des Tumors mit adjuvanter kraniospinaler Bestrahlung empfohlen. Anschließend erfolgt eine Erhaltungchemotherapie. Falls Metastasen bei der Diagnose vorhanden sind, werden die Patienten als hoch Risiko klassifiziert und ein intensiviertes chemotherapeutisches Schema ist indiziert.

Die Strahlentherapie wird bei den Kindern älter als 3-5 Jahre in der Regel vorangestellt. Bei Patienten mit einer Metastasierung in den Liquorraum wird eine kraniospinale Bestrahlung in Kombination mit Chemotherapie eingesetzt (Kortmann et al., 1999). Eine Ausnahme stellen Patienten mit Retinoblastom (Rb), Neurofibromatose Typ 1 (NF1), Li-Fraumeni-Syndrom (LFS) und Nevoid-Basalzellkarzinom-Syndrom (NBCCS) dar, da das Risiko sekundäre, strahlungsbedingte Malignome zu entwickeln erhöht ist (Kleinerman, 2009). Aufgrund des Auftretens schwerer Nebenwirkungen der Strahlentherapie bedingt durch das noch nicht vollständig ausgereifte Gehirn im Kindes- und Säuglingsalter, gelten für diese Altersgruppe andere Empfehlungen (Rutkowski et al., 2005). In einer Gruppe von 104 Patienten der HIT2000 und HIT-REZ2005 Studien wurde gezeigt, dass die Strahlentherapie langfristige neuropsychologische Folgen hat und vor allem den IQ beeinflusst, sodass in dieser Altersgruppe (jünger als 3 Jahre) eine operative und chemotherapeutische Therapie empfohlen wird (Ottensmeier et al., 2020). Hierbei wird die Kombination mehrerer etablierter Zytostatika

verwendet. Die Substanzen enthalten Nitrosoharnstoffderivate, wie CCNU und BCNU, sowie die Platinderivate Cisplatin und Carboplatin. Zusätzlich werden auch Alkaloide (Vincristin), Topoisomerasehemmer (Etoposid) und Antimetabolite (Methotrexat) eingesetzt. Andere verwendete Chemotherapeutika sind Busulfan, Melphalan und Thiotepa (Khatua et al., 2018).

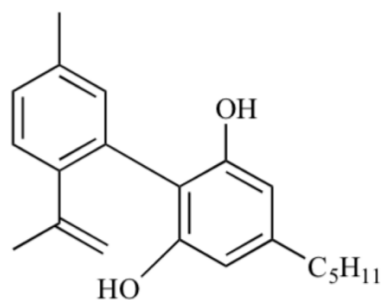
### 1.1.7 Prognose

Eine deutliche Besserung der Überlebensraten bei Kindern und Jugendlichen mit MB konnte in den letzten 40 Jahren erreicht werden. Zwischen 1981 und 1990 betrug die 5-Jahres-Überlebensrate nur 45 %. Aktuell werden über 60 % erreicht (Kaatsch P, 2018). Kinder mit einem günstigen Risikoprofil, wie einer WNT Aktivierung, haben eine gute Prognose mit einer 92% 5-Jahres-Überlebensrate (Ramaswamy et al., 2011). Ebenfalls haben Patienten mit weniger anaplastischen Merkmalen in den Tumoren eine bessere Prognose. Außerdem wurde die Nodularität als positiver Faktor für das Überleben dokumentiert (Eberhart et al., 2002). Das großzellige, anaplastische MB wurde von Huang et al in einer klinischen Studie bei 114 pädiatrischen Patienten mit schlechterer Prognose assoziiert (Huang et al., 2017) und in mehreren Studien bestätigt (von Hoff et al., 2010, Brown et al., 2000). Die 8-Jahres-Überlebensraten bei Kindern ohne Metastasen mit desmoplastischen, nodulären oder extensiven nodulärem MB betrug 54 % im Vergleich zu 32 % bei Patienten mit klassischen MB (Rutkowski et al., 2010). Bei Kindern unter vier Jahren mit nicht desmoplastischem/ nicht nodulärem MB wurde eine schlechtere Prognose und ein erhöhtes Risiko für ein Rezidiv festgestellt, sodass seit 2006 eine lokale Strahlentherapie nach Chemotherapie empfohlen wird (von Bueren et al., 2011). Prognostisch bedeutsam ist nicht nur die histologische Komponente, sondern auch der Nachweis eines postoperativen Resttumors oder Metastasen (Chang et al., 1969, Zeltzer et al., 1999).

## 1.2 Cannabidiol

### 1.2.1 Definition

*Cannabis sativa* ist eine der ersten Pflanzen, die kultiviert wurden, und ihre Eigenschaften wurden bereits vor mehr als 2.000 Jahren beschrieben. Es wurde über ihre Verwendung sowohl im alten Ägypten als auch im alten Indien und Griechenland berichtet (Russo, 2007). Der therapeutische Bereich basierte nicht nur auf den anxiolytischen, sondern auch auf den beruhigenden Eigenschaften. Bei Cannabis sind in der Literatur mehr als 100 Komponenten beschrieben (Aizpurua-Olaizola et al., 2016, Appendino et al., 2011). Die zwei Haupt-Phytocannabinoide, die entscheidend für ihre therapeutischen Potentiale sind, sind Tetrahydrocannabinol (THC) und Cannabidiol (CBD). Ilan *et al.* zeigten in einer klinischen Studie mit 23 Teilnehmer, dass die Gabe von unterschiedlichen Konzentrationen von CBD keine psychoaktive Wirkung hat (Ilan et al., 2005).



**Abbildung 1** CBD (Appendino et al., 2011)

### 1.2.2 Wirkmechanismus

Der Wirkmechanismus von Phytocannaboiden beruht auf dem CBD Rezeptor 1 (CNR1) (Matsuda et al., 1990, Devane et al., 1988). Die CBD-Rezeptoren gehören zu den G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR). Es gibt zwei Varianten, die in allen Organen exprimiert werden, wobei die stärkste Expression im zentral Nerven System (ZNS) stattfindet. CNR1 ist der am stärksten exprimierte GPCR im menschlichen Gehirn (Herkenham et al., 1990). Später wurde ein zweiter Rezeptor, Cannabidiol Rezeptor 2 (CNR2) beschrieben (Munro et al., 1993). CNR2 wird weniger in ZNS exprimiert. CBD bindet an beide Rezeptoren agonistisch (Jarai et al., 1999). Nach Aktivierung der Rezeptoren erfolgt die Inhibition spannungsgesteuerter Calciumkanäle und der Adenylylcyclase, sowie die Aktivierung intrazellulärer Kaliumkanäle und MAP-Kinasen. Diese Kanäle spielen eine Rolle für den Calciumtransport in die Zellen und

sind somit relevant für die Übertragung von elektrischen Signalen in Nervenzellen. Die Wirkung ist nicht auf diesen Signalweg begrenzt, sondern es werden auch endogene Cannabinoide, wie Anandamide und Glycerinester, aktiviert (Mackie, 2006). CBD interagiert auch mit dem Vanilloidrezeptor Typ 1 (TRPV1), dem Rezeptor für Capsaicin (Bisogno et al., 2001). Der Vanilloid Rezeptor 2 (TRPV2) wird von CBD aktiviert und spielt eine wichtige Rolle bei der neuronalen Entwicklung, der Herzfunktion, der Immunität und bei Krebserkrankungen (Pumroy et al., 2019).

Zusätzlich wurde eine anti-Stress Wirkung von CBD durch Bindung als Agonist an den Serotoninrezeptor Typ 1A (5-HT<sub>1A</sub>) beschrieben (Russo et al., 2005). Ein vorgeschlagener dritter Cannabinoidrezeptor ist der G-Protein-gekoppelte Rezeptor 55 (GPR55). Dieser Rezeptor wird in humanen Osteoklasten und Osteoblasten exprimiert und unterdrückt die Formation von Osteoklasten. Gleichzeitig aktiviert er ihre Funktion. Dadurch spielt er eine zentrale Rolle in der Knochenphysiologie (Whyte et al., 2009). CBD aktiviert den Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptor (PPAR)-Liganden und führt zu neuroprotektiven und antitumoralen Effekten (Sun et al., 2007). CBD wurden außerdem als positiver allosterische Modulatoren der GABA<sub>A</sub> Rezeptoren beschrieben, an die der Neurotransmitter GABA ( $\gamma$ -Aminobuttersäure) bindet. Dieses könnte für spasmolytische und anxiolytische Effekte relevant sein (Bakas et al., 2017).

### 1.2.3 Klinische Anwendung

#### Zugelassene Medikamente

Im Jahr 2011 wurde das erste Medikament des Hanfextrakts Nabiximols, Sativex®, ein Oromukosalspray, in Deutschland zugelassen. Das Medikament enthält 2,7 mg THC und 2,5 mg CBD und ist zur Zusatztherapie bei einer ausgeprägten Spastik in Rahmen einer multiplen Sklerose geeignet, sofern die Patienten kein Ansprechen auf andere Therapien zeigen. Die Zulassung des Medikamentes erfolgte nach der Publikation einer Phase III-Studie mit 572 Teilnehmern. 74 % der Patienten zeigten eine Besserung der Spastiksymptomatik (Novotna et al., 2011).

Im Jahr 2018 wurde das Medikament Epidiolex, ein CBD-Produkt, von der „Food and Drug Administration“ (FDA) zur Behandlung von zwei Formen der Epilepsie, dem Lennox-Gastaut- und dem Darver Syndrom, zugelassen. Dieses Arzneimittel enthielt weniger als 0,1 % THC und ist als Schedule V (niedrigere Stufe für Suchtrisiko) eingestuft. Alle anderen Medikamente aus Cannabis sativa werden weiter als Stufe I mit hohem Suchtrisiko eingeordnet (Drug

Enforcement Administration, 2018). Die empfohlene Dosierung liegt zwischen 2,5 und 20 mg/kg KG/Tag. Eine regelmäßige Kontrolle der Leberwerte (AST, ALT und Bilirubin) ist während der Behandlung indiziert. In einer klinischen Phase I Studie mit CBD gab es keine Berichte über eine aufgetretene Medikamentensucht (Carlsbad, 2018).

Seit dem 1. Oktober 2016 ist CBD verschreibungspflichtig laut dem Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte und wird unter anderen als anxiolytisches, neuroprotektives, antiemetisches und antiinflammatorisches Medikament angewandt (Lebensmittelsicherheit).

#### Klinische Studien:

In der klinischen Studie von Palmieri et al. wurde der Effekt von CBD zur Linderung von Symptomen und Verbesserung der Lebensqualität bei jungen Mädchen mit unerwünschten Arzneimittelwirkungen nach Impfung gegen das humane Papillomavirus (HPV) untersucht. Die Ergebnisse waren nicht aussagekräftig, weil fast ein Drittel der Patientinnen nicht auswertbar war (Palmieri et al., 2017). Die Linderung von Schmerzen nach Nierentransplantation wurde in einer klinischen Studie untersucht, allerdings mit einer niedrigen Anzahl von Patienten (N=7). Nur bei zwei Patienten wurde eine deutliche Verbesserung notiert (Cunetti et al., 2018). Bei 24 Patienten wurde die Auswirkung von Cannabis-Arzneimittlextrakten auf neurogene Symptome untersucht, die auf Standardbehandlungen nicht ansprachen. Es wurde eine positive Wirkung festgestellt, allerdings wurde in dieser Studie eine Kombination aus CBD und THC angewandt (Wade et al., 2003). Bei der Parkinson-Erkrankung konnten keine signifikanten Wirkungen von CBD nachgewiesen werden (Chagas et al., 2014).

### 1.3 Antitumorale Wirkung-Forschung

Es gib viele präklinische Studien, die Hemmung des proliferativen und invasiven Phänotyps von Brustkrebszellen durch CBD zeigen (McAllister et al., 2007). Ein Panel von verschiedenen Tumorzellen wurde mit unterschiedlichen Cannabisextrakten behandelt. Insbesondere die hochmaligne humane Brustkarzinomzelllinie (MDAMB-231) war *in vivo* und *in vitro* empfindlich auf CBD. In diesen präklinischen Studien wurde die Aktivierung von CNR2 und TRPV1 Rezeptoren und die Induktion von oxidativem Stress als mögliche Ursache für die Induktion der Apoptose der tumorösen Zellen nachgewiesen (Ligresti et al., 2006).

In der Literatur wurde bislang keine klinische Studie für die Verabreichung des CBDs bei Kindern mit onkologischen Erkrankungen publiziert. Eine Fallserie von 119 Patienten mit



unterschiedlichen soliden Tumoren (wie Mammakarzinom, Glioblastom, anaplastisch Ependynom, Lungenkarzinom u.a.) wurde beschrieben und initial wurden die Patienten mit 20 mg CBD täglich behandelt (Kenyon et al., 2018). Die Autoren beschreiben einen offensichtlichen klinischen Effekt bei 92% der Patienten. Die Dosierung wurde abhängig von der Wirkung angepasst. Aufgrund der Heterogenität der Patienten kann keine Aussage über die Effektivität des CBDs getroffen werden.

Im Jahr 2013 wurde eine randomisierte, doppelblinde, Placebo kontrollierte Phase-2-Studie bei 20 Patienten mit rezidivierendem Glioblastom durchgeführt. Es wurde die Wirkung des Sativex gegen Placebothherapie und beides kombiniert mit dem dosisintensiven Temozolomid untersucht. Die Studie enthielt zwei Phasen. Zuerst wurde die Wirksamkeit und die Sicherheit des Sativex (THC / CBD 1: 1-Verhältnis) überprüft und danach seine Wirkung. Es wurde gezeigt, dass Sativex eine starke Wirksamkeit als Ergänzung zur Chemotherapie mit einer 1-Jahres-Überlebensrate von 83 % im Vergleich zu 56 % nach Placebogabe hatte. Diese Studie wurde bis jetzt nur als Zusammenfassung veröffentlicht (Chris Twelves, 2017).

Seit 2017 läuft in Radwick in Australien eine randomisierte, doppelblinde Phase-2-Studie bei 82 Patienten mit rezidivierendem Glioblastom. Hier wird die Wirkung von zwei Cannabisölen mit einem THC: CBD Verhältnis von 1:1 und 1:4 untersucht (ACTRN12617001287325). In Spanien findet seit 2019 eine Multicenter-Phase I Studie bei 30 Patienten mit einem neu diagnostiziertem Glioblastom statt. Das verwendete Präparat enthält 1:1 THC und CBD und wird in Kombination mit Temozolomid Gabe und Standard-Radiochemotherapie überprüft (NCT03529448).

#### 1.4 Pharmakokinetik- Nebenwirkungen

Cannabidiol hat aufgrund seines starken lipophilen Profils eine schlechte orale Bioverfügbarkeit (Gaston and Friedman, 2017, Agurell et al., 1981). Nach inhalativer Verabreichung ist die Plasmakonzentration vergleichbar mit einer intravenösen Gabe (ca. 30 % Bioverfügbarkeit statt 6 % nach oraler Verabreichung). Es gibt eine schnelle Verteilung im Gehirn und Fettgewebe während etwa 10% an Erythrozyten gebunden sind (Ohlsson et al., 1986). CBD erreicht dosisabhängig die maximale Plasmakonzentrationen nach 1 bis 4 Stunden. Die Verstoffwechslung findet hauptsächlich unter Beteiligung des Cytochrom P450-Systems in der Leber statt (Zendulka et al., 2016). Die Metaboliten des CBDs werden durch die Fäzes oder zum kleinen Teil durch den Urin ausgeschieden (Ohlsson et al., 1986). Die durchschnittliche Halbwertszeit beträgt 24 Stunden nach intravenöser Anwendung und ungefähr 20 % mehr nach inhalativer Verabreichung. Nach wiederholter oraler Einnahme für 6

Wochen wurde eine Halbwertszeit der CBD-Elimination zwischen zwei und fünf Tagen festgestellt (Consroe et al., 1991).

Cannabidiol hemmt das Cytochrom CYP3A und beeinflusst die Hydrocortison und Prednisolon Metabolisierung. Diese inhibierende Wirkung von CBD hat auch Einfluss auf Medikamente wie Amitriptylin, Gabapentin und andere Antidepressiva, die durch das hepatische Cytochrom P450 metabolisiert werden. Das kann zur QT-Verlängerung und anticholinergischen Wirkungen führen. Zudem erhöht die gleichzeitige Verabreichung mit den o.g. Medikamenten das Risiko für neurologische Nebenwirkungen. In diesem Fall sollten die Patienten überwacht werden und gegebenenfalls muss eine Dosisreduktion nachgedacht werden (Wilson-Morkeh et al., 2020).

## 2 FRAGESTELLUNG

Seit jeher spielen pflanzliche Wirkstoffe eine Hauptrolle im Bereich der Pharmakologie. Heutzutage sind mehr als 80% den Arzneimittelsubstanzen Naturprodukte oder sind von einem natürlichen Wirkstoff inspiriert (Harvey, 2008). CBD ist auch ein pflanzlicher Wirkstoff, ursprünglich aus *Cannabis sativa*, der als potentielle Therapie bei Glioblastomen diskutiert wird (McAllister et al., 2015). Da die Überlebenschance beim MB nur bei einem 5-Jahres- Überleben von 60% liegt, besteht die Notwendigkeit nach neuen Therapieansätzen mit möglichst geringen Komplikationen und hoher anti-tumoraler Effektivität zu suchen (Kaatsch P, 2018).

Ziel dieser Arbeit war es daher, die zytotoxischen Effekte von CBD in Hinblick auf die Heterogenität dieser Tumorentität in sechs unterschiedlichen, humanen MB Zelllinien zu überprüfen. Dabei sollte insbesondere die Wirkung auf CB1, CB2, TRPV1 und TRPV2 Rezeptoren analysiert werden. Als Hypothese wurde angenommen, dass die zytotoxische Wirkung des CBDs durch diese Rezeptoren verursacht wird. Deswegen wurde zunächst ihre Expression in diesen Tumorzelllinien überprüft und auf Proteinebene kontrolliert. In dieser Arbeit wurde die Korrelation der o.g. Rezeptoren mit zytotoxischen Effekten analysiert. Zusätzlich wurde durch die Anwendung von CNR1 und CNR2 Inhibitoren untersucht, ob diese Rezeptoren in die Wirkung des CBDs involviert werden.

### 3 MATERIAL

#### 3.1 Verbrauchsmaterialien

<b>Verbrauchsmaterialien</b>	<b>Hersteller</b>
96-Loch-Platten	Starlab (Hamburg, Deutschland)
12-Loch-Platten	Corning (Kaiserslautern, Deutschland)
Bakterienzurückhaltender Filter Minisart Plus 0,22 µm	Sartorius (Göttingen, Deutschland)
Combitips	Greiner Bio-One (Frickenhausen, Deutschland)
Einwegpipetten (2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml)	Greiner Bio-One (Frickenhausen, Deutschland)
Kryoröhrchen	Simport (Beloeil, Kanada)
Kulturflaschen (75 cm <sup>2</sup> )	Greiner Bio-One (Frickenhausen, Deutschland)
Microvette	Sarstedt AG & Co (Nümbrecht, Deutschland)
NuPAGE™ 4-12% Bis-Tris Protein Gels	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging, Inc. (Chicago, USA)
Pasteurpipetten	Brand (Wertheim, Deutschland)
PCR Reaktionsgefäße	Peqlab Biotechnologies GmbH (Erlangen, Deutschland)
Pipettenspitzen	Starlab (Ahrensburg, Deutschland)
Protran Transfer Nitrozellulosemembran	Whatman (Dassel, Deutschland)
PS-Röhrchen (15 ml und 50 ml)	Greiner Bio-One (Frickenhausen, Deutschland)
Scheren	Finescience Tool (Heidelberg, Deutschland)
Zellulose Blot Papier (3 mm)	GE Healthcare (Freiburg, Deutschland)
Zentrifugenröhrchen	Beckmann Coulter (Krefeld, Deutschland)

#### 3.2 Chemikalien

<b>Chemikalien</b>	<b>Hersteller</b>
Cannabidiol(1mg/ml)	Sigma Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, Deutschland)
Agarose	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Amphotericin	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Amphotericin B	PAA Laboratories GmbH (Pasching, Österreich)
Ampuwa 50 ml	Fresenius Kabi GmbH (Bad Homburg, Deutschland)
BSA	Sigma-Aldrich (St.Louis, USA)
Clens Lösung	Beckman Coulter (Krefeld, Deutschland)
cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail	Sigma-Aldrich (St.Louis, USA)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
DMEM	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
ECL plus Western-Blotting Detection System	GE Healthcare(München, Deutschland)
Essigsäure	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Ethanol	Sigma-Aldrich (St.Louis, USA)
Ethidiumbromid	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)

Magic Mark XP Western Protein Standard	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Milchpulver	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
PBS (1x)	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Penicillin- Streptomycin	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Ponceau S	Serva (Heidelberg, Deutschland)
Propidiumiodid (PI)	Sigma-Aldrich (St.Louis, USA)
RPMI 1640	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
SDS Pellets	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
SDS Ultrapure	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Terralin liquid	Schülke & Mayr GmbH (Norderstedt, Deutschland)
Thiazolylblau	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
TRIS	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Trypan Blue Solution	Fluka Analytikal Sigma-Aldrich
Trypsin/ EDTA	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
Trypsin/EDTA	Life technologies GmbH (Gibco) (Darmstadt, Deutschland)
Tween 20	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)

### 3.3 Enzyme

<b>Enzym</b>	<b>Hersteller</b>
cOmplete™, Mini Protease Inhibitor Cocktail	Roche (Mannheim, Deutschland)
MyTaq™ MS Red Mix	Bioline (Luckenwalde, Deutschland)
PhosSTOP™ Phosphatase Inhibitor Cocktail	Roche (Mannheim, Deutschland)
RNase A	Peqlab Biotechnologies GmbH (Erlangen, Deutschland)

### 3.4 Kits

<b>Kit</b>	<b>Hersteller</b>
Cell Proliferation ELISA, BrdU	Roche (Mannheim, Deutschland)
High Pure RNA Isolation	Roche (Mannheim, Deutschland)
Transcriptor First Strand cDNA Synthesis	Roche (Mannheim, Deutschland)
ECL Plus Western Blotting Detection	GE Healthcare (Freiburg, Deutschland)

### 3.5 Antikörper

#### 3.5.1 Primäre Antikörper

<b>Antikörper (Ak)</b>	<b>Ziel</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Sekundär-Ak</b>	<b>Hersteller</b>
Anti-beta Tubulin antibody	Beta-Tubulin	1:5.000	R	abcam (Cambridge, UK)
Monoclonal anti-CNR1	CNR1	1:50	M	Sigma-Aldrich (St.Louis, USA)
Monoclonal anti-CNR2	CNR2	1:750	M	Sigma-Aldrich (St.Louis, USA)
TRPV1 monoclonal Antibody(M01A),	TRRPV1	1:1.000	M	Abnova
Anti-TRPV2 antibody	TRPV2	1:5000	M	LSBio (Seattle, US)
CB1 Antikörper (2F9)	CNR1	1:2.000	R	Santa Cruz (California, US)
CB2 Antikörper (3C7)	CNR2	1:2.000	M	Santa Cruz (California, US)
Anti-VR1 Antibody	TRPV1	1:2.000	M	abcam (Cambridge, UK)
TRPV2 antibody	TRPV2	1:2.000	M	Sigma-Aldrich (St.Louis, USA)

Sekundäre Antikörper: R= Rabbit, M=Mouse

#### 3.5.2 Sekundäre Antikörper

<b>Antikörper</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Hersteller</b>
Anti-Mouse IgG	1:5.000	GE Healthcare (UK)
Anti-Rabbit IgG	1:5.000	GE Healthcare (UK)

### 3.6 Inhibitoren

<b>Inhibitoren</b>	<b>Ziel</b>	<b>Hersteller</b>
AM21	CNR1	MCE MedChem Express (Monmouth Junction, USA)
SR144528	CNR2	MCE MedChem Express (Monmouth Junction, USA)

### 3.7 Primer

<b>Primer</b>	<b>Sequenz forward</b>	<b>Sequenz reverse</b>
GAPDH	CCACCCATGGCAAATTCATGGCA	TCTAGACGGCAGGTCAGGTCCACC
CNR1	AAGACCCTGGTCCTGATCCT	CGCAGGTCCTTACTCCTCAG
CNR2	ATCATGTGGGTCCTCTCAGC	GATCCGGAAAAGAGGAAGG
TRPV1	GAGAGACCTGTGCCGTTTCA	TCCCGTCTTCAATCAGCGTC
TRPV2	AAAGGGAACAGGTGCCAGTCA	TCCCACTGCTTGGTGCAAGCG

## 3.8 Geräte

Geräte	Hersteller
Agarose-Gelelektrophoresekammer	Peqlab Biotechnologies GmbH (Erlangen, Deutschland)
Biodoc Analyzer	Biometra (Göttingen, Deutschland)
CO <sub>2</sub> -Inkubator Binder	Binder (Tuttlingen, Deutschland)
Durchflusszytometer Cytomics FC500	Beckman Coulter (Krefeld, Deutschland)
Eisbereiter	Scotsman Ice Systems (Vernon Hills, USA)
EL-800 Microplate Reader	Bio-Tek Instruments (Bad Friedrichshall, Deutschland)
Enduro 250V Power Supply	Stellar Scientific (Maryland, USA)
Eppendorf Bio Photometer	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Feinwaage	Ohaus Europe GmbH (Greifensee, Schweiz)
Fusion FX 7	VILBER LOURMAT Deutschland GmbH (Eberhardzell, Deutschland)
Gefrierschrank	Kirsch (Willstätt-Sand, Deutschland)
GFL 3005 Schüttler	Heidolph (Schwabach, Deutschland)
Handy Step	Brand (Wertheim, Deutschland)
Heizblock Thermostat TCR 100	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Inkubator	Biomedis (Gießen, Deutschland)
Kühlzentrifuge Mikro22R	Hettich (Kirchlengern, Deutschland)
Laborwaage EW420-3NM	Kern & Sohn (Balingen- Frommen, Deutschland)
Mikroskop Axiovert 25	Zeiss (Oberkochen, Deutschland)
Mikroskop Motic AE 31	Motic (Wetzlar, Deutschland)
Mikrowelle	Severin Elektrogeräte GmbH (Brühl, Deutschland)
Modulus Microplate Reader	Turner Biosystems/ Promega (Mannheim, Deutschland)
Multipette Stream	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Nanodrop 100 Spektrophotometer	Peqlab Biotechnologies GmbH (Erlangen, Deutschland)
PCR C 100 Thermal Cycler	BioRad (München, Deutschland)
pH-Meter inolab PH 7310	WTW (Weilheim, Deutschland)
Pipettierhilfe Rotafiller 3000	Quasar Instruments (Colorado Springs, USA)
Pipetus	Hirschmann Laborgeräte (Eberstadt, Deutschland)
Rollschüttler RM5- Assistant	Braun (Melsungen, Deutschland)
Rollschüttler RS-TR05	Phoenix Instruments (Garbsen, Deutschland)
Rollschüttler Tube Roler	STARLAB GmbH (Hamburg, Deutschland)
Semi-Dry Blotter	Peqlab Biotechnologies GmbH (Erlangen, Deutschland)
Sterilwerkbank Herasafe	Heraeus Instruments (Hanau, Deutschland)
Sterilwerkbank Sterigard	The Baker Company (Stanford, USA)
Vortex Heidolph Reax top	Heidolph (Schwabach, Deutschland)
Vortex MS2c Minishaker	IKA Labortechnik (Staufen, Deutschland)
Wasserbad	GFL Gesellschaft für Labortechnik (Burgwedel, Deutschland)
Z1 Coulter Partikel Counter	Beckmann Coulter (Krefeld, Deutschland)
Zentrifuge 542R	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Zentrifuge Allegra X-22R	Beckmann Coulter (Krefeld, Deutschland)
Zentrifuge Rotixa 50RS	Hettich (Kirchlengern, Deutschland)

### 3.9 Zelllinien

Es folgen Informationen über die Etablierung und die Charakteristika der verwendeten Medulloblastomzelllinien.

#### **ONS-76:**

Die ONS-76 Zelllinie wurde aus tumorösem Gewebe des Cerebellums eines 2-jährigen Mädchens mit klassischem Medulloblastom etabliert (Yamada et al. 1989). ONS-76 Zellen tragen aktivierende Mutationen im SHH-Signalweg und keine *TP53* Mutationen (Ivanov et al. 2016; Kunkele et al. 2012).

#### **DAOY:**

Die DAOY Zelllinie wurde zum ersten Mal im Jahr 1985 bei einem 4-jährigen Patienten mit einem desmoplastischen Medulloblastom beschrieben. Die Etablierung erfolgte nach Biopsie des soliden Tumors des Cerebellums. Die Zellen tragen eine *TP53* Mutation sowie Mutationen im SHH-Signalweg (Jacobsen et al., 1985, Kunkele et al., 2012).

#### **D425:**

Die D425 Zelllinie wurde aus metastasiertem Gewebe etabliert. Die Zellen überexprimieren *MYCN* und tragen eine *TP53* Mutation (Wikstrand et al., 1991, Kunkele et al., 2012).

#### **D458:**

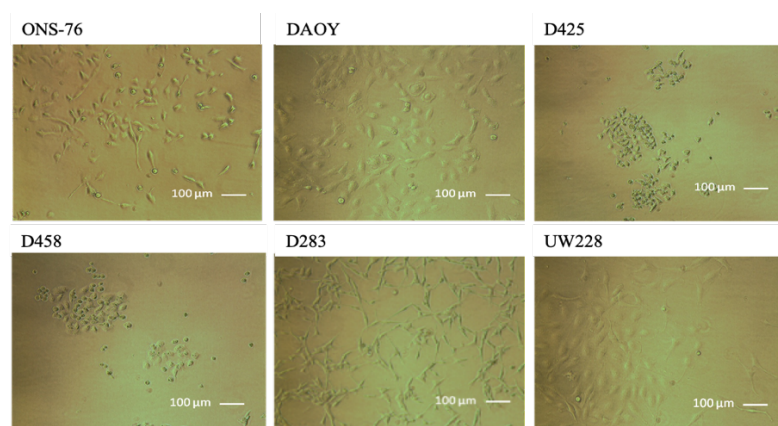
Die Zelllinie D458 wurde aus original medulloblastärem Tumorgewebe bei gleichem Patienten wie die D425 Zelllinie etabliert. Diese Zellen weisen keine Mutation in *TP53* auf. Sie zeigen einen Polymorphismus in *R72P* (Wikstrand et al., 1991, Kunkele et al., 2012).

#### **D283:**

Die D283 Ziellinie wurde im Jahr 1985 aus einem Peritonealimplantat und Aszites Flüssigkeit eines 6-jähriges Kindes mit metastatischem MB etabliert (Friedman et al., 1985). Diese Zellen wurden in die Gruppe 3 oder 4 der MB eingeordnet. D283 überexprimieren *MYCN* und tragen keine *TP53* Mutation (Kunkele et al., 2012).

#### **UW228:**

Die Zelllinien, UW228-1, UW228-2 und UW228-3, wurden aus zwei hinteren Fossa-Medulloblastomen etabliert (Friedman et al., 1985). Die drei UW228-Sublinien stammen von einem Tumor, der trägt aktivierte SHH Mutationen und eine Mutation in *TP53* (Kunkele et al., 2012).



**Abbildung 2** Lichtmikroskopische Aufnahmen der verwendeten Zelllinien



## 4 METHODEN

### 4.1 Zellkultur

#### 4.1.1 Auftauen den verwendeten Zelllinien

Die MB Zelllinien: ONS-76, DAOY, D425, D458, D283 und UW228 wurden für meine Experimente verwendet. Die Zelllinien wurden bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert und zum Auftauen kurz erwärmt und nach Zugabe von 8 ml Medium mit Zusätzen (Vollmedium, Tab. 5) in einem 15-ml-Greiner-Röhrchen aufgenommen. Nach Zentrifugation von 5 Minuten bei 300xg wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet mit frischem Medium in die Kulturflaschen überführt.

**Tabelle 4** Verwendete Medien für die Kultivierung der Medulloblastomzelllinien A=RMPI 1640, B= DMEM

Zelllinien	Medium
ONS-76	A
DAOY	A
D425	B
D458	B
D283	B
UW228	B

**Tabelle 5** Zellkulturmedium-Zusätze

Inhaltsstoffe	Konzentration
FCS	10 %
Pen-Step (10.000 U/ml Penicilin; 10.000 $\mu\text{g}$ /ml Streptomycin)	1 %
Amphotericin B (250 $\mu\text{g}$ /ml)	0,8 %
Ad 500 ml Medium (A oder B)	

#### 4.1.2 Passagierung und Kultivierung

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in T175 Flaschen im Brutschrank bei  $37^{\circ}\text{C}$ , 5 %  $\text{CO}_2$  und 95 % Luftfeuchtigkeit. Als Kultivierungsmedia (Tab. 4 und 5) wurden das RPMI Medium oder DMEM Medium mit Zugabe von Penicillin, Streptomycin und hitze- inaktiviertem fetalen Kälberserum (FCS) angesetzt. Die Kultivierung und Passagierung der Zelllinien erfolgte unter

sterilen Bedingungen. Medium und PBS wurden vorher für ca. 10 Minuten im Wasserbad im 37°C erwärmt.

Durch regelmäßiges Mikroskopieren und Kontrolle des Wachstums wurden die Zellen in Abhängigkeit von der Konfluenz (ca. 2-3 Mal die Woche) passagiert. Nach Absaugen des alten Mediums mit einer Pasteurpipette wurde jede Flasche mit 5 ml PBS(1x) gewaschen. Anschließend erfolgte die Zugabe von 1ml Trypsin pro Flasche bis die Zellen nicht mehr adhärent waren. Nach Zugabe von 8 ml Medium mit Zusätzen wurde die Trypsinierung abgestoppt und das Gemisch in ein 15-ml-Mehrzweckröhrchen überführt, für 5 Minuten bei 300 g in 21 °C abzentrifugiert und mit frischem Medium resuspendiert. Die Zelllinien D425 und D458 sind semi-adhärent. Deswegen wurde nur jedes zweite Mal vor der Zugabe von Trypsin mit PBS gespült.

## 4.2 Bestimmung der Zellviabilität

Mit Hilfe des MTT-Tests lässt sich die zelluläre Viabilität bestimmen. Der Test beruht auf der kolorimetrischen Quantifikation von blau-violetten Formazankristallen, welche durch reduktive Ringspaltung des gelben wasserlöslichen MTT Reagenz 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) durch mitochondriale und zytoplasmatische Dehydrogenasen entstehen (Mosmann, 1983). Da diese nur in metabolisch aktiven Zellen die beschriebene Reaktion katalysieren können, kann der MTT Test als Maß für die Lebensfähigkeit der kultivierten Zellen herangezogen werden. Um die optimale Zellzahl der zu untersuchenden Tumorzellen im 96-well Format zu bestimmen, wurden zunächst unterschiedliche Zellzahlen pro Kavität in einem Volumen von 100 µl (500, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000 Zellen pro Well) auf fünf Mikrotiterplatten ausgesät. Für diesen Zweck wurde das Zellanalysegerät Coulter Counter (Beckman) verwendet. Nach einer Inkubationszeit von 24 h wurden jeweils 20 µl MTT (Thiazolylblau, Tab. 6) pro Well zugegeben und die Mikrotiterplatten für weitere 3 h inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von 100µl/Well einer Solubilisierungslösung (Tab. 7). Um die Formazankristalle effizient zu lösen, wurden die Mikrotiterplatten für 30 Minuten auf einem Plattenschüttler geschüttelt. Zum Schluss erfolgte die Messung des umgesetzten Farbstoffs am ELISA Reader bei einer Wellenlänge von 570/630 nm. Dieser Prozess wurde nach 24, 48, 72 und 96 Stunden (insgesamt fünf Mal) wiederholt, um auf diese Weise eine Proliferationskurve der Zelllinien zu erhalten.

**Tabelle 6** MTT-Lösung, steril filtriert

Inhaltsstoffe	Konzentration
Thiazolylblau	5 mg/ml
Ad 20 ml PBS	

**Tabelle 7** Solubilisierungslösung

Inhaltsstoffe	Konzentration
SDS	10 % (w/v)
Essigsäure	5 % (v/v)
Ad 100 ml DMSO	

#### 4.2.1 Bestimmung des IC<sub>50</sub>-Wertes

Um Effekte von CBD auf die Zellviabilität verschiedener Medulloblastomzelllinien zu untersuchen, wurden MTT-Assays (n=3) durchgeführt. Hierzu wurden die Zelllinien ONS-76, DAOY, D425, D458, D283 und UW228 auf 96-Well-Platten in der zuvor bestimmten optimalen Zellzahl (Kapitel 4.2) ausgesät und nach einer Inkubationszeit von 24 h mit CBD in den Konzentrationen 12,5 µg/ml, 6,25 µg/ml, 3,125 µg/ml, 1,5625 µg/ml und 0,78125 µg/ml behandelt. Als Kontrolle dienten sowohl unbehandelte Zellen als auch eine Lösungsmittelkontrolle (Kapitel 4.2.2) mit Methanol (MeOH), weil das verwendete Präparat (CBD) in MeOH gelöst ist. Weiterhin wurden normale humane Fibroblasten (10000 Zellen pro Well) als Kontrolle verwendet, um die zytotoxischen Effekte von CBD auf Tumorzellen sowie gesunde Körperzellen vergleichbar einschätzen zu können. Nach einer Behandlungszeit von 72 Stunden wurden MTT-Assays durchgeführt und aus den erhaltenen Absorptionwerten Dosis-Wirkungskurven semilogarithmisch dargestellt. Mit der Hilfe von GraphPad Prism 5.0 wurden die Zellviabilitätskurven erstellt. Die Daten wurden hierbei auf die unbehandelten Medulloblastomzellen relativiert. Nun wurden aus den Kurven durch nichtlineare Regression die jeweiligen IC<sub>25</sub>, IC<sub>50</sub> und IC<sub>75</sub> Werte manuell ermittelt. Der IC<sub>50</sub> Wert stellt dabei die mittlere inhibitorische Konzentration dar, bei der die Zellviabilität um 50 % reduziert wird. Die IC<sub>25</sub> und IC<sub>75</sub> Werte entsprechen dabei den CBD Konzentrationen, bei denen die Zellviabilität um 75 % bzw. um 25 % herabgesetzt wird (Litchfield and Wilcoxon, 1949).

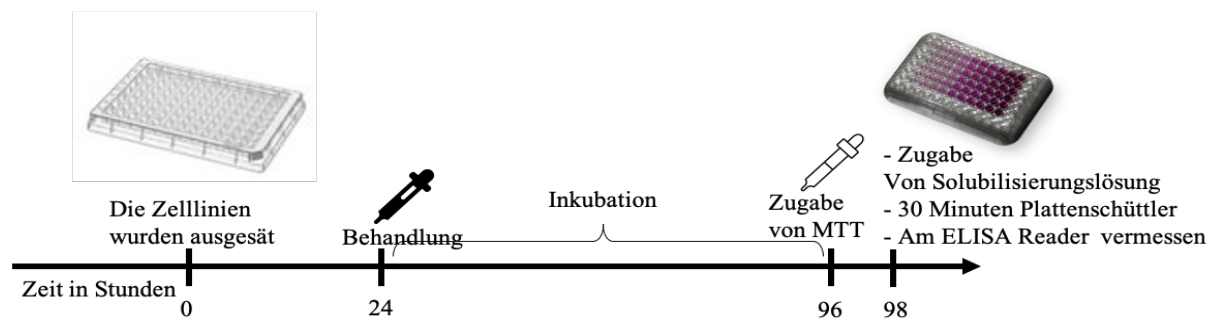


Abbildung 3 MTT Assay-Versuchsschema

Tabelle 8 Pipettierschema für MTT-Assay für IC<sub>50</sub> Bestimmung

	µg/ml	Zelllinie 1					Zelllinie 2				
	Kontrolle	Medium									
Medium											
MeOH											
CBD	12,5										
	6,25										
	3,125										
	1,5625										
	0,78125										

#### 4.2.2 Behandlung nach Gabe von Inhibitoren

Zur Erfassung des Wirkmechanismus erfolgte die selektive Inhibition der CBD Rezeptoren, um den Einfluss des anti-tumoralen Effekts zu definieren. Die verwendeten Inhibitoren waren die AM251 für CNR1 und SR144528 für CNR2. Die ONS-76 Zelllinie wurde für die Untersuchung der Toxizität der Inhibitoren genutzt (Kapitel 4.2.3). Die Konzentration von 0,0009 % wurde als nicht toxisch festgestellt und für die nachfolgende Experimente angewendet. Jeder Inhibitor wurde separat für jede Zelllinie getestet. Nach Feststellung der nicht toxischen Dosen von den Inhibitoren erfolgte die Behandlung mit 0,0009 % AM251 und 0,0009 % RS144528. Eine gleichzeitige Behandlung mit CBD erfolgte sowohl nach der Zugabe der Inhibitoren als auch separat als Referenzkontrolle. Ein ausführliches Pipettierschema ist in Tabelle 9 zu finden. Bei den Zelllinien wurde bei jedem Versuch eine Toxizitätskontrolle mit DMSO und CBD durchgeführt. Die Zellviabilität wurde durch einen MTT Assay (n=3), wie im Kapitel 4.2 beschrieben, 72 Stunden nach der Anwendung von den Inhibitoren analysiert.

**Tabelle 9** Pipettierschema von 96-Well-Platte bei der Anwendung der Inhibitoren, A=AM251, B=SR144528, Kontrolle\* = MeOH (Konzentration von  $IC_{50}$  für jeder Zelllinie) und DMSO

		Zelllinie 1			Zelllinie 2			Zelllinie 3			Zelllinie 4		
Kontrolle	Medium												
	Kontrolle*												
CBD Konzentration von $IC_{50}$	A												
	B												
	A+B												
	Nur CBD												
	Blank												

#### 4.2.3 Toxizitätskontrolle

Die Toxizitätskontrollen wurden in zwei Schritten durchgeführt. Zuerst wurde für die Behandlung mit CBD der Effekt des MeOHs kontrolliert, weil das verwendete CBD in MeOH gelöst wurde. Die Schädigung der verwendeten Zelllinien wurde erfasst, um den Effekt von CBD als einzigen Einflussfaktor nach der Behandlung auszuschließen. Bei den Experimenten, die in dem Kapitel 4.2.1 und 4.2.2 beschrieben sind, wurden die verwendeten Zelllinien mit MeOH behandelt (Tab. 8).

Vor der Anwendung der Inhibitoren wurde ihre Toxizität überprüft. Die ONS-76 Zelllinie wurde als empfindlichste genommen. Die Zelllinie wurde ausplattiert und eine Inkubation in Medium über 24 Stunden erfolgte. Die Inhibitoren wurden in den unterschiedlichen Konzentrationen zugegeben. Die Maximale Konzentration beträgt  $9 \cdot 10^{-1}$  und diese Konzentration wurde weiter eins zu zehn verdünnt bis eine minimale Konzentration von  $9 \cdot 10^{-7}$ . Eine Konzentration von 0,009 % war nicht toxisch und wurde für die weiteren Experimente angewendet.

Ebenfalls erfolgte bei jedem Versuch eine Toxizitätskontrolle mit Kombination von 0,0009 % DMSO und der entsprechenden Konzentration von MeOH laut  $IC_{50}$  bei jeder Anwendung der Inhibitoren (Tab. 9). Da sind die verwendeten Inhibitoren in DMSO gelöst sind.

### 4.3 Expression von Rezeptoren auf mRNA Ebene

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist ein *in vitro* Prozess zur Amplifikation spezifischer DNA-Sequenzen. Eine semiquantitative PCR wurde durchgeführt, um die Expression der folgenden Gene zu überprüfen: *GAPDH* (als Kontrolle), *Cannabidiol Rezeptor 1 (CNR1)*, *Cannabidiol Rezeptor 2 (CNR2)*, *Transienter Rezeptor-Potential-Kationenkanal der Unterfamilie V (für Vanilloid) Subtyp 1 (TRPV1)* und *Subtyp 2 (TRPV2)*. Für die Durchführung der semiquantitativen PCR wurde RNA isoliert und diese in cDNA transkribiert.

#### 4.3.1 RNA-Isolation und cDNA Synthese

Auf Mikrotiterplatten wurden 1,5 Millionen Zellen pro Well mit serumfreiem Medium ausgesät. Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden wurden die Platten abgesaugt und die Zellen mit Trypsin behandelt. Die Proben wurden mit 400 µl Lysis Puffer (Roche; High Pure RNA Purification Kit) und 200 µl PBS für die RNA-Isolation vorbereitet. Das Roche Kit wurde für die RNA Isolation nach Angaben des Herstellers angewendet. Nach der RNA Isolation wurden die RNAs mit Hilfe des Gerätes Nanodrop photometrisch quantifiziert. Jeweils 100ng der isolierten RNA wurden mit Aqua dest. auf ein Volumen von 11 µl aufgefüllt. Danach wurde die cDNA Synthese durchgeführt. Es wurden 2µl Vial 6 (Random Hexamer Primer) pro Probe hinzugefügt. Die Proben wurden in einen Thermalcycler gestellt, um die Primer für 10 Minuten bei 65 °C zu denaturieren. Pro Ansatz wurden 2µl Desoxynukleotid Mix (Vial 4), 4µl Puffer (Vial 2), 0,5µl RNase-Inhibitor und 0,5µl reverse Transkriptase zugegeben. Die Proben wurden erneut für 10 Minuten bei 25°C und anschließend für 30 Minuten bei 55 °C inkubiert. Als letzte Phase wurden die vorbereiteten Proben für 5 Minuten auf 85 °C erhitzt, sodass die Transkriptase inaktiviert wurde. Die fertige cDNA wurde bei -20°C gelagert. Eine Übersicht von diesem Prozess erfolgt bei der Tabelle 10.

**Tabelle 10** Prozess von cDNA Synthese

Schritt	Zeit	Temperatur	
Initiale Deanturierung	5 Min	95 °C	
Denaturierung	30 s	95 °C	Wiederholung von 30 Zyklen
Annealing	30 s	60 °C	
Enlongation	30 s	72 °C	
Finale Enlongation	10 Min	72 °C	

### 4.3.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die eingefrorenen cDNA Proben wurden aufgetaut. Ein PCR Mastermix wurde vorbereitet (Tab. 11). Insgesamt sechs Proben (19  $\mu$ l Mastermix und 1  $\mu$ l cDNA je Probe), eine pro Zelllinie, wurden in einen Thermalcycler untersucht (Tab. 12). Es wurde eine PCR separat für jedes zu untersuchendem Gen (*GAPDH*, *CNR1*, *CNR2*, *TRPV1* und *TRPV2*) durchgeführt. Eine *GAPDH* Kontrolle wurde bei den unverdünnten Proben durchgeführt. Eine PCR für *GAPDH* sowohl mit unverdünnter als auch mit 1:10 verdünnter cDNA durchgeführt. In den verdünnten cDNA Proben wurden die Existenz der Rezeptoren auf mRNA-Ebene kontrolliert. Eine zusätzliche Probe mit Aqua dest. wurde bei jedem Versuch als negative Kontrolle eingesetzt.

**Tabelle 11** Mastermix für PCR

Material		Pro Probe
cDNA		1 $\mu$ l
Mastermix	2 x My Taq Red HS Red Mix	10 $\mu$ l
	Primer forward	1 $\mu$ l
	Primer reverse	1 $\mu$ l
	Aqua dest.	7 $\mu$ l

**Tabelle 10** PCR Protokoll, Temperatur für Annealing pro Primer\*: CNR1 61 °C, CNR2 58 °C, TRPV1 58,3 °C und TRPV2 58,3 °C

Schritt	Zeit	Temperatur	
Initiale Deanturierung	5 Min	95 °C	
Denaturierung	30 s	95 °C	Wiederholung von 30 Zyklen
Annealing	30 s	Pro Primer*	
Enlongation	30 s	72 °C	
Finale Enlongation	10 Min	72 °C	

### 4.3.3 Agarose Gelelektrophorese

Ein 2%iges Agarose Gel wurde vorbereitet. In einem Erlenmeyerkolben wurden 2g Agarose und 100ml TAE Puffer (1x) (Tab. 13) gemischt und über 2 Minuten in der Mikrowelle gekocht. Nach Zugabe von 3µl Ethidiumbromid wurde die gesamte Lösung in eine Gel-Kammer mit einem Kamm gefüllt und für ungefähr 20 Minuten ausgehärtet. Die Taschen wurden mit 15µl Probe ausgefüllt, die erste Tasche wurde mit 5µl eines 100 bp Basenmarkers ausgefüllt. Danach erfolgte die Elektrophorese über ungefähr 40 Minuten bei einer Spannung von 100 Volt. Als nächstes wurde das Gel unter UV Licht mit Hilfe des Bio Doc Analyse Programmes fotografiert. Es erfolgte eine Bestimmung der Intensivität den Banden anhand der Megapixel. Es erfolgte eine Normalisierung auf die verdünnte GAPHD Kontrolle.

**Tabelle 11** TAE-Puffer (x50)

Inhaltsstoffe	Konzentration
TRIS-Base	2 M
Essesig	
EDTA 0,5 M	50 mM
Ad 1 l Aqua dest.	

### 4.4 Durchflusszytometrische Zellzyklusanalyse

Für die Analyse des Zellzyklus wurden 30.000 Zellen pro Well für ONS-76, DAOY, D425, D458, D283 und 20.000 Zellen pro Well für UW228 im 12-well Maßstab auf Mikrotiterplatten ausgesät. Die Zellen wurden mit den IC<sub>25</sub>, IC<sub>50</sub> und IC<sub>75</sub> Konzentrationen (Tab. 14) von CBD nach 24 Stunden behandelt. Eine zusätzliche Kontrolle wurde mit der maximalen MeOH Konzentration durchgeführt. Die Proben wurden nach 24, 48 und 72 Stunden nach der Behandlung trypsiniert, abzentrifugiert und mit 300 µl gekühltem PBS gelöst. Zunächst wurden die Proben während der Durchmischung mit Hilfe eines Vortex-Schüttlers mit 700µl eiskaltem Ethanol fixiert. Die Lagerung der Proben erfolgte bei -20 °C. Nach Auftauen der Proben und Zugabe von 3 ml PBS (1x) pro Röhrchen wurden die Proben für 5 Minuten auf 800xg bei 4 °C zentrifugiert. Nach einer einstündigen Inkubation mit 12,5µl RNase bei 37°C wurden jeweils 20 µl Propidiumiodid (PI) zugesetzt und die Proben wurden mit Hilfe eines Durchflusszytometer gemessen (Telford et al., 1994). Durch die Fluoreszenzmarkierung wird durchflusszytometrisch das Zellwachstum und die Zellteilung kontrolliert. Die vier Hauptphasen des Zellzyklus, Apoptose (sub-G1), Interphase I (G1), die DNA-Synthese



(Interphase II); S-Phase und Interphase III (G2) wurden nach der Färbung mit PI am FC500 CXP Durchflusszytometer (Beckman Coulter) gemessen und analysiert.

**Tabelle 12** Berechnung einzusetzenden Mengen für MeOH Kontrolle und Behandlungen mit den IC<sub>25</sub>, IC<sub>50</sub>, IC<sub>75</sub> Konzentrationen. Die Mengen sind in µl berechnet auf ein Endvolumen von 2,5 ml.

Zelllinien	MeOH Kontrolle		IC <sub>25</sub>		IC <sub>50</sub>		IC <sub>75</sub>	
	MeOH	Medium	CBD	Medium	CBD	Medium	CBD	Medium
ONS-76	118,075	2381,925	118,075	2381,925	50,825	2449,175	21,4125	2478,5875
DAOY	105,15	2394,85	105,15	2394,85	61,7375	2438,2625	32,9375	2467,0625
D425	76,475	2423,525	76,475	2423,525	61,300	2438,700	47,915	2452,085
D458	69,775	2430,225	69,775	2430,225	51,175	2448,825	37,3375	2462,6625

#### 4.5 BrDU-Assay

Um die Proliferationsrate zu kontrollieren wurde das Cell proliferation Kit der Firma Roche nach Angabe des Herstellers verwendet. Zu diesem Zweck wurden die Zelllinien ONS-76, DAOY, D425 und D458 in 96-Maßstabplatten ausgesät und nach 24 Stunden mit MeOH oder CBD (IC<sub>50</sub>, IC<sub>25</sub> und IC<sub>75</sub>) (Tab. 14) behandelt. Die Zugabe von 20 µl BrdU-Lösung erfolgte nach 72 Stunden und anschließend eine weitere Inkubation über 4 Stunden. 5'-Bromo-2'-desoxyuridin (BrdU) ist ein synthetisches Analogon von Thymidin und wird bei der Replikation von DNA eingebaut (Gratzner et al., 1975). Unter Anwendung von Hitze wird die Bindung des Antikörpers durch eine Denaturierung der DNA stabilisiert. Nach Zugabe einer Fixierungslösung wurde die Absorption durch den ELISA Reader bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen, um die Proliferationsrate zu ermitteln.

#### 4.6 Immundetektion von Proteinen

Für die Immundetektion von isolierten Proteinen wird eine Auftrennung mittels SDS-Polyacrylamidgel Elektrophorese (PAGE) und eine Übertragung der Proteine auf eine Nitrozellulösemembran mit Hilfe eines Semi-Dry-Blots durchgeführt. Der Nachweis von den CNR1, CNR2, TRPV2 und TRPV2 Proteinen wurde durch diese Methode überprüft.

#### 4.6.1 Zelllyse

Die Proteine wurden aus unbehandelten Zelllinien extrahiert. Die Medulloblastomzellen wurden in Kultivierungsflaschen kultiviert und geerntet. Nach Trypsinierung und Resuspension mit Medium wurden die Zellen in 15 ml Falconröhrchen überführt und bei 300xg für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation und Abheben des Überstandes erfolgte die Zugabe von 500 µl RIPA-Lyse Puffer (Tab. 15). Die vorbereiteten Proben wurden bei 4°C mit 14000xg für 10 Minuten zentrifugiert und der Überstand wurde abgenommen. Die Proben wurden bei -20 °C gelagert.

Tabelle 13 RIPA-Lyse Puffer

Inhaltsstoffe	Konzentrationen
TRIS	50 mM
NaCl	150 mM
100 mM EDTA ( pH 7,4)	1 mM
NP40	1 % (v/v)
10 % Natriumdesoxycholat	1 % (v/v)
10 % SDS Lösung	0,1 % (v/v)
Proteinase Inhibitoren (Roche)	1 Tablette
PhosStop Phosphatase Inhibitoren (Roche)	2 Tabletten
Ad 500 ml Aqua dest.	

#### 4.6.2 Proteinquantifizierung

Das Pierce BCA-Proteinassay Kit wurde verwendet, um die Menge an Proteinen in den gewonnenen Proben zu detektieren. Eine Reihe bekannter Konzentrationsstandards aus Rinderserumalbumin (BSA) wurde als Referenz für die Bestimmung der Konzentration jeder unbekanntem Probe basierend auf der Standardkurve benutzt.

Nach der Herstellung der Standards war der nächste Schritt die Herstellung des Arbeitsreagenz (WR) als Mischung von BCA-Reagenz A und BCA-Reagenz B (50:1). In eine 96-Well-Platte wurden 10µl pro Well von den vorbereiteten Proben pipettiert. Als nächstes erfolgte die Zugabe von 200 µl/Well WR. Die Platte wurde mit Aluminiumfolie bedeckt und 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Vermessung den Proben wurde mittels ELISA Reader mit einem

Absorptionsspektrum von 465 nm bis 590 nm durchgeführt. Aus diesen Daten erfolgte die Berechnung des Proteingehaltes für jede Probe.

#### 4.6.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)

Die gewonnenen Proteine wurden abhängig von ihrem Molekulargewicht mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt. Es wurden jeweils 20µg Proteine eingesetzt und in PBS verdünnt. Ein Endvolumen von 30 µl wurde durch Zugabe von vierfach-konzentriertem Laemmli-Puffer, β-Mercaptoethanol, SDS (Natriumlaurylsulfat) und Bromphenolblau erhalten. Nach der Mischung wurden die Proben für 10 Minuten bei 95 °C im Wärmeblock erhitzt und denaturiert. In die erste Geltasche wurden 5µl des PAGE-Markers gegeben, während die restlichen mit je 30µl Probenlösung jeder Zelllinie gefüllt wurden. Die Gelelektrophorese-Kammer wurde mit Laufpuffer (Tab. 16) gefüllt. Die verwendete elektrische Spannung wurde initial auf 80 V gestellt und nach ungefähr 10 Minuten auf 120 V erhöht.

**Tabelle 14** Zusammensetzung des Laufpuffers

Materialien	Menge
MES	9,76 g
Tris Base	6,06 g
SDS	1 g
EDTA	0,3 g
Ad 1 L Aqua dest.	

#### 4.6.4 Western Blot

Für die Übertragung der Proteine auf eine Nitrocellulose Membran wurde die Semi-Dry-Methode zum Blotten verwendet. Sechs mit Laufpuffer befeuchteten Whatman-Papiere wurden benutzt. Hiervon wurden je drei für die untere und drei für die obere Seite genutzt. Inzwischen wurde das Gel und eine befeuchtete Membran bereitgestellt. In einem elektrischen Feld von 100 mA erfolgte der Transfer der Proteine von dem Gel auf die Membran. Zur Überprüfung dieser Methode wurde eine Ponceau-Färbung (Kapitel 4.6.5) durchgeführt.

Die Membran wurde für eine Stunde bei Raumtemperatur mit 5 %igen Milchpulver in PBS mit Tween (Tab. 21) inkubiert, um die unspezifischen Bindungsstellen der Nitrozellulosemembranen zu blockieren. Anschließend wurde zunächst der Primärantikörper in einer geeigneten Verdünnung (Kapitel 3.5.1, 3.5.2) in die 5%ige Milchpulver gegeben und

über die Nacht inkubiert. Anschließend wurde die Membrane dreimal mit TBST gewaschen und die Inkubation mit dem Sekundärantikörper erfolgte für eine Stunde bei Raumtemperatur. Die Membran wurde noch dreimal mit TBST gewaschen. Abschließend erfolgte die Zugabe von der ECL-Lösung (GE Healthcare), sodass die proteinenspezifischen Banden mit einem Lumineszenz-Entwicklungsgerät sichtbar gemacht werden konnten.

**Tabelle 15** Zusammensetzung des Laufpuffers

Material	Menge
MES	9,76 g
Tris Base	6,06 g
SDS	1 g
EDTA	0,3 g
Ad 1 L Aqua dest.	

**Tabelle 16** Zusammensetzung des Transferpuffers

Material	Menge
Tris Base	1,5 g
SDS	0,5 g
Glycine	7,2 g
Ad 500 ml Aqua dest.	

**Tabelle 17** Waschpuffer 0,05 % Tween

Material	Menge
Tween20	250µl
Ad 500 ml PBS	

**Tabelle 18** TBS Puffer (pH 7,6 with 37% HCL)

Material	Menge
Tris Base	1,212 g
NaCl	4,388 g
Ad 450 ml Aqua dest.	

**Tabelle 19** Milch (5 %) für Blockierung

Material	Menge
Milk Pulver	2.5 g
Tween20	25 µl
Ad 50 ml PBS	

#### 4.6.5 Ponceau-Färbung

Eine Ponceau-Färbung wurde durchgeführt, um den Transfer der Proteine auf die Membran zu überprüfen. Die Membran wurde für circa 5 Minuten in die Ponceau-Lösung gelegt und geschüttelt. Danach erfolgte ein Waschschrift mit Aqua dest., wodurch die überschüssige Farbe entfernt wurde.

#### 4.6.6 Abbildungen und statistische Auswertungen

Die Graphen wurde mit Hilfe von GraphPad Prism® 5.0 erstellt und die entsprechenden Fehlerbalken (SEM- Standard error of the mean) wurden für jedes Experiment berechnet. Für die Berechnung der Signifikanzen wurde der t-Test angewandt. Die Signifikanzen wurden wie folgt eingeteilt:  $p=0,001-0,01(**)$  und  $p=0,01-0,05(*)$ .

## 5 ERGEBNISSE

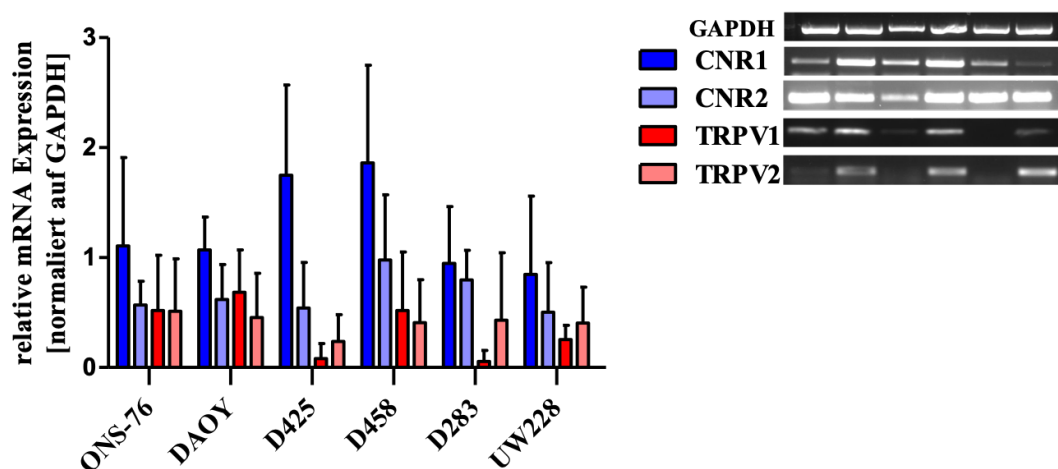
### 5.1 Expression von CBD-Rezeptoren in Medulloblastomzelllinien

#### 5.1.1 Expression von mRNA

Auf mRNA-Ebene wurde die Expression von CBD Rezeptoren in den verwendeten Zelllinien mittels PCR kontrolliert. Durchschnittlich lag die relative Expression für *CNR1* bei 1,26, für *CNR2* bei 0,66, für *TRPV1* bei 0,35 und für *TRPV2* bei 0,41 normalisiert auf die *GAPDH* Expression. Die CBD Rezeptoren (*CNR1*, *CNR2*) wurden deutlich stärker im Vergleich zu den Vanilloid Rezeptoren (*TRPV1*, *TRPV2*) exprimiert.

Bei den Zelllinien D425 und D458 konnte eine beinahe doppelt so hohe Expression von *CNR1* im Vergleich zu den anderen genannten Rezeptoren nachgewiesen werden. Nicht nur bei der Zelllinien D425 und D458 sondern auch bei der anderen verwendenden Zelllinien konnte der *CNR1* als der am stärksten exprimierte Rezeptor herausgestellt werden. In den meisten Fällen war die Expression von *CNR1* zweifach höher als die Expression eines zweiten exprimierten Rezeptors. Eine Ausnahme zeigte sich bei der Zelllinie D283. Hier war die Expression von *CNR1* und *CNR2* ähnlich stark.

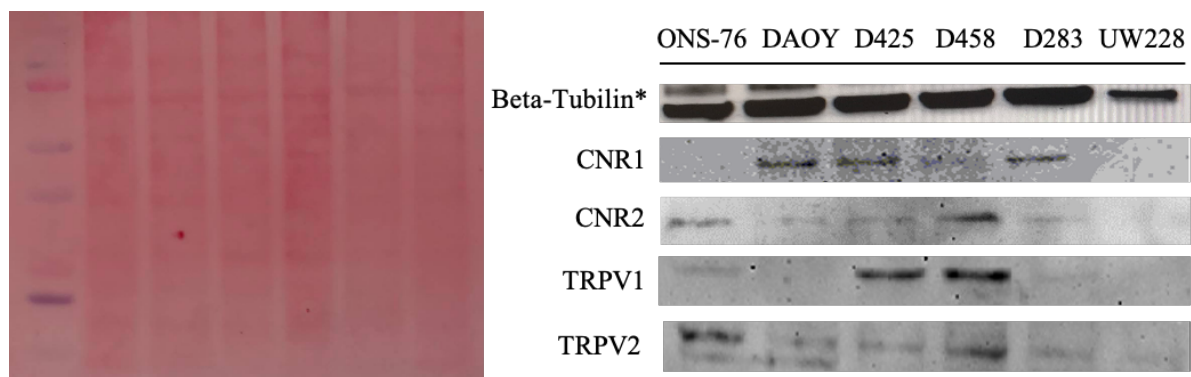
Der *TRPV1* wurde bei den Zelllinien D425 und D283 am wenigsten exprimiert. Das Vorhandensein von mRNA bei ONS-76 war ähnlich für die *TRPV1* und *TRPV2*. Die höchste Expression der beiden TRPV-Rezeptoren ließ sich bei den Zelllinien DAOY und D458 nachweisen.



**Abbildung 4** Die relative Expression der CBD Rezeptoren wird auf der y-Achse dargestellt. Alle Proben sind auf *GAPDH* Kontrollen relativiert. Die rechte Abbildung zeigt die fotografischen Aufnahmen der PCR-Banden unter UV-Licht.

### 5.1.2 Expression von Proteinen

Um die Expression von CBD Rezeptoren und Vanilloid Rezeptoren auf Proteinebene zu überprüfen, wurden Western Blots durchgeführt. Dieses Experiment wurde achtmal durchgeführt. Die Expression von CNR1 ließ sich bei den Zelllinien DAOY, D425, D283 nachweisen, eine schwache Expression war in D458 Zellen zu detektieren. Ebenfalls konnte die Expression von CNR2 in den Zelllinien ONS-76, DAOY, D425, D458 und D283 (sehr schwach) gezeigt werden. Der TRPV1-Rezeptor konnte auf Proteinebene bei Zellen der Zelllinien D458 und D245 nachgewiesen werden. Ein schwaches Signal zeigte sich bei der Zelllinie DAOY. Der *TRPV2* Rezeptor wurde bei den Zelllinien ONS-76, DAOY, D425, D458 und D283 (sehr schwach) nachgewiesen. In einem Versuch ein stärkeres Signal im Western Blot für die Rezeptoren zu bekommen, wurden neue Antikörper getestet. Die gleichen Proben wurden für den Western Blot benutzt. Im Ergebnis konnte auf diese Membran eine beta-Tubulin Expression nachgewiesen werden. Leider konnte die zuvor gezeigte Expression der untersuchten Rezeptoren nach Anwendung der neuen Antikörper bestätigt werden. Die Ergebnisse (Abb.5), die dargestellt wurden, sind eine Kombination aus drei Versuchen. Aus ungeklärten methodischen Gründen konnte die Expression der untersuchten Rezeptoren nicht ideal dargestellt werden.



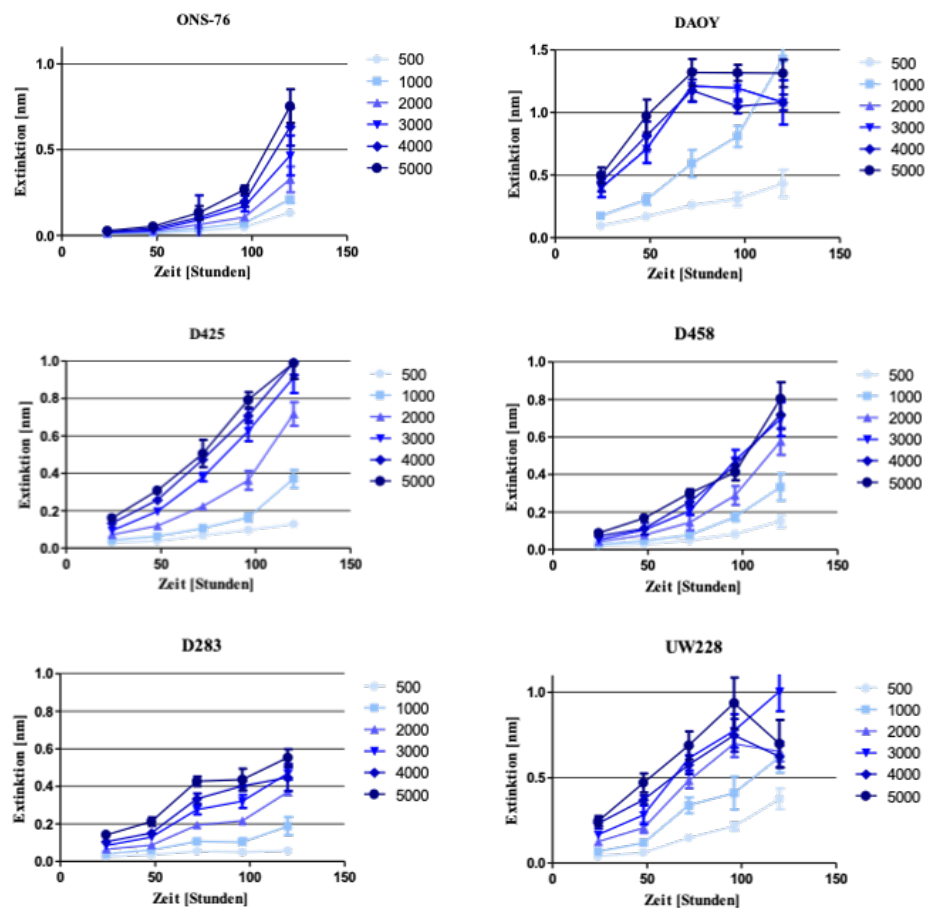
**Abbildung 5** links: Ponceau Färbung, rechts: Expression der getesteten Proteine als Western Blot-Banden. Auf der rechten Seite werden die verwendeten Antikörper dokumentiert.

\*Darstellung von Beta-Tubulin Banden von einer separaten Membran.

## 5.2 Zytotoxische Effekte von CBD

### 5.2.1 Bestimmung der optimalen Zellzahl

Die graphische Auswertung der Wachstumskurven ist in der Abbildung 6 dargestellt. Abhängig von der Zeit zeigte sich eine Zunahme der Extinktion, welche Rückschlüsse auf die Zellviabilität und somit der Zellzahl zulässt. Hierdurch konnte die optimale Zellzahl pro Zelllinie abgeleitet werden. Für die ONS-76, DAOY, D425, D458 und D283 Zellen wurde als ideal eine Zellzahl von 3.000 Zellen pro Well definiert. Die o.g. Zelllinien befinden sich für die Experimente zum Versuchszeitpunkt noch in der Wachstumsphase. Für die UW228 Zellen wurde eine initiale Aussaat von 2.000 Zellen pro Well als optimal geschätzt, sodass es eine adäquate Konfluenz der Zellen 72 Stunden nach Behandlung vorhanden ist.

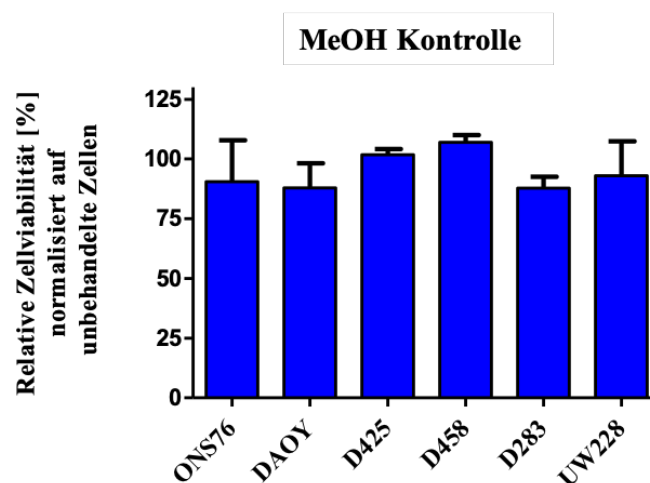


**Abbildung 6** Wachstumskurve der verwendeten Zelllinien. Auf der y-Achse ist die absolut gemessene Extinktion durch ELISA Reader aufgetragen und auf der x-Achse der Zeitverlauf zum Zeitpunkt der Lyse der Zellen.



## 5.2.2 Toxizität des Lösungsmittels

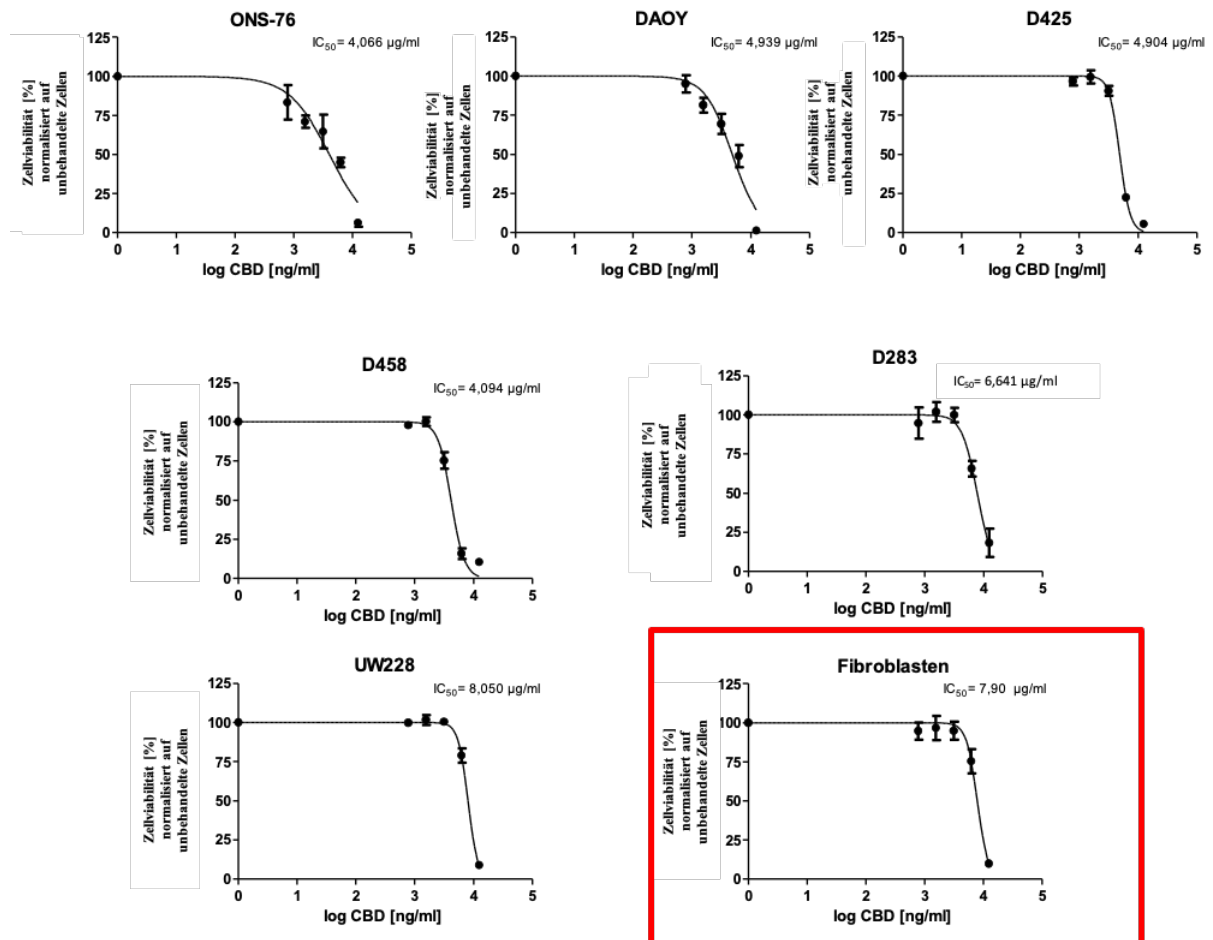
Die verwendeten Zelllinien wurden zur Kontrolle mit Methanol behandelt, um eine zytotoxische Wirkung auszuschließen. Diese Toxizitätskontrolle erfolgt, weil CBD in MeOH gelöst wurde. Die Konzentration wurde auf die höchste Behandlungsdosis (12,5 µg/ml) angepasst. Die relative Zellviabilität sank bei den DAOY und D283 Zelllinien auf maximal 13,1 %. Kein Einfluss auf das Wachstum wurde bei den D425 und D458 Zelllinien festgestellt. Eine ähnliche Wirkung mit weniger als 10 % Reduktion des Zellviabilitäts wurde bei den ONS-76 und UW228 Zelllinien nachgewiesen (Abb. 6).



**Abbildung 6** Einfluss des Lösungsmittels (MeOH) auf die Zellviabilität. Hierzu wurde die relative Zellviabilität normalisiert auf die unbehandelten Zellen [%] (y-Achse) für jede Zelllinie aufgetragen.

## 5.2.3 Hemmende Wirkung von CBD auf die Zellviabilität

Die Messung der Zellviabilität unter Behandlung mit seriellen Verdünnungen von CBD (Kapitel 4.2.1) erfolgte nach 72 Stunden. Die relative Zellviabilität in % wurde gegen die eingesetzte CBD Konzentration (log) aufgetragen (Abb. 7). Die Wirkungskurven wurden nicht nur für die sechs verwendeten Zelllinien, sondern auch für die humane Fibroblasten erstellt, um die Wirkung auf nicht tumorogene Zellen zu untersuchen.



**Abbildung 7** Dosis-Wirkungskurven der verwendeten Medulloblastomzelllinien und humanen Fibroblasten zur Berechnung der jeweiligen  $IC_{50}$ -Werte mithilfe nichtlinearer Regression. Hierzu wurde die relative Zellviabilität [%] gegen die verwendeten seriellen Verdünnungen von CBD halblogarithmisch aufgetragen. Die jeweiligen  $IC_{25}$ ,  $IC_{50}$  und  $IC_{75}$  Werte wurden nun der Kurve manuell entnommen.

#### 5.2.4 Bestimmung der $IC_{50}$

Die Berechnung der jeweiligen  $IC_{50}$  Werte ermöglicht eine vergleichende Analyse des Ansprechens der Medulloblastomzellen auf eine Behandlung mit CBD. Die Werte wurden durch nichtlineare Regression aus Dosis-Wirkungskurven (Kapitel 5.2.3) bestimmt und aus mindestens  $n = 3$  Versuchen gemittelt. Für die Zelllinie ONS-76 konnte auf diese Weise ein  $IC_{50}$  Wert von  $4,066 \mu\text{g/ml}$  berechnet werden. Sie erwies sich somit als sensitivste Zelllinie. Allerdings war auch die Zelllinie D458 mit einem  $IC_{50}$  Wert von  $4,094 \mu\text{g/ml}$  ähnlich empfindlich. Bei den Zelllinien DAOY mit  $4,939 \mu\text{g/ml}$  und D425  $4,904 \mu\text{g/ml}$  wurden ähnliche  $IC_{50}$  berechnet. Als eine nicht so empfindliche Zelllinie wurde die D283 mit einem

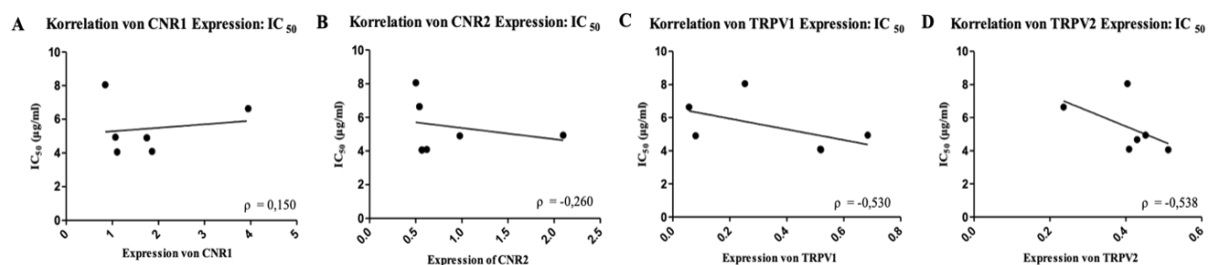
IC<sub>50</sub> von 6,641 µg/ml nachgewiesen. Die Zelllinie UW228 (IC<sub>50</sub>= 8,050 µg/ml) war am resistantesten gegen die CBD-Behandlung. Die humanen Fibroblasten wiesen einen IC<sub>50</sub> Wert von 7,90 µg/ml auf. Insgesamt waren jedoch die Mehrzahl der Medulloblastomzelllinien empfindlicher gegenüber einer Behandlung mit CBD als die Fibroblastenzelllinie. Es wurden im Schnitt 5,449 µg/ml CBD benötigt, um die Zellviabilität der Tumorzellen um 50 % zu reduzieren (Tab. 22).

**Tabelle 20** Die sechs verwendeten Medulloblastomzelllinien und ihre IC<sub>50</sub> Konzentrationen. Zusätzlich die IC<sub>50</sub> Konzentration von CBD für die humane Fibroblasten.

Zelllinien	IC <sub>50</sub> (µg/ml)
ONS-76	4,066
DAOY	4,939
D425	4,904
D458	4,094
D283	6,641
UW228	8,050
Fibroblasten	7,900

### 5.2.5 Korrelation der Rezeptorexpression und der IC<sub>50</sub> Werte

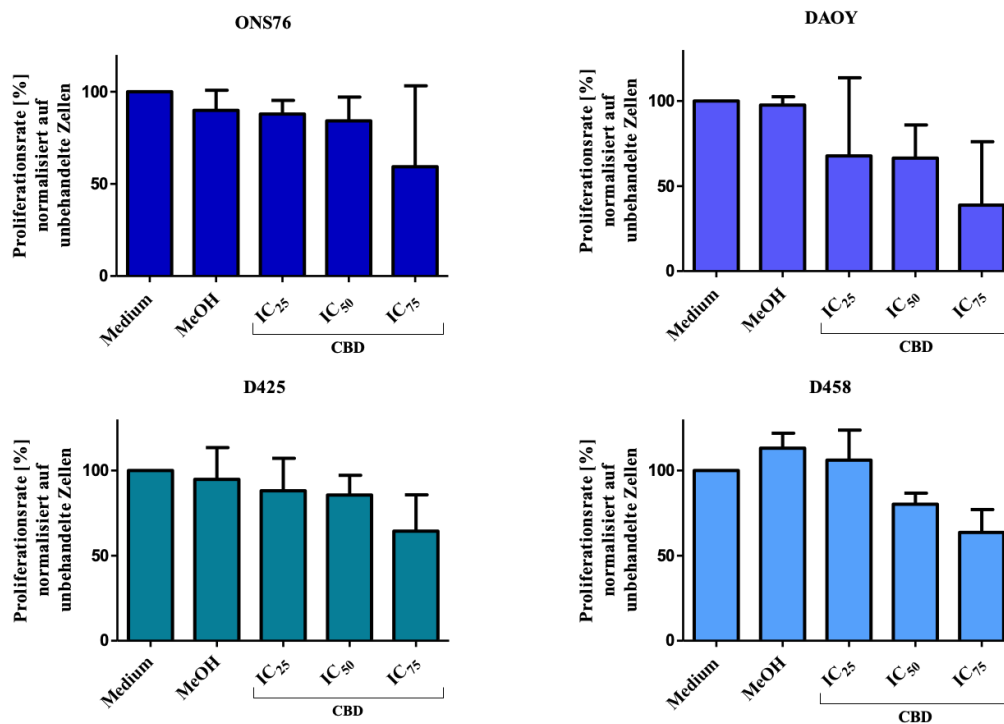
Die Korrelation der Expression der Rezeptoren CNR1, CNR2, TRPV1 und TRPV2 und von den IC<sub>50</sub>-Werte pro Zelllinie wurde getestet. Hierzu wurde die CBD IC<sub>50</sub> Werte und die mRNA Expressionsdaten gegeneinander aufgetragen und der entsprechende Korrelationsfaktor berechnet. Es konnte hierbei nicht nachgewiesen werden, dass diese Expression mit der zytotoxischen Wirkung des CBDs zusammenhängt (Abb. 8).



**Abbildung 8** Korrelationsanalyse der CNR (A, B), TRPV (C, D) Expression und den IC<sub>50</sub> Konzentration. ρ = Pearson Korrelationskoeffizient.

### 5.3 Auswirkungen von CBD auf die Proliferationsrate, (BrdU)

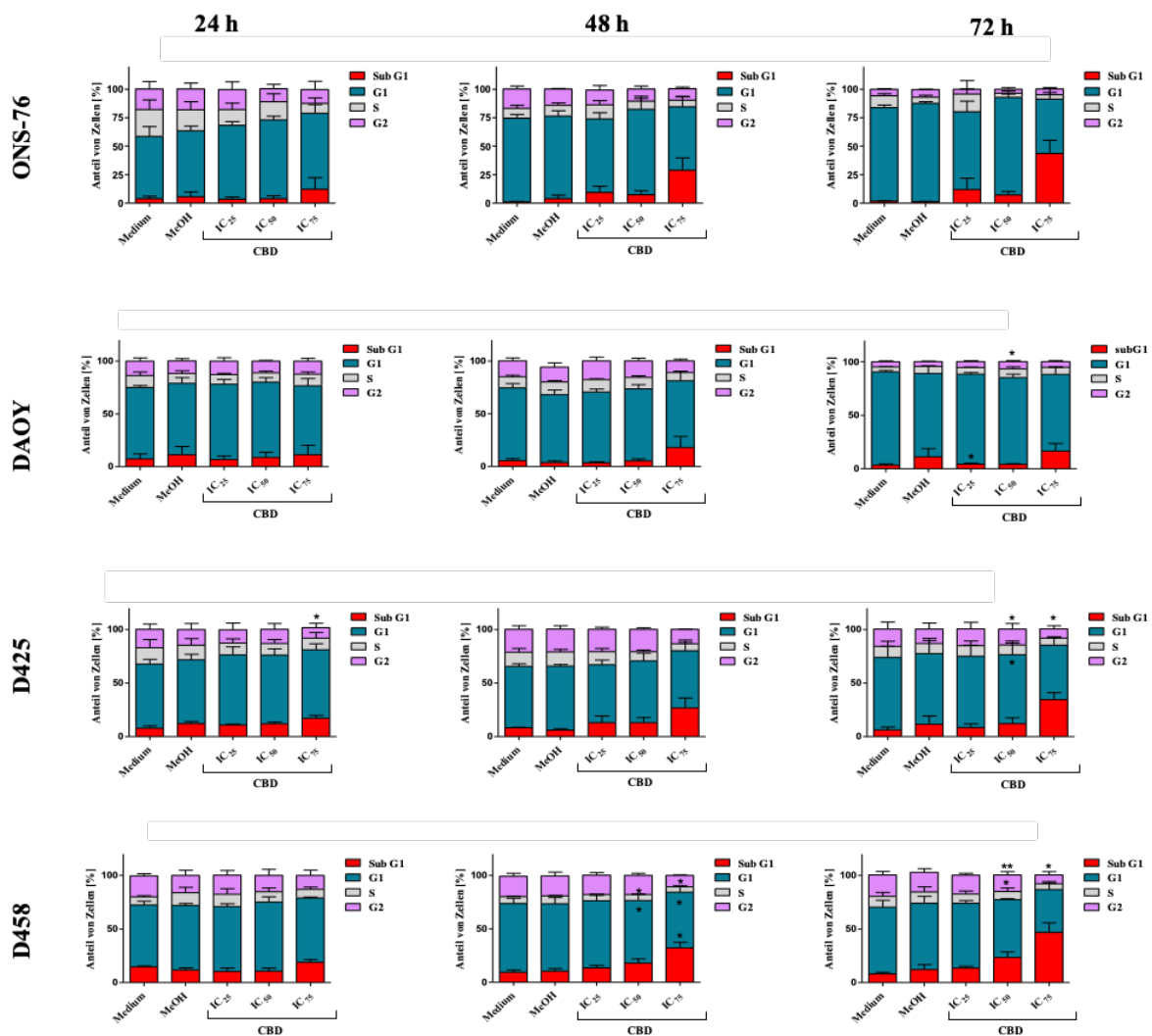
Um die Proliferationsrate zu analysieren, wurde das BrdU-Kit von Roche für die ONS-76, DAOY, D425 und D458 Zelllinien verwendet. Es konnte eine dosisabhängige Wirkung des CBDs festgestellt werden (Abb. 9). Die Proliferationshemmung betrug nach Behandlung mit den IC<sub>25</sub>, IC<sub>50</sub> und IC<sub>75</sub> Konzentrationen von CBD ungefähr 60 % bei den Zelllinien ONS-76 und DAOY im Vergleich zu 40 % bei der D425 und D458. Die Reduktion der Zellproliferation war jedoch nicht signifikant. Die Behandlung mit dem Lösungsmittel (MeOH) beeinflusste die Proliferationsrate der Zellen nicht.



**Abbildung 9** Proliferationsrate der ONS-76, DAOY, D425 und D458 Zelllinien unter CBD-Behandlung. Nachweis einer Dosis-abhängigen Wirkung.

## 5.4 Zellzyklus-Analyse nach Behandlung mit CBD

Die zytotoxischen Effekte von CBD wurden in der Zellzyklusanalyse bestätigt. Nach der Behandlung steigerte sich der prozentuale Anteil der subG1-Phase und somit der apoptotischen Zellen bei allen Zelllinien. Dafür nahm die Anzahl der in der G1 Phase befindlichen Zellen zu (Abb. 10). Die MeOH Kontrollen hatte keinen oder nur einen sehr geringen Einfluss auf die Apoptose. Einen Einfluss auf die weiteren Zellzyklusphasen konnte nicht festgestellt werden.

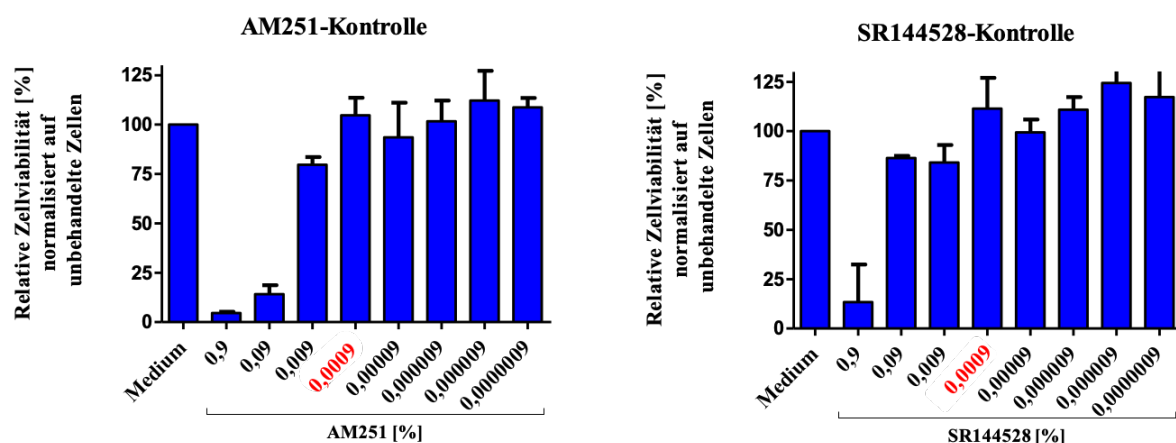


**Abbildung 10** Vorstellung der Gesamtdaten der Zellzyklusuntersuchung. Die Apoptoseinduktion nach Behandlung mit CBD konnte bei allen Zelllinien als anteiliger Anstieg der subG1-Phase nachgewiesen werden.

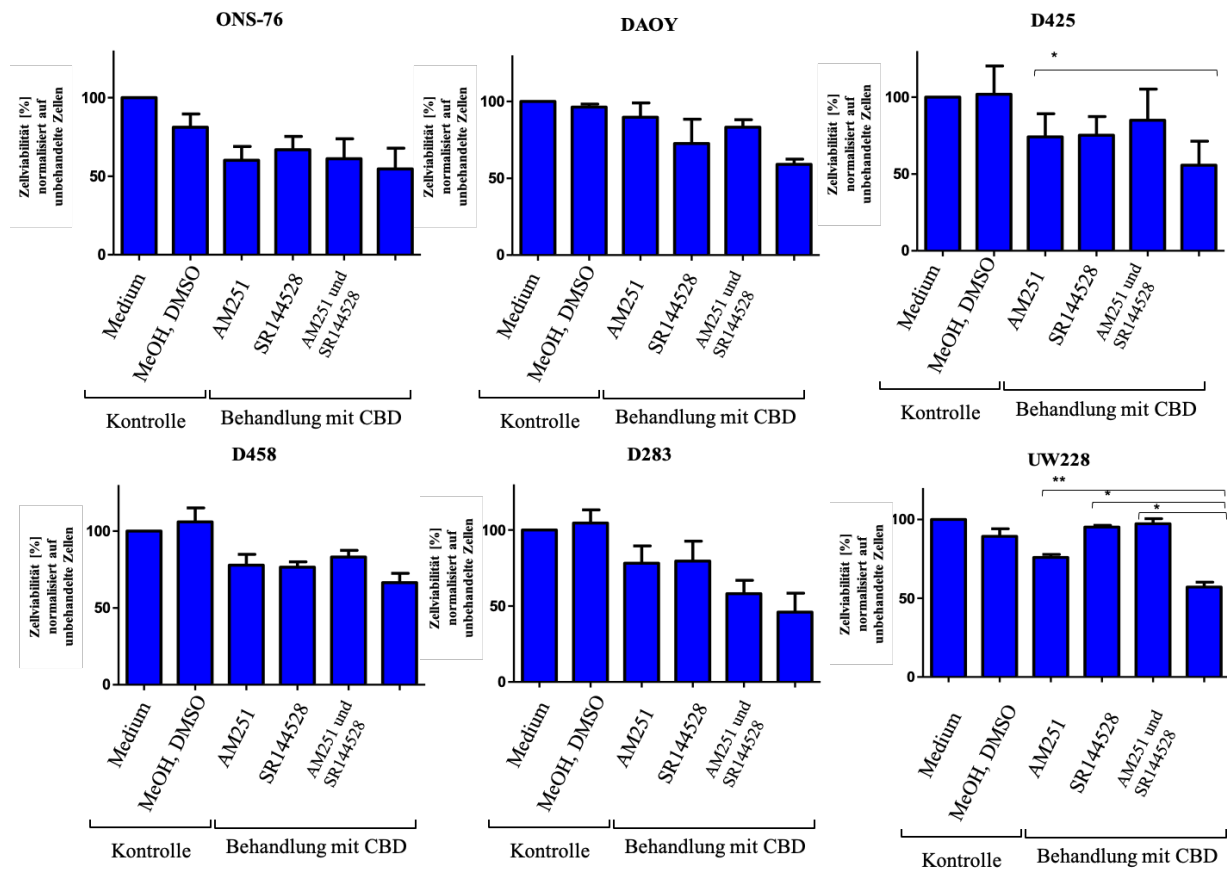
## 5.5 Effekt der Wirkung von CBD während der Inhibition der Rezeptoren

Die Hypothese, dass die CBD-Rezeptoren im Wirkmechanismus des zytotoxischen Effektes eine Rolle spielen, wurde mit der Verwendung eines CNR1 Inhibitors (AM251) und eines CNR2 Inhibitors (SR144528) untersucht. Zuerst wurde die maximale Konzentration der Inhibitoren bei der für die CBD-Behandlung empfindlichsten Zelllinie, ONS-76, überprüft, sodass die Zellviabilität nicht beeinflusst wurden (Abb. 11). Für weitere Versuche wurde eine Konzentration von 0.0009 % gewählt.

Bei allen getesteten Zelllinien erfolgte die Zugabe von MeOH und DMSO als Kontrolle und es wurde kein Unterschied in Wachstum nachgewiesen (Abb. 12). Bei der ONS-76 und D458 Zelllinien wurde die Zellviabilität nicht von der Inhibitoren-Gabe beeinflusst (Abb. 12). Bei der anderen verwendeten Zelllinien wurde nach Inhibition von den CNR1 und CNR2 ein reduzierter Effekt der Wirkung des CBDs nachgewiesen. Um ein Viertel konnte die Zellviabilität gesteigert werden, wenn die DAOY Zelllinien gleichzeitig mit CBD und Inhibitoren behandelt wurden. Nach Inhibition des CNR1s wurde ein minimaler Abfall von 10 % bei der Zellviabilität von DAOY festgestellt im Vergleich mit 30 % nach Inhibierung des CNR2s (Abb. 12). Insgesamt konnte ein signifikanter Einfluss nur bei den UW228 und D425 Zelllinien erkannt werden. Insbesondere wurde keine zytotoxische Wirkung nach Behandlung mit CBD auf die UW228 entweder nach Inhibition des CNR1s oder nach Inhibition des CNR2s nachgewiesen. Der Einfluss auf vier von der sechs getesteten Zelllinien konnte eine potentielle Korrelation der zytotoxischen Wirkung des CBDs mit der Aktivierung der CBD Rezeptoren ermöglichen.



**Abbildung 11** Toxizitätskontrolle auf die ONS-76, um die maximale verwendete Konzentration den AM251 und SR144528 zu überprüfen. Auf der x-Achse: unterschiedliche Konzentrationen der Inhibitoren und Medium Kontrolle. Y-Achse: Prozentuale Zellviabilität, relativiert auf die unbehandelten Zellen.



**Abbildung 12** Auf der y-Achse ist die relativierte Zellviabilität normalisiert auf unbehandelte Zellen aufgetragen. Auf der x-Achse ist die Behandlung der Zelllinien dargestellt. Die Zellen wurden zur Kontrolle nur in Medium und mit Zusatz der beiden Lösungsmittel (MeOH und DMSO) kultiviert. Die letzteren vier Balken zeigen die Zellviabilität nach Behandlung mit CBD ( $IC_{50}$ ) mit und ohne Zugabe der CBD Inhibitoren.

## 6 DISKUSSION

Die möglichen Anwendungen von CBD wurden in den letzten fünfzehn Jahren durch präklinische Studien untersucht (McAllister et al., 2015). Die CBD-Rezeptoren, die zum Endocannabinoid-System gehören, werden als potentielle Therapieziele beschrieben (Massi et al., 2013), dabei ist ihr exakter Wirkmechanismus bisher nicht nachgewiesen worden. Es liegen jedoch Daten zur Überexpression der Rezeptoren CNR1 und CNR2 bei Tumorzellen vor (Velasco et al., 2016). Obwohl die Verwendung von CBD in vielen präklinischen Studien berichtet wurde und CBD bei Palliativpatienten als experimentelle Behandlung verwendet wird (Good et al., 2019), liegen bisher keine Daten zu pädiatrischen Tumoren vor.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung dieser Substanz auf Medulloblastomzelllinien überprüft. Zusätzlich zu der zytotoxischen Wirkung auf die Zellviabilität wurden der Zellzyklus und die Apoptoseinduktion untersucht. Als Teil des Wirkungsmechanismus wurde die Expression von vier Rezeptoren (CNR1, CNR2, TRPV1, TRPV2) bestimmt. Eine Korrelation mit dem Effekt des CBDs konnte nicht bestätigt werden. Diese Studie unterstützt die bisherigen Daten zur Wirkung von CBD, lässt jedoch aufgrund des begrenzten Forschungsfeldes noch viele Fragen offen, die geprüft werden müssen.

### 6.1 Nachweis von CBD und Vanilloid Rezeptoren auf Tumorzelllinien

Die Beteiligung der CBD-Rezeptoren (*CNR1*, *CNR2*) und den Vanilloid Rezeptoren (*TRPV1*, *TRPV2*) wurde bei unterschiedlichen onkologischen Gruppen erwähnt (Massi et al., 2013). In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die CBD-Rezeptoren sowie die Rezeptoren der Vanilloid-Familie in allen sechs verwendeten Zelllinien auf mRNA Ebene exprimiert werden. *CNR1* und *CNR2* werden stärker als *TRPV1* und *TPV2* exprimiert. Der Proteinnachweis gelang aus methodischem Gründen nicht. Nur bei den Zelllinien D425 und D458 konnte die Expression von allen vier Rezeptoren auf Proteinebene bestätigt werden.

Bei den U87 und U373 Glioblastomzelllinien wurden sowohl CNR1 als CNR2 nachgewiesen (Massi et al., 2004). Bei Brusttumoren (MDA MDA-MB 231-, MDA-MB 231-luc-D3H2LN- und MDA-MB 468-Zelllinien) wurde die Expression den CNR1 und CNR2 bewiesen (Qamri et al., 2009). In Melanom-Zelllinien (B16-A und A375) wurde auch die Existenz von CNR1 und CNR2 dokumentiert. Als Positivkontrolle wurde die C6 Glioblastomzelllinie benutzt (Blazquez et al., 2006). Beim RT4 und RT112 Harnblasenkarzinom wurde die stärkere



Expression von CNR2 gegen CNR1 gezeigt, was im Gegensatz zu unseren Ergebnissen für eine Überexpression von CNR1 spricht (Bettiga et al., 2017). Die Expression von den TRPV1 wurde bei den U373, U87, FC1 und FLS GL261 Glioblastomzelllinien nachgewiesen (Amantini et al., 2007) (Stock et al., 2012). Der TRPV2 wird bei den Harnblasentumorzelllinien RT4 und T24 exprimiert (Yamada et al., 2010).

Zusammenfassend stimmen die Ergebnisse dieser Arbeit mit den Literaturdaten auf mRNA-Ebene überein.

## 6.2 Effekt von CBD als anti-tumorales Arzneimittel und Induktion von Apoptose

Die untersuchten Medulloblastomzelllinien werden in drei der vier molekularen MB Gruppen (SHH-aktivierte Gruppe, WNT-aktivierte Gruppe, Gruppe 3 und 4) eingeteilt (Kapitel 1.1.2). (Taylor et al., 2012). ONS-76, DAOY und D283 gehören zur SHH-aktivierten Gruppe, D425 und D458 zur MB Gruppe 3. Die letzte verwendete Zelllinie, UW228, die resistenter als die humanen Fibroblasten war, wurde nicht nur als MB der Gruppe 3, sondern auch Gruppe 4 MB zugeordnet (Künkele et al. 2012). Die D425 und D458 Zelllinien repräsentieren MB mit der schlechtesten Prognose. Diese Zelllinien scheinen im Vergleich zu menschlichen Fibroblasten deutlich empfindlicher gegen die CBD-Behandlung zu sein. Deshalb wurde die Mitbehandlung mit CBD bei dieser Tumorgruppe diskutiert.

Der erste Bericht über CBD und anderen Cannabinoide wurde im 1976 von Carchman dokumentiert. Es ist die erste Aufzeichnung der zytotoxischen Aktivität der Substanz in Lewis-Lungenzelllinien, L1210 Leukämiezelllinien und undefinierten Knochenmarkzelllinien (Carchman et al., 1976). Die darüber hinaus bisher untersuchten Zellen weisen ein breites Spektrum onkologischer Erkrankungen auf, einschließlich Lungen-, Brust- und Blasen-Karzinome (Velasco et al., 2016). Unsere Studie ergänzt die bisherigen Ergebnisse der Literatur zur zytotoxischen Wirkung des CBDs auf Medulloblastomzelllinien.

In den letzten Jahren wurde aufgrund der niedrigen Überlebenschancen besonderes Interesse auf die Wirkung bei Glioblastomen gelegt. Massi *et al.* zeigten die zytotoxische Wirkung der Substanz auf U87 und U373 Glioblastomzelllinien (Massi et al., 2004). Eine 50%-ige Reduktion des Zellwachstums in den SF126, U251 und U87 Glioblastomzelllinien wurde von Marcu *et al.* nach Behandlung mit deutlich weniger CBD (fast 1/10 der in dieser Arbeit verwendeten Konzentrationen) erreicht (Marcu et al., 2010). Von Nabissi *et al.* wurde ein IC<sub>50</sub> Wert von 30,2 µM und 33,2µM für die Zelllinien U87MG und MZC nachgewiesen (Nabissiet al., 2013). Eine weitere präklinische Studie unterstützt die zytotoxische Wirkung von CBD auf

Glioblastomzelllinien (U87-MG und T98G) mit einer 50%-igen Reduktion der Zellviabilität nach einer Anwendung durchschnittlich von 12,2  $\mu\text{M}$  (Solinas et al., 2013). Für die T98G, U251, und U87MG Zelllinien waren von Deng *et al.* signifikant niedrigere Wirkstoffkonzentrationen (3,2–9,2  $\mu\text{M}$ ) erforderlich, um die Zellviabilität auf 50% zu reduzieren (Deng et al., 2017).

MacAllister *et al.* beobachteten nach Behandlung mit 1,5  $\mu\text{l}$  CBD eine statistisch signifikante Reduktion bei den MDA-MB231 Brustkrebszelllinien (McAllister et al., 2011). Die Wirkung der Substanz auf vier Zelllinien der gleichen Tumorentität (MCF-7, ZR-75-1, MDA-MB-231 und SK-BR-3) wurde von Shrivastava *et al.* beschrieben (Shrivastava et al., 2011). Trotz der Behandlung mit niedrigeren Konzentrationen erfolgte eine signifikante Reduktion der Zellviabilität. Eine zusätzliche Studie, die im Jahr 2020 veröffentlicht wurde, zeigt eine signifikante Reduktion der Zellviabilität von MCF-7- und 6D-Zellen nach Anwendung von 10  $\mu\text{l}$  CBD und unterstützt die Ergebnisse dieser Arbeit (Garcia-Morales et al., 2020).

Ligresti *et al.* hat verschiedene Arten von Krebszellen (MCF-7- und MDA-MB-231-humane Brustkarzinomzellen, DU-145-humane Prostatakarzinomzellen, CaCo-2-humane kolorektale Karzinomzellen, AGS-humane Magenadenokarzinomzellen, C6-Gliomzellen, KiMol mit dem vK-ras-Onkogen transformierte Ratten-Schilddrüsenzellen und basophile Leukämiezellen) untersucht. Die  $\text{IC}_{50}$ -Werte des CBDs variieren von 6 bis 10,6  $\mu\text{M}$ , deutlich niedriger als die verwendeten Konzentrationen in dieser Arbeit (Ligresti et al., 2006).

Bezüglich der Kontrollgruppe wurde kein besonderer Effekt auf humane Astrozyten durch CBD festgestellt, ähnlich wie bei humanen Fibroblasten (Nabissi et al., 2013). Die Brustepithelzelllinie MCF-10A wurde auch als Kontrollgruppe verwendet (Shrivastava et al., 2011). Insgesamt stimmen die angewandten CBD-Konzentrationen mit den in dieser Arbeit gewonnenen Daten überein (Marcu et al., 2010, Massi et al., 2004). Aufgrund der Heterogenität der Zelllinien ist ein exakter Vergleich der Ergebnisse nicht möglich. Insgesamt scheinen Brustkrebszelllinien auf die Behandlung sensibler als Medulloblastomzelllinien zu reagieren während Glioblastomzelllinien ähnlich resistent sind.

Außer der zytotoxischen Wirkungen des CBDs wurden Zellzyklusanalysen für den Nachweis der Apoptoseinduktion durchgeführt. Bei allen getesteten Zelllinien konnte ein Anstieg des Anteils der sich subG1 Phase befindenden Zellen nachgewiesen werden. Ein signifikanter Effekt wurde nur bei D458 festgestellt. Massi *et al.* untersuchte die Zellapoptose in den Glioblastomzelllinien U87 und U373 und konnte bei höheren Dosierungen Apoptoseraten von bis zu 41 % feststellen (Massi et al., 2004). Marcu *et al.* zeigen auch einen Anstieg der G0/G1

Phase (Marcu et al., 2010), während Yamada *et al.* ebenfalls eine höhere Apoptose bei T4 Harnblasentumorzellen zeigen konnten (Yamada et al., 2010).

### 6.3 Verwendung von Inhibitoren gegen CBD-Rezeptoren

Um den spezifischen Wirkmechanismus von CBD durch die CNR1 und CNR2-Rezeptoren zu belegen, wurden Rezeptorinhibitoren (AM251, SR144528) eingesetzt. Nur bei zwei der sechs untersuchten Medulloblastomzelllinien zeigte sich ein statistisch signifikanter Effekt. Bei D425 tritt eine Inhibition der Wirkung des CBDs nach Anwendung von AM251 (CNR1 Inhibitor) auf. Bei UW228-Zellen wurde ein signifikanter Effekt der Zellviabilität bei beiden Inhibitoren gezeigt. Massi *et al.* zeigten, dass die CNR1 Inhibition bei U87-Zellen keinen Effekt hatte. Für den CNR2 wurde nur eine partielle Wirkung bewiesen (Massi et al., 2004). Eine Korrelation der CBD-Wirkung mit der Rezeptorexpression konnte, wie bei den in dieser Arbeit gewonnenen Daten, nicht bestätigt werden.

Nach der Anwendung des CNR2 Inhibitors SR144528 zeigte sich kein zytotoxischer Effekt auf die LNCaP Prostatakarzinomzelllinien durch den CBD-Agonisten WIN-55,212-2 (Sarfaraz et al., 2005). Es ist anzumerken, dass die Verwendung dieser Inhibitoren nicht auf der vollständigen Abdeckung der Rezeptoren beruht, sondern mit Konzentrationen ohne zusätzliche zytotoxische Aktivität auf die untersuchten Zelllinien (Abb. 11). Daher kann eine partielle Beteiligung der Rezeptoren am Wirkmechanismus nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden, da nur niedrige Inhibitorkonzentrationen angewendet wurde, die unterhalb der zytotoxischen Aktivität liegen. Zusammengefasst konnte nur eine geringe Evidenz für die Relevanz der rezeptorvermittelten Wirkung von CBD auf Medulloblastomzelllinien generiert werden.

### 6.4 Potentieller Wirkmechanismus durch CBD

In diesem Kapitel werden die möglichen Mechanismen für die induzierte Apoptose erörtert. Zuerst wird der mögliche Effekt der vier untersuchten Rezeptoren beschrieben. Laut der gewonnenen Daten konnte keine Korrelation festgestellt werden, aber ihre Wirkung wurde von anderen Studien bewiesen (McAllister et al., 2015). Darüber hinaus werden andere Mechanismen beschrieben, die während der Behandlung mit CBD zum Zelltod führen können. Die CBD-Rezeptoren (CNR1, CNR2) können auf viele Arten an der Signalübertragung beteiligt sein, wie zum Beispiel durch die Reaktion mit den G-Proteinen G1 und Gi, sowie durch Ionenkanäle (Glass and Northup, 1999). Für CNR1 konnte bewiesen werden, dass dieser Rezeptor durch die präsynaptische Aktivierung der Kalziumkanäle zur Regulation der

GABAergen Übertragung führt (Wilson et al., 2001, Huang et al., 2001). Dieser Signalweg wurde bei MB der Gruppe 3 beschrieben (Taylor et al., 2012). Die D425 und D458 Zelllinien gehören in diese molekulare MB Gruppe und exprimieren CNR1. Dieser Wirkmechanismus könnte eine Erklärung für die Wirkung des CBDs sein. Leider wurde diese Korrelation nicht durch die in dieser Arbeit erzeugten Ergebnisse bestätigt. Eine partielle agonistische Wirkung auf CNR2 wurde auch von Massi *et al.* auf Glioblastomzelllinien vorgeschlagen (Massi et al., 2004). Die CNR1 und CNR2 zeigen eine Affinität für die Aktivierung der Proteine Go und Gi. Zusätzlich haben diese beiden Rezeptoren unterschiedliche Fähigkeiten, Ionenkanäle insbesondere für Kalium, zu aktivieren (Glass and Northup, 1999). Es wurde gezeigt, dass der gesteigerte Zufluss von Kalzium zum Zelltod führt, wodurch die zytotoxische Wirkung des CBDs erklärt werden konnte (Yamada et al., 2010).

Bei Glioblastomzelllinien wurde gezeigt, dass TRPV1 eine funktionelle Bedeutung für die induzierte Apoptose durch Aktivierung von p38 hat (Amantini et al., 2007). Es gab auch Hinweise für die agonistische Wirkung des CBDs durch TRPV1, die mit einem Anstieg der zytoplasmatischen Kalzium-Konzentrationen korreliert (Bisogno et al., 2001). Stock *et al.* zeigten die starke Expression des TRPV1 in hochgradigen Astrozytom und bewiesen die Stimulation der Apoptose durch den Signalweg des endoplasmatischen Retikulums. Sowie die Aktivierung des Transkriptionsfaktors 3 (Stock et al., 2012). Das konnte in dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden, aber dieser Signalweg könnte für die induzierte Apoptose eine Rolle spielen. Beim Glioblastom aktiviert TRPV2 die Kalziumkanäle und induziert über Fas / CD95 die Apoptose (Santoni and Amantini, 2019).

Hierbei spielt die Caspase-Aktivierung und reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) eine Rolle (Massi et al., 2006). Neben den ROS wird die Beteiligung der extrazellulären Rezeptor Kinase (ER) vorgeschlagen (Marcu et al., 2010).

## 6.5 Ausblick

Die Existenz oder Überexpression von den CBD-Rezeptoren scheint nicht der alleinige Wirkmechanismus zu sein. Um die Beteiligung der Rezeptoren konkret auszuschließen, sollte ihre Aktivierung genauer untersucht werden. Auf die andere Seite wurden andere Signalwege in der Wirkung des CBDs beschrieben. Die Arbeit von Mac Allister *et al.* stellte dar, dass das CBD auch eine Auswirkung auf Signalwege wie der ERK-Weg und ROS aufweisen kann (McAllister et al., 2011). Daher sollten durch Anwendung von weiteren Screening Methoden, wie zum Beispiel Genexpressionanalysen mittels RNA-Sequenzierung und Proteomics, ein Effekt des CBDs auf diese weitere Signalwegen in den verwendeten Medulloblastomzelllinien analysiert werden. Desweiteren konnte die Wirkung des CBDs in Kombination mit anderen verwendeten Chemotherapeutika überprüft werden. Wie Jacobson *et al.* beschrieben hat, zeigte der Substanz auf zellulärer Ebene eine synergistische Wirkung mit Chemotherapeutika (Jacobsson et al., 2000). Speziell für die MB Gruppen mit schlechter Prognose könnte eine Mitbehandlung mit CBD vorgeschlagen werden.

## 7 ZUSAMMENFASSUNG

Das Medulloblastom macht 20-25% der Hirntumoren im Kindesalter aus. Trotz einer signifikanten Verbesserung wird aktuell nur eine 5-Jahres-Überlebensrate von 60% erreicht. Die Prognose von Medulloblastomen (MB) der vier molekulargenetisch definierten Gruppen ist sehr heterogen. Für Patienten der Gruppe 3, die mit der schlechtesten Prognose verbunden ist, erfolgt eine intensiviert zytostatische Therapie. Diese präklinische Studie soll zusätzlich möglichen Behandlungsansatz die zytotoxische Wirkung von Cannabis bzw. Cannadidiol (CBD) auf Medulloblastomzelllinien untersuchen.

Unter Berücksichtigung der Heterogenität der MB-Kategorien wurden sechs verschiedene Zelllinien, die zu den Subgruppen SHH-aktiviert, Gruppe 3 und Gruppe 4 gehören, eingeschlossen. Initial wurde die dosisabhängige Wirkung des CBDs untersucht und eine höhere Empfindlichkeit der meisten Zelllinien im Vergleich zu menschlichen Fibroblasten gezeigt. Zusätzlich konnte eine Reduktion der Proliferationsrate bei allen getesteten Zelllinien nachgewiesen werden. Als nächster Schritt wurde eine Zellzyklusanalyse durchgeführt. Außerdem konnte ein Anstieg der Apoptose bei allen Zelllinien gezeigt werden.

Die potentiellen Wirkmechanismen, die in der Literatur beschrieben sind, beziehen sich auf die CBD-Rezeptoren als therapeutische Targets. Folglich wurde die Expression der CBD Rezeptoren Cannadidiol Rezeptor 1 (CNR1), Cannadidiol Rezeptor 2 (CNR2), Vaniloid Rezeptor 1 (TRPV1) und Vaniloid Rezeptor 2 (TRPV2) untersucht. Diese Rezeptoren sind in allen Zelllinien auf mRNA-Ebene exprimiert. Die Expression der Rezeptoren auf Proteinebene konnte nur bei den Zelllinien D425 und D458 bestätigt werden. Eine Korrelation der Rezeptorexpression mit den  $IC_{50}$ -Werten konnte nicht festgestellt werden.

Nach dem Nachweis der Rezeptoren wurden die Rezeptor-Inhibitoren AM251 und SR144528 angewendet. AM251 ist ein selektiver Inhibitor des CNR1 und SR144528 ist ein Inhibitor des CNR2. Bei der D425 Zelllinie konnte ein signifikanter Effekt nach Inhibition von CNR1 nachgewiesen werden. Von besonderem Interesse ist, dass UW228, obwohl es die einzige Zelllinie war, die im Vergleich zu humanen Fibroblasten eine geringe Empfindlichkeit gegenüber der CBD-Behandlung zeigte, nach der Rezeptorhemmung einen statistisch signifikanten Unterschied in der Zellviabilität aufwies.

Zusammenfassend wurde gezeigt, dass CBD dosisabhängige, apoptoseinduzierende Effekte in fast allen MB-Zelllinien hat und als potentieller Therapieansatz weiter untersucht werden sollte. Allerdings konnte der genaue Wirkmechanismus nicht belegt werden, so dass sich hier weiterführende Fragestellungen ergeben.

## Abstract

Medulloblastoma accounts for 20-25% of childhood brain tumors. Despite a significant improvement, only a 5-year survival rate of 60% is currently achieved. The prognosis of medulloblastomas (MB) of the four molecular-genetic groups is very heterogeneous. For patients in group 3, which is associated with the worst prognosis, intensified chemotherapy is carried out. This preclinical study is also intended to investigate the cytotoxic effects of cannabidiol (CBD) on medulloblastoma cell lines.

Taking into account the heterogeneity of the MB categories, six different cell lines were included belonging to the subgroups SHH-activated, group 3 and group 4. Initially, the dose-dependent effect of the CBD was tested, and a higher sensitivity of most cell lines compared to human fibroblasts was shown. In addition, a reduction in the proliferation rate could be demonstrated in all cell lines tested. The next step was a cell cycle analysis and an increase in apoptosis could be shown in all cell lines.

The potential mechanisms of action described in the literature relate to the CBD receptors as therapeutic targets. Consequently, the expression of the CBD receptors cannabidiol receptor 1 (CNR1), cannabidiol receptor 2 (CNR2), vanilloid receptor 1 (TRPV1) and vanilloid receptor 2 (TRPV2) was examined. These receptors are expressed at the mRNA level in all cell lines. The expression of the receptors at the protein level could only be confirmed in the cell lines D425 and D458. A correlation of the receptor expression with the IC<sub>50</sub> values could not be established.

After detecting the receptors, the receptor inhibitors AM251 and SR144528 applied. AM251 is a selective inhibitor of CNR1 and SR144528 is an inhibitor of CNR2. A significant effect after inhibition of CNR1 could be demonstrated in the D425 cell line. Of particular interest is that while UW228 was the only cell line with low sensitivity to CBD treatment compared to human fibroblasts, it showed a statistically significant difference in cell viability after receptor inhibition.

In summary, it was shown that CBD has dose-dependent, apoptosis-inducing effects in almost all MB cell lines and should be further investigated as a potential therapeutic approach. However, the exact mechanism of action could not be proven, so that further investigation is needed.

## 8 LITERATURVERZEICHNIS

1. AGURELL, S., CARLSSON, S., LINDGREN, J. E., OHLSSON, A., GILLESPIE, H. & HOLLISTER, L. 1981. Interactions of delta 1-tetrahydrocannabinol with cannabiniol and cannabidiol following oral administration in man. Assay of cannabiniol and cannabidiol by mass fragmentography. *Experientia*, 37, 1090-2.
2. AIZPURUA-OLAIZOLA, O., SOYDANER, U., OZTURK, E., SCHIBANO, D., SIMSIR, Y., NAVARRO, P., ETXEBARRIA, N. & USOBIAGA, A. 2016. Evolution of the Cannabinoid and Terpene Content during the Growth of Cannabis sativa Plants from Different Chemotypes. *J Nat Prod*, 79, 324-31.
3. AMANTINI, C., MOSCA, M., NABISSI, M., LUCCIARINI, R., CAPRODOSSI, S., ARCELLA, A., GIANGASPERO, F. & SANTONI, G. 2007. Capsaicin-induced apoptosis of glioma cells is mediated by TRPV1 vanilloid receptor and requires p38 MAPK activation. *J Neurochem*, 102, 977-90.
4. APPENDINO, G., CHIANESE, G. & TAGLIALATELA-SCAFATI, O. 2011. Cannabinoids: occurrence and medicinal chemistry. *Curr Med Chem*, 18, 1085-99.
5. BAKAS, T., VAN NIEUWENHUIJZEN, P. S., DEVENISH, S. O., MCGREGOR, I. S., ARNOLD, J. C. & CHEBIB, M. 2017. The direct actions of cannabidiol and 2-arachidonoyl glycerol at GABAA receptors. *Pharmacol Res*, 119, 358-370.
6. BETTIGA, A., AURELI, M., COLCIAGO, G., MURDICA, V., MOSCHINI, M., LUCIANO, R., CANALS, D., HANNUN, Y., HEDLUND, P., LAVORGNA, G., COLOMBO, R., BASSI, R., SAMARANI, M., MONTORSI, F., SALONIA, A. & BENIGNI, F. 2017. Bladder cancer cell growth and motility implicate cannabinoid 2 receptor-mediated modifications of sphingolipids metabolism. *Sci Rep*, 7, 42157.
7. BISOGNO, T., HANUS, L., DE PETROCELLIS, L., TCHILIBON, S., PONDE, D. E., BRANDI, I., MORIELLO, A. S., DAVIS, J. B., MECHOULAM, R. & DI MARZO, V. 2001. Molecular targets for cannabidiol and its synthetic analogues: effect on vanilloid VR1 receptors and on the cellular uptake and enzymatic hydrolysis of anandamide. *Br J Pharmacol*, 134, 845-52.
8. BLAZQUEZ, C., CARRACEDO, A., BARRADO, L., REAL, P. J., FERNANDEZ-LUNA, J. L., VELASCO, G., MALUMBRES, M. & GUZMAN, M. 2006. Cannabinoid receptors as novel targets for the treatment of melanoma. *FASEB J*, 20, 2633-5.
9. BROWN, H. G., KEPNER, J. L., PERLMAN, E. J., FRIEDMAN, H. S., STROTHER, D. R., DUFFNER, P. K., KUN, L. E., GOLDTHWAITE, P. T. & BURGER, P. C. 2000. "Large cell/anaplastic" medulloblastomas: a Pediatric Oncology Group Study. *J Neuropathol Exp Neurol*, 59, 857-65.
10. CARCHMAN, R. A., HARRIS, L. S. & MUNSON, A. E. 1976. The inhibition of DNA synthesis by cannabinoids. *Cancer Res*, 36, 95-100.
11. CARLSBAD, C. G. B., INC. 2018. Epidiolex (Cannabidiol) prescribing information.
12. CHAGAS, M. H., ZUARDI, A. W., TUMAS, V., PENA-PEREIRA, M. A., SOBREIRA, E. T., BERGAMASCHI, M. M., DOS SANTOS, A. C., TEIXEIRA, A. L., HALLAK, J. E. & CRIPPA, J. A. 2014. Effects of cannabidiol in the treatment of patients with Parkinson's disease: an exploratory double-blind trial. *J Psychopharmacol*, 28, 1088- 98.
13. CHANG, C. H., HOUSEPIAN, E. M. & HERBERT, C., JR. 1969. An operative staging system and a megavoltage radiotherapeutic technic for cerebellar medulloblastomas. *Radiology*, 93, 1351-9.
14. CHO, Y. J., TSHERNIAK, A., TAMAYO, P., SANTAGATA, S., LIGON, A., GREULICH, H., BERHOUKIM, R., AMANI, V., GOUMNEROVA, L., EBERHART, C. G., LAU, C. C., OLSON, J. M., GILBERTSON, R. J., GAJJAR, A., DELATTRE, O., KOOL, M., LIGON, K., MEYERSON, M., MESIROV, J. P. & POMEROY, S. L. 2011. Integrative genomic analysis of medulloblastoma identifies a molecular subgroup that



- drives poor clinical outcome. *J Clin Oncol*, 29, 1424-30.
15. CHRIS TWELVES, S. S., STEPHEN WRIGHT 2017. A two-part safety and exploratory efficacy randomized double-blind, placebo-controlled study of a 1:1 ratio of the cannabinoids cannabidiol and delta-9-tetrahydrocannabinol (CBD:THC) plus dose- intense temozolomide in patients with recurrent glioblastoma multiforme (GBM). *Journal of Clinical Oncology* 35.
  16. CLIFFORD, S. C., LUSHER, M. E., LINDSEY, J. C., LANGDON, J. A., GILBERTSON, R. J., STRAUGHTON, D. & ELLISON, D. W. 2006. Wnt/Wingless pathway activation and chromosome 6 loss characterize a distinct molecular sub-group of medulloblastomas associated with a favorable prognosis. *Cell Cycle*, 5, 2666-70.
  17. CONSROE, P., LAGUNA, J., ALLENDER, J., SNIDER, S., STERN, L., SANDYK, R., KENNEDY, K. & SCHRAM, K. 1991. Controlled clinical trial of cannabidiol in Huntington's disease. *Pharmacol Biochem Behav*, 40, 701-8.
  18. CUNETTI, L., MANZO, L., PEYRAUBE, R., ARNAIZ, J., CURI, L. & ORIHUELA, S. 2018. Chronic Pain Treatment With Cannabidiol in Kidney Transplant Patients in Uruguay. *Transplant Proc*, 50, 461-464.
  19. DAVID N. LOUIS, A. P., GUIDO REIFENBERGER, ANDREAS VON DEIMLING, DOMINIQUE FIGARELLA-BRANGER, WEBSTER K. CAVENEE, HIROKO OHGAKI, OTMAR D. WIESTLER, PAUL KLEIHUES, DAVID W. ELLISON 2016. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol*.
  20. DENG, L., NG, L., OZAWA, T. & STELLA, N. 2017. Quantitative Analyses of Synergistic Responses between Cannabidiol and DNA-Damaging Agents on the Proliferation and Viability of Glioblastoma and Neural Progenitor Cells in Culture. *J Pharmacol Exp Ther*, 360, 215-224.
  21. DEVANE, W. A., DYSARZ, F. A., 3RD, JOHNSON, M. R., MELVIN, L. S. & HOWLETT, A. C. 1988. Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Mol Pharmacol*, 34, 605-13.
  22. DRUG ENFORCEMENT ADMINISTRATION, D. O. J. 2018. Schedules of Controlled Substances: Placement in Schedule V of Certain FDA-Approved Drugs Containing Cannabidiol; Corresponding Change to Permit Requirements. Final order. *Fed Regist*, 83, 48950-3.
  23. EBERHART, C. G., KEPNER, J. L., GOLDTHWAITE, P. T., KUN, L. E., DUFFNER, P. K., FRIEDMAN, H. S., STROTHER, D. R. & BURGER, P. C. 2002. Histopathologic grading of medulloblastomas: a Pediatric Oncology Group study. *Cancer*, 94, 552-60.
  24. ELLISON, D. W. 2010. Childhood medulloblastoma: novel approaches to the classification of a heterogeneous disease. *Acta Neuropathol*, 120, 305-16.
  25. FRIEDMAN, H. S., BURGER, P. C., BIGNER, S. H., TROJANOWSKI, J. Q., WIKSTRAND, C. J., HALPERIN, E. C. & BIGNER, D. D. 1985. Establishment and characterization of the human medulloblastoma cell line and transplantable xenograft D283 Med. *J Neuropathol Exp Neurol*, 44, 592-605.
  26. GARCIA-MORALES, L., CASTILLO, A. M., TAPIA RAMIREZ, J., ZAMUDIO-MEZA, H., DOMINGUEZ-ROBLES, M. D. C. & MEZA, I. 2020. CBD Reverts the Mesenchymal Invasive Phenotype of Breast Cancer Cells Induced by the Inflammatory Cytokine IL- 1beta. *Int J Mol Sci*, 21.
  27. GASTON, T. E. & FRIEDMAN, D. 2017. Pharmacology of cannabinoids in the treatment of epilepsy. *Epilepsy Behav*, 70, 313-318.
  28. GIANGASPERO, F., PERILONGO, G., FONDELLI, M. P., BRISIGOTTI, M., CAROLLO, C., BURNELLI, R., BURGER, P. C. & GARRE, M. L. 1999. Medulloblastoma with extensive nodularity: a variant with favorable prognosis. *J Neurosurg*, 91, 971-7.

29. GIANGASPERO, F., RIGOBELLO, L., BADIALI, M., LODA, M., ANDREINI, L., BASSO, G., ZORZI, F. & MONTALDI, A. 1992. Large-cell medulloblastomas. A distinct variant with highly aggressive behavior. *Am J Surg Pathol*, 16, 687-93.
30. GLASS, M. & NORTHUP, J. K. 1999. Agonist selective regulation of G proteins by cannabinoid CB(1) and CB(2) receptors. *Mol Pharmacol*, 56, 1362-9.
31. GOOD, P., HAYWOOD, A., GOGNA, G., MARTIN, J., YATES, P., GREER, R. & HARDY, J. 2019. Oral medicinal cannabinoids to relieve symptom burden in the palliative care of patients with advanced cancer: a double-blind, placebo controlled, randomised clinical trial of efficacy and safety of cannabidiol (CBD). *BMC Palliat Care*, 18, 110. GRATZNER, H. G., LEIF, R. C., INGRAM, D. J. & CASTRO, A. 1975. The use of antibody specific for bromodeoxyuridine for the immunofluorescent determination of DNA replication in single cells and chromosomes. *Exp Cell Res*, 95, 88-94.
32. HARVEY, A. L. 2008. Natural products in drug discovery. *Drug Discov Today*, 13, 894-901.
33. HERKENHAM, M., LYNN, A. B., LITTLE, M. D., JOHNSON, M. R., MELVIN, L. S., DE COSTA, B. R. & RICE, K. C. 1990. Cannabinoid receptor localization in brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87, 1932-6.
34. HUANG, C. C., LO, S. W. & HSU, K. S. 2001. Presynaptic mechanisms underlying cannabinoid inhibition of excitatory synaptic transmission in rat striatal neurons. *J Physiol*, 532, 731-48.
35. HUANG, P. I., LIN, S. C., LEE, Y. Y., HO, D. M., GUO, W. Y., CHANG, K. P., CHANG, F. C., LIANG, M. L., CHEN, H. H., LIU, Y. M., YEN, S. H., WONG, T. T. & CHEN, Y. W. 2017. Large cell/anaplastic medulloblastoma is associated with poor prognosis-a retrospective analysis at a single institute. *Childs Nerv Syst*, 33, 1285-1294.
36. ILAN, A. B., GEVINS, A., COLEMAN, M., ELSOHLY, M. A. & DE WIT, H. 2005. Neurophysiological and subjective profile of marijuana with varying concentrations of cannabinoids. *Behav Pharmacol*, 16, 487-96.
37. JACOBSEN, P. F., JENKYN, D. J. & PAPADIMITRIOU, J. M. 1985. Establishment of a human medulloblastoma cell line and its heterotransplantation into nude mice. *J Neuropathol Exp Neurol*, 44, 472-85.
38. JACOBSSON, S. O., RONGARD, E., STRIDH, M., TIGER, G. & FOWLER, C. J. 2000. Serum-dependent effects of tamoxifen and cannabinoids upon C6 glioma cell viability. *Biochem Pharmacol*, 60, 1807-13.
39. JAMJOOM, Z. A., JAMJOOM, A. B., SULAIMAN, A. H., NAIM UR, R. & AL RABIAA, A. 1993. Systemic metastasis of medulloblastoma through ventriculoperitoneal shunt: report of a case and critical analysis of the literature. *Surg Neurol*, 40, 403-10.
40. JARAI, Z., WAGNER, J. A., VARGA, K., LAKE, K. D., COMPTON, D. R., MARTIN, B. R., ZIMMER, A. M., BONNER, T. I., BUCKLEY, N. E., MEZEY, E., RAZDAN, R. K., ZIMMER, A. & KUNOS, G. 1999. Cannabinoid-induced mesenteric vasodilation through an endothelial site distinct from CB1 or CB2 receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 14136-41.
41. KAATSCH P, G. D., SPIX C 2018. German Childhood Cancer Registry - Annual Report 2018 (1980-2017). *Institute of Medical Biostatistics, Epidemiology and Informatics (IMBEI) at the University Medical Center of the Johannes Gutenberg University Mainz 2019*.
42. KENYON, J., LIU, W. & DALGLEISH, A. 2018. Report of Objective Clinical Responses of Cancer Patients to Pharmaceutical-grade Synthetic Cannabidiol. *Anticancer Res*, 38, 5831-5835.

43. KHATUA, S., SONG, A., CITLA SRIDHAR, D. & MACK, S. C. 2018. Childhood Medulloblastoma: Current Therapies, Emerging Molecular Landscape and Newer Therapeutic Insights. *Curr Neuropharmacol*, 16, 1045-1058.
44. KLEINERMAN, R. A. 2009. Radiation-sensitive genetically susceptible pediatric subpopulations. *Pediatr Radiol*, 39 Suppl 1, S27-31.
45. KOOL, M., KORSHUNOV, A., REMKE, M., JONES, D. T., SCHLANSTEIN, M., NORTHCOTT, P. A., CHO, Y. J., KOSTER, J., SCHOUTEN-VAN MEETEREN, A., VAN VUURDEN, D., CLIFFORD, S. C., PIETSCH, T., VON BUEREN, A. O., RUTKOWSKI, S., MCCABE, M., COLLINS, V. P., BACKLUND, M. L., HABERLER, C., BOURDEAUT, F., DELATTRE, O., DOZ, F., ELLISON, D. W., GILBERTSON, R. J., POMEROY, S. L., TAYLOR, M. D., LICHTER, P. & PFISTER, S. M. 2012. Molecular subgroups of medulloblastoma: an international meta-analysis of transcriptome, genetic aberrations, and clinical data of WNT, SHH, Group 3, and Group 4 medulloblastomas. *Acta Neuropathol*, 123, 473-84.
46. KOOL, M., KOSTER, J., BUNT, J., HASSELT, N. E., LAKEMAN, A., VAN SLUIS, P., TROOST, D., MEETEREN, N. S., CARON, H. N., CLOOS, J., MRSIC, A., YLSTRA, B., GRAJKOWSKA, W., HARTMANN, W., PIETSCH, T., ELLISON, D., CLIFFORD, S. C. & VERSTEEG, R. 2008. Integrated genomics identifies five medulloblastoma subtypes with distinct genetic profiles, pathway signatures and clinicopathological features. *PLoS One*, 3, e3088.
47. KORSHUNOV, A., REMKE, M., KOOL, M., HIELSCHER, T., NORTHCOTT, P. A., WILLIAMSON, D., PFAFF, E., WITT, H., JONES, D. T., RYZHOVA, M., CHO, Y. J., WITTMANN, A., BENNER, A., WEISS, W. A., VON DEIMLING, A., SCHEURLLEN, W., KULOZIK, A. E., CLIFFORD, S. C., PETER COLLINS, V., WESTERMANN, F., TAYLOR, M. D., LICHTER, P. & PFISTER, S. M. 2012. Biological and clinical heterogeneity of MYCN-amplified medulloblastoma. *Acta Neuropathol*, 123, 515-27.
48. KORTMANN, R. D., TIMMERMANN, B., KUHLE, J., WILICH, N., FLENTJE, M., MEISNER, C. & BAMBERG, M. 1999. HIT '91 (prospective, co-operative study for the treatment of malignant brain tumors in childhood): accuracy and acute toxicity of the irradiation of the craniospinal axis. Results of the quality assurance program. *Strahlenther Onkol*, 175, 162-9.
49. KUNKELE, A., DE PRETER, K., HEUKAMP, L., THOR, T., PAJTLER, K. W., HARTMANN, W., MITTELBRONN, M., GROTZER, M. A., DEUBZER, H. E., SPELEMAN, F., SCHRAMM, A., EGGERT, A. & SCHULTE, J. H. 2012. Pharmacological activation of the p53 pathway by nutlin-3 exerts anti-tumoral effects in medulloblastomas. *Neuro Oncol*, 14, 859-69.
50. LEBENSMITTELSICHERHEIT, B. F. V. U. Hanf, THC, Cannabidiol(CBD) & Co. LIGRESTI, A., MORIELLO, A. S., STAROWICZ, K., MATIAS, I., PISANTI, S., DE PETROCELLIS, L., LAEZZA, C., PORTELLA, G., BIFULCO, M. & DI MARZO, V. 2006. Antitumor activity of plant cannabinoids with emphasis on the effect of cannabidiol on human breast carcinoma. *J Pharmacol Exp Ther*, 318, 1375-87.
51. LITCHFIELD, J. T., JR. & WILCOXON, F. 1949. A simplified method of evaluating dose- effect experiments. *J Pharmacol Exp Ther*, 96, 99-113.
52. MACKIE, K. 2006. Mechanisms of CB1 receptor signaling: endocannabinoid modulation of synaptic strength. *Int J Obes (Lond)*, 30 Suppl 1, S19-23.
53. MARCU, J. P., CHRISTIAN, R. T., LAU, D., ZIELINSKI, A. J., HOROWITZ, M. P., LEE, J., PAKDEL, A., ALLISON, J., LIMBAD, C., MOORE, D. H., YOUNT, G. L., DESPREZ, P. Y. & MCALLISTER, S. D. 2010. Cannabidiol enhances the inhibitory effects of delta9-tetrahydrocannabinol on human glioblastoma cell proliferation and survival. *Mol Cancer Ther*, 9, 180-9.
54. MASSI, P., SOLINAS, M., CINQUINA, V. & PAROLARO, D. 2013. Cannabidiol as

- potential anticancer drug. *Br J Clin Pharmacol*, 75, 303-12.
55. MASSI, P., VACCANI, A., BIANCHETTI, S., COSTA, B., MACCHI, P. & PAROLARO, D. 2006. The non-psychoactive cannabidiol triggers caspase activation and oxidative stress in human glioma cells. *Cell Mol Life Sci*, 63, 2057-66.
56. MASSI, P., VACCANI, A., CERUTI, S., COLOMBO, A., ABBRACCHIO, M. P. & PAROLARO, D. 2004. Antitumor effects of cannabidiol, a nonpsychoactive cannabinoid, on human glioma cell lines. *J Pharmacol Exp Ther*, 308, 838-45.
57. MATSUDA, L. A., LOLAIT, S. J., BROWNSTEIN, M. J., YOUNG, A. C. & BONNER, T. I. 1990. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature*, 346, 561-4.
58. MCALLISTER, S. D., CHRISTIAN, R. T., HOROWITZ, M. P., GARCIA, A. & DESPREZ, P. Y. 2007. Cannabidiol as a novel inhibitor of Id-1 gene expression in aggressive breast cancer cells. *Mol Cancer Ther*, 6, 2921-7.
59. MCALLISTER, S. D., MURASE, R., CHRISTIAN, R. T., LAU, D., ZIELINSKI, A. J., ALLISON, J., ALMANZA, C., PAKDEL, A., LEE, J., LIMBAD, C., LIU, Y., DEBS, R. J., MOORE, D. H. & DESPREZ, P. Y. 2011. Pathways mediating the effects of cannabidiol on the reduction of breast cancer cell proliferation, invasion, and metastasis. *Breast Cancer Res Treat*, 129, 37-47.
60. MCALLISTER, S. D., SOROCEANU, L. & DESPREZ, P. Y. 2015. The Antitumor Activity of Plant-Derived Non-Psychoactive Cannabinoids. *J Neuroimmune Pharmacol*, 10, 255-67.
61. MOSMANN, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, 65, 55-63.
62. MUNRO, S., THOMAS, K. L. & ABU-SHAAR, M. 1993. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature*, 365, 61-5.
63. NABISSI, M., MORELLI, M. B., SANTONI, M. & SANTONI, G. 2013. Triggering of the TRPV2 channel by cannabidiol sensitizes glioblastoma cells to cytotoxic chemotherapeutic agents. *Carcinogenesis*, 34, 48-57.
64. NORTHCOTT, P. A., HIELSCHER, T., DUBUC, A., MACK, S., SHIH, D., REMKE, M., AL-HALABI, H., ALBRECHT, S., JABADO, N., EBERHART, C. G., GRAJKOWSKA, W., WEISS, W. A., CLIFFORD, S. C., BOUFFET, E., RUTKA, J. T., KORSHUNOV, A., PFISTER, S. & TAYLOR, M. D. 2011a. Pediatric and adult sonic hedgehog medulloblastomas are clinically and molecularly distinct. *Acta Neuropathol*, 122, 231-40.
65. NORTHCOTT, P. A., KORSHUNOV, A., WITT, H., HIELSCHER, T., EBERHART, C. G., MACK, S., BOUFFET, E., CLIFFORD, S. C., HAWKINS, C. E., FRENCH, P., RUTKA, J. T., PFISTER, S. & TAYLOR, M. D. 2011b. Medulloblastoma comprises four distinct molecular variants. *J Clin Oncol*, 29, 1408-14.
66. NOVOTNA, A., MARES, J., RATCLIFFE, S., NOVAKOVA, I., VACHOVA, M., ZAPLETALOVA, O., GASPERINI, C., POZZILLI, C., CEFARO, L., COMI, G., ROSSI, P., AMBLER, Z., STELMASIAK, Z., ERDMANN, A., MONTALBAN, X., KLIMEK, A., DAVIES, P. & SATIVEX SPASTICITY STUDY, G. 2011. A randomized, double-blind, placebo-controlled, parallel-group, enriched-design study of nabiximols\* (Sativex((R))), as add-on therapy, in subjects with refractory spasticity caused by multiple sclerosis. *Eur J Neurol*, 18, 1122-31.
67. OHLSSON, A., LINDGREN, J. E., ANDERSSON, S., AGURELL, S., GILLESPIE, H. & HOLLISTER, L. E. 1986. Single-dose kinetics of deuterium-labelled cannabidiol in man after smoking and intravenous administration. *Biomed Environ Mass Spectrom*, 13, 77-83.
68. OTTENSMEIER, H., SCHLEGEL, P. G., EYRICH, M., WOLFF, J. E., JUHNKE, B. O., VON HOFF, K., FRAHSEK, S., SCHMIDT, R., FALDUM, A., FLEISCHHACK, G., VON BUEREN, A., FRIEDRICH, C., RESCH, A., WARMUTH-METZ, M.,

- KRAUSS, J., KORTMANN, R. D., BODE, U., KUHL, J. & RUTKOWSKI, S. 2020. Treatment of children under 4 years of age with medulloblastoma and ependymoma in the HIT2000/HIT-REZ 2005 trials: Neuropsychological outcome 5 years after treatment. *PLoS One*, 15, e0227693.
69. PALMIERI, B., LAURINO, C. & VADALA, M. 2017. Short-Term Efficacy of CBD-Enriched Hemp Oil in Girls with Dysautonomic Syndrome after Human Papillomavirus Vaccination. *Isr Med Assoc J*, 19, 79-84.
70. PERCIVAL BAILEY, M. D. H. C., M.D. 1925. MEDULLOBLASTOMA CEREBELLI A COMMON TYPE OF MIDCEREBELLAR GLIOMA OF CHILDHOOD. *Arch NeurPsych*, 14, 192-224.
71. PUMROY, R. A., SAMANTA, A., LIU, Y., HUGHES, T. E., ZHAO, S., YUDIN, Y., ROHACS, T., HAN, S. & MOISEENKOVA-BELL, V. Y. 2019. Molecular mechanism of TRPV2 channel modulation by cannabidiol. *Elife*, 8.
72. QAMRI, Z., PREET, A., NASSER, M. W., BASS, C. E., LEONE, G., BARSKY, S. H. & GANJU, R. K. 2009. Synthetic cannabinoid receptor agonists inhibit tumor growth and metastasis of breast cancer. *Mol Cancer Ther*, 8, 3117-29.
73. RAMASWAMY, V., NORTHCOTT, P. A. & TAYLOR, M. D. 2011. FISH and chips: the recipe for improved prognostication and outcomes for children with medulloblastoma. *Cancer Genet*, 204, 577-88.
74. RUSSO, E. B. 2007. History of cannabis and its preparations in saga, science, and sobriquet. *Chem Biodivers*, 4, 1614-48.
75. RUSSO, E. B., BURNETT, A., HALL, B. & PARKER, K. K. 2005. Agonistic properties of cannabidiol at 5-HT1a receptors. *Neurochem Res*, 30, 1037-43.
76. RUTKOWSKI, S., BODE, U., DEINLEIN, F., OTTENSMEIER, H., WARMUTH-METZ, M., SOERENSEN, N., GRAF, N., EMSER, A., PIETSCH, T., WOLFF, J. E., KORTMANN, R. D. & KUEHL, J. 2005. Treatment of early childhood medulloblastoma by postoperative chemotherapy alone. *N Engl J Med*, 352, 978-86.
77. RUTKOWSKI, S., GERBER, N. U., VON HOFF, K., GNEKOW, A., BODE, U., GRAF, N., BERTHOLD, F., HENZE, G., WOLFF, J. E., WARMUTH-METZ, M., SOERENSEN, N., EMSER, A., OTTENSMEIER, H., DEINLEIN, F., SCHLEGEL, P. G., KORTMANN, R. D., PIETSCH, T., KUEHL, J. & GERMAN PEDIATRIC BRAIN TUMOR STUDY, G. 2009. Treatment of early childhood medulloblastoma by postoperative chemotherapy and deferred radiotherapy. *Neuro Oncol*, 11, 201-10.
78. RUTKOWSKI S, T. R., KORINTHENBERG R, WARMUTH-METZ M, WECKESSER M, KRAUSS J, PIETSCH T 2016. Leitsymptome und Diagnostik der ZNS-Tumoren im Kindes- und Jugendalter. . *Gemeinsame Leitlinie der Gesellschaft für Neuropädiatrie und der Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie 2016*.
79. RUTKOWSKI, S., VON HOFF, K., EMSER, A., ZWIENER, I., PIETSCH, T., FIGARELLA-BRANGER, D., GIANGASPERO, F., ELLISON, D. W., GARRE, M. L., BIASSONI, V., GRUNDY, R. G., FINLAY, J. L., DHALL, G., RAQUIN, M. A. & GRILL, J. 2010. Survival and prognostic factors of early childhood medulloblastoma: an international meta-analysis. *J Clin Oncol*, 28, 4961-8.
80. SANTONI, G. & AMANTINI, C. 2019. The Transient Receptor Potential Vanilloid Type- 2 (TRPV2) Ion Channels in Neurogenesis and Gliomagenesis: Cross-Talk between Transcription Factors and Signaling Molecules. *Cancers (Basel)*, 11.
81. SARFARAZ, S., AFAQ, F., ADHAMI, V. M. & MUKHTAR, H. 2005. Cannabinoid receptor as a novel target for the treatment of prostate cancer. *Cancer Res*, 65, 1635-41.
82. SHRIVASTAVA, A., KUZONTKOSKI, P. M., GROOPMAN, J. E. & PRASAD, A. 2011. Cannabidiol induces programmed cell death in breast cancer cells by coordinating the cross-talk between apoptosis and autophagy. *Mol Cancer Ther*, 10, 1161-72.
83. SOLINAS, M., MASSI, P., CINQUINA, V., VALENTI, M., BOLOGNINI, D.,

- GARIBOLDI, M., MONTI, E., RUBINO, T. & PAROLARO, D. 2013. Cannabidiol, a non-psychoactive cannabinoid compound, inhibits proliferation and invasion in U87-MG and T98G glioma cells through a multitarget effect. *PLoS One*, 8, e76918.
84. STOCK, K., KUMAR, J., SYNOWITZ, M., PETROSINO, S., IMPERATORE, R., SMITH, E. S., WEND, P., PURFURST, B., NUBER, U. A., GUROK, U., MATYASH, V., WALZLEIN, J. H., CHIRASANI, S. R., DITTMAR, G., CRAVATT, B. F., MOMMA, S., LEWIN, G. R., LIGRESTI, A., DE PETROCELLIS, L., CRISTINO, L., DI MARZO, V., KETTENMANN, H. & GLASS, R. 2012. Neural precursor cells induce cell death of high-grade astrocytomas through stimulation of TRPV1. *Nat Med*, 18, 1232-8.
85. SUN, Y., ALEXANDER, S. P., GARLE, M. J., GIBSON, C. L., HEWITT, K., MURPHY, S. P., KENDALL, D. A. & BENNETT, A. J. 2007. Cannabinoid activation of PPAR alpha; a novel neuroprotective mechanism. *Br J Pharmacol*, 152, 734-43.
86. TAYLOR, M. D., NORTHCOTT, P. A., KORSHUNOV, A., REMKE, M., CHO, Y. J., CLIFFORD, S. C., EBERHART, C. G., PARSONS, D. W., RUTKOWSKI, S., GAJJAR, A., ELLISON, D. W., LICHTER, P., GILBERTSON, R. J., POMEROY, S. L., KOOL, M. & PFISTER, S. M. 2012. Molecular subgroups of medulloblastoma: the current consensus. *Acta Neuropathol*, 123, 465-72.
87. TELFORD, W. G., KING, L. E. & FRAKER, P. J. 1994. Rapid quantitation of apoptosis in pure and heterogeneous cell populations using flow cytometry. *J Immunol Methods*, 172, 1-16.
88. THOMPSON, M. C., FULLER, C., HOGG, T. L., DALTON, J., FINKELSTEIN, D., LAU, C. C., CHINTAGUMPALA, M., ADESINA, A., ASHLEY, D. M., KELLIE, S. J., TAYLOR, M. D., CURRAN, T., GAJJAR, A. & GILBERTSON, R. J. 2006. Genomics identifies medulloblastoma subgroups that are enriched for specific genetic alterations. *J Clin Oncol*, 24, 1924-31.
89. VELASCO, G., HERNANDEZ-TIEDRA, S., DAVILA, D. & LORENTE, M. 2016. The use of cannabinoids as anticancer agents. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 64, 259-66.
90. VON BUEREN, A. O., VON HOFF, K., PIETSCH, T., GERBER, N. U., WARMUTH-METZ, M., DEINLEIN, F., ZWIENER, I., FALDUM, A., FLEISCHHACK, G., BENESCH, M., KRAUSS, J., KUEHL, J., KORTMANN, R. D. & RUTKOWSKI, S. 2011. Treatment of young children with localized medulloblastoma by chemotherapy alone: results of the prospective, multicenter trial HIT 2000 confirming the prognostic impact of histology. *Neuro Oncol*, 13, 669-79.
91. VON HOFF, K., HARTMANN, W., VON BUEREN, A. O., GERBER, N. U., GROTZER, M. A., PIETSCH, T. & RUTKOWSKI, S. 2010. Large cell/anaplastic medulloblastoma: outcome according to myc status, histopathological, and clinical risk factors. *Pediatr Blood Cancer*, 54, 369-76.
92. WADE, D. T., ROBSON, P., HOUSE, H., MAKELA, P. & ARAM, J. 2003. A preliminary controlled study to determine whether whole-plant cannabis extracts can improve intractable neurogenic symptoms. *Clin Rehabil*, 17, 21-9.
93. WHYTE, L. S., RYBERG, E., SIMS, N. A., RIDGE, S. A., MACKIE, K., GREASLEY, P. J., ROSS, R. A. & ROGERS, M. J. 2009. The putative cannabinoid receptor GPR55 affects osteoclast function in vitro and bone mass in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 16511-6.
94. WIKSTRAND, C. J., FRIEDMAN, H. S. & BIGNER, D. D. 1991. Medulloblastoma cell-substrate interaction in vitro. *Invasion Metastasis*, 11, 310-24.
95. WILSON, R. I., KUNOS, G. & NICOLL, R. A. 2001. Presynaptic specificity of endocannabinoid signaling in the hippocampus. *Neuron*, 31, 453-62.
96. WILSON-MORKEH, H., AL-ABDULLA, A., SIEN, L., MOHAMED, H. & YOUNGSTEIN, T. 2020. Important drug interactions exist between cannabidiol oil and commonly prescribed drugs in rheumatology practice. *Rheumatology (Oxford)*, 59, 249-

- 251.
97. YAMADA, T., UEDA, T., SHIBATA, Y., IKEGAMI, Y., SAITO, M., ISHIDA, Y., UGAWA, S., KOHRI, K. & SHIMADA, S. 2010. TRPV2 activation induces apoptotic cell death in human T24 bladder cancer cells: a potential therapeutic target for bladder cancer. *Urology*, 76, 509 e1-7.
98. ZELTZER, P. M., BOYETT, J. M., FINLAY, J. L., ALBRIGHT, A. L., RORKE, L. B., MILSTEIN, J. M., ALLEN, J. C., STEVENS, K. R., STANLEY, P., LI, H., WISOFF, J. H., GEYER, J. R., MCGUIRE-CULLEN, P., STEHBENS, J. A., SHURIN, S. B. & PACKER, R. J. 1999. Metastasis stage, adjuvant treatment, and residual tumor are prognostic factors for medulloblastoma in children: conclusions from the Children's Cancer Group 921 randomized phase III study. *J Clin Oncol*, 17, 832-45.
100. ZENDULKA, O., DOVRTELOVA, G., NOSKOVA, K., TURJAP, M., SULCOVA, A., HANUS, L. & JURICA, J. 2016. Cannabinoids and Cytochrome P450 Interactions. *Curr Drug Metab*, 17, 206-26.

## 9 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

CBD	Cannabidiol
CNR1	Cannabidiol Rezeptor 1
CNR2	Cannabidiol Rezeptor 2
ERK	Extrameduläre Rezeptoren Kinase
GABA	$\gamma$ -Aminobuttersäure
GPCR	G-Protein-gekoppelte Rezeptor
GPR55	G-Protein-gekoppelte Rezeptor 55
FDA	Food and Drug Administration
HAGs	hoch-Grad Astrocytomas
HPV	humane Papillomavirus
LFS	Li-Fraumeni-Syndrom
MB	Medulloblastoma
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NBCCS	Nevoid-Basalzellkarzinom-Syndrom
NF1	Neurofibromatose Typ 1
PPAR	Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptor
Rb	Retinoblastom
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
SHH	Sonic hedgehog Signalweges
TCH	Tetrahydrocannabinol
TRPV1	transiente Rezeptorpotential Vanilloid 1
TRPV2	transiente Rezeptorpotential Vanilloid 2
WNT	Wingless und Int-1
ZNS	Zentral Nerven System
5-HT1A	Serotonin Rezeptor Typ 1A



## 10 DANKSAGUNG

Ich möchte mich hiermit herzlich bei allen, die bei dieser Arbeit involviert waren, bedanken.

Zuerst danke ich meinen Doktorvater Prof. Dr. med. Tycho Zuzak, der mir die Chance gegeben hat, meinen ersten wissenschaftlichen Schritt zu verwirklichen. Gleichzeitig bedanke ich mich bei ihm für die herzliche Unterstützung als leitender Oberarzt während der Dienste im Gemeinschaftskrankenhaus Herdecke.

Ein besonderer Dank gebühren Frau Katrin Menke und Dr. Melanie Schwermer für die Begleitung, die wissenschaftliche Hilfe und die konstruktive Beratung.

Herr Prof. Dr. med. Dirk Reinhardt möchte ich herzlich für seine engagierte, wissenschaftliche Unterstützung und seine konstruktive Kritik danken.

Ich danke auch Dr. Katarina Reinhardt für ihre Einführung in PCR und WB und gleichzeitig für die herzliche Unterstützung. Ich möchte auch bei Frau Anja Rieb, Tatjana Ryl und allen Mitarbeitern des kideronkologischen Labors am Universitätsklinikum Essen bedanken.

Ein herzliches Dankeschön gehört auch zu allen Mitarbeitern in der Kinderklinik in Gemeinschaftskrankenhaus Herdecke und dem AML Labor in Essen für das Verständnis und die Unterstützung während dieser anspruchsvollen Zeit der Durchführung meiner Promotion.

Der größte Dank gehört meiner Familie. Ohne ihre liebevolle und kontinuierliche Unterstützung wäre dieser Arbeit nicht möglich geworden.

## 11 LEBENSLAUF

### **Evangelia Antoniou**

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.



