

**Einfluss von Cannabinoiden auf die
Expression des Interzellulären
Adhäsionsmoleküls-1: Rolle bei der
zytotoxischen Lyse von Lungentumorzellen
durch Lymphokin-aktivierte
Killerzellen**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Rostock

vorgelegt von
Maria Haustein, geb. am 24.10.1984 in Hagenow
aus Rostock

Rostock, den 20. Oktober 2014

1. Gutachter: Prof. Dr. Birgit Piechulla
Universität Rostock, Institut für Biowissenschaften, Abteilung Biochemie
2. Gutachter: Prof. Dr. Burkhard Hinz
Universitätsmedizin Rostock, Institut für Toxikologie und Pharmakologie
3. Gutachter: Prof. Dr. Christoph Ritter
Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald, Institut für Pharmazie,
Abteilung Klinische Pharmazie

Datum der Einreichung: 22. Oktober 2014

Datum der Verteidigung: 26. Januar 2015

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Krebserkrankungen.....	1
1.2 Cannabinoide	3
1.2.1 <i>Cannabis sativa</i>	3
1.2.2 Das Endocannabinoidsystem	4
1.2.3 Cannabidiol.....	9
1.3 Das Interzelluläre Adhäsionsmolekül ICAM-1	11
1.4 Das Immunsystem	15
1.4.1 Überblick über Immunzellen und deren Funktion	15
1.4.2 Mechanismen der zytotoxischen Lyse und Tumorimmunüberwachung	18
1.5 Zielsetzung der Arbeit	22
2. Material und Methoden	24
2.1 Material.....	24
2.1.1 Zellen.....	24
2.1.2 Medien und Zusätze.....	24
2.1.3 Chemikalien.....	25
2.1.4 Kits.....	26
2.1.5 siRNA und Antikörper für Blockierungsexperimente	26
2.1.6 Proteinmarker und Antikörper für Western Blot-Analyse.....	26
2.1.7 Verbrauchsmaterialien	27
2.2 Methoden	27
2.2.1 Kultivierung von adhärenen Zellen	27
2.2.1.1 Allgemeine Bestimmungen.....	27
2.2.1.2 Subkultivierung der Zellen.....	28
2.2.1.3 Bestimmung der Zellzahl.....	28
2.2.1.4 Kryokonservierung.....	29
2.2.1.5 Aussaat und Stimulation der adhärenen Zellen.....	29
2.2.1.6 siRNA-Transfektion der Tumorzellen.....	30
2.2.2 Isolierung von PBMCs aus Buffy Coats.....	31
2.2.2.1 Dichtegradientenzentrifugation	31
2.2.2.2 Abtrennung der adhärenen Zellen (Monozyten/Makrophagen).....	33
2.2.2.3 Kultivierung und Generieren von LAK-Zellen.....	34

2.2.2.4 Behandlung der LAK-Zellen mit CBD	34
2.2.3 Adhäsions- und Zytotoxizitätsassay	35
2.2.3.1 Allgemeine Bestimmungen	35
2.2.3.2 Adhäsion	36
2.2.3.3 Zytotoxizität	38
2.2.4 WST-1-Test.....	39
2.2.5 Isolation von Proteinen aus Zellen	40
2.2.6 Proteinbestimmung.....	41
2.2.7 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese.....	42
2.2.8 Western Blot	43
2.2.9 Immunologischer Nachweis der Proteine (Chemilumineszenz).....	44
2.2.10 Strippen und Aufbewahrung von Membranen	46
2.2.11 Statistik	46
3. Ergebnisse	47
3.1 Einfluss von CBD auf die ICAM-1-Proteinexpression in Tumorzellen.....	47
3.2 Rolle von ICAM-1 bei der Adhäsion von LAK-Zellen an CBD-stimulierte Tumorzellen	48
3.3 LAK-Zell-vermittelte Lyse von CBD-stimulierten Tumorzellen	50
3.3.1 Unterschiedliche Tumorzellzahlen und Verhältnisse von LAK- zu Tumorzellen	50
3.3.2 Einfluss von CBD auf die LAK-Zellen.....	52
3.3.2.1 Vitalität und LFA-1-Expression	53
3.3.2.2 Zytotoxische Aktivität	53
3.3.3 Rolle von ICAM-1 bei der LAK-Zell-vermittelten Lyse von CBD- stimulierten Tumorzellen	55
3.3.3.1 ICAM-1-Antikörper	55
3.3.3.2 ICAM-1 siRNA-Transfektion	56
3.3.4 Rolle der CB-Rezeptoren und des TRPV1 bei der LAK-vermittelten Lyse von CBD-stimulierten Tumorzellen.....	59
3.3.4.1 Eigeneffekt der Rezeptorantagonisten	61
3.3.5 Rolle von LFA-1 bei der LAK-Zell-vermittelten Lyse von Tumorzellen.....	62
3.4 Wirkung anderer Cannabinoide auf die LAK-Zell-vermittelte Lyse von Tumorzellen	64
3.4.1 Testung verschiedener Cannabinoide	64
3.4.2 Rolle von ICAM-1 bei der LAK-Zell-vermittelten Lyse von MA- und THC-stimulierten Tumorzellen	64
3.4.2.1 R-(+)-Methanandamid.....	65

3.4.2.2 Δ^9 -Tetrahydrocannabinol	67
3.5 Wirkung von CBD, MA und THC auf Nicht-Tumorzellen	69
3.5.1 Einfluss auf die ICAM-1-Proteinexpression und LAK-Zell-vermittelte Lyse von BEAS-2B-Zellen	69
3.5.2 Wirkung von CBD auf die ICAM-1-Proteinexpression in Monozyten	70
3.6 Einfluss des FAAH-Inhibitors AA-5HT auf die LAK-Zell-vermittelte Lyse von Tumorzellen	71
3.6.1 Wirkung verschiedener AA-5HT-Konzentrationen auf die spezifische Tumorzelllyse	71
3.6.2 Rolle von ICAM-1 bei der LAK-vermittelten Lyse von AA-5HT-stimulierten Tumorzellen	72
3.6.3 Rolle der CB-Rezeptoren und des TRPV1 bei der LAK-vermittelten Lyse von AA-5HT-stimulierten Tumorzellen	74
3.6.4 Rolle von LFA-1 bei der LAK-vermittelten Lyse von AA-5HT-stimulierten Tumorzellen	75
3.7 Einfluss von Endocannabinoiden und ähnlichen Verbindungen auf die LAK-Zell-vermittelte Lyse von Tumorzellen	76
3.7.1 Rolle von ICAM-1 bei der LAK-vermittelten Lyse von AEA-stimulierten Tumorzellen	77
3.7.2 Rolle der CB-Rezeptoren und des TRPV1 bei der LAK-vermittelten Lyse von AEA-stimulierten Tumorzellen	79
4. Diskussion	80
4.1 Negative Lysewerte und Tumorzellviabilitäten	80
4.2 Rolle von ICAM-1, LFA-1 und zytotoxischen Lymphozyten bei der Tumorabwehr	81
4.3 Rolle der CB-Rezeptoren und des TRPV1 bei der CBD-induzierten Tumorzelllyse	87
4.4 Antitumorigene Wirkungen von Cannabinoiden	92
4.5 Cannabinoide und das Immunsystem	96
4.6 Therapeutisches Potential von CBD bei der Krebsbehandlung	99
5. Zusammenfassung	104
6. Literaturverzeichnis	106
7. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	137
8. Anhang	140
8.1 Tabellarische Übersichten zu den Viabilitäten der Tumor- und Nicht-Tumorzellen	140

Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere
AA-5HT	Arachidonylserotonin; N-[2-(5-hydroxy-1H-indol-3-yl)ethyl]-5Z,8Z,11Z,14Z-eicosatetraenamide
Abb.	Abbildung
AEA	Anandamid; N-Arachidonylethanolamin
2-AG	2-Arachidonylglycerol
AM251	N-(piperidin-1-yl)-5-(4-iodophenyl)-1-(2,4-dichlorophenyl)-4-methyl-1H-pyrazole-3-carboxamide
AM630	(6-iodo-2-methyl-1-[2-(4-morpholinyl)ethyl]-1H-indol-3-yl)(4-methoxyphenyl)methanone
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua dest.	destilliertes Wasser
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)
bzw.	beziehungsweise
C	Kohlenstoff
°C	Grad Celsius
ca.	circa
Ca ²⁺	Calciumionen
Calcein-AM	Calcein-Acetoxy-methylester
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat (cyclic adenosine monophosphate)
CB ₁	Cannabinoid-Rezeptor 1
CB ₂	Cannabinoid-Rezeptor 2
CBD	(-)-Cannabidiol; (2-[(1S,6S)-3-methyl-6-(prop-1-en-2-yl)cyclohex-2-enyl]-5-pentylbenzene-1,3-diol)
CD	Cluster of Differentiation
d. h.	das heißt
cm ²	Quadratcentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CTLs	zytotoxische T-Lymphozyten (cytotoxic T lymphocytes)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (Deoxyribonucleic acid)
eCB	Endocannabinoid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ERK	extracellular-signal-regulated kinase
et al.	et alteri (und andere)
EtOH	Ethanol
E:Z	Verhältnis Effektorzellen zu Zielzellen
FAAH	Fettsäure-Amidohydrolase (fatty acid amide hydrolase)
FCS	fötales Kälberserum (fetal calf serum)
g	Gramm

GPR55	G-Protein-gekoppelten Rezeptor 55
h	Stunden
HCl	Salzsäure
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinyl)-Ethansulfonsäure
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
ICAM-1	Interzelluläres Adhäsionsmolekül-1 (intercellular adhesion molecule-1)
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IFN- γ	Interferon- γ
JWH133	(6a <i>R</i> ,10a <i>R</i>)-3-(1,1-dimethylbutyl)-6a,7,10,10a-tetrahydro-6,6,9-trimethyl-6H-dibenzo[b,d]pyran
K ⁺	Kaliumionen
kDa	Kilodalton (atomare Masseneinheit)
l	Liter
LAK-Zellen	Lymphokin-aktivierte Killerzellen
LFA-1	lymphocyte function-associated antigen-1
LSM	Lymphozytentrennmedium (lymphocyte separation medium)
m	Milli (10 ⁻³)
M	Molar
MA	R-(+)-Methanandamid
MAPK	mitogenaktivierte Proteinkinase (mitogen-activated protein kinase)
Mg ²⁺	Magnesiumionen
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (major histocompatibility complex)
min	Minuten
Mio.	Millionen
mm	Millimeter
MMP	Matrixmetalloproteinasen
mRNA	messenger RNA
MS	Multiple Sklerose
μ	Mikro (10 ⁻⁶)
μ m	Mikrometer
n	Nano (10 ⁻⁹)
N	Stickstoff
NaCl	Natriumchlorid
NAD ⁺	Nicotinamidadenindinukleotid (oxidierte Form)
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid (reduzierte Form)
NaOH	Natriumhydroxid
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
nm	Nanometer
NSCLC	nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom (non-small-cell lung carcinoma)
OEA	Oleylethanolamid
p	para
P	Passage

PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBMCs	peripheral blood mononuclear cells
PBS	Phosphate buffered salt solution (Pufferlösung)
PEA	Palmitoylethanolamid
Pen-Strep	Penicillin-Streptomycin
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PPAR	Peroxisome proliferator-activated receptor
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
ROS	reaktive Sauerstoffspezies (reactive oxygen species)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulphate)
SEM	Standardfehler (standard error of the mean)
siRNA	small interfering RNA
s. u.	siehe unten
Tab.	Tabelle
TBS	Tris-buffered saline
TBS-T	Tris-buffered saline mit Tween [®] 20
Temed	N,N,N',N'-Tetramethylethane-1,2-diamine
TGF- β	Transforming growth factor- β
THC	Δ^9 -Tetrahydrocannabinol; (-)- Δ^9 - <i>trans</i> -(6aR,10aR)-Tetrahydrocannabinol
TIL	tumorinfiltrierende Lymphozyten (tumor infiltrating lymphocytes)
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan
TRPV1	transient receptor potential vanilloid 1
U	units
v. a.	vor allem
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule-1
VEGF	vascular endothelial growth factor
vs.	versus
v/v	Volumen pro Volumen
WIN55,212-2	(R)-(+)-[2,3-dihydro-5-methyl-3-(4-morpholinylmethyl)pyrrolo[1,2,3-de]-1,4-benzoxazin-6-yl]-1-naphthalenylmethanone
WST-1	4-[-(4-iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazo-lio]-1,6-benzene disulfonate
w/v	Masse pro Volumen
x	mal (Produkt)
x g	mal Fallbeschleunigung (ca. 9,81 m/s ²)
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil
%	Prozent

1. Einleitung

1.1 Krebserkrankungen

In der Medizin fasst man unter dem Begriff Krebs Krankheitsbilder von malignen Tumorerkrankungen zusammen, die sich durch ein unkontrolliertes Wachstum auszeichnen. In diesem Zusammenhang unterscheidet man zwischen benignen (gutartigen) und malignen (bösartigen) Tumoren. Die wichtigsten Therapiemöglichkeiten bei Tumorerkrankungen umfassen die operative Entfernung, die medikamentöse Behandlung und die Bestrahlung. In Deutschland ist Krebs nach Herz-Kreislauf-Erkrankungen mit einem Viertel der Todesfälle die zweithäufigste Todesursache (Statistisches Bundesamt, 2013). Im Jahre 2010 wurden in Deutschland insgesamt rund 477.300 Krebsneuerkrankungen diagnostiziert, wobei bei Männern am häufigsten Prostata (26,1 %), Lunge (13,9 %) und Darm (13,4 %) und bei Frauen Brustdrüse (31,3 %), Darm (12,7 %) und Lunge (7,6 %) betroffen waren. Dabei war bei den Männern Lungenkrebs (24,9 %) mit Abstand die häufigste Krebstodesursache und bei den Frauen nach Brustkrebs (17,4 %) die zweithäufigste (Lungenkrebs: 13,6 %) (Robert Koch-Institut und GEKID, 2013). Lungenkrebs ist nicht nur in Deutschland, sondern auch weltweit die häufigste Krebstodesursache (GLOBOCAN, 2012).

Tumore sind nicht nur Ansammlungen von Krebszellen, sondern heterogene komplexe Gewebe, die sich aus verschiedenen Zelltypen wie Fibroblasten, Epithel- und Immunzellen, Zellen, die Blut- und Lymphgefäße bilden, sowie aus spezialisierten Mesenchymzelltypen zusammensetzen. Mutierte Zellen stören die Homöostase zwischen diesen Zelltypen im normalen Gewebe und machen sich deren Eigenschaften für ihr eigenes Überleben zunutze (de Visser et al., 2006). Krebs ist durch verschiedene Merkmale, die für die meisten, wenn nicht sogar alle humanen Tumortypen charakteristisch sind, gekennzeichnet. Diese Kennzeichen umfassen die Aufrechterhaltung der proliferativen Signalgebung und damit die Unempfindlichkeit gegenüber Wachstumsinhibitoren, das Umgehen der Apoptose, ein unbegrenztes Replikationspotential, die Induktion der Angiogenese, die Invasion und Metastasierung, die Neuprogrammierung des Energiestoffwechsels und das Umgehen der Immunüberwachung (Hanahan und Weinberg, 2000 und 2011).

Tumorzellen können ihre Proliferation aufrechterhalten, indem sie die Regulation der Produktion und Freisetzung von Wachstumsfaktoren stören und z. B. selber welche herstellen oder Zellen der Tumormikroumgebung zu deren Produktion anregen oder indem sie entsprechende Rezeptoren auf ihrer Zelloberfläche hochregulieren (Hanahan und Weinberg, 2011). Zusätzlich können sie der Wirkung von Wachstumsinhibitoren umgehen, die das Zellwachstum und die Proliferation in normalen Geweben

limitieren, wobei die Retinoblastom(RB)-assoziierten und die Tumorsuppressor(TP)53-Proteine die bekanntesten Vertreter sind. RB-Proteine binden an Transkriptionsfaktoren wie E2F, der die Expression von Genen reguliert, deren Produkte bei der Zellproliferation von Bedeutung sind und verhindern so die Transkription von E2F-induzierten Genen (Hiebert et al., 1992). Mutationen des p53-Tumorsuppressorgens gehören zu den häufigsten Veränderungen bei vielen humanen Krebstypen. Das TP53-Protein entfaltet seine antiproliferative Wirkung als Antwort auf verschiedene Stresssignale und kann zur Induktion der Apoptose beitragen (Hollstein et al., 1991; Olivier et al., 2010). Das Fehlen oder Mutationen solcher Schlüsselproteine können zur unkontrollierten Zellproliferation führen. Des Weiteren können Tumorzellen auch die antiproliferativen Effekte von TGF- β umgehen, indem sie Komponenten der Signalkaskade wie z. B. den Rezeptor auf ihrer Oberfläche herunterregulieren (Bierie und Moses, 2006). Um ausreichend Energie für die kontinuierliche Proliferation bereitstellen zu können, verstärken viele Tumorzellen ihren Stoffwechsel, indem sie z. B. Glukosetransporter und Enzyme der Glykolyse hochregulieren (Jones und Thompson, 2009). Zusätzlich zur dauerhaften Proliferation umgehen Tumorzellen die Apoptose, die von wichtiger Bedeutung bei der Aufrechterhaltung der Homöostase von Zellpopulationen im Gewebe ist und der Eliminierung von infizierten und entarteten Zellen dient. Gestörte oder veränderte Apoptose tritt u. a. bei neurodegenerativen und Autoimmunerkrankungen und vielen Krebstypen auf (Elmore, 2007). Tumorzellen können der Apoptose z. B. durch den Verlust der Tumorsuppressorfunktion, durch Hochregulation von antiapoptotischen oder Herunterregulation von proapoptotischen Faktoren oder durch Ausschalten der extrinsischen ligandenabhängigen Apoptose-Signalwege entgehen (Hanahan und Weinberg, 2011). Darüber hinaus spielt beim Umgehen der Apoptose und der Aufrechterhaltung der Proliferation die Telomeraseaktivität eine entscheidende Rolle. Eine Aktivität der Telomerase kann v. a. in unsterblichen, nicht aber in den meisten normalen Zellen nachgewiesen werden (Kim et al., 1994). Dieses Enzym verlängert die Telomere der Chromosomen, die bei jedem Replikationszyklus 50–100 Basenpaare verlieren und in normalen Zellen die Anzahl von Teilungen limitieren und ermöglicht so eine höhere oder unbegrenzte Anzahl von Replikationszyklen. Darüber hinaus ist die Bildung neuer Blutgefäße (Angiogenese) von essentieller Bedeutung bei der Versorgung von Zellen mit Nährstoffen und Sauerstoff. Während der Tumorprogression kommt es meist zum sogenannten 'angiogenic switch', wodurch ständig neue Gefäße gebildet werden. Dementsprechend kann die Expression von proangiogenen Faktoren wie VEGF-A (vascular endothelial growth factor-A) hoch- und die von antiangiogenen Faktoren wie Thrombospondin-1 herunterreguliert sein (Hanahan und Weinberg, 2011). Die Angiogenese ist auch Voraussetzung für

Invasion und Metastasierung. Bei der Metastasierung kommt es nach Proliferation von primären Tumorzellen und Ausbildung eines umfangreichen Blutgefäßnetzwerks innerhalb des Tumors zur lokalen Invasion von malignen Zellen in nahegelegene Blut- und Lymphgefäße, über die sie zu anderen Organen gelangen. Dort adhären sie an Gefäßwände, wandern in das Gewebe ein und wachsen zu Tumoren heran ('seed and soil'-Hypothese) (Fidler, 2003), wobei Adhäsionsmoleküle wie E-Cadherin und extrazelluläre Matrixmetalloproteinasen (z. B. MMP-9) eine wichtige Rolle spielen. Tumorzellen sind auch in der Lage der Immunüberwachung, die entartete Zellen normalerweise erkennt und eliminiert, zu entgehen (siehe 1.4.2).

1.2 Cannabinoide

1.2.1 *Cannabis sativa*

Cannabis sativa L. (Gewöhnlicher Hanf) ist eine einjährige krautige Pflanze, die zur Familie der Cannabaceae gehört. *Cannabis* wird schon seit Jahrtausenden als entspannend wirkende Droge, aber auch für medizinische Zwecke eingesetzt (EISOhly und Slade, 1995). Der geografische Ursprung von *Cannabis* liegt wahrscheinlich in Zentralasien, die erste bekannte Aufzeichnung der medizinischen Nutzung dieser Pflanze stammt aus China von vor 5000 Jahren (Appendino et al., 2011). Die Phytochemie von *Cannabis* ist sehr komplex und umfasst Verbindungen fast aller chemischer Klassen wie z. B. Polyketide, Terpene (Gemisch aus ca. 120 Mono- und Sesquiterpenen ist verantwortlich für charakteristischen Duft der Pflanze), modifizierte Zucker, Alkaloide, Flavonoide, Stilbene, Quinone und nitrogene Substanzen. Cannabinoide sind eine Klasse von mono- bis tetrazyklischen C₂₁- (oder C₂₂-) Verbindungen und stellen die bedeutendsten Sekundärmetabolite von *C. sativa* dar (EISOhly und Slade, 1995; Appendino et al., 2011). Die Vorläufer zur Bildung von Cannabinoiden sind Olivetolsäure (Polyketid) und Geranylpyrophosphat (Monoterpen-einheit), die zu Cannabigerolsäure kondensiert werden, die die Vorstufe der meisten wichtigen Phytocannabinoidklassen ist (Flores-Sanchez und Verpoorte, 2008). Mittlerweile wurden mehr als 500 Verbindungen aus *C. sativa* charakterisiert, darunter etwa 100 Cannabinoide, die in epidermalen Drüsen akkumuliert (Appendino et al., 2011) und scheinbar bei der Abwehr von Feinden wie Insekten von Bedeutung sind, da sie Apoptose in Insektenzellen induzieren können (Sirikantaramas et al., 2005). Der wohlbekannteste Vertreter der Cannabinoide ist das psychoaktive (-)- Δ^9 -*trans*-(6aR,10aR)-Tetrahydrocannabinol (THC; Abb. 1-3), eine der Hauptkomponenten aus *C. sativa*. THC wurde erstmals 1964 isoliert (Gaoni und Mechoulam, 1964) und seine Stereochemie schließlich als (6aR,10aR) aufgeklärt (Mechoulam und Gaoni, 1967).

Neben THC sind Cannabigerol, Cannabinol und Cannabidiol (siehe 1.2.3) weitere Phytocannabinoide aus *C. sativa*. Außer in *Cannabis* wurden Cannabinoide wie Cannabigerol und deren Säure in südafrikanischen Strohblumen (*Helichrysum umbraculigerum*) gefunden (Bohlmann und Hoffmann, 1979) und cannabinoidähnliche Verbindungen auch aus Lebermoosen (*Radula*) isoliert (Toyota et al., 2002).

1.2.2 Das Endocannabinoidsystem

Das Endocannabinoidsystem umfasst die Cannabinoid (CB)-Rezeptoren, ihre endogenen Liganden und Proteine, die die Biosynthese und den Abbau der Endocannabinoide katalysieren (Di Marzo et al., 2004). Es ist bei der Regulation von physiologischen Funktionen wie Bewegung, Erinnerung und Lernen, Wahrnehmung, neuroendokriner Sekretion, Appetit, Erbrechen, Schmerz, Körpertemperatur und Immunsystemmodulation von Bedeutung (Croxford und Yamamura, 2005). Die Wirkung von Marihuana und insbesondere die des psychoaktiven Phytocannabinoids THC, welches Effekte auf Kognition und Motorik hat (Abood und Martin, 1992), hatten Untersuchungen zum Mechanismus dieser Effekte zur Folge. Dies führte zur Entdeckung des CB₁-Rezeptors, der zuerst im Gehirn von Ratten charakterisiert (Devane et al., 1988) und dann schließlich auch aus diesem (Matsuda et al., 1990) und aus dem humanen Gehirn kloniert werden konnte (Gérard et al., 1991). Als ein zweiter Rezeptor wurde der CB₂-Rezeptor, der eine Homologie von ca. 44 % zur Aminosäuresequenz des CB₁-Rezeptors aufweist, durch Klonierung aus humanen Leukämiezellen identifiziert und seine Expression in der Milz, nicht aber im Gehirn von Ratten nachgewiesen (Munro et al., 1993). Die CB-Rezeptoren sind Ziele von endogenen lipophilen Verbindungen, den Endocannabinoiden, wobei Anandamid (AEA) und 2-Arachidonylglycerol (2-AG) zu den am besten untersuchten gehören (Abb. 1-1). Das Arachidonsäurederivat AEA wurde zunächst als intrinsischer Ligand des CB₁-Rezeptors aus dem Schweinehirn (Devane et al., 1992) und 2-AG erstmals aus dem Hundedarm isoliert, wobei letzteres auch schnell als Ligand im Gehirn identifiziert werden konnte (Mechoulam et al., 1995; Sugiura et al., 1995).

Die Endocannabinoide (eCB) werden bei Bedarf *de novo* aus Membranphospholipiden synthetisiert, wobei die Aktivität der Biosyntheseenzyme durch eine erhöhte Konzentrationen von intrazellulärem Ca²⁺ stimuliert wird. Direkt nach ihrer Biosynthese werden eCB von der Zelle freigesetzt, um ihre Ziele zu aktivieren, und anschließend durch schnelle und selektive Aufnahme wieder aus dem extrazellulären Raum entfernt und durch enzymatische Hydrolyse gespalten (Di Marzo et al., 2004; Matias und Di Marzo, 2006). Der entscheidende Schritt der Synthese von AEA ist die hydrolytische Spaltung

der Phosphodiesterbindung von N-Arachidonyl-Phosphatidylethanolamin (NArPE) durch die N-Acylphosphatidylethanolamin-selektive Phospholipase D (NAPE-PLD) (Okamoto et al., 2004), wobei auch alternative Synthesewege für N-Acylethanolamine existieren (Sun et al., 2004). Das eCB 2-AG entsteht hingegen durch Hydrolyse von sn-1-Acyl-2-Arachidonylglycerolen (DAGs) durch die sn-1-selektiven Diacylglycerollipasen (DAGL)- α und - β (Bisogno et al., 2003). Der Abbau von AEA erfolgt durch hydrolytische Spaltung zu Arachidonsäure und Ethanolamin, katalysiert durch die Fettsäure-Amidohydrolase (FAAH), die auch 2-AG als Substrat hydrolysieren kann und erstmal aus der Leber von Ratten kloniert (Cravatt et al., 1996), zunächst aber als katabolisches Enzym von AEA beschrieben wurde (Deutsch und Chin, 1993). Die Hydrolyse von 2-AG zu Arachidonsäure und Glycerol wird v. a. von der Monoacylglycerollipase (MAGL) katalysiert (Karlsson et al., 1997; Dinh et al., 2002). Die Enzyme besitzen keine Selektivität für einzelne Substrate, so dass Inhibitoren die Konzentration von N-Acylethanolaminen (NAEs) und Monoacylglycerolen (MAGs) beeinflussen (Di Marzo et al., 2004). Darüber hinaus dienen eCBs als Substrate der Cyclooxygenase-2 (Yu et al., 1997; Kozak et al., 2000), von Lipoxygenasen (Hampson et al., 1995; Ueda et al., 1995) und von Cytochrom P450 (Bornheim et al., 1995; Snider et al., 2007).

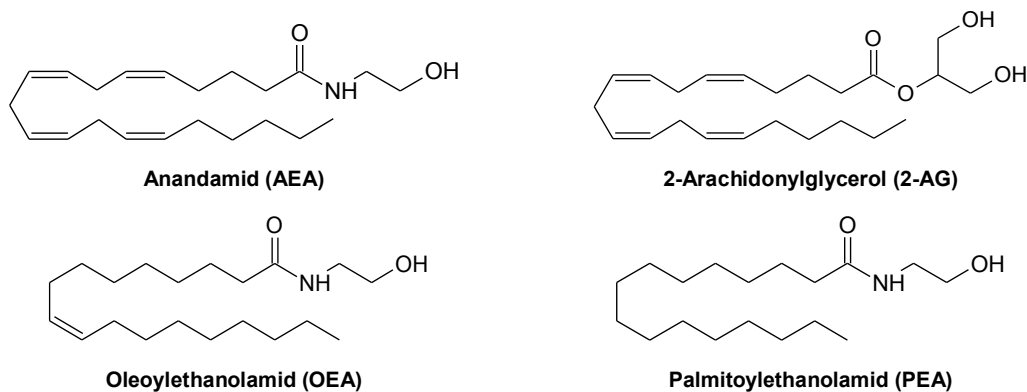


Abb. 1-1: Strukturformeln von Endocannabinoiden und ähnlichen Verbindungen

Die Entfernung von AEA aus dem extrazellulären Raum weist trotz Lipophilie der Verbindung Eigenschaften eines carriervermittelten erleichternden Diffusionsprozesses auf. So erfolgt dieser schnell und selektiv, ist temperaturabhängig, sättigbar und unabhängig von Ionengradienten oder Energie (Di Marzo et al., 1994; Beltramo et al., 1997; Bisogno et al., 1997; Hillard et al., 1997; Rakshan et al., 2000). Zudem wurde kürzlich eine verkürzte zytosolische Variante der FAAH beschrieben (FLAT; FAAH-ähnlicher AEA-Transporter), die keine Amidaseaktivität besitzt, aber den AEA-Transport gewährt, wobei FLAT-mRNA in Hirn und Leber von Ratten, in Astrozyten und Neuroblastomzellen detektiert werden konnte (Fu et al., 2012). In einer anderen Studie konnten jedoch keine detektierbaren Konzentrationen von FLAT in den dort untersuchten

Gewebe des zentralen und peripheren Nervensystems gefunden werden (Leung et al., 2013), womit unklar bleibt, ob FLAT der gesuchte Transporter ist oder ob es noch andere Transportsysteme gibt. Die Aufnahme von 2-AG scheint über den gleichen Transporter wie die AEA-Aufnahme zu erfolgen (Beltramo und Piomelli, 1999; Bisogno et al., 2001; Hájos et al., 2004).

Cannabinoid-Rezeptoren

Der CB₁-Rezeptor wird v. a. im Gehirn exprimiert, was auch mit den von Cannabinoiden ausgelösten Effekten wie der Beeinträchtigung der kognitiven Fähigkeiten, die die Wahrnehmung, Erinnerung, Aufmerksamkeit, das Lernen und die Konzentration beinhalten, und der Störung der Kontrolle der motorischen Koordination übereinstimmt (Abood und Martin, 1992). Im Gegensatz dazu wird der CB₂-Rezeptor hauptsächlich in Zellen und Geweben des Immunsystems exprimiert (CB₁ mRNA-Level innerhalb des Immunsystems nur 1–10 % vom CB₂ mRNA-Gehalt). Somit wurde seine Expression v. a. in B- und Natürlichen Killer (NK)-Zellen und mit geringeren Konzentrationen auch in Monozyten, Neutrophilen und T-Zellen nachgewiesen (Galiègue et al., 1995). Weiterhin zeigten Galiègue et al., dass sowohl der CB₁- als auch der CB₂-Rezeptor, wenn auch in sehr geringen Konzentrationen, in peripheren Geweben wie der Nebennierendrüse, Lunge und Prostata, dem Herzen, Uterus und Pankreas und den Hoden exprimiert werden. Außerhalb der Peripherie wird der CB₂-Rezeptor von Mikrogliazellen des Gehirns (Núñez et al., 2004) und von anderen Neuronen des Zentralnervensystems exprimiert (Van Sickle et al., 2005; Beltramo et al., 2006; Gong et al., 2006). Die beiden eCB AEA und 2-AG können an beide CB-Rezeptoren binden. So verhält sich AEA an beiden Rezeptoren als partieller Agonist, besitzt zum CB₁- aber eine etwas höhere Affinität als zum CB₂-Rezeptor (Mechoulam et al., 1995; Showalter et al., 1996; Hillard et al., 1999). 2-AG agiert an beiden Rezeptoren als voller Agonist und besitzt wie AEA ebenfalls eine etwas höhere Affinität zum CB₁-Rezeptor (Mechoulam et al., 1995; Ben-Shabat et al., 1998; Sugiura et al., 2006).

Die Signaltransduktion über beide CB-Rezeptoren ist sensitiv gegenüber dem Pertussis-Toxin (Toxin aus *Bordetella pertussis* – Erreger des Keuchhustens), was eine Kopplung an G_{i/o}-Proteine zeigt. Die Aktivierung der G_{i/o}-Protein-gekoppelten CB-Rezeptoren führt zur Inhibition der Adenylatzyklase (Howlett et al., 1986; Felder et al., 1993 und 1995; Bayewitch et al., 1995; Slipetz et al., 1995) und zur Aktivierung der mitogenaktivierten Proteinkinase (MAPK) (Bouaboula et al., 1995 und 1996; Kobayashi et al., 2001; Galve-Roperh et al., 2002). Cannabinoide können über Aktivierung von CB-Rezeptoren auch die FAK (focal adhesion kinase), die ERK (extracellular-signal-regulated kinase) und die JNK (c-Jun N-terminal kinase) aktivieren (Howlett et al., 2002). Die Aktivierung von intrazellulären CB₁-Rezeptoren führt zur Freisetzung von

Ca^{2+} aus dem Endoplasmatischem Retikulum und den Lysosomen (Brailoiu et al., 2011). Der CB_1 -Rezeptor kann außerdem mit G_s -Proteinen interagieren. Demnach vermittelt er unter Bedingungen der Pertussis-Toxin-Behandlung, die die Interaktion mit $G_{i/o}$ blockiert, eine Stimulation der Adenylatzyklase und folglich eine cAMP-Akkumulation (Glass und Felder, 1997; Bonhaus et al., 1998). Der CB_1 -Rezeptor ist zudem negativ mit N-, P/Q- und L-Typ Ca^{2+} -Kanälen assoziiert, was zur Verringerung des Ca^{2+} -Influges in Zellen führt (Felder et al., 1993; Mackie et al., 1993; Twitchell et al., 1997; Gebremedhin et al., 1999). Des Weiteren ist er positiv mit nach innen gerichteten G-Protein-gekoppelten K^+ -Kanälen (Mackie et al., 1995; Vasquez et al., 2003) und mit spannungsabhängigen auswärts gerichteten A-Typ K^+ -Kanälen und negativ mit spannungsunabhängigen auswärts gerichteten D-Typ K^+ -Kanälen assoziiert (Mu et al., 1999). Es wurde auch gezeigt, dass AEA direkt, d. h. nicht über CB_1 , T-Typ Ca^{2+} -Kanäle (Chemin et al., 2001) und spannungsabhängige Na^+ -Kanäle inhibiert (Nicholson et al., 2003; Kim et al., 2005). Der CB_2 - kann wie der CB_1 -Rezeptor nach innen gerichtete K^+ -Kanäle koppeln, aber nicht konsistent und weniger effektiv (McAllister et al., 1999). Ansonsten scheint der CB_2 -Rezeptor keine Rolle bei der Modulation von Ionenkanälen zu spielen (Felder et al., 1995). Die Aktivierung von CB_1 -Rezeptoren auf zentralen und peripheren Nervenenden inhibiert die Freisetzung von Neurotransmittern wie z. B. Acetylcholin, Dopamin, Noradrenalin, 5-Hydroxytryptamin (5HT, Serotonin), γ -Aminobuttersäure (GABA), Glutamat und Aspartat (Schlicker und Kathmann, 2001; Pertwee und Ross, 2002).

Endocannabinoidähnliche Verbindungen und synthetische Cannabinoide

Die eCB-ähnlichen Verbindungen Palmitoylethanolamid (PEA) und Oleoylethanolamid (OEA) gehören wie AEA zur Familie der N-Acylethanolamine (Abb. 1-1). So erfolgt deren Biosynthese ebenfalls über die NAPE-PLD (Okamoto et al., 2004) und der Abbau wird von der FAAH und der NAAA (N-acylethanolamine-hydrolyzing acid amidase) katalysiert, wobei letztere OEA und AEA mit geringerer Effektivität als PEA hydrolysiert (Ueda et al., 2001). Im Gegensatz zu AEA besitzt PEA keine (Felder et al., 1993; Sugiura et al., 2000) und OEA wenn überhaupt nur eine sehr geringe Affinität zu den CB-Rezeptoren (Sheskin et al., 1997; Lambert et al., 1999). PEA vermittelt seine antinozizeptive Wirkung aber unter Beteiligung von CB_1 und TRPV1 (s. u.), wobei dies aus einer PEA-induzierten Inhibition der FAAH (Konkurrenz um katalytische Aktivität) resultieren könnte, was folglich zur Erhöhung der AEA-Konzentration führt und so die analgetische Wirkung verstärkt (Costa et al., 2008), eine Hypothese, die als 'entourage effect' bekannt ist. Sie besagt, dass PEA zusammen mit AEA die CB-Rezeptoren und TRPV1 aktiviert bzw. deren Aktivierung durch AEA verstärkt (Lambert und Di Marzo, 1999; Smart et al., 2002). OEA kann den TRPV1 direkt oder indirekt aktivieren, wobei

die direkte Aktivierung die Phosphorylierung des Kanals voraussetzt (Ahern, 2003) und die indirekte ebenfalls über eine erhöhte AEA-Konzentration erfolgen könnte, denn auch OEA kann die Aktivität der FAAH hemmen (Jonsson et al., 2003).

Neben Phyto- und Endocannabinoiden existiert auch eine Reihe von semi- und vollsynthetisch hergestellten Cannabinoiden (Abb. 1-2), die zur Erforschung CB-Rezeptor-abhängiger Effekte eingesetzt werden. Das hydrolysestabile Anandamid-Analogon (R)-(+)-Methanandamid (MA) besitzt wie AEA ebenfalls eine etwas höhere Affinität zum CB₁- als zum CB₂-Rezeptor (Lin et al., 1998) und aktiviert wie AEA auch TRPV1-Kanäle (Zygmunt et al., 1999; Breyne und Vanheel, 2006). JWH133 ist ein selektiver CB₂-Agonist (Huffman et al., 1999) ohne Affinität zu TRPV1 (Qin et al., 2008), wobei auch JWH015 und HU-308 zu den CB₂-selektiven Agonisten zählen (Showalter et al., 1996; Hanuš et al., 1999). Das synthetische Cannabinoid WIN55,212-2 wirkt sowohl über CB₁- als auch über CB₂-Rezeptoren (Felder et al., 1995; Showalter et al., 1996; Hillard et al., 1999) und zeigt nur einen sehr schwachen Effekt am TRPV1 (Qin et al., 2008). Die THC-Derivate CP55,940 und HU-210 binden ebenfalls mit ähnlichen Affinitäten an beide CB-Rezeptoren und wirken mit höherer Potenz als THC (Felder et al., 1995; Showalter et al., 1996; Hillard et al., 1999).

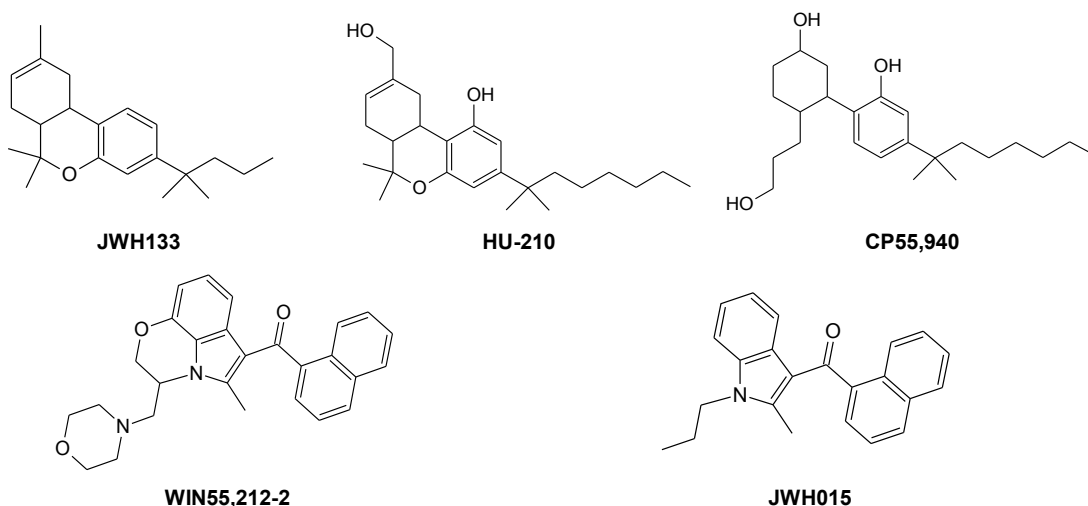


Abb. 1-2: Strukturformeln von synthetischen Cannabinoiden

Andere Ziele von Cannabinoiden

Neben der Aktivität an den CB-Rezeptoren besitzt AEA im Gegensatz zu 2-AG auch agonistische Aktivität am Vanilloid-Rezeptor TRPV1 (transient receptor potential vanilloid 1) (Zygmunt et al., 1999). TRPV1 ist ein nicht-selektiver Kationenkanal, der bei seiner Aktivierung den Influx von mono- und divalent Kationen, v. a. von Ca²⁺ ermöglicht (Caterina et al., 1997). Der TRPV1-Agonist Capsaicin (aus Chilischoten) reizt sensorische Neuronen durch direkte Aktivität am TRPV1 in deren Enden, was zur

Generation eines Aktionspotentials führt, das als brennender Schmerz wahrgenommen wird (Costa et al., 2004). Zudem wird TRPV1 auch durch Hitze ($> 43\text{ °C}$) und Protonen ($\text{pH} < 6$) aktiviert und spielt eine wichtige Rolle bei der Wahrnehmung von schädlichen Reizen und bei inflammatorischer Hyperalgesie (Tominaga et al., 1998; Caterina et al., 2000; Davis et al., 2000). TRPV1 wird nicht nur von sensorischen Neuronen, sondern auch von Neuronen im Gehirn und nicht-neuronalen Zellen wie Epithel-, Endothel-, glatten Muskel- und dendritischen Zellen sowie Lymphozyten, Keratinozyten, Osteoblasten, Hepatozyten und Fibroblasten exprimiert (Pertwee et al., 2010).

Weiterhin aktivieren AEA und 2-AG sowie andere Cannabinoide (PEA, CP55,940, THC, WIN55,212-2) den G-Protein-gekoppelten Rezeptor 55 (GPR55), dessen Expression v. a. in der Nebenniere, Teilen des Gastrointestinaltraktes und im Zentralnervensystem nachgewiesen wurde (Ryberg et al., 2007). Der GPR55 wurde erstmal 1999 isoliert und kloniert und seine Expression im Gehirn gezeigt (Sawzdargo et al., 1999). Ein weiteres Ziel für Cannabinoide stellen PPARs dar. PPARs (Peroxisome proliferator-activated receptors), von denen es drei Isotypen (α , δ und γ) gibt, gehören zur Familie der nukleären Rezeptoren. Sie heterodimerisieren mit dem Retinoid-X-Rezeptor und binden an DNA-Sequenzen, die PPREs (PPAR response elements), was die Transkription von Zielgenen induziert (O'Sullivan et al., 2009). Eine Aktivierung von PPARs beeinflusst den Lipidmetabolismus, das Essverhalten, die Neuroprotektion, Epilepsie, den circadianen Rhythmus, Entzündungsprozesse und kognitive Funktionen (Battista et al., 2012). So induzieren AEA und 2-AG durch Aktivierung von PPAR- γ die Differenzierung von Fibroblasten zu Adipozyten (Bouaboula et al., 2005; Rockwell et al., 2006). Darüber hinaus kann AEA mit Serotonin (5-Hydroxytryptamin; 5HT)-Rezeptoren interagieren (Kimura et al., 1998), die eine wichtige Rolle bei physiologischen und pathologischen Prozessen wie Angst, Depression, Kopfschmerz, Zwangsstörungen, Panik und der Immun- und kardiovaskulären Regulation spielen (Russo et al., 2005). Zusätzlich interagieren Cannabinoide mit Opioid-, nikotinischen Acetylcholin- und N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptoren (Demuth und Molleman, 2006).

1.2.3 Cannabidiol

Cannabidiol (CBD; Abb. 1-3) ist neben THC eine der Hauptkomponenten aus *Cannabis sativa* und wurde erstmals im Jahre 1940 isoliert (Adams et al., 1940). Die Aufklärung der Struktur und Stereochemie von CBD erfolgte dann in den 60er Jahren des 20. Jahrhunderts (Mechoulam und Shyo, 1963). CBD ist das wichtigste nicht-psychoaktive Phytocannabinoid aus *C. sativa* und kann bis zu 40 % des Pflanzenextraktes ausmachen (Campos et al., 2012). CBD besitzt trotz ähnlicher Struktur wie THC (Abb. 1-3), das mit ähnlichen Affinitäten an CB_1 - und CB_2 -Rezeptoren (nM-Bereich)

bindet (Felder et al., 1995; Bayewitch et al., 1996; Showalter et al., 1996), im Vergleich zu anderen Cannabinoiden nur eine sehr geringe Affinität zu diesen Rezeptoren (Showalter et al., 1996; Thomas et al., 1998; Bisogno et al., 2001). Zudem kann CBD den Vanilloid-Rezeptor TRPV1 aktivieren und induziert wie der TRPV1-Agonist Capsaicin den Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration (Bisogno et al., 2001), wohingegen THC keine Aktivität am TRPV1 zeigt (Qin et al., 2008).

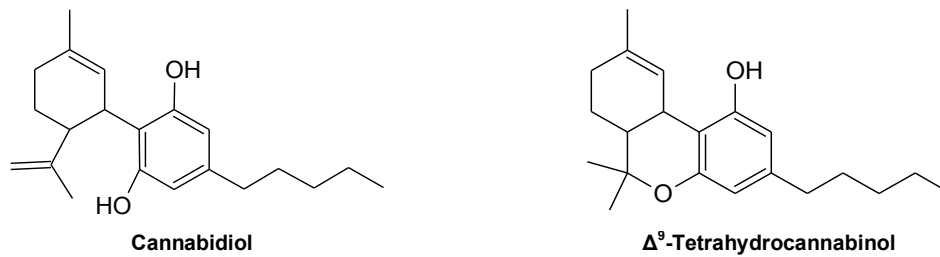


Abb. 1-3: Strukturformeln von CBD und THC

CBD gilt aufgrund seiner nicht-psychoaktiven Eigenschaft und seiner zahlreichen positiven Effekte als vielversprechende Verbindung für eine therapeutische Anwendung. So ist CBD Bestandteil des oromukosalen Sprays Sativex[®], das seit 2011 in Deutschland zur Behandlung von mittelschweren oder schweren therapieresistenten Spastiken bei Multiple Sklerose (MS)-Patienten zugelassen ist (Grotenhermen und Müller-Vahl, 2012). Sativex[®] setzt sich aus nahezu gleichen Anteilen THC und CBD zusammen, wobei jede 100 µl-Spraydosis 2,7 mg THC und 2,5 mg CBD enthält (Sativex[®] Product Monograph, 2012). Darüber hinaus ist Sativex[®] in Kanada auch zur Behandlung von neuropathischen Schmerzen bei MS und zur Behandlung fortgeschrittener opioidresistenter Tumorschmerzen zugelassen (Lee et al., 2013). Im Einklang mit dieser analgetischen Wirkung bei neuropathischen und Tumorschmerzen, wirkt CBD ebenfalls bei Hyperalgesie (Schmerzüberempfindlichkeit), wobei der TRPV1 bei der Vermittlung dieses Effektes involviert ist (Costa et al., 2004 und 2007). Des Weiteren wirkt CBD entkrampfend und hat daher therapeutisches Potential bei Epilepsie (Cunha et al., 1980; Consroe et al., 1981) und besitzt angstlösende Aktivität (Guimaraes et al., 1994; Moreira et al., 2006), die es über den 5HT_{1A}-Rezeptor vermittelt (Gomes et al., 2011). Außerdem wurde für CBD in diversen Arbeiten eine neuroprotektive Wirkung nachgewiesen (Braidia et al., 2003; Hayakawa et al., 2004), die zumindest teilweise auf seine antioxidativen Eigenschaften zurückzuführen ist und eine wichtige Rolle in Zusammenhang mit Parkinson (Lastres-Becker et al., 2005), Chorea Huntington (Sagredo et al., 2007), Alzheimer (Iuvone et al., 2004) und MS (Kozela et al., 2011) spielen könnte. Dabei wirkt CBD als Antioxidans effektiver als Ascorbinsäure oder α-Tocopherol (Hampson et al., 1998). Es wurde auch gezeigt, dass CBD *in vivo*

kardioprotektive Effekte bei myokardialer Ischämie (Minderdurchblutung oder Durchblutungsausfall eines Gewebes oder Organs) induziert und antiinflammatorische Wirkung besitzt (Durst et al. 2007). So vermittelt CBD durch eine Kombination von immunsuppressiven und antiinflammatorischen Aktivitäten blockierende Effekte bei der Progression der kollageninduzierten Arthritis, indem es die Lymphozytenproliferation supprimiert und die Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) inhibiert (Malfait et al., 2000). Dementsprechend wurden mit Sativex[®] auch Erfolge bei der Behandlung von neuropathischen Schmerzen bei rheumatoider Arthritis erzielt (Blake et al., 2006). Weiterhin induziert CBD die Migration und osteoblastische Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen, was bei osteodegenerativen Erkrankungen von Bedeutung sein könnte (Schmuhl et al., 2014). Abgesehen davon haben CBD, THC und andere Cannabinoide antibakterielle (bakteriostatisch, bakterizid) Aktivität gegenüber Bakterien der Gattung *Staphylococcus* und *Streptococcus* (Van Klingeren und Ten Ham, 1976; Appendino et al., 2008). Zudem besitzt CBD wie auch andere Cannabinoide antitumorogene Aktivität. So kann es Apoptose in Tumorzellen induzieren und deren Wachstum inhibieren, die Invasivität und Metastasierung der Zellen verringern und die Angiogenese hemmen (siehe 4.4). In diesem Zusammenhang wurde kürzlich auch gezeigt, dass CBD seine antiinvasive und antimetastatische Wirkung auf Lungentumorzellen über das interzelluläre Adhäsionsmolekül-1 (ICAM-1) vermittelt (Ramer et al., 2012), das auch bei der Interaktion von Tumor- mit Immunzellen eine entscheidende Rolle spielt (van de Stolpe und van der Saag, 1996).

1.3 Das Interzelluläre Adhäsionsmolekül ICAM-1

Das interzelluläre Adhäsionsmolekül ICAM-1 (CD54) ist ein 80 bis 114 kDa großes membrangebundenes Glykoprotein, wobei die Größe abhängig vom Grad der Glykolysierung (zelltypspezifisch) ist und eine vollständige Deglykolysierung ein Molekül von 60 kDa hervorbringt (Dustin et al., 1986; Rothlein et al., 1986; van de Stolpe und van der Saag, 1996). ICAM-1 gehört zur Immunoglobulinsuperfamilie und besitzt fünf Immunoglobulin(Ig)-ähnliche Domänen, eine kurze Transmembrandomäne und ein kurzes zytoplasmatisches C-terminales Ende, wobei jede Ig-Domäne eine β -Faltblattstruktur aufweist, die durch Disulfidbrücken stabilisiert wird (Abb. 1-4) (Staunton et al., 1990; van de Stolpe und van der Saag, 1996; Bella et al., 1998).

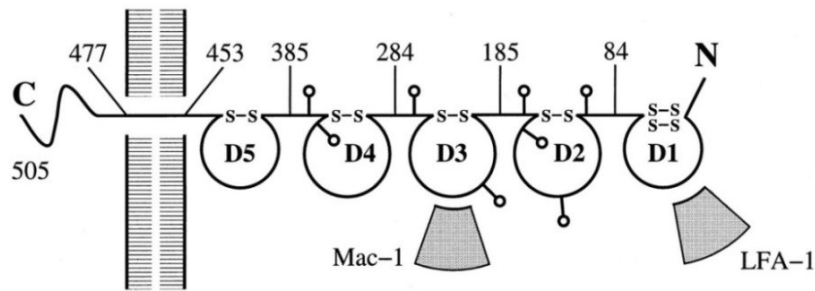


Abb. 1-4: Schematische Darstellung der Struktur von ICAM-1

Struktur von ICAM-1 mit den Bindestellen für LFA-1 und Mac-1; 'Lollipop'-Strukturen zeigen die Glykolisierungsstellen (modifiziert nach Bella et al., 1998).

Die Promotorregion des humanen ICAM-1-Gens enthält putative Erkennungssequenzen für viele Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B (nuclear factor- κ B), AP-1 und AP-2 (activator protein) und ISR (interferon-stimulated response) (Voraberger et al., 1991). Eine Expression von ICAM-1 wurde auf Endothel- und Epithelzellen, Fibroblasten und dendritischen Zellen im Thymus und Darm, in der Haut, Niere und Leber (Dustin et al., 1986) und auf Leukozyten wie Monozyten und aktivierten T-Lymphozyten nachgewiesen (Dougherty et al., 1988). Eine erhöhte ICAM-1-Konzentration konnte bei inflammatorischen Erkrankungen, Arteriosklerose, Ischämie, septischem Schock, allogenen Organtransplantaten und in Geweben mit bösartigen Tumoren detektiert werden (van de Stolpe und van der Saag, 1996). Dementsprechend wurde ICAM-1 auf der Oberfläche von vielen primären Tumoren und Tumorzelllinien wie Kolonkarzinom- (Kelly et al., 1992; Shibata et al., 1996), Pankreaskarzinom- (Schwaelbe et al., 1993) und Magenkrebszellen (Koyama et al., 1992), Melanomen (Johnson et al., 1989; Natali et al. 1990), Lymphomen (Billaud et al., 1987), Nierenzellkarzinomen (Tomita et al., 1990), Lungen- (Melis et al., 1996) und Brustkrebszellen (Fox et al., 1995) nachgewiesen. Die Expression von ICAM-1 kann durch Zytokine wie IL-1 α und β , IFN- γ und TNF- α induziert werden und ist somit v. a. unter inflammatorischen Bedingungen erhöht (Dustin et al., 1986; Pober et al., 1986; Fabry et al., 1992; Chen et al., 2001). Demnach haben Zytokine, die von aktivierten Lymphozyten abgegeben werden, das Potential, die ICAM-1-Expression lokal hoch zu regulieren und so die Lymphozyten-Tumorzelladhäsion zu erhöhen (Kelly et al., 1992). Zudem gelten Retinsäure, Virusinfektionen und oxidativer Stress (H_2O_2) als Induktoren der ICAM-1-Expression (Bassi et al., 1995; van de Stolpe und van der Saag, 1996). Darüber hinaus wird die Hochregulation von ICAM-1 in Endothelzellen durch Trombospondin-1 (Narizhneva et al., 2005) und das Zytostatikum Cisplatin (Yu et al., 2008) stimuliert, was in beiden Fällen zu einer erhöhten Leukozytenadhäsion führte.

Eine Schlüsselfunktion von ICAM-1 liegt in der Induktion der spezifischen und reversiblen Zell-Zell-Adhäsion, die der interzellulären Kommunikation dient. So spielt

ICAM-1 eine wichtige Rolle bei Zell-Zell-Interaktionen zwischen zytotoxischen T- und ihren Zielzellen, während der Antigenpräsentation und bei der transendothelialen Migration von inflammatorischen Zellen aus dem Blut ins Gewebe zum Ort der Inflammation (van de Stolpe und van der Saag, 1996; Hubbard und Rothlein, 2000). ICAM-1 ist nicht nur Adhäsionsmolekül, sondern auch costimulatorisches Molekül, das zur Aktivierung von zytotoxischen T-Lymphozyten und NK-Zellen beiträgt (Van Seventer et al., 1990; Chong et al., 1994). Weiterhin ist ICAM-1 bei der mikrobiellen Pathogenese von Bedeutung, da es als Ligand für Rhinoviren und *Plasmodium falciparum*-infizierte Erythrozyten dient (Staunton et al., 1990; Berendt et al., 1992; Hubbard und Rothlein, 2000). Darüber hinaus wird ICAM-1 eine Funktion als Signalmolekül bei der Weiterleitung von Signalen von außerhalb der Zelle über die Membran in die Zelle ('outside-in signaling') zugeschrieben. Dabei können durch die Bindung von ICAM-1 spezifische Kinasen (MAPK, ERK1, ERK2) aktiviert werden, was wiederum eine Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, eine erhöhte Zytokinproduktion (z. B. IL-1), eine verstärkte Expression von Zellmembranproteinen (ICAM-1, VCAM-1), die Produktion von ROS und eine veränderte Zellproliferation zur Folge hat (Hubbard und Rothlein, 2000).

In seiner Eigenschaft als Adhäsionsmolekül bindet ICAM-1 an die Mitglieder der β_2 -Integrine LFA-1 (lymphocyte function associated antigen-1; CD11a/CD18) (Marlin und Springer, 1987) und Mac-1 (macrophage-1 antigen; CD11b/CD18) (Diamond et al., 1993), die von Leukozyten exprimiert werden (Abb. 1-4). Der wichtigste Bindungspartner von ICAM-1 ist das Protein LFA-1, welches insbesondere von Monozyten bzw. Makrophagen, CTLs, NK- und LAK-Zellen exprimiert wird (Springer, 1990; Melis et al., 1996). Die Bindung von LFA-1-exprimierenden Zellen an ICAM-1 ist temperaturabhängig und benötigt metabolische Energie, ein intaktes Zytoskelett und die Anwesenheit von extrazellulären Mg^{2+} (Marlin und Springer, 1987). LFA-1 besteht aus zwei nicht-kovalent assoziierten Untereinheiten (UE), der α -UE mit 180 kDa und der β -UE mit 95 kDa (Kishimoto et al., 1989). Die Bindestelle für LFA-1 befindet sich in D1 von ICAM-1 (Abb. 1-4) (Staunton et al., 1990) und die für die ICAM-1-Bindung wichtige Bindestelle von LFA-1 ist auf Domäne 1 der α -UE lokalisiert (Huang und Springer, 1995). Der LFA-1-Komplex ist essentiell für die zellvermittelte Zytotoxizität von CTLs und NK-Zellen (Davignon et al., 1981; Sanchez-Madrid et al., 1982; Patarroyo und Makgoba, 1989) und bildet einen Teil der immunologischen Synapse zwischen Lymphozyten und Antigenpräsentierenden Zellen sowie zwischen zytotoxischen Lymphozyten und ihren Zielzellen (Grakoui et al., 1999; Orange, 2008). Durch Inhibitionsversuche mit gegen ICAM-1 und LFA-1 gerichteten Antikörpern konnte schon in frühen Arbeiten eine Interaktion dieser beiden Proteine gezeigt werden. So führte die Inkubation von Fibroblasten mit einem ICAM-1-Antikörper und umgekehrt die

Inkubation von aktivierten T-Lymphozyten mit einem LFA-1-Antikörper zu einer Inhibition der Adhäsion zwischen diesen beiden Zellen (Dustin et al., 1986). In Zusammenhang mit der Immunüberwachung von Tumoren inhibierten gegen ICAM-1 bzw. LFA-1 gerichtete Antikörper sowohl die Adhäsion von Lymphozyten an Kolonkarzinomzellen (Kelly et al., 1992) als auch die zytotoxische Lyse von Melanomzellen durch tumorinfiltrierende Lymphozyten (Pandolfi et al., 1992). Darüber hinaus zeigen einige Studien eine erhöhte Anfälligkeit von Tumorzellen gegenüber der Adhäsion von Lymphozyten und der durch sie vermittelten Zytotoxizität nach Transfektion mit oder Hochregulation von ICAM-1 (Vánky et al., 1990; Naganuma et al., 1991; Melis et al., 1996; Sunami et al., 2000). Umgekehrt verringert die Herunterregulation von ICAM-1 sowohl die Lymphozytenadhäsion an Tumorzellen als auch deren zytotoxische Lyse (Sawada et al., 2006). Im Einklang damit korreliert eine ICAM-1-Expression in einigen klinischen Studien negativ mit der Metastasierung von verschiedenen Krebstypen (Ogawa et al., 1998; Maeda et al., 2002).

Neben der membrangebundenen existiert auch eine lösliche Form von ICAM-1 (sICAM-1 für soluble ICAM-1), die durch Abspaltung an Aminosäure 453 entsteht (Abb. 1-4) und dem extrazellulärem Teil, der aus den fünf Ig-ähnlichen Domänen besteht, entspricht (Staunton et al., 1990). So bleibt in der Zellmembran von humanen Nierenzellen nach Stimulation mit einem Phorbolster und auf Endothelzellen nach Stimulation mit TNF- α ein 7 kDa großer ICAM-1-Rest zurück, wobei die Abspaltung von sICAM-1 durch MAP-Kinasen, die Src-Tyrosinkinase und den Phosphoinositid-3-Kinase-Signalweg reguliert wird (Tsakadze et al., 2004). Dabei sind in den Spaltungsprozess Matrixmetalloproteinasen (MMP) involviert, wobei die Abspaltung direkt durch die MMP-9 erfolgen kann (Lyons und Benveniste, 1998; Fiore et al., 2002). sICAM-1 wird v. a. eine antiinflammatorische Rolle als kompetitiver Inhibitor der Interaktion von aktivierten Leukozyten mit membrangebundenem ICAM-1 zugesprochen (Tsakadze et al., 2004; Sapna und Shivakumar, 2007). Zudem fördert sICAM-1 die Angiogenese und kann so zum Tumorwachstum und zur Metastasierung beitragen (Gho et al., 1999). Weiterhin induziert sICAM-1 die Produktion von TNF- α , IFN- γ , IL-6 und macrophage inflammatory protein-2 und scheint somit auch proinflammatorische Aktivität zu haben (Schmal et al., 1998; Tsakadze et al., 2004). Die Zytokine IFN- γ , IL-1 α und TNF- α wiederum stimulieren die Freisetzung von sICAM-1 durch verschiedene Zelltypen wie Endothel- und glatte Muskelzellen, Keratinozyten, bronchiale Epithelzellen, Lungenfibroblasten, Astrozyten (Lyons und Benveniste, 1998; Leung, 1999) und Krebszellen (Giavazzi et al., 1992). Eine erhöhte Expression bzw. Abgabe von sICAM-1 konnte für verschiedene Tumore wie Darm- (Dippold et al., 1993; Toiyama et al., 2008), Pankreas- (Schwaeble et al., 1993), Lungen- (De Vita et al., 1998) und Brustkrebs

(Zhang und Adachi, 1999), maligne Lymphome (Abdelrazik et al., 2008), Melanome (Harning et al., 1991) und Nierenzellkarzinome (Heicappel et al., 1994) gezeigt werden. Weiterhin konnte eine erhöhte Serumkonzentration von sICAM-1 u. a. auch bei Rheumatoider Arthritis (Cush et al., 1993), Autoimmunhepatitis und Leberzirrhose (Thomson et al., 1994), akuter *Plasmodium falciparum*-Malaria (Hviid et al., 1993) und Multipler Sklerose (Tsukada et al., 1993) detektiert werden.

1.4 Das Immunsystem

Das Immunsystem ist ein komplexes Netzwerk, das sich aus einer Reihe von unterschiedlichen Zellen zusammensetzt, die untereinander entweder direkt oder über verschiedene Effektormoleküle kommunizieren und so die Abwehr von Pathogenen (Bakterien, Pilze, Parasiten) und entarteten Zellen vermitteln. Es lässt sich in die angeborene und adaptive (erworbene) Immunität unterteilen. Zellen des angeborenen Immunsystems sind dendritische Zellen (DCs), NK-Zellen, Makrophagen, Granulozyten und Mastzellen. Die adaptive Immunität besteht aus B- und T-Lymphozyten, bildet das immunologische Gedächtnis und ist im Gegensatz zur angeborenen Immunität sehr spezifisch. Innerhalb des angeborenen Immunsystems sind v. a. DCs, Makrophagen und Mastzellen dafür verantwortlich, ihre Umgebung nach abnormalen Signalen zu überprüfen. Sobald die Homöostase im Gewebe gestört ist, sezernieren Makrophagen und Mastzellen Mediatoren wie Zytokine, Chemokine (chemotaktisch aktive Zytokine), MMPs, ROS und Histamin, die alle die Mobilisierung und Infiltration von zusätzlichen Leukozyten in das geschädigte Gewebe induzieren (de Visser et al., 2006).

1.4.1 Überblick über Immunzellen und deren Funktion

Zur ersten Abwehrlinie des Immunsystems zählen Makrophagen, deren wichtigste Aufgabe die Phagozytose und Eliminierung von Mikroorganismen ist, die sie aufgrund von Oberflächenstrukturen (z. B. Lipopolysacchariden) erkennen. Nach der Erkennung von Pathogenen setzen sie proinflammatorische Zytokine und Chemokine (IL-1 α , TNF- α) frei, die die Entzündungsreaktion unterstützen und weitere Immunzellen zum Ort der Inflammation rekrutieren. Makrophagen agieren wie DCs als Antigenpräsentierende Zellen (APCs) und aktivieren so T- und B-Lymphozyten. Dabei nehmen DCs fremde Antigene auf und präsentieren sie über MHC-II-Moleküle (major histocompatibility complex II) den Zellen des adaptiven Immunsystems (Cella et al., 1997), womit sie ein Bindeglied zwischen angeborener und adaptiver Immunität darstellen. Zusätzlich zu den DCs tragen auch NK-Zellen zur Kommunikation zwischen angeborener und adaptiver Immunität bei, indem sie die Aktivität von DCs positiv (Reifung) oder negativ

(Eliminierung) beeinflussen (Raulet et al., 2004). Granulozyten werden aufgrund ihrer Färbungseigenschaften der Granula in neutrophile, basophile und eosinophile unterteilt und sind v. a. an der Beseitigung von Pathogenen beteiligt. Dabei sind insbesondere die neutrophilen Granulozyten in der Lage, Pathogene zu phagozytieren und diese in intrazellulären Vesikeln zu zerstören (Segal, 2005). Mastzellen spielen bei allergischen Reaktionen eine Rolle und tragen zur Pathogenabwehr bei (Galli et al., 2005).

Die Induktion der adaptiven Immunantworten wird durch eine direkte Interaktion mit reifen APCs und eine proinflammatorische Umgebung vermittelt. Zellen des adaptiven Immunsystems unterscheiden sich von Zellen der angeborenen Immunität durch die Expression von antigenspezifischen Rezeptoren, deren Aktivierung für ihre Differenzierung, Proliferation und anschließende Ausübung ihrer Effektorfunktion notwendig ist (de Visser et al., 2006). B-Lymphozyten werden nach Antigenbindung an einen Rezeptor und durch stimulatorische Signale von T-Helferzellen zur Proliferation aktiviert und differenzieren zu Plasmazellen, die Effektorform der B-Lymphozyten. Aktivierte B-Lymphozyten produzieren dann spezifische Antikörper (Immunglobuline), die nach Freisetzung an die entsprechenden Antigene auf den Zielzellen binden und diese für die ADCC (antibody-dependent cell cytotoxicity) markieren (McHeyzer-Williams, 2003; Oracki et al., 2010). T-Lymphozyten sind mit ihren spezifischen T-Zell-Rezeptoren nur dann in der Lage, Antigene zu erkennen, wenn ihnen diese durch Oberflächenmoleküle, die MHC-Moleküle, präsentiert werden, wobei diese in zwei Klassen unterteilt werden. Die MHC-Klasse-I-Moleküle werden von allen Zellen, die einen Zellkern besitzen, exprimiert. Sie präsentieren den zytotoxischen $CD8^+$ -T-Lymphozyten fremdartige Peptide von infizierten oder entarteten Zellen (Townsend und Bodmer, 1989). MHC-Klasse-II-Moleküle kommen nur auf APCs vor und präsentieren den $CD4^+$ -T-Helferzellen Peptide, die von phagozytierten Pathogenen, Tumor- und abgestorbenen Zellen stammen (Unanue und Allen, 1987). T-Lymphozyten sind durch eine $CD3$ -Oberflächenexpression gekennzeichnet (van Agthoven et al., 1981; Clevers et al., 1988) und werden aufgrund ihrer Funktion in drei Subpopulationen unterteilt, die regulatorischen und zytotoxischen T-Lymphozyten und die T-Helferzellen. Die $CD4^+$ -T-Helferzellen werden angesichts ihrer Zytokinsekretion und Effektorfunktion in T_H1 -, T_H2 - und T_H17 -Zellen unterteilt. T_H1 -Zellen produzieren v. a. IL-2, IFN- γ und TNF- β , tragen durch Aktivierung von Makrophagen und Lymphozyten zur Inflammation bei und fördern die Differenzierung von $CD8^+$ -T-Lymphozyten zu zytotoxischen Zellen. T_H2 -Zellen sezernieren v. a. IL-3 bis 6, sind an humoralen Immunantworten beteiligt und aktivieren demnach insbesondere die Antikörperproduktion von B-Zellen (Abbas et al., 1996; Mosmann und Sad, 1996). Die T_H17 -Zellen sind durch ihre hohe Produktion von IL-17, das die Produktion proinflammatorischer Zytokine, Chemokine und MMPs induziert und

so zur Inflammation und Abwehr von extrazellulären Pathogenen beiträgt, charakterisiert (Bettelli et al., 2008). Regulatorische T-Lymphozyten spielen bei der negativen Regulation von Immunantworten und der Aufrechterhaltung der Selbst-Toleranz eine wichtige Rolle. Sie bewahren den Organismus vor Autoimmunerkrankungen und inhibieren inflammatorische Erkrankungen wie Asthma (Thompson und Powrie, 2004).

In Bezug auf die Abwehr bzw. Eliminierung von Tumorzellen sind v. a. zytotoxische CD8⁺-T-Lymphozyten und NK-Zellen von essentieller Bedeutung.

Zytotoxische T-Lymphozyten (CTLs) benötigen neben der T-Zell-Rezeptor-Ligation mit spezifischen Peptiden, die von MHC-I-Molekülen präsentiert werden, eine Costimulation (z. B. durch CD40, CD80, CD86) und Zytokinsignale wie IL-12, um aktiviert zu werden und eine effiziente Antwort zu generieren. CTLs sind durch ihre Zytokinproduktion (IFN- γ und TNF) und Effektorfunktion der zytotoxischen Lyse charakterisiert (Hoves et al., 2010). Aktivierte T-Zellen produzieren IL-2, das wiederum die Proliferation dieser Zellen stimuliert, wohingegen ruhende T-Zellen nicht auf exogen zugefügtes IL-2 reagieren (Smith et al., 1988). IL-2 ist zudem notwendig für die Aufrechterhaltung der zytotoxischen Aktivität der T-Lymphozyten.

NK-Zellen sind Teil der ersten Abwehrlinie innerhalb der angeborenen Immunität und machen 10–15 % der im Blut zirkulierenden Lymphozyten aus. Sie sind durch ihre Oberflächenexpression von CD56 und das Fehlen von CD3 charakterisiert und exprimieren den IL-2-Rezeptor, der die proliferative Wirkung von IL-2 vermittelt (Cooper et al., 2001). NK-Zellen sind die wichtigsten Produzenten des Zytokins IFN- γ , das die Aktivierung von an der Immunantwort beteiligten Immunzellen fördert. Darüber hinaus produzieren sie sowohl proinflammatorische (wie TNF- α , IL-3) als auch immunsuppressive (wie IL-10) Zytokine und viele Chemokine (z. B. IL-8) (Vivier et al., 2011). Die von NK-Zellen produzierten Zytokine TNF- α und IFN- γ sind an der Reifung von DCs beteiligt und umgekehrt verstärkt das von DCs abgegebene IL-18 die lytische und sekretorische Funktion von NK- und LAK-Zellen (Moretta et al., 2005; Capobianco et al., 2006). Die Regulation der NK-Zell-Funktion erfolgt über die Balance von aktivierenden und inhibitorischen Rezeptoren sowie durch Adhäsions- und costimulatorische Moleküle. Inhibitorische Rezeptoren erkennen v. a. selbst-MHC-I-Moleküle und aktivierende Rezeptoren interagieren mit virus-, stress- oder transformationsinduzierten Liganden. Die 'richtige' Kombination von aktivierenden und inhibitorischen Signalen und von Adhäsionsmolekülen zwischen NK- und Zielzellen ist entscheidend für die Bildung einer immunologischen Synapse und die NK-Zell-vermittelte Lyse von Zielzellen (Lanier, 2005). Inhibitorische Rezeptoren wie die Killerzell-Ig-ähnlichen Rezeptoren (KIRs) und die Leukozyt-Ig-ähnlichen Rezeptoren (LILRs) sind entweder spezifisch für MHC-I-Moleküle, die konstitutiv von den meisten gesunden Zellen exprimiert

werden, oder binden nicht-MHC-Liganden. So sind NK-Zellen in der Lage, 'missing self' und somit transformierte Zellen zu erkennen, die die Expression von MHC-I herunterreguliert haben, um der Erkennung durch CTLs zu entgehen. Dementsprechend töten NK-Zellen Tumorzellen, die keine MHC-I-Moleküle auf ihrer Oberfläche exprimieren, wohingegen sie einige Tumorzellen mit MHC-I-Expression verschonen (Lanier, 2008). Anfang der 1980er Jahre wurde gezeigt, dass IL-2 die Bildung von zytotoxischen Zellen, den Lymphokin-aktivierten Killer (LAK)-Zellen, bewirkt (Grimm et al., 1982 und 1983). LAK-Zellen sind nicht-adhärente Zellen mit nicht-MHC-abhängiger zytotoxischer Aktivität und besitzen die Fähigkeit, frisch isolierte und NK-Zell-resistente Tumorzellen zu lysieren (Grimm et al., 1982). So lysieren LAK-Zellen sowohl MHC-I-positive als auch MHC-I-negative Zielzellen, wohingegen NK-Zellen nur MHC-I-negative und CTLs nur MHC-I-positive Zielzellen lysieren. Die LAK-Zell-Aktivität von Lymphozyten lässt sich v. a. der NK-Zell-Stimulation mit IL-2 zuschreiben, wobei aber auch T-Zellen zur Zytotoxizität beitragen können (Herberman et al., 1987). Die phänotypische Analyse von LAK-Zellen zeigte, dass es sich um eine heterogene Population handelt, die sich v. a. aus CD3⁺CD56⁺(NK-LAK)-, CD3⁺CD56⁺(NKT-LAK)- und CD3⁺CD56⁻(T-LAK)-Zellen zusammensetzt (West et al., 2011). Zudem veränderte sich das Verhältnis der drei Subpopulationen während der Kultivierung der PBMCs mit IL-2, wobei sich die Anzahl von NK-Zellen in der LAK-Zell- im Vergleich zur PBMC-Population verdoppelte, die der NKT-Zellen etwa verdreifachte und die Anzahl von T-Zellen sich etwas verringerte. Diese Phänotypisierung suggeriert, dass NK-Zellen die primären Effektorzellen innerhalb der LAK-Zellen sind, wobei auf allen Subpopulationen die Expression von LFA-1, die durch Kultivierung mit IL-2 zunahm, nachgewiesen werden konnte (West et al., 2011). Um LAK-Zellen für Laborversuche zu erhalten, werden PBMCs normalerweise 7–10 Tage mit IL-2 inkubiert, Bedingungen, die das Wachstum und die Proliferation von NK-Zellen nicht aber von CTLs, die eher dem induzierten Zelltod unterliegen, favorisieren (Hoves et al., 2010). Eine LAK-Zell-Aktivität ist nach 2–3 Tagen nachweisbar, steigt nach fünf Tagen an und bleibt bis über den siebten Tag hinaus erhalten (Grimm et al., 1982).

1.4.2 Mechanismen der zytotoxischen Lyse und Tumormunüberwachung

Bei der Tumorabwehr sind NK-Zellen und CTLs von wichtiger Bedeutung. Sie können Apoptose in Zielzellen durch zwei unterschiedliche Signalwege auslösen, den Todesrezeptor-Signalweg und den Perforin/Granzym-Weg.

Todesrezeptoren gehören zur Familie der Tumornekrosefaktor (TNF)-Rezeptoren und besitzen cysteinreiche extrazelluläre Domänen und eine zytoplasmatische Domäne,

die 'death domain' (Locksley et al., 2001), die eine wichtige Rolle bei Übermittlung des tödlichen Signals von der Zelloberfläche in das Zellinnere spielt. Am besten charakterisiert sind folgende Liganden (L) und ihre entsprechenden Rezeptoren (R): FasL/FasR, TNF- α /TNFR1, Apo3L/DR3, Apo2L/DR4 und Apo2L/DR5 (Fas = fatty acid synthetase; D = death). Nach Bindung eines Liganden an seinen Rezeptor werden zytoplasmatische Adapterproteine rekrutiert, die mit ihrer korrespondierenden Todesdomäne an den Rezeptor binden. Dabei resultiert die Bindung von FasL an FasR in der Assoziation des Adapterproteins FADD (Fas-associated death domain) und die von TNF- α an TNFR in der Bindung des Adapterproteins TRADD (TNF receptor-associated death domain) mit anschließender Assoziation von FADD und RIP (receptor-interacting protein). FADD dimerisiert dann über die Todeseffektordomäne mit Procaspase-8 und es kommt zur Bildung des death-inducing signaling complex (DISC), was zur autokatalytischen Aktivierung der Initiatorcaspase-8 führt, wodurch dann über Caspase-3 die Exekutionsphase der Apoptose eingeleitet wird (Elmore, 2007).

Dem Töten von Zellen durch den Perforin/Granzym-Weg geht die Bildung einer sogenannten immunologischen Synapse zwischen Effektor- und Zielzelle voraus. Die immunologische Synapse wurde ursprünglich als entscheidende Kontaktstelle zwischen einer T-Zelle und einer APC, an der T-Zell-Rezeptoren (TCRs) mit MHC-Molekülen interagieren, definiert. Spätere Studien konnten immunologische Synapsen aber auch zwischen verschiedenen Typen des Immunsystems und zwischen Immun- und Nicht-Immunzellen beobachten (Orange, 2008). Der Perforin/Granzym-vermittelte Weg ist der Schlüsselmechanismus für die Beseitigung von virusinfizierten und entarteten Zellen, wobei NK-Zellen und CTLs einen ähnlichen Mechanismus für das Töten von Zielzellen haben, der in der polarisierten Sekretion von zytotoxischen Granula, die Perforin und Granzyme (Serinproteasen) enthalten, resultiert. Im Gegensatz zu NK-Zellen, die konstitutiv zytotoxische Aktivität besitzen, benötigen naive CD8⁺-T-Zellen nach der Antigenerkennung einige Tage, um zu CTLs zu differenzieren, zu proliferieren und zum betroffenen Gewebe zu migrieren, wobei erst während des Differenzierungsprozesses Granzyme und Perforin synthetisiert und in zytotoxischen Granula gespeichert werden (de Saint Basile et al., 2010). Die reife immunologische Synapse zwischen T- und Zielzellen hat eine charakteristische Rezeptororganisation mit einem zentralen Cluster von TCRs (central supramolecular activation cluster (cSMAC)), der von einem Ring aus Adhäsionsmolekülen (peripheral SMAC (pSMAC)) umgeben ist (Abb. 1-5). Die Bildung der Zell-Zell-Kontakt-stabilisierenden pSMAC-Region wird durch ICAM-1/LFA-1-Interaktion vermittelt und verstärkt die Effektivität der Zielzellyse (Beal et al., 2008). Die zytotoxischen Granula sind an Mikrotubuli verankert und wandern bei Kontakt mit einer Zielzelle zusammen mit dem MTOC (microtubule

organizing center) in Richtung immunologischer Synapse. Im Anschluss an diese polarisierte Ausrichtung docken die zytotoxischen Granula an die Plasmamembran an und es folgt die Exozytose des Granulainhaltes mit Perforin, Granzymen, anderen membranzerstörenden Bestandteilen, Chemokinen und Strukturelementen (wie Chondroitinsulphat-Proteoglykane), die ein Kristallgitter bilden, an das die meisten Toxine durch elektrostatische Interaktionen gebunden sind (Voskoboinik et al., 2006; de Saint Basile et al., 2010). Dabei wird die Exozytose durch den nach Zielzellerkennung initiierten Ca^{2+} -Influx in die Lymphozyten ausgelöst. Im synaptischen Spalt verursacht die porenbildende Aktivität von Perforin eine Permeabilisierung der Zielzellmembran, was eine Diffusion von extrazellulärem Milieu mit den darin enthaltenen Granzymen in die Zielzelle zur Folge hat (Abb. 1-5). Dort spalten die Granzyme Caspasen und initiieren die Apoptose der Zelle, die innerhalb von 2 min der Perforin-Permeabilisierung durch Zielzellabrundung sichtbar wird, so dass in kurzer Zeit eine letale Menge Granzyme in die Zielzelle gelangen können (Lopez et al., 2013). Die u. a. über ICAM-1 und LFA-1 vermittelte stabile Adhäsion der pSMAC ist essentiell für die Aufrechterhaltung des synaptischen Spaltes, der die lokal hohe Konzentration von zytotoxischen Proteinen sichert und schädliche Effekte auf Nachbarzellen verhindert (de Saint Basile et al., 2010).

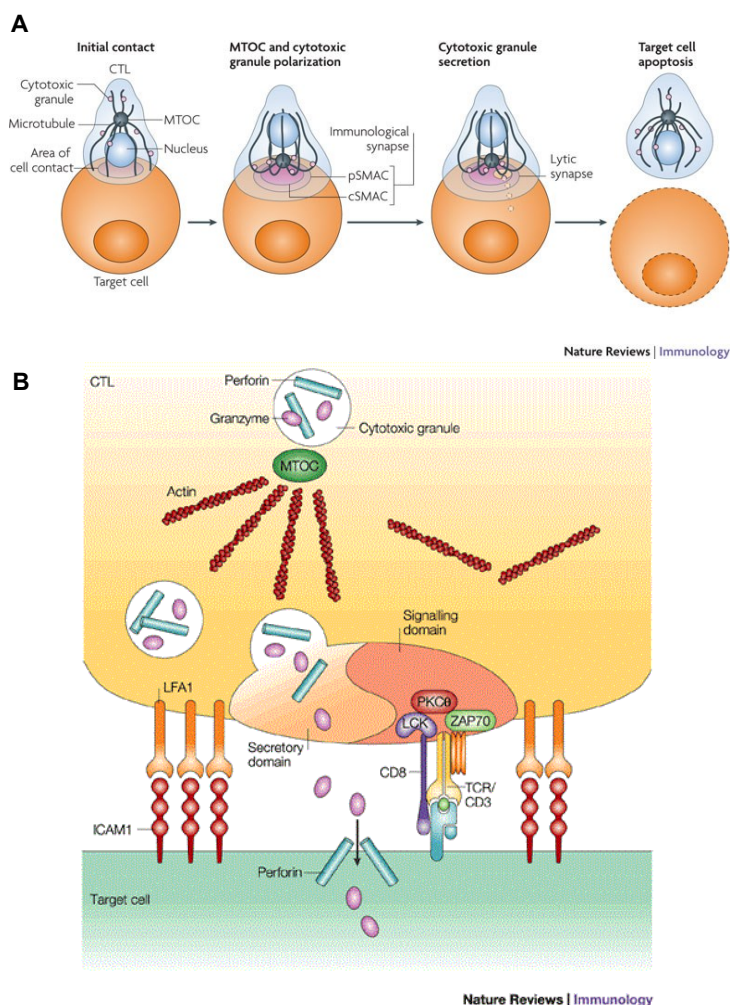


Abb. 1-5: Zytotoxische Lyse von Zielzellen über den Perforin/Granzym-Weg

(A) Überblick über den Ablauf der zytotoxischen Lyse (aus de Saint Basile et al., 2010). Nach Erkennung der Zielzelle bildet sich eine immunologische Synapse, die aus einem Cluster von Rezeptoren (supramolecular activation complex (cSMAC)) und einem peripheren integrinreichen Ring (peripheral SMAC (pSMAC)) besteht. Es kommt zur polarisierten Ausrichtung der MTOC (microtubule organizing centre) mit den an die Mikrotubuli verankerten Granula und zur Exozytose des Granulainhaltes in den sekretorischen Spalt (gelb).

(B) Immunologische Synapse mit sekretorischer Domäne (aus Lieberman, 2003). Die Signaldomäne entspricht der cSMAC und die pSMAC wird durch LFA-1/ICAM-1-Interaktion vermittelt. Nach Exozytose des Granulainhaltes kommt es durch die porenbildende Aktivität von Perforin zur Permeabilisierung der Zielzellmembran, so dass Granzyme in die Zelle gelangen und dort Apoptose auslösen.

Die Perforin-Porenbildung, die Ca^{2+} -abhängig erfolgt (Masson und Tschopp, 1985), basiert auf der elektrostatischen Interaktion zwischen Perforin-Monomeren und die entstehende Pore ist mit einem Durchmesser von rund 20 nm groß genug für Granzym-Monomere und -Dimere (Hoves et al., 2010). Der saure pH-Wert innerhalb der Granula sorgt dafür, dass Perforin inaktiv bleibt, so dass die Immunzellen vor der Zerstörung der Granulamembran und damit der Initiation der Apoptose durch Granzyme geschützt sind (Voskoboinik et al., 2005). Granzym B hat unter den Granzymen die stärkste proapoptotische Funktion, es spaltet Substrate nach Aspartatresten und kann Caspasen direkt aktivieren (Voskoboinik et al., 2006). Granzym B-defiziente NK-, LAK-Zellen und CTLs sind in ihrer Fähigkeit, Apoptose in Zielzellen zu induzieren, eingeschränkt (Shresta et al., 1995). Granzym A kann den Zelltod unabhängig von Caspasen induzieren. Eine proapoptotische Funktion wurde auch für Granzym C und M beschrieben, nicht aber für die Granzyme D-G (nur in Maus), das Granzym H oder K (Voskoboinik et al., 2006). Granulysin, ein ebenfalls in den Granula NK-Zellen und CTLs vorkommendes Protein, besitzt zytolytische Aktivität gegenüber Pathogenen und Tumorzellen und kann ebenfalls Apoptose auslösen (Gamen et al., 1998; Stenger et al., 1998).

In Zusammenhang mit der Tumormunüberwachung spielen Perforin bzw. zytotoxische Lymphozyten (NK- und T-Zellen) folglich eine entscheidende Rolle. Die essentielle Bedeutung der perforinabhängigen zytotoxischen Aktivität bei der Immunüberwachung von Krebs konnte anhand perforindefizienter Mäuse, die die Fähigkeit der Tumorsuppression verlieren, gezeigt werden (Bolitho et al., 2009). So entwickeln perforindefiziente Mäuse spontan B-Zell-Lymphome, wenn sie altern (Trapani und Smyth, 2002) und sind anfälliger gegenüber der induzierten Tumorbildung als Wildtyp-Mäuse (van den Broek et al., 1996; Smyth et al., 2000; Street et al., 2001). Darüber hinaus konnte bei perforindefizienten Mäusen im Vergleich zu Kontrollmäusen eine höhere Anzahl von Lungenmetastasen nachgewiesen werden (Smyth et al., 1999). Menschen mit Mutationen im Perforin entwickeln die sogenannte Familiäre Hämophagozytische Lymphohistiozytose (FHL), die mit einer stark verringerten oder nicht vorhandenen Aktivität von CTLs und NK-Zellen einhergeht (Trapani und Smyth, 2002). Zudem sind FHL-Patienten prädisponiert gegenüber der Entwicklung von bösartigem hämatologischen Krebs (Chia et al., 2009). Darüber hinaus ist bei der Tumormunüberwachung auch das Zytokin $\text{IFN-}\gamma$ von essentieller Bedeutung. So wachsen Tumore in Mäusen, die mit $\text{IFN-}\gamma$ -Antikörper behandelt wurden, schneller und effektiver als in unbehandelten Mäusen (Dighe et al., 1994) und Mäuse ohne intakten $\text{IFN-}\gamma$ -Rezeptor oder Aktivator von STAT1, einem Transkriptionsfaktor, der wichtig für $\text{IFN-}\gamma$ -Signalgebung ist, sind sensitiver gegenüber der induzierten Tumorbildung als Wildtyp-Mäuse (Kaplan et al., 1998). Zudem sind Mäuse mit einem Mangel an

Lymphozyten und/oder mit defekter IFN- γ -Signalgebung anfälliger gegenüber der kanzerogeninduzierten und spontanen Entwicklung von Tumoren (Shankaran et al., 2001; Street et al., 2002).

Bei der Tumormimmunüberwachung bzw. Eliminierung entarteter Zellen sind IFN- γ und Perforin somit von essentieller Bedeutung. Lymphozyten und IFN- γ üben dabei einen hohen Selektionsdruck auf Tumorzellen aus und da diese genetisch instabil sind und schnell mutieren, entstehen Tumorzellen, die resistenter gegenüber dem Angriff durch das Immunsystem sind und demnach der Immundetektion entgehen können (Dunn et al., 2002). Mögliche Veränderungen umfassen dabei den Verlust oder die Herunterregulation von MHC-I-Molekülen, den Verlust von Tumorantigenen (Klein, 1966), Defekte im IFN- γ -Rezeptor- oder im apoptotischen Todesrezeptor-Signalweg, die Herunterregulation von costimulatorischen Molekülen auf der Tumorzelloberfläche und die Induktion der Apoptose in aktivierten Lymphozyten durch Produktion von Todesrezeptorliganden (Dunn et al., 2002; Khong und Restifo, 2002). Darüber hinaus können Tumorzellen zur Schaffung einer immunsuppressiven Umgebung beitragen, indem sie die Produktion von Mediatoren wie VEGF, TGF- β , Galectin oder der Indolamin-2,3-Dioxygenase induzieren und/oder durch Rekrutierung regulatorischer Immunzellen (T_{reg}). T_{reg} inhibieren nach ihrer Aktivierung die Funktion von tumorspezifischen T-Lymphozyten durch Produktion der Zytokine IL-10 und TGF- β , durch Expression von negativ costimulatorischen Molekülen und durch Zerstörung von IL-2, dem Zytokin, das essentiell für die Aufrechterhaltung der CTL-Funktion ist (Schreiber et al., 2011; Vesely et al., 2011).

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Cannabinoide besitzen diverse antikanzerogene Aktivitäten. So beeinflussen sie das Tumorstadium, die Migration und Metastasierung von Tumorzellen sowie die Angiogenese (Guzmán, 2003; Bifulco et al., 2006). Dementsprechend vermittelt auch das nicht-psychoaktive Phytocannabinoid CBD antitumorogene Effekte (Review: Massi et al., 2013). In diesem Zusammenhang konnte in der Arbeitsgruppe am Institut für Toxikologie und Pharmakologie der Universitätsmedizin Rostock gezeigt werden, dass CBD im Xenograftmodell das Tumorstadium inhibiert und eine starke antimetastatische Wirkung besitzt (Ramer et al., 2010a, b und 2012). Im Bereich der Tumormimmunüberwachung existieren jedoch nur wenige Daten zur Wirkung von Cannabinoiden auf die Aktivität von zytotoxischen Immunzellen, wobei sich die entsprechenden vorwiegend in den 1980er Jahren publizierten Arbeiten auf Effekte des Phytocannabinoids THC beschränken. In Bezug auf die Tumorstadiumabwehr durch das

Immunsystem spielt die Adhäsion von zytotoxischen Lymphozyten an Tumorzellen, die u. a. durch ICAM-1 vermittelt wird und die Voraussetzung für die anschließende Tumorzelllyse ist, eine wichtige Rolle. In der vorliegenden Arbeit wird der Einfluss von CBD auf die ICAM-1-Proteinexpression von Tumorzellen ermittelt, wobei in der Arbeitsgruppe in einigen Tumorzelllinien bereits eine durch CBD induzierte Hochregulation der ICAM-1-Expression gezeigt werden konnte (Ramer et al., 2012). In diesem Zusammenhang wird der Einfluss von CBD auf die Adhäsion zwischen Tumor- und Immunzellen und auf die durch Immunzellen vermittelte Lyse von Tumorzellen mittels Adhäsions- und Zytotoxizitätsassays untersucht. Dafür werden zwei Lungentumorzelllinien (A549, H460), Zellen aus Gehirnmastasen von Lungenkrebspatienten und LAK-Zellen, deren Generation aus PBMCs (peripheral blood mononuclear cells) von gesunden Spendern erfolgt, verwendet. Bezüglich der Wirkung von CBD auf die Adhäsion und Tumorzelllyse wird die funktionelle Rolle der CBD-induzierten Hochregulation von ICAM-1, das ebenfalls bei der Vermittlung der antiinvasiven und antimetastatischen Wirkung von CBD eine Rolle spielt (Ramer et al., 2012), mit Hilfe von neutralisierenden Antikörpern und Knockdown-Experimenten bestimmt. Darüber hinaus wird eine mögliche Involvierung der Cannabinoid-Rezeptoren CB₁ und CB₂ und des Vanilloid-Rezeptors TRPV1 bei den durch CBD vermittelten Effekten auf die Tumorzelllyse analysiert. Neben dem Phytocannabinoid CBD wird auch der Einfluss anderer Cannabinoide (THC, MA, JWH133, WIN55,212-2) auf die LAK-Zell-vermittelte zytotoxische Lyse von Tumorzellen untersucht. Zur Ermittlung einer Selektivität der potentiellen Cannabinoideffekte auf Tumorzellen wird der Einfluss von CBD (THC, MA) auf die zytotoxische Lyse und ICAM-1-Expression von nicht kanzerogenen Bronchialepithelzellen (BEAS-2B) überprüft.

In Zusammenhang mit dem Endocannabinoidsystem liegt neben der exogenen Applikation von Cannabinoiden ein anderer therapeutischer Ansatz in der Hemmung der FAAH. Diese Hemmung resultiert in einem Anstieg der Konzentration von Endocannabinoiden und endocannabinoidähnlichen Verbindungen, die ihre antitumorigene Wirkung wiederum via CB-Rezeptoraktivierung vermitteln (Ligresti et al., 2003; Bifulco et al., 2004; Maione et al., 2007; Micale et al., 2009). Dementsprechend wird der Einfluss des FAAH-Inhibitors Arachidonylserotonin (AA-5HT) auf die LAK-Zell-vermittelte Lyse und ICAM-1-Proteinexpression der Lungentumorzellen untersucht. Zusätzlich wird ebenfalls die Wirkung von Endocannabinoiden (AEA, 2-AG) und endocannabinoidähnlichen Verbindungen (OEA, PEA) auf die Tumorzelllyse überprüft, da diese durch eine FAAH-Inhibition akkumulieren können.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zellen

A549	humane Lungenkarzinomzelllinie (Nummer: ACC 107) DSMZ, Braunschweig
H460	humane Lungenkarzinomzelllinie (Nummer: HTB-177™) ATTC®, Wesel
HROBML01	humane Lungenkarzinomzellen aus der Resektion einer Gehirnmetastase eines 67 Jahre alten Patienten mit nicht- kleinzelligem Bronchialkarzinom (NSCLC) Universitätsmedizin, Rostock
HROBML03	humane Lungenkarzinomzellen aus der Resektion einer Gehirnmetastase einer 47 Jahre alten Patientin mit nicht- kleinzelligem Bronchialkarzinom (NSCLC) Universitätsmedizin, Rostock
BEAS-2B	humane Bronchialepithelzellen Sigma-Aldrich® (European selection of cell culture), Taufkirchen
PBMCs	<u>P</u> eripheral <u>B</u> lood <u>M</u> ononuclear <u>C</u> ells (mononukleäre Zellen des peripheren Blutes) → isoliert aus Buffy Coats von gesunden Spendern, dienen der Generation von <u>LAK-Zellen</u> (Lymphokin-aktivierte Killerzellen) Transfusionsmedizin, Rostock

2.1.2 Medien und Zusätze

DMEM (<u>D</u> ulbecco's <u>M</u> odified <u>E</u> agle <u>M</u> edium) - mit 4,5 g/l Glukose, mit L-Glutamin	Lonza, Köln
RPMI 1640 (<u>R</u> oswell <u>P</u> ark <u>M</u> emorial <u>I</u> nstitute) - mit L-Glutamin	Lonza, Köln
FCS (<u>F</u> etal <u>C</u> alf <u>S</u> erum)	PAN Biotech, Aidenbach
Penicillin-Streptomycin - 10.000 U/ml und 10.000 µg/ml	Life Technologies™, Darmstadt
LSM1077 (<u>L</u> ymphocyte <u>S</u> eparation <u>M</u> edium)	PAA, Cölbe
DPBS (<u>D</u> ulbecco's <u>P</u> hosphate <u>B</u> uffered <u>S</u> alt Solution) - ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺	PAN Biotech, Aidenbach

2.1.3 Chemikalien

Anandamid	Enzo [®] Life Science, Lörrach
AM251	Biomol, Hamburg
AM630	Biomol, Hamburg
Ammoniumpersulfat	Roth [®] , Karlsruhe
Aprotinin	Sigma-Aldrich [®] , Taufkirchen
2-Arachidonylglycerol	Biomol, Hamburg
Arachidonylserotonin	Biomol, Hamburg
Aqua ad iniectabilia	Braun Melsungen AG, Melsungen
β -Mercaptoethanol	Ferak [®] , Berlin
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich [®] , Taufkirchen
Calcein-AM	Sigma-Aldrich [®] , Taufkirchen
(-)-Cannabidiol	Biotrend AG, Köln
Capsazepin	Sigma-Aldrich [®] , Taufkirchen
Δ^9 -Tetrahydrocannabinol	Lipomed GmbH, Weil am Rhein
DMSO	AppliChem, Darmstadt
EDTA	AppliChem, Darmstadt
Ethanol	Zentralapotheke, Rostock
Glycerin (wasserfrei)	AppliChem, Darmstadt
Glycin	AppliChem, Darmstadt
HCl	Merck, Darmstadt
Hepes	Ferak [®] , Berlin
H ₂ O ₂	AppliChem, Darmstadt
Interleukin-2	ReliaTech, Wolfenbüttel
Isopropanol	J. T. Baker, Griesheim
JWH133	Tocris Bioscience, Wiesbaden-Nordenstadt
Leupeptin	Biomol, Hamburg
Luminol	Sigma-Aldrich [®] , Taufkirchen
Methanol	J. T. Baker, Griesheim
Milchpulver (Blotting Grade Blocker)	Bio-Rad, München
NaCl	AppliChem, Darmstadt
NaOH	AppliChem, Darmstadt
Oleylethanolamid	Biomol, Hamburg
Orthovanadat	Sigma-Aldrich [®] , Taufkirchen
Palmitoylethanolamid	Biomol, Hamburg
p-Cumarinsäure	Sigma-Aldrich [®] , Taufkirchen
Phenylmethylsulfonylfluorid	Sigma-Aldrich [®] , Taufkirchen

R-(+)-Methanandamid	Tocris Bioscience, Wiesbaden-Nordenstadt
Rotiphorese® Gel 30	Roth®, Karlsruhe
SDS ultrapure	AppliChem, Darmstadt
Temed	Roth®, Karlsruhe
Tris Ultrapure	AppliChem, Darmstadt
Tris HCl	AppliChem, Darmstadt
Triton® X-100	Roth®, Karlsruhe
Trypanblau (0,4 %)	Invitrogen™, Darmstadt
Trypsin-EDTA (10 x)	Life Technologies™, Darmstadt
Tween® 20	Roth®, Karlsruhe
(+)-WIN55,212-2-Mesylat	Biomol, Hamburg
WST-1-Reagenz	Roche, Grenzach-Wyhlen

2.1.4 Kits

RNAiFect™ Transfection Kit	Qiagen, Hilden
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Pierce, Rockford (USA)

2.1.5 siRNA und Antikörper für Blockierungsexperimente

ICAM-1 siRNA	Qiagen, Hilden
siRNA Negative control	Eurogentec, Köln
Human ICAM-1/CD54 Antibody	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt
Mouse IgG ₁ Antibody	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt
LEAF™ Purified anti-human CD11a	Biolegend, London (UK)
LEAF™ Purified Mouse IgG1, κ Isotype Control	Biolegend, London (UK)

2.1.6 Proteinmarker und Antikörper für Western Blot-Analyse

Prestained SDS-PAGE Standard (Broad Range)	Bio-Rad, München
<i>Primärantikörper</i>	
ICAM-1 Antibody (G-5)	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
LEAF™ Purified anti-human CD11a	Biolegend, London (UK)
Monoclonal anti-β-Actin Antibody (Clone AC-74)	Sigma-Aldrich®, Taufkirchen

Sekundärantikörper

Anti-Mouse IgG, HRP-linked Antibody New England Biolabs, Frankfurt am Main

2.1.7 Verbrauchsmaterialien

6-Well-Platten Falcon®	BD Biosciences, Heidelberg
24-Well-Platten Falcon®	BD Biosciences, Heidelberg
96-Well-Platten Falcon®	BD Biosciences, Heidelberg
Combitips (Multipettenaufsätze)	Eppendorf, Hamburg
Einmal-Pasteurpipetten	Sarstedt, Nürnberg
Glaspasteurpipetten	Roth®, Karlsruhe
Kryoeinfrierröhrchen (2 ml)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Microtest Plate 96er	Sarstedt, Nürnberg
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nürnberg
Reaktionsgefäße (farblos)	Sarstedt, Nürnberg
Rotilabo® Blottingpapiere (0,35 mm)	Roth®, Karlsruhe
Safe-Lock Tubes, amber (0,5 und 1,5 ml)	Eppendorf, Hamburg
Seropipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Whatman Nitrocellulosemembran (0,2 µm)	Roth®, Karlsruhe
Zellkulturflaschen (75 cm ²)	Sarstedt, Nürnberg
Zentrifugenröhrchen (15, 50 ml)	Sarstedt, Nürnberg

2.2 Methoden**2.2.1 Kultivierung von adhärenen Zellen****2.2.1.1 Allgemeine Bestimmungen**

Sowohl bei den verwendeten Lungentumorzellen A549, H460, HROBML01 und HROBML03 als auch bei den Bronchialepithelzellen BEAS-2B handelt es sich um adhärenente Zellen. Die A549-, H460-, HROBML03- und BEAS-2B-Zellen wurden in DMEM, welches 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin (Pen-Strep) und 10 % fötales Kälberserum (FCS) enthielt und im Folgenden als DMEM-Komplettmedium bezeichnet wird, in Zellkulturflaschen mit einer Fläche von 75 cm² kultiviert. Das für die Kultivierung der HROBML01-Zellen verwendete DMEM unterschied sich nur in der Menge des zugegebenen Kälberserums, so beinhaltete es 20 % FCS. Die Kultivierung von Zellen erfolgte im CO₂-Inkubator (Binder GmbH, Tuttlingen) bei einer Temperatur von 37 °C und bei 5 % CO₂.

2.2.1.2 Subkultivierung der Zellen

Die Subkultivierung bzw. das Splitten der Zellen erfolgte vor dem Erreichen der Konfluenz. Zunächst wurde das Medium abgesaugt und die Zellen gründlich mit PBS gewaschen. Anschließend wurden ca. 3 ml einer 1 x Trypsin-EDTA-Lösung, welche durch 1:10-Verdünnung der 10 x Trypsin-EDTA-Lösung mit PBS hergestellt wurde, auf die Zellen gegeben und für 3–5 min bei 37 °C, 5 % CO₂ inkubiert. Dabei beginnt das Trypsin Proteine, die für die Adhäsion der Zellen an die Oberfläche der Zellkulturflasche und bei Zell-Zell-Interaktionen eine Rolle spielen, abzubauen, wodurch sich die Zellen lösen. Das EDTA fungiert als Chelator und fängt Ca²⁺-Ionen ab, die für die Adhäsion der Zellen benötigt werden. Die Aktivität der Trypsin-EDTA-Lösung wurde mit etwa 7 ml DMEM-Komplettmedium abgestoppt. Im Anschluss erfolgte eine Zentrifugation für 5 min bei ca. 200 x g, der Überstand wurde verworfen, das Pellet dann in Komplettmedium aufgenommen und die Zellzahl bestimmt (siehe 2.2.1.3). Die A549- und H460-Zellen wurden alle 3–4 Tage gesplittet und mit einer Zelldichte von 9000–15000 Zellen/cm² in Zellkulturflaschen ausgesät. Die HROBML03- und BEAS-2B-Zellen hingegen wurden nur alle sieben Tage, wobei dann in der Regel auch eine Aussaat der Zellen für Experimente erfolgte, passagiert. Daher wurden die Zellen mit ca. 2000 Zellen/cm² ausgesät und innerhalb der sieben Tage ein Medienwechsel vorgenommen. Da die HROBML01-Zellen ein sehr langsames Wachstum aufwiesen, wurde bei ihnen regelmäßig ein Medienwechsel vollzogen und die Zellen nur passagiert, wenn sie für Versuche verwendet wurden. Die Versuche wurden mit den Zellen bei den hier aufgeführten Passagen (P) durchgeführt: A549 P3–22, H460 P5–24, HROBML03 P2–9, HROBML01 P7–8, BEAS-2B P8–11.

2.2.1.3 Bestimmung der Zellzahl

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer. Die Zellzahl von adhärennten Zellen wurde unmittelbar nach dem Ablösen der Zellen aus den Kulturflaschen mit Hilfe von Trypsin-EDTA und der Aufnahme der Zellpellets in DMEM-Komplettmedium nach der Zentrifugation (2.2.1.2) bestimmt. Für die Bestimmung der Zellzahl von Suspensionszellen (PBMCs bzw. LAK-Zellen) wurde vor dem Auszählen der Zellen eine Trypanblaufärbung vorgenommen. Für die Färbung der Zellen mit Trypanblau wurden 40 µl der Zellsuspension abgenommen und mit 5 µl Trypanblau versetzt, kurz gemischt und dann in die Zählkammer gegeben. Die Trypanblaufärbung dient als Vitalitätstest und ermöglicht das Unterscheiden von lebenden und toten Zellen. Tote Zellen erscheinen unter dem Mikroskop blau, da der Farbstoff die Membran von toten Zellen durchdringen und ins Zytoplasma gelangen

kann. Die intakte Membran von lebenden Zellen kann der Farbstoff hingegen nicht passieren. Zur Bestimmung der Zellzahl wurden 4 x 16 kleine Quadrate (entspricht 4 Großquadraten) ausgezählt und daraus anschließend der arithmetische Mittelwert bestimmt.

2.2.1.4 Kryokonservierung

Die Kryokonservierung diente der Langzeitlagerung von Zellen. Für die Konservierung mussten die adhärenen Zellen zunächst aus den Zellkulturflaschen abgelöst werden (siehe 2.2.1.2). Nach der Zentrifugation und Resuspension des Pellets in frischem DMEM-Komplettmedium wurde die Zellzahl bestimmt und wiederum zentrifugiert (ca. 200 x g, 5 min). Im Anschluss daran wurde das Zellpellet mit der gewünschten Zellzahl (2–4 Mio. Zellen/Kryoröhrchen) in Einfriermedium aufgenommen. Das Einfriermedium setzte sich aus 70 % DMEM, 20 % FCS und 10 % DMSO als Kryoprotektivum zusammen. Das Herunterkühlen der Zellsuspension erfolgte zunächst unter Verwendung eines Nalgene™ Cryo 1 °C Freezing Containers (Thermo Scientific, Waltham, USA), der über Nacht bei -80 °C aufbewahrt wurde. Mit Hilfe des verwendeten Freezing Containers wurde die Zellsuspension um 1 °C pro Minute heruntergekühlt. Am darauffolgenden Tag wurden die Kryoröhrchen für die Langzeitlagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

Das Auftauen von Zellen musste aufgrund des toxischen Kryoprotektivums schnell erfolgen. So wurde vorgewärmtes DMEM-Komplettmedium in eine Zellkulturflasche vorgelegt, das Kryoröhrchen mit den darin enthaltenen Zellen im Wasserbad (37 °C) angetaut und anschließend in die vorbereitete Zellkulturflasche gegeben. Durch Verwendung eines größeren Volumens Komplettmedium wurde das Einfriermedium mit dem Kryoprotektivum ausreichend verdünnt, so dass kein Effekt auf die hier verwendeten Zellen erkennbar war. Nach etwa 24 h wurde dann ein Medienwechsel vorgenommen und so das DMSO und die nicht adhärenen Zellen entfernt.

2.2.1.5 Aussaat und Stimulation der adhärenen Zellen

Um die Zellen für Experimente aussäen zu können, mussten diese zunächst, wie unter 2.2.1.2 beschrieben, aus den Zellkulturflaschen abgelöst und die Zellzahl bestimmt (2.2.1.3) werden. Die Adhäsions- und Zytotoxizitätsexperimente (2.2.3) wurden im 96-Well-Format mit einer Zellzahl von 5.000–10.000 Zellen/Well durchgeführt. Für die Proteinisolation und anschließende Western Blot-Analyse wurden 200.000 Zellen/Well in 6-Well-Platten ausgesät. Die Aussaat erfolgte in DMEM-Komplettmedium, in dem die Zellen daraufhin für 24 h inkubiert wurden (37 °C, 5 % CO₂). Daran schloss sich die

Stimulation der Zellen in serumfreiem DMEM, welches nur Pen-Strep, aber kein FCS enthielt, an. Es wurde hier unter serumfreien Bedingungen gearbeitet, um eine mögliche direkte Interaktion zwischen Serumproteinen wie Albumin und den Cannabinoiden auszuschließen (Zheng et al., 1993). Vor der Stimulation wurde zunächst das Komplettmedium abgesaugt, die Zellen dann mit PBS gewaschen und serumfreies DMEM auf die Zellen gegeben. Die Testsubstanzen, die in Ethanol (CBD, MA, THC, JWH133, WIN55,212-2, AEA, OEA, PEA) oder DMSO (2-AG, AA-5HT) gelöst waren, wurden so mit PBS verdünnt, dass für die Stimulation eine Endkonzentration von 0,1 % (v/v) Ethanol bzw. DMSO erreicht wurde. Als Vehikel dienten entsprechende 0,1 %ige Ethanol- bzw. DMSO-Lösungen ohne Testsubstanz. Bei den Versuchen mit den in DMSO gelösten Rezeptorantagonisten (AM251, AM630, Capsazepin) wurden die Zellen vor Zugabe der Testsubstanzen für 1 h mit den Antagonisten (1 μ M) präinkubiert. Dabei wurden die Lösungen so mit PBS verdünnt, dass die Endkonzentration bei der Stimulation bei 0,2 % (v/v) DMSO lag. Die Stimulation erfolgte bei den 96-Well-Platten im Gesamtvolumen von 100 μ l und bei den 6-Well-Platten in 1 ml Volumen. Die Inkubation der Zellen mit den Stimulanzien erfolgte über 48 h.

2.2.1.6 siRNA-Transfektion der Tumorzellen

Die Transfektion von Tumorzellen erfolgte mit siRNA, die auf die ICAM-1 mRNA abzielt. Die Zielsequenz der ICAM-1 siRNA lautet 5'-CGGCCAGCTTATACACAAGAA-3'. Ein BLAST-Vergleich zeigte, dass die ausgewählte Sequenz keine Homologie zu einem anderen bekannten humanen Gen aufweist. Die Zellen wurden unter Verwendung des RNAiFectTM-Reagenz (Qiagen) transfiziert. Als Negativkontrolle wurde eine nonsilencing siRNA (non siRNA) verwendet. Die Tumorzellen wurden in 6-Well- (Western Blot-Analyse) oder 96-Well-Platten (Zytotoxizitätsassay) ausgesät (2.2.1.5) und für 2–3 h im Brutschrank inkubiert. In dieser Zeit adhäreren die Zellen an die Oberfläche der Platten. Anschließend erfolgte die sogenannte Vortransfektion unter Zugabe des entsprechenden Transfektionsansatzes mit 1,25 μ g/ml ICAM-1 siRNA oder non siRNA im selben Verhältnis (w/v) von RNA zu Transfektionsreagenz. Die Vortransfektion erfolgte in DMEM-Komplettmedium über eine Zeit von etwa 21 h. Vor der Stimulation mit den Testsubstanzen bzw. der Vehikelkontrolle wurden die Zellen mit PBS gewaschen und in serumfreiem DMEM erneut transfiziert, um konstante Transfektionsbedingungen zu erhalten.

2.2.2 Isolierung von PBMCs aus Buffy Coats

Die Aufreinigung von PBMCs (peripheral blood mononuclear cells) erfolgte aus Buffy Coats, die vom Institut für Transfusionsmedizin der Universitätsmedizin Rostock zur Verfügung gestellt wurden. Buffy Coats (auch Leukozytenkonzentrate) entstehen bei der Herstellung von Erythrozytenkonzentraten und Frischplasma aus Vollblut als Nebenprodukt und enthalten v. a. Leukozyten und Thrombozyten. Die Buffy Coats wurden über Nacht bei 4 °C aufbewahrt und am darauffolgenden Tag für die Isolation von PBMCs verwendet. Der Einfluss der Lagerung von Buffy Coats bei 4 °C wurde zu Beginn getestet. Es konnte keine Beeinflussung der Ausbeute von PBMCs und deren Vitalität (Trypanblaufärbung, siehe 2.2.1.3) festgestellt werden. Im Anschluss an die Aufreinigung (Dichtegradientenzentrifugation und Abtrennung adhärenter Zellen) wurden dann Lymphokin-aktivierte Killer (LAK)-Zellen generiert.

2.2.2.1 Dichtegradientenzentrifugation

Zunächst erfolgte eine Dichtegradientenzentrifugation des Buffy Coat-Materials, um die Blutbestandteile entsprechend ihrer Dichte voneinander zu trennen und so die PBMCs zu gewinnen. Die Aufreinigung erfolgte im Allgemeinen nach den Angaben im Protokoll für das Lymphozytentrennmedium (LSM1077, PAA). Vor der Zentrifugation wurde der Buffy Coat 1:2 mit sterilem PBS verdünnt. In 50 ml-Zentrifugenröhrchen wurden je 20 ml LSM1077, das eine Dichte von 1,077 g/ml besitzt, vorgelegt. Auf dieses Trennmedium wurden dann vorsichtig 20–30 ml des Buffy Coat-PBS-Gemisches geschichtet, ohne dass sich die beiden Schichten vermischen (Abb. 2-1, links). Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 1171 x g und 20 °C für 25 min mit ausgeschalteter Bremse. Während dieser Dichtegradientenzentrifugation ordnen sich die Blutbestandteile entsprechend ihrer Dichte (Tab. 2-1) im Gradienten an, wodurch vier unterschiedliche Phasen entstehen (Abb. 2-1, rechts).

Tab. 2-1: Mittlere Dichte von Blutbestandteilen

(Kiefel (Hrsg.), 2011)

Blutbestandteil	Mittlere Dicht [g/ml]
Plasma	1,026
Thrombozyten	1,058
Monozyten	1,062
Lymphozyten	1,070
Neutrophile Granulozyten	1,082
Erythrozyten	1,100

Die oberste gelbliche Phase besteht aus Plasma (1,026 g/ml) und enthält Thrombozyten (1,058 g/ml). Die Interphase („weiße Wolke“) befindet sich direkt über der Schicht des Lymphozytentrennmediums mit der Dichte von 1,077 g/ml und besteht aus Monozyten (1,062 g/ml) und Lymphozyten (1,070 g/ml). Im roten Pellet befinden sich die Erythrozyten (1,100 g/ml) und Granulozyten (1,082 g/ml).

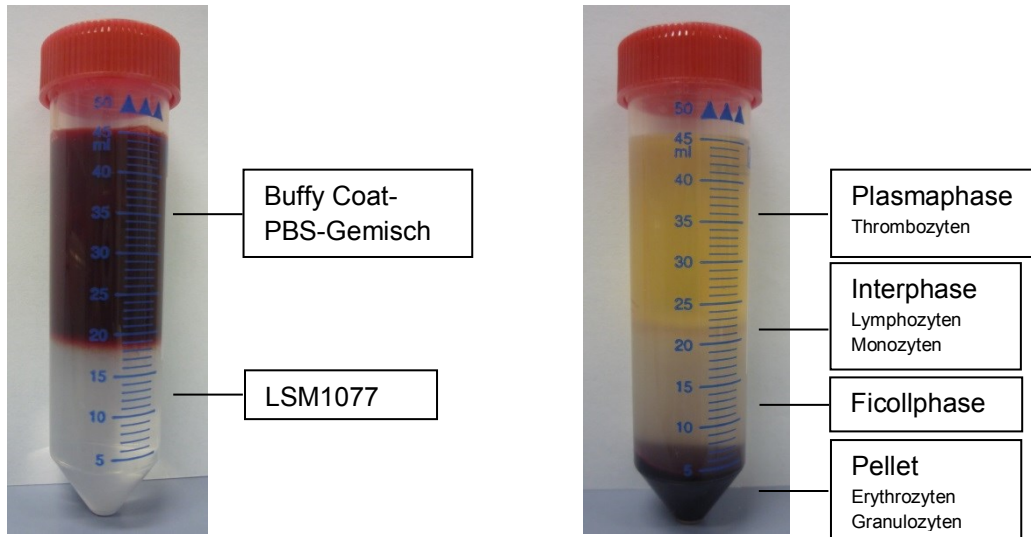


Abb. 2-1: Trennung der Blutbestandteile durch Dichtegradientenzentrifugation

Links, vor der Zentrifugation: Das Buffy Coat-PBS-Gemisch mit allen Blutbestandteilen ist auf das LSM1077 geschichtet. *Rechts, nach der Zentrifugation:* Die Blutbestandteile wurden entsprechend ihrer Dichte voneinander getrennt. Die Thrombozyten (1,058 g/ml) bleiben in der gelblichen Plasmaphase, die PBMCs (Lymphozyten, Monozyten) reichern sich in der Interphase („weiße Wolke“) zwischen Plasma und LSM1077 (1,077 g/ml) an und die Granulozyten (1,082 g/ml) und Erythrozyten (1,1 g/ml) wandern durch das Trennmedium und bilden das Pellet.

Die Plasmaphase wurde im Anschluss an die Zentrifugation möglichst vollständig mit einer Pasteurpipette entfernt und verworfen. Anschließend konnte die Interphase vorsichtig abgenommen und in ein steriles 50 ml-Zentrifugenröhrchen überführt werden. Das Material der Interphase wurde dann zwei Waschschritten unterzogen. Dazu wurde das Volumen für den ersten Waschschrift auf 50 ml mit PBS aufgefüllt und dann für 10 min bei 300 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet für den zweiten Waschschrift in 40–50 ml PBS gelöst. Dann wurde für 10 min bei 200 x g zentrifugiert, der Überstand wurde wiederum abgesaugt und das Pellet in RPMI 1640-Komplettmedium (mit Pen-Strep und 10 % FCS) resuspendiert.

Für die anschließende Zellzählung wurde ein Teil der Zellsuspension zunächst mit RPMI-Komplettmedium verdünnt. Von dieser Verdünnung wurden 40 µl abgenommen und mit 5 µl Trypanblau versetzt (Trypanblau-/Vitalitätsfärbung, siehe 2.2.1.3), um die lebenden Zellen auszuzählen. Die Gesamtzahl der isolierten Zellen (PBMCs) wurde dann unter Berücksichtigung der Verdünnung berechnet.

2.2.2.2 Abtrennung der adhärenen Zellen (Monozyten/Makrophagen)

In einem zweiten Aufreinigungsschritt nach der Dichtegradientenzentrifugation erfolgte die Abtrennung von adhärenen Zellen aus der Zellsuspension nach einem leicht abgewandelten Protokoll von Fuss et al. (2009). Die Zellsuspension enthält v. a. Monozyten und Lymphozyten, wobei es sich bei den Monozyten um adhärenen Zellen und bei den Lymphozyten um Suspensionszellen handelt. Das heißt, die beiden Zellpopulationen lassen sich leicht voneinander trennen, da die Monozyten im Gegensatz zu den Lymphozyten an die Oberfläche der Zellkulturflaschen adhären. Somit wurde die nach Dichtegradientenzentrifugation erhaltene Zellsuspension (2.2.2.1) auf eine Zelldichte von 2 Mio. Zellen/ml eingestellt und diese dann in Zellkulturflaschen überführt. Es folgte eine Inkubation von 1–2 h im Inkubator (37 °C, 5 % CO₂), damit die Monozyten adhären konnten. Anschließend wurde die Zellsuspension mit einer Seropipette aus den Kulturflaschen in 50 ml-Zentrifugenröhrchen überführt und die Flaschen mit den adhärenen Zellen verworfen. Dann wurde die Zellsuspension für 10 min bei 500 x g zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und die Pellets in RPMI-Komplettmedium resuspendiert und zusammengeführt. Die Zellen wurde ausgezählt und die Zellsuspension wieder auf eine Dichte von 2 Mio. Zellen/ml eingestellt und in Kulturflaschen überführt. Es folgte abermals eine Inkubation von 1–2 h, wodurch möglichst viele adhärenen Zellen aus der Suspension entfernt werden sollten. Im Anschluss daran wurde die Zellsuspension, wie bereits beschrieben, in 50 ml-Röhrchen überführt und anschließend für 10 min bei 500 x g zentrifugiert. Die Pellets wurden in RPMI-Komplettmedium gelöst, gepoolt und die Zellen dann wiederum ausgezählt.

Aussaat der Monozyten für die Proteinisolation

Für die Untersuchung des Einflusses von CBD auf die ICAM-1-Proteinexpression (Western Blot-Analyse) von Monozyten erfolgte die erste ein- bis zweistündige Inkubation der PBMCs, die direkt aus der unter 2.2.2.1 beschriebenen Aufreinigung stammen, nicht in Zellkulturflaschen, sondern in 6-Well-Platten. So wurden je 4 ml der 2 Mio. Zellen/ml-PBMC-Suspension pro Well pipettiert (entspricht 8 Mio. Zellen/Well). Nach der ein- bis zweistündigen Inkubation wurde der Überstand abgenommen und der weiteren Aufreinigung unterzogen. Die an die Oberfläche der 6-Well-Platten adhärenen Monozyten wurden dann vorsichtig mit PBS gewaschen, mit serumfreien DMEM überschichtet und nach einer Inkubation von ca. 2 h mit Vehikel und verschiedenen CBD-Konzentrationen stimuliert (2.2.1.5).

2.2.2.3 Kultivierung und Generieren von LAK-Zellen

Nach Abtrennung der adhärennten Zellen (2.2.2.2) in zwei Schritten sollten aus den verbliebenen PBMCs zytotoxische Zellen generiert werden. Dazu wurde die Zellsuspension zunächst auf eine Dichte von ca. 1,5 Mio. Zellen/ml eingestellt. Diese Zellsuspension wurde dann mit Interleukin-2 (IL-2) versetzt, was zur Bildung von LAK-Zellen führt (Grimm et al., 1982 und 1983). Die Inkubation der aufgereinigten PBMCs mit 10 ng/ml IL-2 erfolgte über insgesamt sechs Tage. Nach drei Tagen wurde ein Medienwechsel (RPMI-Komplettmedium) vorgenommen, d. h. die Zellsuspension wurde in 50 ml-Zentrifugenröhrchen überführt und für 10 min bei 500 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde in RPMI 1640-Komplettmedium resuspendiert, die Zellsuspension erneut auf ca. 1,5 Mio. Zellen/ml eingestellt und mit frischem IL-2 (10 ng/ml) versetzt. Nach 6-tägiger Inkubation mit IL-2 wurden die LAK-Zellen für den Adhäsions- bzw. Zytotoxizitätsassay verwendet.

In Zusammenhang der Vorversuche wurden auch andere IL-2-Inkubationszeiten (fünf und acht Tage) getestet. Letztendlich stellte sich eine 6-tägige Inkubationszeit als für den Ablauf der Versuche am geeignetsten heraus.

2.2.2.4 Behandlung der LAK-Zellen mit CBD

Um einen möglichen Einfluss von CBD auf die LAK-Zellen, insbesondere auf deren zytotoxische Aktivität, zu untersuchen, wurde für einige Versuche jeweils ein Teil der LAK-Zellen zusätzlich zu IL-2 mit CBD bzw. der entsprechenden Vehikelkontrolle (0,1 % Ethanol) inkubiert. Die CBD-Konzentration (3 μ M) und Inkubationszeit mit dem Stimulans (48 h) entsprachen den Bedingungen für die Tumorzellen. Neben dem Einfluss von CBD auf die zytotoxische Aktivität wurde auch dessen Wirkung auf die Vitalität der LAK-Zellen mittels Trypanblaufärbung und Zellzahlbestimmung (2.2.2.3) und auf die LFA-1-Proteinexpression durch die LAK-Zellen bestimmt. Ein Teil der LAK-Zellen wurde demnach 48 h vor dem Zytotoxizitätsassay (am vierten Tag der IL-2-Inkubation) entweder mit 3 μ M CBD oder der Vehikelkontrolle versetzt. Für den Zytotoxizitätsassay wurden dann die unbehandelten, die mit Vehikel und mit CBD behandelten Zellen verwendet. Die jeweils übrig gebliebenen Zellen wurden der Proteinisolation (2.2.5) unterzogen. Um einen mögliche Beeinflussung der Vitalität der LAK-Zellen zu ermitteln, wurde die am dritten Tag der IL-2-Inkubation bestimmte Zellzahl (siehe 2.2.2.3) als 100 % angenommen. Die am sechsten Tag für den Zytotoxizitätsassay bestimmte LAK-Zellzahl diente dann der prozentualen Berechnung dafür, wieviel der anfänglich 100 % LAK-Zellen nach der jeweiligen Behandlung noch

vorhanden waren. So konnte ein Vergleich der Zellzahlabnahme von unbehandelten, vehikel- und CBD-stimulierten LAK-Zellen erfolgen.

2.2.3 Adhäsions- und Zytotoxizitätsassay

2.2.3.1 Allgemeine Bestimmungen

Zur Bestimmung der Adhäsion von LAK-Zellen an Tumorzellen und der LAK-Zell-vermittelten Lyse der Tumorzellen wurde der Farbstoff Calcein-AM (Calcein-AcetoxyMethylester) verwendet. Calcein-AM, das nicht fluoresziert, ist hydrophob und kann aus diesem Grund leicht durch intakte Zellmembranen diffundieren. Im Zellinneren werden die Acetoxymethylestergruppen dann durch intrazelluläre Esterasen abgespalten, wodurch ein fluoreszierendes, hydrophiles Molekül, das Calcein, entsteht (Abb. 2-2). Durch seine Hydrophilie verbleibt Calcein im Zytoplasma von Zellen mit intakter Zellmembran. Da es sich bei Calcein-AM bzw. Calcein um lichtempfindliche Moleküle handelt, wurden die Arbeiten mit diesem Farbstoff im Dunkeln, d. h. ohne direkte Lichtquelle durchgeführt.

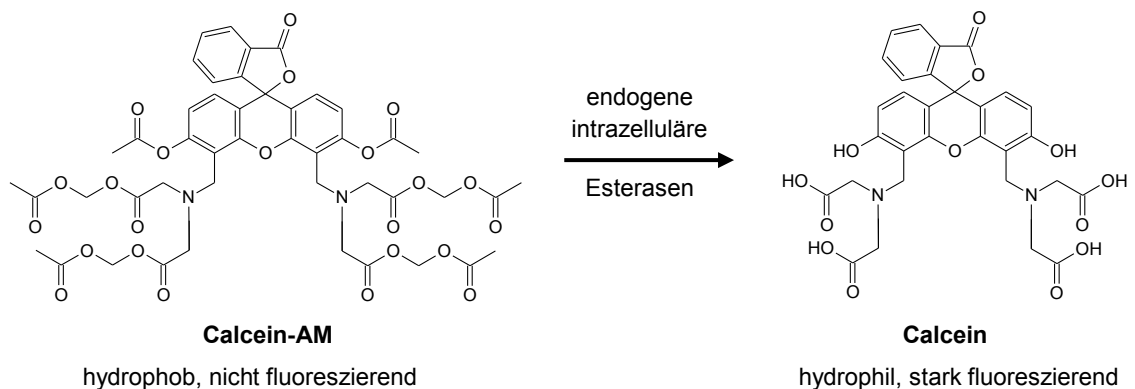


Abb. 2-2: Spaltung von Calcein-AM durch Esterasen

Beim Adhäsionsassay wurden die LAK-Zellen mit Calcein-AM gefärbt, so konnte die Adhäsion der fluoreszierenden LAK- an die mit Vehikel oder CBD behandelten Tumorzellen durch Fluoreszenzmessung bestimmt werden (2.2.3.2). Im Gegensatz dazu wurden beim Zytotoxizitätsassay die Tumorzellen angefärbt und letztendlich die Fluoreszenz des Kulturüberstandes nach 6-stündiger Coinkubation mit den LAK-Zellen ermittelt (2.2.3.3). Die Einstellungen für die Fluoreszenzmessung am Tecan Infinite® 200 Pro Plattenreader (Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim) sind in Tab. 2-2 aufgeführt.

Tab. 2-2: Einstellungen für die Fluoreszenzmessungen

Gerät	infinite 200Pro
Programm	Tecan i-control
Modus	Fluoreszenzmessung von oben
Schütteln (Linear) Dauer, Amplitude	15 s, 1 mm
Exzitationswellenlänge	485 nm
Emissionswellenlänge	535 nm
Exzitationsbandbreite	20 nm
Emissionsbandbreite	25 nm
Verstärkung	25 (Manuell)
Anzahl der Blitze	2
Integrationszeit	20 μ s
Verzögerungszeit	0 μ s
Ruhezeit	0 ms
Spiegel (Automatisch)	Dichroisch 510

2.2.3.2 Adhäsion

Die Aussaat und Stimulation der Tumorzellen für den Adhäsionsassay erfolgte wie unter 2.2.1.5 beschrieben. Dabei wurden 10.000 Tumorzellen/Well in 96-Well-Platten ausgesät und anschließend für 48 h mit Vehikel und CBD behandelt. Vor der Coinkubation mit den LAK-Zellen wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen.

Die LAK-Zellsuspension wurde aus den Kulturflaschen in 50 ml-Zentrifugenröhrchen überführt, 40 μ l für die Zellzahlbestimmung (2.2.1.3) abgenommen, die Suspension dann für 10 min bei 500 x g zentrifugiert und das Pellet in serumfreiem RPMI 1640 mit 5 Mio. Zellen/ml resuspendiert. Die benötigte Anzahl von Zellen wurde dann in einer 24-well-Platte für 30 min mit 5 μ M Calcein-AM gefärbt (37 °C, 5 % CO₂). Im Anschluss an die Färbung wurden die Zellen wieder in ein 50 ml-Röhrchen überführt und zentrifugiert (500 x g, 10 min). Anschließend wurden die gefärbten Zellen zweimal mit PBS gewaschen, d. h. das Pellet wurde jeweils in PBS resuspendiert und die Suspension dann einer Zentrifugation (500 x g, 10 min) unterzogen. Nach dem Waschen wurden die LAK-Zellen mit serumfreiem RPMI 1640 auf eine Dichte von 0,4 Mio. Zellen/ml eingestellt. Für die nachfolgende Cokultivierung mit den stimulierten Tumorzellen wurden 100 μ l der hergestellten LAK-Zellsuspension auf die Tumorzellen pipettiert, so dass sich pro Well letztlich 40.000 LAK-Zellen befanden. Die Coinkubation von LAK- (Effektorzellen = E) mit Tumorzellen (Zielzellen = Z) erfolgte also in einem Verhältnis von E:Z = 4:1. Nach einer einstündigen Coinkubation wurde der Überstand abgesaugt und die Zellen vorsichtig mit PBS gewaschen, um die nicht an die

Tumorzellen adhären LAK-Zellen zu entfernen. Die in den Wells verbliebenen Zellen wurden dann mit serumfreiem RPMI 1640, das 2 % (v/v) Triton[®] X-100 enthielt, für 20 min lysiert und anschließend die Fluoreszenz bei 535 nm mit dem Tecan Infinite[®] 200 Pro Plattenreader gemessen. Parallel zum Adhäsionsassay wurde die Viabilität der Tumorzellen bei gleichen Bedingungen unter Verwendung des WST-1-Reagenzes bestimmt (siehe 2.2.4). Die Adhäsion wurde dann durch Normalisierung auf die Viabilität der Tumorzellen nach folgender Formel berechnet: % Adhäsion = Fluoreszenz von adhären LAK-Zellen / Viabilität der Tumorzellen. Die Vehikelkontrolle wurde dabei als 100 % definiert und Veränderungen der LAK-Zell-Tumorzell-Adhäsion auf diese bezogen. Erforderliche Blankwerte wurden mitgeführt und von den Fluoreszenzmesswerten abgezogen. Vor der Berechnung der Adhäsion wurden die Rohdaten mittels Nalimov-Test analysiert und entsprechend ermittelte Ausreißer aus den Daten entfernt.

Präinkubation der Tumorzellen mit Antikörper

Um die Rolle von ICAM-1 bei der Adhäsion von LAK- an Tumorzellen zu bestimmen, wurden Versuche mit einem neutralisierendem ICAM-1-Antikörper durchgeführt. Die Tumorzellen wurden dafür nach der 48-stündigen Vehikel- bzw. CBD-Stimulation für 3 h mit 1 µg/ml ICAM-1- oder Isotype Control-Antikörper (Mouse IgG₁ Antibody) in serumfreiem DMEM inkubiert. Das Medium wurde dann vor Zugabe der gefärbten LAK-Zellen abgesaugt, die Zellen aber nicht mit PBS gewaschen.

Versuche zu Optimierung des Adhäsionsassays

Zur Etablierung des Adhäsionsassays wurden zu Beginn unterschiedliche Parameter untersucht. Dabei wurde die Tumorzellzahl variiert, so wurden Zellzahlen von 5.000 bis 50.000 Zellen/Well und die E:Z-Verhältnisse 4:1 und 8:1 getestet. Des Weiteren wurden Experimente mit PBMCs durchgeführt, d. h. direkt am Tag nach der Aufreinigung des Buffy Coats (ohne IL-2-Inkubation). Außerdem wurden Adhäsionsversuche mit LAK-Zellen, die unterschiedlich lange mit IL-2 behandelt wurden (fünf, sechs und acht Tage) durchgeführt. Eine weitere untersuchte Komponente war die Inkubationszeit der Tumorzellen mit CBD. So erfolgte ebenfalls eine Durchführung von Versuchen mit Tumorzellen, die über 24 h oder 72 h stimuliert wurden. Bezüglich der Experimente mit dem ICAM-1-Antikörper wurden verschiedene Konzentrationen im Bereich von 1 ng/ml und 10 µg/ml getestet.

2.2.3.3 Zytotoxizität

Die LAK-Zell-vermittelte Lyse von Tumorzellen wurde mit Hilfe des Calcein-Release-Assays untersucht, wobei die Tumorzellen mit Calcein-AM gefärbt wurden. Das Prinzip dieses Assays beruht darauf, dass durch Coinkubation von stimulierten Tumorzellen mit LAK-Zellen eine größere Menge des Calcein-Farbstoffs in den Kulturüberstand freigesetzt wird, als durch Tumorzellen, die nicht den LAK-Zellen ausgesetzt sind.

Die Aussaat und Stimulation der Tumorzellen für den Zytotoxizitätsassay erfolgte wie unter 2.2.1.5 beschrieben. Dabei wurden 5.000 oder 10.000 Tumorzellen/Well in 96-Well-Platten ausgesät, anschließend mit Vehikel und Testsubstanz stimuliert und für 48 h inkubiert. Vor der Coinkubation mit den LAK-Zellen wurde das Medium abgesaugt, die Zellen wurden mit PBS gewaschen und anschließend mit 5 µM Calcein-AM in serumfreiem DMEM für 30 min im Inkubator (37 °C, 5 % CO₂) gefärbt. Dann wurden die Tumorzellen zweimal mit PBS gewaschen, um das nicht aufgenommene Calcein-AM zu entfernen.

Die LAK-Zellsuspension wurde wie beim Adhäsionsassay aus den Kulturflaschen in 50 ml-Zentrifugenröhrchen überführt, es wurden 40 µl für die Zellzahlbestimmung (2.2.1.3) abgenommen, die Suspension dann für 10 min bei 500 x g zentrifugiert und das Pellet in serumfreiem RPMI 1640 mit 5 Mio. Zellen/ml resuspendiert. Im Anschluss daran wurden die jeweils für den Assay benötigten LAK-Zellsuspensionen für das entsprechende E:Z-Verhältnis (s. u.) hergestellt und 100 µl pro Well auf die Tumorzellen pipettiert. Für die spontane Abgabe von Calcein durch die Tumorzellen, d. h. ohne Einwirkung der LAK-Zellen, wurden 100 µl serumfreies RPMI 1640 pro Well auf die Tumorzellen gegeben. Nach einer Coinkubation (37 °C, 5 % CO₂) von 6 h wurde der Zytotoxizitätsassay gestoppt, indem die Überstände abgenommen und in unbehandelte Wells überführt wurden. Die in den Wells verbliebenen Tumorzellen wurden für 20 min mit 2 % (v/v) Triton[®] X-100 in serumfreiem RPMI 1640 lysiert. Anschließend wurde die Fluoreszenz bei 535 nm mit dem Tecan Infinite[®] 200 Pro Plattenreader gemessen. Die maximale Abgabe von Calcein wurde aus der Fluoreszenz der spontanen Calcein-Abgabe oder der Calcein-Abgabe in Anwesenheit der LAK-Zellen und der Fluoreszenz der lysierten Tumorzellen in den jeweils dazugehörigen Wells berechnet. Die spezifische Lyse in % wurde dann nach folgender Formel ermittelt: % spezifische Lyse = (Fluoreszenz der Überstände aus Wells mit LAK-Zellen - Fluoreszenz der spontanen Calcein-Abgabe) / (Fluoreszenz der maximalen Calcein-Abgabe - Fluoreszenz der spontanen Calcein-Abgabe) (Melis et al., 1996; Lefor und Fabian, 1998; Massi et al., 2000; Fiore et al., 2002). Erforderliche Blankwerte wurden mitgeführt und von den Fluoreszenzmesswerten abgezogen. Vor der Berechnung der

spezifischen Lyse wurden die Rohdaten mittels Nalimov-Test analysiert und entsprechend ermittelte Ausreißer aus den Daten entfernt.

Für die Versuch mit den unterschiedlichen E:Z-Verhältnissen wurden LAK-Zellsuspensionen von 0,05–2 Mio. Zellen/ml je nach Tumorzellzahl benötigt. Diese Versuche wurden mit folgenden E:Z-Verhältnissen durchgeführt: 1:1, 2:1, 4:1, 8:1, 10:1 und 20:1. Für alle anderen Experimente (Antikörper, siRNA, Rezeptorantagonisten, CBD-behandelte LAK-Zellen) wurde ein Verhältnis von E:Z = 4:1 oder E:Z = 8:1 (z. T. siRNA-Versuche mit H460-Zellen), was einer LAK-Zellzahl von 40.000 Zellen/Well entsprach, verwendet. Die Transfektion von Tumorzellen mit siRNA ist unter 2.2.1.6 und die Behandlung mit Rezeptorantagonisten unter 2.2.1.5 beschrieben.

Präinkubation der Zellen mit Antikörper

Auch beim Zytotoxizitätsassay wurden analog zum Adhäsionsassay Versuche mit einem gegen ICAM-1 gerichteten Antikörper zur Untersuchung der Rolle von ICAM-1 durchgeführt. Dazu wurden die stimulierten Tumorzellen vor dem Beginn der Cokultivierung mit LAK-Zellen für 2 h mit 1 µg/ml ICAM-1- oder Isotype Control-Antikörper in serumfreiem DMEM inkubiert. Auch hier wurde das Medium mit dem entsprechenden Antikörper abgesaugt und der Assay ohne ein Waschen der Tumorzellen gestartet. Zur Bestimmung der optimalen ICAM-1-Antikörperkonzentration wurden zunächst Versuche mit Antikörperkonzentrationen von 1 ng/ml bis zu 1 µg/ml durchgeführt. Zur Untersuchung der Rolle von LFA-1, dem wichtigstem Bindungspartner von ICAM-1, erfolgten Experimente, bei denen die LAK-Zellen vor der Coinkubation mit den Tumorzellen für 2 h mit 1 µg/ml CD11a- (bindet an α-Kette von LFA-1) bzw. Isotype Control-Antikörper inkubiert wurden. Bei diesem Versuchsaufbau befanden sich während der 6-stündigen Coinkubation neben den LAK-Zellen auch die entsprechenden Antikörper im Medium. Dementsprechend wurde für die spontane Calcein-Abgabe Medium verwendet, das mit den Antikörpern versetzt war. Mit dem CD11a-Antikörper wurden in Vorversuchen ebenfalls unterschiedliche Konzentrationen (1 µg/ml und 5 µg/ml) getestet.

2.2.4 WST-1-Test

Das Tetrazoliumsals WST-1 (4-[3-(4-iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzene disulfonat), welches eine leicht rote Farbe zeigt, dient der Bestimmung der Viabilität von Zellen. Dabei wird WST-1 mit Hilfe von NADH, welches aus dem mitochondrialen Tricarbonsäurezyklus stammt, reduziert. Die Reduktion des Moleküls erfolgt extrazellulär mittels Elektronentransport über die Zellmembran von NADH auf

WST-1 (Berridge et al., 2005), wodurch das dunkelrot erscheinende Formazan entsteht (Abb. 2-3). Dieser Farbumschlag kann dann photometrisch bestimmt werden.

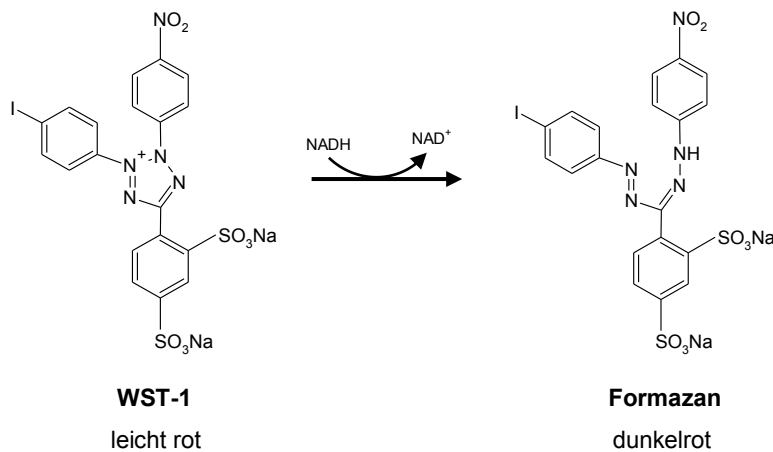


Abb. 2-3: Reduktion des Tetrazoliumsalses WST-1 zu Formazan

Die Bestimmung der Viabilität der Tumorzellen erfolgte parallel zum Adhäsions- bzw. Zytotoxizitätsassay. Die Tumorzellen wurden dabei der entsprechend gleichen Prozedur (Waschschritte usw., siehe 2.2.3) unterzogen. Dementsprechend war der Kulturüberstand bei der WST-1-Zugabe serumfreies RPMI 1640 (100 µl). Zur Viabilitätsbestimmung wurden 10 µl des WST-1-Reagenzes in jedes Well pipettiert, leicht geschüttelt und die Zellen dann bei 37 °C inkubiert. Pro Platte wurde jeweils ein Blankwert mitgeführt (Medium ohne Tumorzellen), der dann von den Messwerten abgezogen wurde. Der Farbumschlag wurde beobachtet und es erfolgte innerhalb von 30 min nach WST-1-Zugabe die Messung der Absorption bei 450 nm am ELISA-Plattenreader (A. Sternkopf GmbH, Lübeck) bei einer Referenzwellenlänge von 690 nm. Für die Berechnung des Einflusses der Testsubstanzen auf die Tumorzellviabilität wurde die Vehikelkontrolle als 100 % definiert und Messwerte der mit Testsubstanz behandelten Tumorzellen auf diese bezogen. Vor der Berechnung der Viabilität wurden die Rohdaten mittels Nalimov-Test analysiert und entsprechend ermittelte Ausreißer aus den Daten entfernt.

2.2.5 Isolation von Proteinen aus Zellen

Die Isolation von Proteinen aus den Zellen diente der anschließenden SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) und der Darstellung und Quantifizierung der Proteine mittels Western Blot.

Die Tumor- und BEAS-2B-Zellen wurden, wie unter 2.2.1.5, und die Monozyten, wie unter 2.2.2.2 beschrieben, ausgesät und anschließend für 48 h mit den

Testsubstanzen inkubiert. Für die Ernte der Zellen mit anschließender Proteinisolation wurde zunächst das Medium abgesaugt, die Zellen mit kaltem PBS gewaschen und auf Eis gestellt. Die dann folgenden Arbeiten wurden alle auf Eis durchgeführt. Die Lyse der Zellen erfolgte in 80 µl Lysispuffer, der in jedes Well auf die Zellen pipettiert wurde. Kurz vor Verwendung des Lysispuffers wurde dieser mit Protease- und Phosphataseinhibitoren versetzt (s. u.). Mit einem Gummischaber wurden die Zellen von den Platten gelöst und das Zell-Lysispuffer-Gemisch in 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt. Die Lyse der LAK-Zellen erfolgte mit den nach dem Zytotoxizitätsassay übrig gebliebenen Zellen (unbehandelt, mit Vehikel oder CBD stimuliert, 2.2.2.4). Diese Suspensionszellen wurden mittels Zentrifugation (10 min, 500 x g) mit PBS gewaschen und das Pellet dann in Lysispuffer resuspendiert. Die Zell-Lysispuffer-Gemische wurden für mindestens 30 min auf Eis inkubiert und zwischendurch immer wieder gevortext. Anschließend wurde das Gemisch aus lysierten Zellen und Lysispuffer für 5 min bei 10.000 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet, welches aus Zellfragmenten besteht, verworfen. Von den Überständen wurden je 5 µl, die der anschließenden Proteinbestimmung dienen, abgenommen. Die Proben wurden bei -20 °C gelagert.

Lysispuffer (pH 7,4):	50 mM	Hepes
	150 mM	NaCl
	1 % (v/v)	Triton® X-100
	1 mM	EDTA
	10 % (v/v)	Glycerin
	→ pH mit NaOH auf 7,4 einstellen	

Lysispuffer mit Protease- und Phosphataseinhibitoren:

1 ml	Lysispuffer (pH 7,4)
2 µl	Leupeptin (0,5 mg/ml-Stammlösung)
10 µl	PMSF (100 mM-Stammlösung)
10 µl	Orthovanadat (100 mM-Stammlösung)
5,2 µl	Aprotinin (1,9 mg/ml-Stammlösung)

2.2.6 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung erfolgte unter Verwendung des Pierce™ BCA (Bicinchoninic Acid) Protein Assay Kits mit den aus der Zellyse gewonnenen Proteinen (2.2.5). Zunächst wurden dazu die für die Bestimmung abgenommenen 5 µl der Proben 1:10 mit Aqua ad iniectabilia verdünnt. Für die Herstellung der Eichreihe wurde der im Kit enthaltene Albumin-Standard verwendet. Aus der Stammlösung von 2 mg/ml Albumin-Standard wurde mit Aqua ad iniectabilia zunächst eine Stammlösung von 1 mg/ml

hergestellt, die dann für die Herstellung der Verdünnungsreihe verwendet wurde (Tab. 2-3).

Tab. 2-3: Pipettierschema zur Erstellung der Eichreihen für die Proteinbestimmung

BSA ($\mu\text{g/ml}$)	0	0,02	0,04	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0
$\mu\text{l BSA}$ ($1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$)	0	10	10	10	10	20	30	40	20
$\mu\text{l Aqua ad iniectabilia}$	20	490	240	90	40	30	20	10	0

Für die Proteinbestimmung wurden die Eichreihe und die verdünnten Lysate auf eine 96-Well-Platte pipettiert, wobei $10 \mu\text{l}$ der Eichreihe doppelt und $10 \mu\text{l}$ der verdünnten Lysate dreifach aufgetragen wurden. Anschließend wurden $200 \mu\text{l}$ des Working Reagents, welches zu 50 Teilen aus Reagent A und zu einem Teil aus Reagent B bestand, in jedes Well gegeben und kurz geschüttelt. Die 96-Well-Platte wurde dann 30 min bei 37°C inkubiert und im Anschluss die Absorption am Plattenreader (A. Sternkopf GmbH, Lübeck) bei 570 nm bestimmt. Unter Einbeziehung des Verdünnungsfaktors konnte dann die Proteinmenge in $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ berechnet werden.

2.2.7 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (Laemmli, 1970)

Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) dient der Auftrennung von Proteinen nach ihrer Molekülmasse. Bei SDS (sodium dodecyl sulfate = Natriumdodecylsulfat) handelt sich um ein anionisches Detergenz, welches die Eigenladung von Proteinen überdeckt, so dass Mizellen mit konstanter negativer Ladung pro Masseneinheit entstehen, mit ca. $1,4 \text{ g SDS pro g Protein}$ (Lottspeich und Engels, 2006). Durch die negative Ladung wandern dann alle Proteine im elektrischen Feld in Richtung Anode und das Proteingemisch wird nur aufgrund der Molekülmasse der enthaltenen Proteine aufgetrennt.

Die Durchführung der SDS-PAGE erfolgte mit dem Bio-Rad Mini-PROTEAN[®] Tetra Cell System (Bio-Rad, München). Für die Gelelektrophorese wurden 10 %ige SDS-Gele von 1 mm oder $1,5 \text{ mm}$ Dicke verwendet (Tab. 2-4) und in der Regel $40 \mu\text{g}$ Protein pro Tasche aufgetragen. Mit Hilfe der aus der Proteinbestimmung erhaltenen Werte wurde das einzusetzende Volumen der Proben errechnet. Dieses wurde mit Aqua ad iniectabilia auf ein Volumen von $20 \mu\text{l}$ (1 mm -Gele) bzw. $40 \mu\text{l}$ ($1,5 \text{ mm}$ -Gele) aufgefüllt und im Verhältnis von 5:1 mit 5 x Laemmli-Puffer versetzt. Die Ansätze wurden dann für 10 min bei 95°C denaturiert, anschließend auf Eis abgekühlt und auf die vorbereiteten Gele aufgetragen. Zusätzlich wurde als Proteinmarker der Prestained SDS-PAGE Standard (Broad Range) aufgetragen, um die aufgetrennten Proteine anhand ihrer Größe identifizieren zu können. Der Gellauf erfolgte mit 1 x Laufpuffer

(10 x Laufpuffer 1:10 verdünnt mit Aqua dest.) bei 15 mA pro Gel, wobei die Stromstärke auf 25 mA pro Gel erhöht wurde, nachdem die Lauffront die Grenze zwischen Sammel- und Trenngel erreicht hatte. Sobald die Lauffront am Ende des Gels austrat, wurde der Gellauf gestoppt und die Gele für den Western Blot verwendet.

10 x Laufpuffer:	250 mM	Tris Ultrapure
	1920 mM	Glycin
	1 % (w/v)	SDS
	(keine pH-Einstellung)	
5 x Laemmli-Puffer:	2 ml	0,625 M Tris HCl, pH 6,8 (einstellen mit NaOH)
	1 g	SDS
	5 ml	Glycerin (wasserfrei)
	0,5 ml	β -Mercaptoethanol
	0,5 ml	Bromphenolblau (1 % in EtOH)
	→ auffüllen auf 10 ml mit Aqua ad iniectabilia	

Tab. 2-4: Ansätze für zwei 10 %ige SDS-Polyacrylamidgele

	Trenngel (10 %)		Sammelgel (4 %)	
	1 mm	1,5 mm	1 mm	1,5 mm
Aqua ad iniectabilia	4,05 ml	6,075 ml	3,05 ml	4,575 ml
0,5 M Tris HCl, pH 6,8	-	-	1,25 ml	1,875 ml
1,5 M Tris HCl, pH 8,8	2,5 ml	3,25 ml	-	-
10 % (w/v) SDS	100 μ l	150 μ l	50 μ l	75 μ l
Acrylamid/Bisacrylamid (30 %/0,8 %; w/v)	3,3 ml	4,95 ml	0,65 ml	0,975 ml
10 % (w/v) APS	50 μ l	75 μ l	25 μ l	37,5 μ l
Temed	5 μ l	7,5 μ l	2,5 μ l	7,5 μ l

2.2.8 Western Blot

Mit Hilfe des Western Blots wurden die durch die SDS-PAGE aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulosemembran übertragen, so dass anschließend der immunologische Nachweis der Proteine erfolgen konnte.

Der Western Blot wurde direkt im Anschluss an die SDS-PAGE unter Verwendung des Mini Trans-Blot[®] Electrophoretic Transfer Cell Systems (Bio-Rad, München) durchgeführt. Der Zusammenbau der Blot-Anlage erfolgte in einer mit 1 x Transferpuffer gefüllten Wanne nach folgendem Schema: zwei Schwämme, Filterpapier, SDS-Gel, Nitrozellulosemembran, Filterpapier, zwei Schwämme. Während des Western Blots war das Gel auf Seiten der Kathode und die Membran auf Seiten der Anode, so dass die negativ geladenen Proteine in Richtung positiven Pol auf die Membran wandern.

Der Blotvorgang wurde über 2 h bei einer Stromstärke von 200 mA pro Gel mit 1 x Transferpuffer und unter Verwendung von Kühllakkus durchgeführt.

10 x Transferpuffer:	250 mM	Tris Ultrapure
	1920 mM	Glycin
	0,5 %	SDS
	(keine pH-Einstellung)	

1 x Transferpuffer (Gebrauchslösung)		
	100 ml	10 x Transferpuffer
	700 ml	Aqua dest.
	200 ml	Methanol

2.2.9 Immunologischer Nachweis der Proteine (Chemilumineszenz)

Nachdem die Proteine mittels Western Blot auf die Nitrozellulosemembran transferiert wurden, wurden die Membranen in 50 ml-Zentrifugenröhrchen überführt und kurz mit 1 x TBS-T (ca. 5 ml) gewaschen. Anschließend wurden die Membranen mit 5 %igem Milchpulver für 1 h bei Raumtemperatur auf einem Rollmixer inkubiert, um unspezifische Proteinbindestellen zu blockieren. Dann wurden die Membranen 2 x 10 min und 2 x 5 min mit 1 x TBS-T gewaschen. Anschließend wurden die Membranen mit dem Primärantikörper, der gegen ICAM-1, LFA-1 oder β -Aktin gerichtet war, in 1 %igem Milchpulver (3–5 ml 1 x TBS-T mit 1 % Milchpulver) über Nacht bei 4 °C auf dem Rollmixer inkubiert. Alternativ konnte auch für mindestens 1 h bei Raumtemperatur gerollt werden. Am darauffolgenden Tag wurden die Membranen dann zunächst mit 1 x TBS-T für 2 x 10 min und 2 x 5 min gewaschen und dann mit dem Sekundärantikörper (Anti-Mouse IgG) in 1 %igem Milchpulver für 1 h bei Raumtemperatur gerollt, in dieser Zeit bindet der Sekundär- an den Primärantikörper. Bis auf den β -Aktin-Antikörper, der in einer 1:10000-Verdünnung genutzt wurde, wurden alle anderen verwendeten Antikörper 1:1000 angesetzt. Die Membranen wurden nach der Inkubation mit dem Sekundärantikörper dann wieder, wie angegeben, mit 1 x TBS-T gewaschen und es erfolgte die Immundetektion.

Da der Sekundärantikörper mit einer Meerrettich-Peroxidase konjugiert ist, lässt sich unter Verwendung eines chemilumineszenten Substrates ein Lichtsignal erzeugen. Die Zusammensetzung der für die Chemilumineszenzreaktion verwendeten Lösungen ist in Tab. 2-5 zusammengestellt. Für die Proteindetektion wurden Lösung I und Lösung II vorher in einem Verhältnis von 1:1 gemischt und auf Raumtemperatur erwärmt. Dieses Gemisch wurde dann gleichmäßig auf der Membranen verteilt und das entstehende Lichtsignal am Molecular Imager® ChemiDoc™ XRS (Bio-Rad, München) detektiert.

Zusätzlich zu dem Chemilumineszenznachweis wurde ein Foto (ein sogenanntes Epi-Bild) unter Belichtung der Membran gemacht, auf dem der Größenstandard für die Abschätzung der Proteingröße zu sehen ist (Abb. 2-4, Beispiel eines Epi-Bildes und des dazugehörigen Chemilumineszenzbildes). Mit Hilfe der Quantity One[®] 1-D Analysis Software (Bio-Rad, München) konnten dann im Anschluss die einzelnen Proteinbanden quantifiziert werden.

10 x TBS, pH 7,5: 1 M Tris Ultrapure
 1,5 M NaCl
 → pH mit HCl auf 7,5 einstellen

1 x TBS-T: 100 ml 10 x TBS
 900 ml Aqua dest.
 1 ml Tween[®] 20

Tab. 2-5: Zusammensetzung der Chemilumineszenzlösung (Lösung I und II)

Die Lagerung der Lösungen erfolgte im Dunkeln bei 4 °C.

	Reagenzien	Konzentration Stammlösung	Finale Konzentration	Stammlösung für 50 ml Lösung
Lösung I	Luminol	250 mM	2,5 mM	500 µl
	p-Cumarinsäure	90 mM	400 µM	220 µl
	Tris HCl, pH 8,5	1 M	100 mM	5 ml
		auf 50 ml mit Aqua ad iniectabilia auffüllen		
Lösung II	H ₂ O ₂	30 %	0,18 %	300 µl
	Tris HCl, pH 8,5	1 M	100 mM	5 ml
		auf 50 ml mit Aqua ad iniectabilia auffüllen		

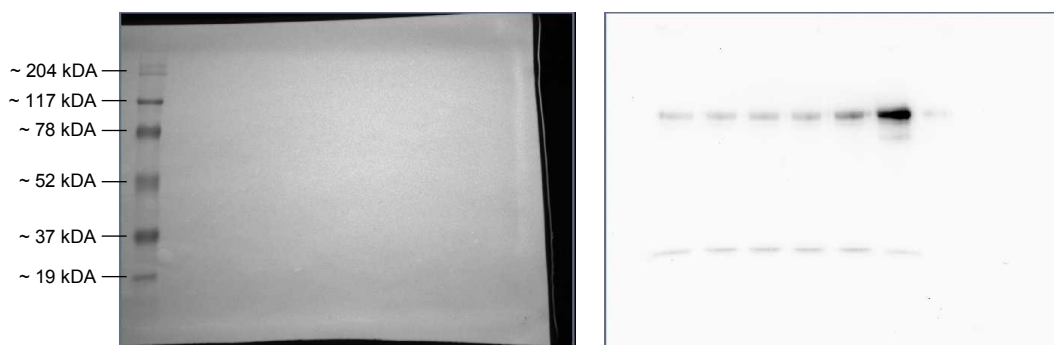


Abb. 2-4: Proteinmarker und Chemilumineszenz bei ICAM-1-Nachweis (Beispiel)

Das Protein ICAM-1 hat eine Molekülmasse von etwa 90 kDa und liegt somit zwischen den Markerbanden von rund 78 und 117 kDa.

2.2.10 Strippen und Aufbewahrung von Membranen

In der Regel wurde auf einer Membran mehr als ein Protein detektiert. Insofern war es nach einer erfolgten Proteindetektion notwendig, die auf der Membran befindlichen Antikörper zu entfernen. Dafür wurden die Membranen in 50 ml-Zentrifugenröhrchen 2 x 10 min mit etwa 5 ml 1 x Glycin-Stripp-Puffer (5 x Glycin-Stripp-Puffer 1:5 verdünnt mit Aqua dest.) auf dem Rollmixer inkubiert und anschließend 5 min mit 1 x TBS-T gewaschen. Sollte ein weiteres Protein detektiert werden, dann wurde die Prozedur unter 2.2.9 wiederholt. Wenn kein weiteres Protein nachgewiesen werden sollte, dann wurden die Membranen 2 x 20 min mit Aqua dest. gewaschen, anschließend getrocknet und in einer Folie bei 4 °C gelagert. So war es möglich, auch zu einem späteren Zeitpunkt noch Proteine auf der Membran zu detektieren, indem diese reaktiviert wurden. Die Reaktivierung von getrockneten Membranen erfolgte unter Rollen mit Aqua dest. für 10–20 min. Anschließend wurden die Membranen für 5 min mit 1 x TBS-T gerollt und dann mit 5 %igem Milchpulver blockiert und die Behandlung wie unter 2.2.9 fortgeführt.

5 x Glycin-Stripp-Puffer, pH 2,5: 1 M Glycin
 2,5 M NaCl
 → pH mit HCl auf 2,5 einstellen

2.2.11 Statistik

Die statistische Analyse von Daten erfolgte mit dem Programm GraphPad Prism 5.04 (GraphPad Software, Inc., San Diego, USA). Die Vergleiche zwischen den Gruppen wurden mit dem Student's two-tailed t-Test oder dem one-way ANOVA plus post Bonferroni-Test oder Dunnett-Test durchgeführt. Ergebnisse wurden bei Werten von $P < 0,05$ als statistisch signifikant erachtet.

3. Ergebnisse

3.1 Einfluss von CBD auf die ICAM-1-Proteinexpression in Tumorzellen

Um die Wirkung von CBD auf die Proteinexpression von Tumorzellen zu untersuchen, wurden die beiden Lungentumorzelllinien A549 und H460 sowie Zellen aus einer Gehirnmastase einer Lungenkrebspatientin (HROBML03) mit unterschiedlichen Konzentrationen (0,001–3 μM) dieses Cannabinoids behandelt. Im Fall der A549- und H460-Zellen konnte bereits eine durch CBD induzierte erhöhte Expression von ICAM-1 sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene gezeigt werden (Ramer et al., 2012). Im Rahmen dieser Arbeit konnten die Ergebnisse zur CBD-induzierten Hochregulation der ICAM-1-Proteinexpression in diesen beiden Zelllinien reproduziert werden. Zudem hatte die Stimulation der HROBML03-Zellen mit CBD ebenfalls einen Anstieg des ICAM-1-Proteinlevels in diesen Zellen zur Folge (Abb. 3-1). In allen drei Lungentumorzellen resultierte die Stimulation mit 3 μM CBD in einem signifikanten Anstieg der ICAM-1-Proteinexpression. So war das ICAM-1-Proteinlevel in den A549-Zellen ca. 4-fach ($424 \pm 45 \%$) und in den H460- ($769 \pm 194 \%$) und HROBML03-Zellen ($807 \pm 148 \%$) etwa 8-fach erhöht. Eine Konzentration von 1 μM CBD bewirkte bei den A549- ($306 \pm 25 \%$) und den HROBML03-Zellen ($285 \pm 42 \%$) einen etwa 3-fachen Anstieg der ICAM-1-Proteinexpression im Vergleich zur Vehikelkontrolle, wohingegen bei den H460-Zellen ($182 \pm 31 \%$) nur ein geringer Anstieg zu beobachten war. Die niedrigen CBD-Konzentrationen von 0,001 bis 0,1 μM hatten nur einen moderaten bzw. keinen Einfluss auf die ICAM-1-Proteinexpression der hier verwendeten Tumorzellen.

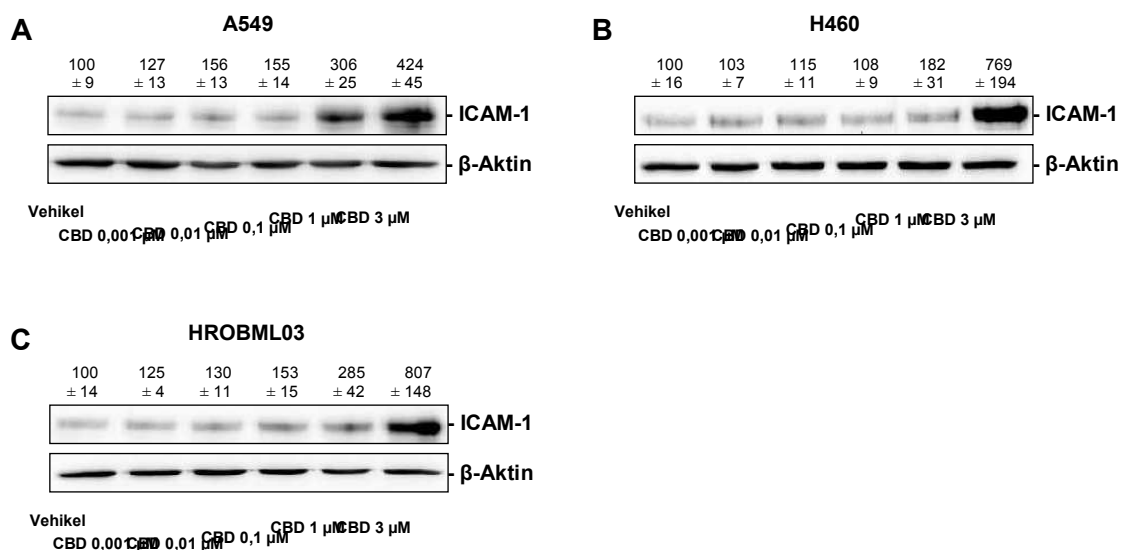


Abb. 3-1: Einfluss von CBD auf die ICAM-1-Proteinexpression von Lungentumorzellen

Die Tumorzellen A549 (A), H460 (B) und HROBML03 (C) wurden 48 h mit Vehikel und CBD (0,001–3 μM) inkubiert. Die Werte oberhalb der Blots sind die Mittelwerte \pm SEM (%-Angabe) der densitometrischen Analyse von $n = 5$ (A) oder $n = 7$ (B, C) Blots nach Normalisierung der ICAM-1-Expression auf β -Aktin.

3.2 Rolle von ICAM-1 bei der Adhäsion von LAK-Zellen an CBD-stimulierte Tumorzellen

Eine wesentliche Funktion von ICAM-1 ist die Vermittlung von Zell-Zell-Kontakten über Adhäsion, die u. a. eine wichtige Rolle bei der Interaktion von zytotoxischen Zellen mit ihren Zielzellen spielt (van de Stolpe und van der Saag, 1996). In diesem Zusammenhang wurde zunächst die Rolle des Adhäsionsmoleküls ICAM-1 bei der Vermittlung der Adhäsion von LAK- an Tumorzellen, die mit CBD behandelt wurden, untersucht. Dafür wurde ein gegen ICAM-1 gerichteter neutralisierender Antikörper verwendet, mit dem die stimulierten Tumorzellen vor der Coinkubation mit LAK-Zellen präinkubiert wurden. In Abb. 3-2 sind die Ergebnisse dieser Blockierungsversuche dargestellt. Eine Behandlung der Lungentumorzellen mit CBD führte zu einer erhöhten Adhäsion von LAK-Zellen. Dabei hatte die Behandlung der drei verwendeten Tumorzellen mit 3 μM CBD (rechte Spalte) jeweils einen signifikanten Anstieg der an die Tumorzellen adhärenen LAK-Zellen zur Folge. So war die Adhäsion von LAK-Zellen an A549-Zellen im Vergleich zur Kontrolle 1,5-fach ($150 \pm 10 \%$), an H460-Zellen 3,3-fach ($327 \pm 22 \%$) und an HROBML03-Zellen 2-fach ($205 \pm 10 \%$) erhöht. Bei einer CBD-Konzentration von 1 μM (linke Spalte) konnte dagegen nur bei den H460- und HROBML03-Zellen eine erhöhte Adhäsion von LAK- an Tumorzellen gezeigt werden, mit einer LAK-Zell-Adhäsion von $133 \pm 6 \%$ bei CBD-stimulierten H460- und von $135 \pm 6 \%$ bei CBD-stimulierten HROBML03-Zellen im Vergleich zur entsprechenden Vehikelkontrolle von 100 %. Die Behandlung der mit 3 μM CBD stimulierten Tumorzellen mit einem ICAM-1-Antikörper resultierte in einer verringerten Adhäsion von LAK-Zellen. Demzufolge lag die Adhäsion von LAK- an A549-Zellen bei $125 \pm 9 \%$, an H460-Zellen bei $218 \pm 14 \%$ und an HROBML03-Zellen bei $150 \pm 10 \%$. Der Einsatz eines Isotype Control-Antikörpers, der als Negativkontrolle diente, hatte keinen Effekt auf die CBD-induzierte Adhäsion zwischen LAK- und Tumorzellen (A549, $168 \pm 15 \%$; H460, $282 \pm 20 \%$; HROBML03, $214 \pm 19 \%$).

Da die Adhäsion unter Einbeziehung der Viabilität berechnet wurde, erfolgte parallel zu diesem Assay auch eine Bestimmung der Viabilität der Tumorzellen unter gleichen Bedingungen (48 h CBD, 3 h Antikörperinkubation; 2.2.4). Die Ergebnisse zum Einfluss von CBD und den verwendeten Antikörpern auf die Viabilität der Tumorzellen sind im Anhang in Tab. 8-1 aufgeführt. So hatte eine CBD-Konzentration von 1 μM keinen negativen Effekt auf die Viabilität aller drei Lungentumorzellen, sie bewegte sich um die 100 %, also im Bereich der entsprechenden Vehikelkontrolle. Bei der Behandlung der Tumorzellen mit 3 μM CBD hingegen zeigte sich z. T. ein anderes Bild. So war kaum ein Effekt bei den HROBML03-Zellen ($93 \pm 2 \%$), eine geringe Viabilitätsabnahme bei den A549-Zellen ($83 \pm 6 \%$) und ein größerer Viabilitätsverlust bei den H460-Zellen

($59 \pm 5\%$) zu verzeichnen. Der ICAM-1-Antikörper wie auch der Isotype Control-Antikörper hatten keinen zusätzlichen Einfluss auf die Viabilität der Tumorzellen.

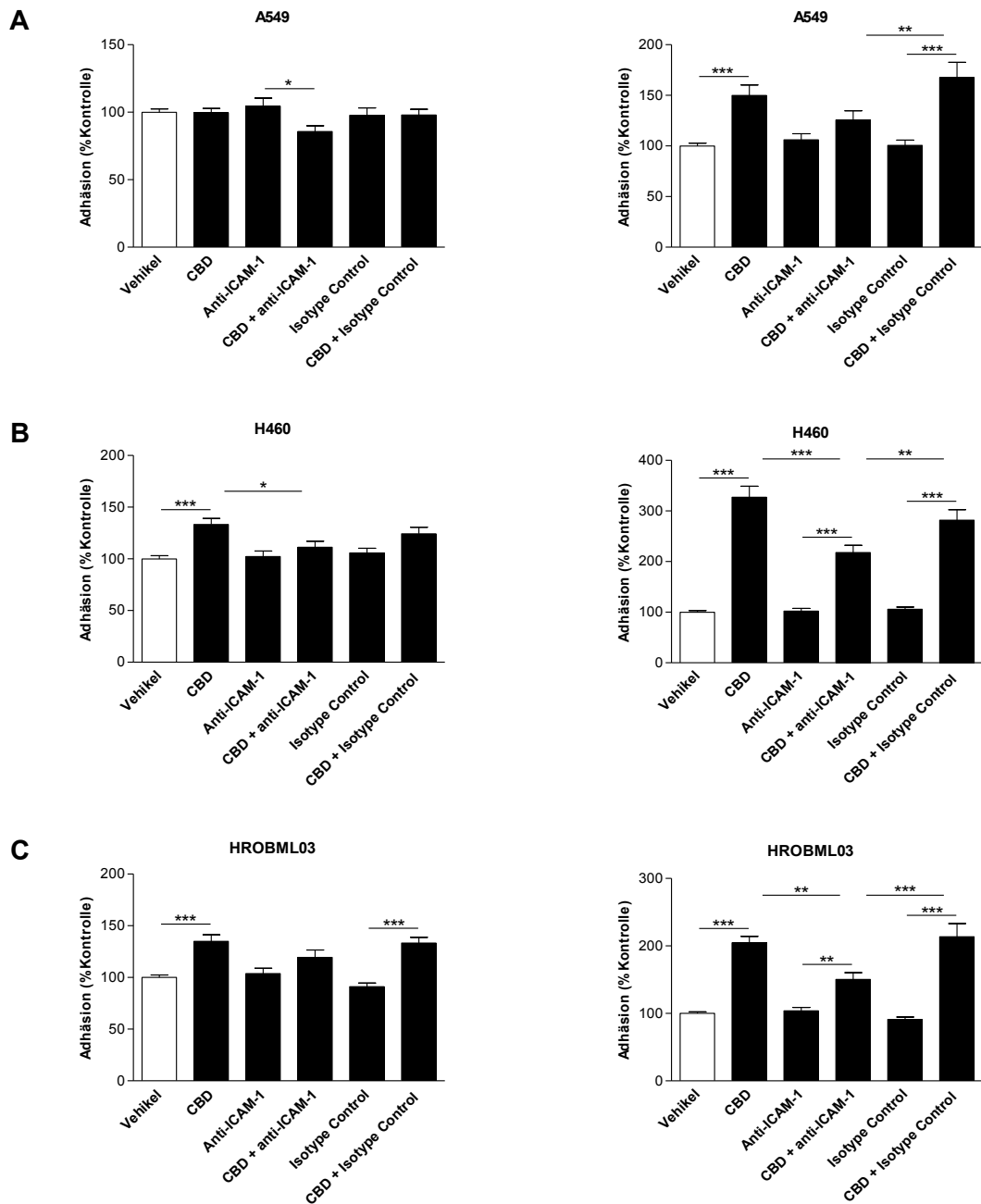


Abb. 3-2: Einfluss eines ICAM-1-Antikörpers auf die Adhäsion von LAK-Zellen an CBD-stimulierte Tumorzellen

A549- (A), H460- (B) und HROBML03-Zellen (C) (10.000 Zellen/Well) wurden für 48 h mit Vehikel oder 1 μ M (linke Spalte) bzw. 3 μ M CBD (rechte Spalte) stimuliert. Anschließend wurden die Tumorzellen 3 h mit einem ICAM-1- bzw. Isotype Control-Antikörper (1 μ g/ml) inkubiert, bevor dann eine Coinkubation mit LAK-Zellen über 1 h erfolgte (E:Z = 4:1). In den Diagrammen sind die Mittelwerte \pm SEM von n = 36 (A, 8 Spender), n = 44 (B, 7 Spender) und n = 32 (C, 5 Spender) Wells dargestellt. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; one-way ANOVA plus post hoc Bonferroni-Test.

3.3 LAK-Zell-vermittelte Lyse von CBD-stimulierten Tumorzellen

Neben der Adhäsion wurde die LAK-Zell-vermittelte zytotoxische Lyse von CBD- im Vergleich zu vehikelbehandelten Tumorzellen untersucht. Dabei wurden in Vorversuchen zunächst unterschiedliche Tumorzellzahlen und Verhältnisse von Tumor- zu LAK-Zellen (3.3.1) getestet und diejenigen ausgewählt, die für nachfolgende Experimente verwendet werden sollten. Anschließend wurden dann verschiedene Parameter, die bei der zytotoxischen Aktivität der LAK-Zellen gegenüber Tumorzellen eine Bedeutung haben könnten, untersucht. Dies beinhaltete den Einfluss von CBD auf die LAK-Zellen (3.3.2), die Rolle von ICAM-1 (3.3.3) und die Beteiligung von Rezeptoren (3.3.4) bei der ICAM-1-Hochregulation und der spezifischen Tumorzellyse und bei Letzterem auch die Rolle von dem auf Leukozyten exprimierten LFA-1 (3.3.5).

3.3.1 Unterschiedliche Tumorzellzahlen und Verhältnisse von LAK- zu Tumorzellen

Zunächst wurden unterschiedliche Zellzahlen der verwendeten Tumorzellen und unterschiedliche Verhältnisse von LAK- (Effektorzellen = E) zu Tumorzellen (Zielzellen = Z) getestet. Dabei wurden die folgenden E:Z-Verhältnisse ausgewählt: 1:1, 2:1, 4:1, 8:1, 10:1 und 20:1. In Abb. 3-3 sind die Ergebnisse zu den Zytotoxizitätsversuchen mit 5.000 und 10.000 Tumorzellen dargestellt. In Vorversuchen zur Wahl der Zellzahl wurden zudem auch Versuche mit 7.500 und 15.000 Tumorzellen und den oben aufgeführten E:Z-Verhältnissen durchgeführt. Die Lyse von vehikelbehandelten Tumorzellen ist als gestrichelte und die der CBD-behandelten als durchgezogene Linie dargestellt. Anhand der Diagramme lässt sich erkennen, dass die Lyse von CBD-stimulierten im Vergleich zu der vehikelbehandelter Zellen im Allgemeinen erhöht war. Darüber hinaus nahm die spezifische Lyse der Tumorzellen mit steigender Anzahl von LAK-Zellen, d. h. mit höheren E:Z-Verhältnissen, zu. Bei diesen Zytotoxizitätsversuchen wurde neben der Konzentration von 3 μ M CBD wie bei der Adhäsion auch 1 μ M CBD mitgeführt. Da die zytotoxische Lyse von mit 1 μ M CBD behandelten Tumorzellen im Bereich der Lyse von vehikelbehandelten Zellen lag, ist diese in den Diagrammen nicht mit dargestellt.

Diese Versuche galten in erster Linie als Vorversuche, um für nachfolgende Untersuchungen die entsprechenden Bedingungen auswählen zu können. Bei den A549-Zellen kristallisierte sich die Verwendung von 10.000 Zellen für weitere Versuche heraus, wobei wie bei der Adhäsion ebenfalls das Verhältnis E:Z = 4:1 ausgewählt wurde. Das Gleiche galt auch für die HROBML03-Zellen, bei denen die Experimente mit 5.000 Zellen keine eindeutigen Ergebnisse hervorbrachten. Bei den H460-Zellen konnte sowohl mit 5.000 als auch mit 10.000 Zellen eine signifikant erhöhte Lyse von

CBD- gegenüber vehikelbehandelten Zellen beobachtet werden. Somit wurden die ersten anschließenden Experimente mit 5.000 Zellen und E:Z = 8:1 durchgeführt. Im Verlauf der Arbeit zeigte sich dann jedoch, dass die Behandlung der H460-Zellen mit 3 μ M CBD in einigen Versuchen zu einer z. T. sehr stark verringerten Viabilität der Zellen führte, die teilweise unter 20 % (vs. 100 % Vehikel) lag. Aufgrund dessen wurden die Bedingungen dann auf 10.000 Zellen und E:Z = 4:1 umgestellt, wie bei den Versuchen mit den A549- und HROBML03-Zellen. Demnach unterscheiden sich bei den H460-Zellen die Bedingungen für die Versuche mit ICAM-1 siRNA (Abb. 3-8, 3-13, 3-14) und den unterschiedlichen Cannabinoiden (Abb. 3-12) von denen der restlichen Experimente hinsichtlich der verwendeten Zellzahl und des E:Z-Verhältnisses.

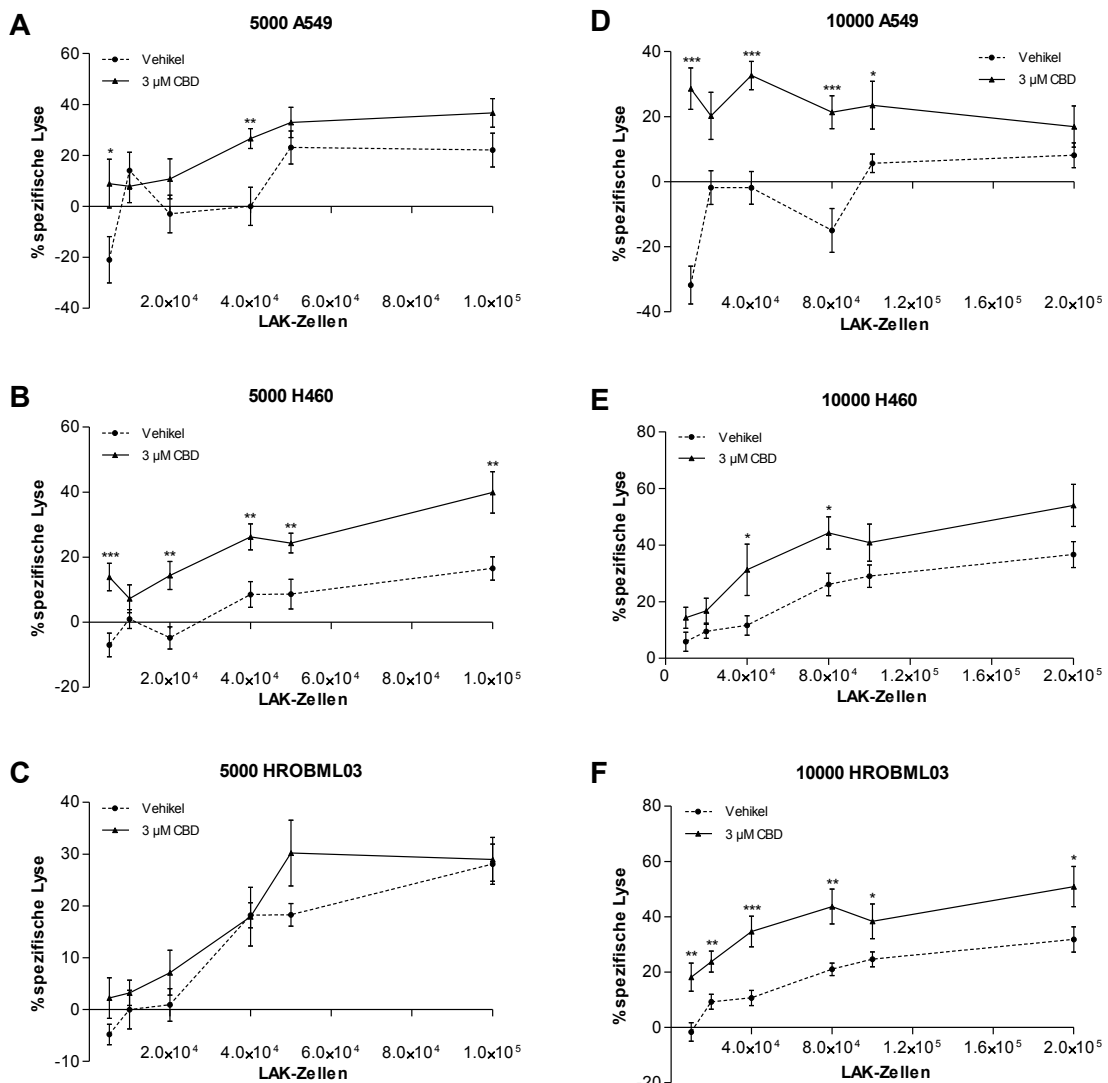


Abb. 3-3: LAK-Zell-vermittelte Lyse von CBD-stimulierten Tumorzellen bei unterschiedlichen E:Z-Verhältnissen

Die Versuche wurden mit 5.000 (A-C) oder 10.000 (D-F) Zellen der Lungentumorzellen A549 (A, D), H460 (B, E) und HROBML03 (C, F) durchgeführt. Die Zellen wurden 48 h mit Vehikel (gestrichelte Linie) bzw. 3 μ M CBD (durchgezogene Linie) stimuliert und anschließend für 6 h mit unterschiedlichen LAK-Zellzahlen cointubiert (E:Z = 1:1; 2:1; 4:1; 8:1; 10:1 und 20:1). Die Messpunkte sind als Mittelwerte \pm SEM von n = 16 (A, C, D, 4 Spender), n = 20 (B, 5 Spender) oder n = 24 (E, F, 6 Spender) Wells dargestellt. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ vs. entsprechender Vehikelkontrolle; Student's t-Test.

Zusätzlich zu den Lungentumorzelllinien A549 und H460 und den Gehirnetastasenzellen einer 47 Jahre alten Patientin mit NSCLC (HROBML03) standen auch Zellen aus einer Gehirnetastase eines 67 Jahre alten Patienten mit NSCLC, hier als HROBML01 bezeichnet, zur Verfügung. Da diese Tumorzellen ein sehr langsames Wachstum aufwiesen und die Zellen nur in geringen Passagen verwendet werden konnten, waren nur wenige Versuche möglich. Die Ergebnisse zur Verwendung der Zellzahl von 5.000 HROBML01-Zellen und verschiedenen E:Z-Verhältnissen sind in Abb. 3-4 gezeigt. Auch hier war die zytotoxische Lyse der mit CBD behandelten HROBML01-Zellen im Vergleich zu der vehikelbehandelter Zellen erhöht und mit steigendem E:Z-Verhältnis nahm die Tumorzellyse zu. Der Nachweis zur Hochregulation der ICAM-1-Proteinexpression durch Behandlung der HROBML01-Zellen mit CBD wurde bereits früher gezeigt (Ramer et al., 2012).

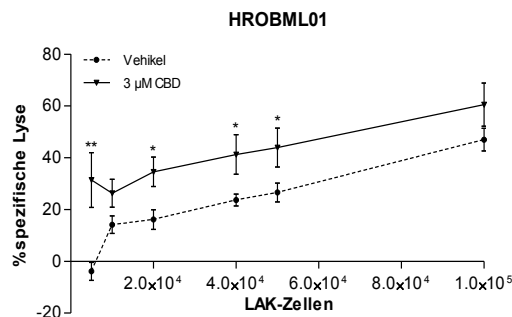


Abb. 3-4: LAK-Zell-vermittelte Lyse von CBD-stimulierten HROBML01-Zellen bei unterschiedlichen E:Z-Verhältnissen

Die Versuche wurden mit 5.000 HROBML01-Zellen, die 48 h mit Vehikel (gestrichelte Linie) bzw. 3 µM CBD (durchgezogene Linie) stimuliert wurden, durchgeführt. Die anschließende 6-stündige Coinkubation erfolgte mit unterschiedlichen LAK-Zellzahlen (E:Z = 1:1; 2:1; 4:1; 8:1; 10:1 und 20:1). Die Messpunkte sind als Mittelwerte \pm SEM von n = 8 (2 Spender) Wells dargestellt. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ vs. entsprechender Vehikelkontrolle; Student's t-Test.

3.3.2 Einfluss von CBD auf die LAK-Zellen

Wie erwähnt, hatte die Behandlung von Tumorzellen mit CBD Einfluss auf die Proteinexpression von ICAM-1 (3.1) und damit einhergehend auf die Adhäsion von LAK-Zellen an Tumorzellen (3.2) und auf die Lyse der Tumor- durch LAK-Zellen (3.3.1). Dementsprechend wurde ebenfalls die Wirkung von CBD auf die LAK-Zellen untersucht. Dabei wurde eine mögliche Beeinflussung der LFA-1-Proteinexpression, der Vitalität und der zytotoxischen Aktivität der Zellen überprüft.

3.3.2.1 Vitalität und LFA-1-Expression

Die Untersuchung des Einflusses von CBD auf die Vitalität der LAK-Zellen erfolgte über die Bestimmung der Zellzahl mit Trypanblaufärbung (2.2.2.4). Durch die Inkubation der LAK-Zellen mit IL-2 kam es zu einer Abnahme der Zellzahl von anfänglichen 100 % lebende Zellen (dritter Tag IL-2) auf 65 ± 9 % (sechster Tag IL-2). Es waren also etwa ein Drittel weniger lebende Zellen vorhanden. Sowohl die zusätzliche Behandlung der LAK-Zellen mit Vehikel als auch mit CBD hatte keinen Einfluss auf die Vitalität der LAK-Zellen. So nahm die Zellzahl vom dritten zum sechsten Tag der IL-2-Behandlung durch Stimulation mit dem Vehikel auf 71 ± 6 % und bei Stimulation mit CBD auf 74 ± 7 % lebende Zellen ab. Es zeigten sich also keine signifikanten Unterschiede zwischen der Zellzahlabnahme unbehandelter, vehikel- oder CBD-behandelter LAK-Zellen. Bezüglich toter Zellen (blau gefärbt) in den jeweiligen Zellsuspensionen waren ebenfalls keine Unterschiede zu beobachten. Der Anteil toter Zellen lag immer unterhalb von 0,05 Mio. Zellen/ml. Die Bestimmung der Abnahme der Zellzahl durch Inkubation mit Vehikel oder CBD erfolgte mit LAK-Zellen von fünf verschiedenen Spendern.

Neben dem Einfluss von CBD auf die Zellzahl wurde auch dessen Einfluss auf die LFA-1-Proteinexpression von LAK-Zellen mittels Western Blot-Analyse bestimmt, wobei ein repräsentativer Western Blot zur LFA-1-Expression in Abb. 3-5 gezeigt ist. Die 48-stündige Inkubation der LAK-Zellen mit Vehikel (106 ± 11 %) und $3 \mu\text{M}$ CBD (100 ± 20 %) hatte im Vergleich zu unbehandelten LAK-Zellen keinen Einfluss auf die LFA-1-Proteinexpression. Gleichzeitig diente dieser Versuch auch dem Nachweis der LFA-1-Proteinexpression durch die LAK-Zellen.

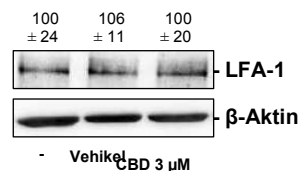


Abb. 3-5: Einfluss von CBD auf die LFA-1-Proteinexpression von LAK-Zellen

Die LAK-Zellen wurden in RPMI 1640 mit 10 % FCS, 100 U/ml Penicillin, 100 $\mu\text{g/ml}$ Streptomycin und 10 ng/ml IL-2 (erste Bande) kultiviert. Zusätzlich wurde ein Teil der Zellen für 48 h mit Vehikel (0,1 % EtOH, zweite Bande) oder $3 \mu\text{M}$ CBD (dritte Bande) inkubiert. Die Werte oberhalb des Blots zeigen die Mittelwerte \pm SEM (%-Angabe) der densitometrischen Analyse von $n = 4$ Blots (generierte LAK-Zellen von 4 verschiedenen Spendern) nach Normalisierung auf β -Aktin.

3.3.2.2 Zytotoxische Aktivität

Zusätzlich zum Einfluss von CBD auf die LFA-1-Expression und Vitalität der LAK-Zellen wurde die zytotoxische Aktivität von CBD-behandelten LAK-Zellen überprüft. Dafür wurden die entsprechend mit Vehikel oder CBD behandelten LAK-Zellen von den

gleichen Spendern wie unter 3.3.2.1 verwendet. Die zytotoxische Lyse von CBD-stimulierten Tumorzellen durch die unterschiedlich behandelten LAK-Zellen (ohne Zusatz, mit Vehikel, mit 3 μ M CBD) ist in Abb. 3-6 dargestellt. In Übereinstimmung mit dem fehlenden Einfluss von CBD auf die Zellzahl und LFA-1-Expression konnte auch kein wesentlicher Einfluss auf die zytotoxische Aktivität der LAK-Zellen festgestellt werden. CBD-behandelte A549-Zellen wurden zu 23 ± 4 % durch unbehandelte LAK-Zellen, zu 25 ± 3 % durch vehikel- und zu 23 ± 6 % durch CBD-stimulierte LAK-Zellen lysiert. Ähnlich Ergebnisse wurden auch bei den H460- (39 ± 7 %, 28 ± 8 %, 41 ± 7 %) und den HROBML03-Zellen (39 ± 6 %, 45 ± 6 %, 47 ± 6 %) erzielt.

Parallel zu diesen Zytotoxizitätsversuchen wurde auch die Viabilität der Tumorzellen, die im Anhang in Tab. 8-2 aufgeführt ist, bestimmt. CBD hatte z. T. eine leicht toxische Wirkung auf die Tumorzellen. So betrug die Viabilität im Vergleich zur entsprechenden Vehikelkontrolle von 100 % bei den H460-Zellen 76 ± 7 % und bei den HROBML03-Zellen 67 ± 5 %. Bei den A549-Zellen konnte nur eine minimale Verringerung der Viabilität beobachtet werden (88 ± 5 %).

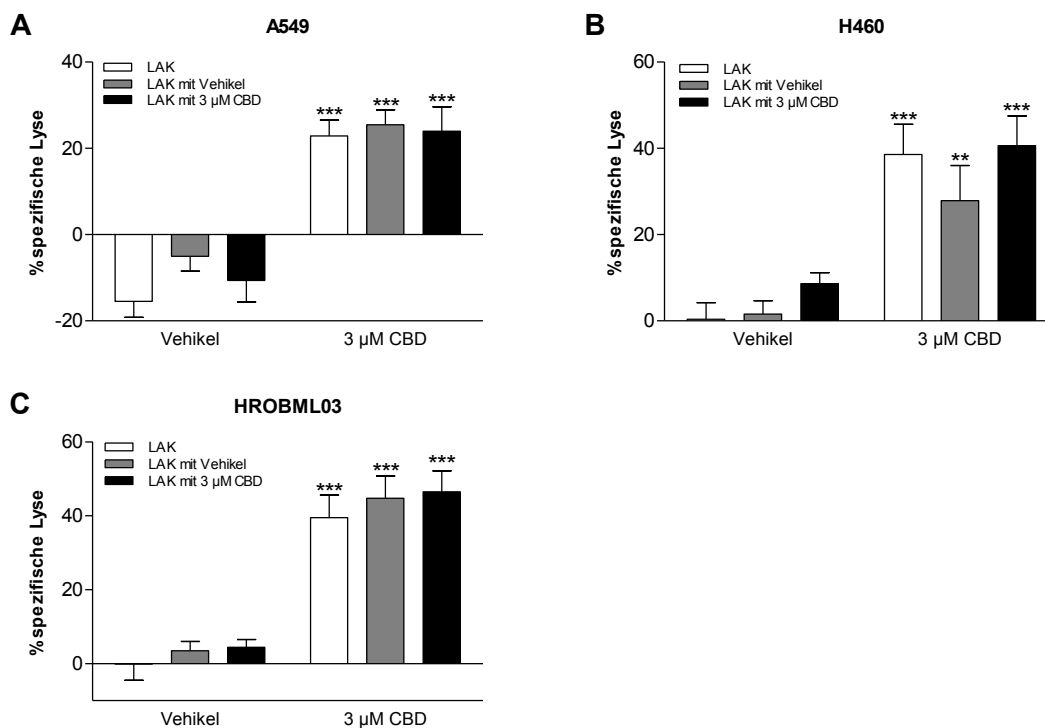


Abb. 3-6: Wirkung von CBD auf die zytotoxische Aktivität von LAK-Zellen

Die LAK-Zellen wurden in RPMI 1640 mit 10% FCS, 100 U/ml Penicillin, 100 μ g/ml Streptomycin und 10 ng/ml IL-2 (weiße Säule) kultiviert. Zusätzlich wurde ein Teil der Zellen 48 h vor dem Zytotoxizitätsassay mit Vehikel (0,1 % EtOH, graue Säule) oder 3 μ M CBD (schwarze Säule) versetzt. Die 6-stündige Coinkubation erfolgte mit entsprechend behandelten LAK-Zellen und CBD-stimulierten A549- (A), H460- (B) und HROBML03-Zellen (C) (10.000 Zellen/Well, 48 h CBD, E:Z = 4:1). Die Säulen der Diagramme geben die Mittelwerte \pm SEM von n = 24 (A, 5 Spender) und n = 16–20 (B, C, 4 Spender) Wells wieder. ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ vs. entsprechender Vehikelkontrolle; Student's t-Test.

3.3.3 Rolle von ICAM-1 bei der LAK-Zell-vermittelten Lyse von CBD-stimulierten Tumorzellen

Um die Rolle von ICAM-1 bei der zytotoxischen Lyse von CBD-stimulierten Tumorzellen durch LAK-Zellen zu untersuchen, wurden sowohl Experimente mit einem gegen ICAM-1 gerichteten neutralisierenden Antikörper als auch mit ICAM-1 siRNA durchgeführt.

3.3.3.1 ICAM-1-Antikörper

Die Versuche mit dem neutralisierenden ICAM-1-Antikörper erfolgten analog zu den Adhäsionsversuchen mit einer Antikörperkonzentration von 1 µg/ml. Als Negativkontrolle wurde der Isotype Control-Antikörper bei gleicher Konzentration verwendet. In Abb. 3-7 sind die Ergebnisse dieser Zytotoxizitätsversuche dargestellt. Bei den drei verwendeten Lungentumorzellen kam es, wie zuvor schon gezeigt, zu einer erhöhten Lyse von CBD-stimulierten im Vergleich zu vehikelbehandelten Zellen. So zeigte sich bei CBD-behandelten A549-Zellen eine spezifische Lyse von $31 \pm 6 \%$, bei H460-Zellen von $22 \pm 6 \%$ und bei HROBML03-Zellen von $25 \pm 7 \%$. Die Präinkubation der Tumorzellen mit dem ICAM-1-Antikörper vor der Coinkubation mit LAK-Zellen führte zu einer Inhibition der CBD-induzierten zytotoxischen Lyse der Tumorzellen. Demnach war die spezifische Lyse der A549-Zellen auf $6 \pm 9 \%$, die der H460-Zellen auf $5 \pm 3 \%$ und die der HROBML03-Zellen auf $8 \pm 3 \%$ reduziert und bewegte sich somit z. T. wieder im Bereich der Lyse vehikelbehandelter Zellen. Die Inkubation der Tumorzellen mit dem Isotype Control-Antikörper hatte keinen Effekt auf die Lyse der CBD-stimulierten Tumorzellen (A549, $30 \pm 6 \%$; H460, $33 \pm 4 \%$; HROBML03, $33 \pm 4 \%$).

Die zum Zytotoxizitätsassay parallel bestimmte Viabilität der Tumorzellen ist im Anhang in Tab. 8-3 zusammengestellt. Im Vergleich zur entsprechenden Vehikelkontrolle (100 %) hatte die Behandlung der Tumorzellen mit 3 µM CBD eine Verringerung der Viabilität auf $80 \pm 7 \%$ bei den A549-, $60 \pm 5 \%$ bei den H460- und $78 \pm 6 \%$ bei den HROBML03-Zellen zur Folge. Auch hier konnte wie schon bei der Adhäsion kein Einfluss des ICAM-1- bzw. Isotype Control-Antikörpers auf die Viabilität der Tumorzellen festgestellt werden.

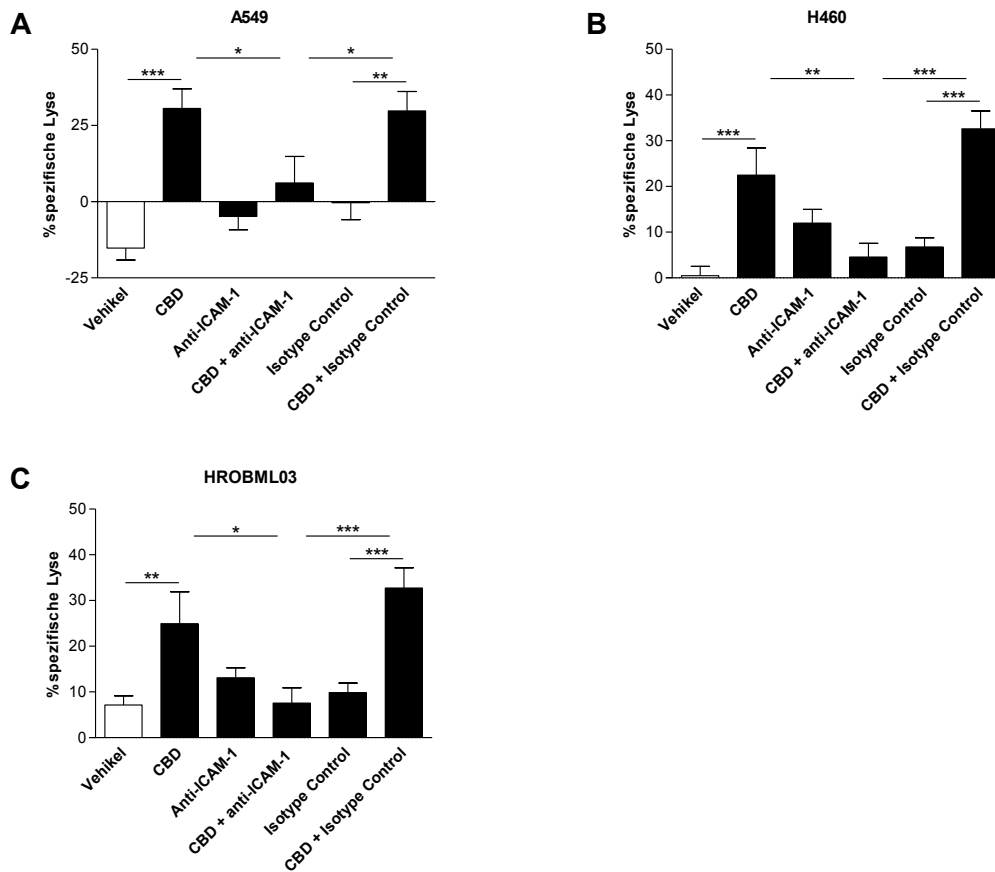


Abb. 3-7: Einfluss eines ICAM-1-Antikörpers auf die LAK-Zell-vermittelte Lyse von CBD-behandelten Tumorzellen

A549- (A), H460- (B) und HROBML03-Zellen (C) (10.000 Zellen/Well) wurden für 48 h mit Vehikel oder 3 μ M CBD stimuliert. Anschließend wurden die Tumorzellen 2 h mit einem ICAM-1- bzw. Isotype Control-Antikörper (1 μ g/ml) präinkubiert. Dann erfolgte die 6-stündige Coinkubation mit den LAK-Zellen (E:Z = 4:1). In den Diagrammen sind die Mittelwerte \pm SEM von n = 24 (A, 6 Spender), n = 32 (B, 8 Spender) und n = 20 (C, 5 Spender) Wells dargestellt. * P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001; one-way ANOVA plus post hoc Bonferroni-Test.

3.3.3.2 ICAM-1 siRNA-Transfektion

Die Versuche mit dem ICAM-1-Antikörper zeigten eine Blockierung der LAK-Zell-vermittelten zytotoxischen Lyse von CBD-behandelten Tumorzellen auf Proteinebene, also nachdem ICAM-1 hochreguliert war. Mit den Knockdown-Experimenten unter Verwendung von ICAM-1 siRNA sollte hingegen schon auf posttranskriptioneller Ebene eingegriffen werden, so dass eine Hochregulation des Proteins ICAM-1 verhindert wird. Die Effizienz der Transfektion der Tumorzellen mit ICAM-1 siRNA, nachgewiesen durch Western Blot-Analyse, und die Ergebnisse der entsprechenden Zytotoxizitätsversuche sind in Abb. 3-8 dargestellt. Schließlich konnte auch in diesen Zytotoxizitätsversuchen eine erhöhte LAK-Zell-vermittelte Lyse von CBD-stimulierten (A549, 17 \pm 6 %; H460, 38 \pm 6 %; HROBML03, 25 \pm 5 %) im Vergleich zu vehikel-behandelten Tumorzellen (spezifische Lyse < 5 %) gezeigt werden. Die Transfektion mit ICAM-1 siRNA führte zur Inhibition dieser CBD-induzierten Tumorzellyse, so dass

sich diese im Bereich der Lyse von vehikelbehandelten Zellen bewegte. Die Verwendung einer non siRNA als Negativkontrolle hatte keinen negativen Einfluss auf die spezifische Lyse der mit CBD stimulierten Tumorzellen (A549, 31 ± 5 %; H460, 33 ± 5 %; HROBML03, 24 ± 6 %).

Die parallel zum Zytotoxizitätsassay bestimmte Viabilität der Tumorzellen ist im Anhang in Tab. 8-4 zusammengefasst. CBD hatte in dieser Versuchsreihe keinen (A549-Zellen) oder nur einen geringen Einfluss auf die Viabilität der Tumorzellen. So war die Viabilität der H460-Zellen auf 77 ± 3 % und die der HROBML03-Zellen auf 85 ± 2 % im Vergleich zur entsprechenden Vehikelkontrolle (100 %) verringert. Eine Beeinflussung der Tumorzellviabilität durch die Transfektion mit ICAM-1 siRNA bzw. non siRNA konnte nicht beobachtet werden.

Die Western Blot-Analyse (Abb. 3-8, rechte Spalte), dargestellt durch jeweils einen repräsentativen Blot, wurde zur Überprüfung der Effizienz der ICAM-1 siRNA-Transfektion durchgeführt. Bei allen drei Lungentumorzellen wurde die CBD-induzierte Hochregulation der ICAM-1-Proteinexpression durch die Transfektion der Zellen mit ICAM-1 siRNA verringert. Die non siRNA hatte wie bei den Zytotoxizitätsversuchen keinen Einfluss auf die Proteinexpression von ICAM-1.

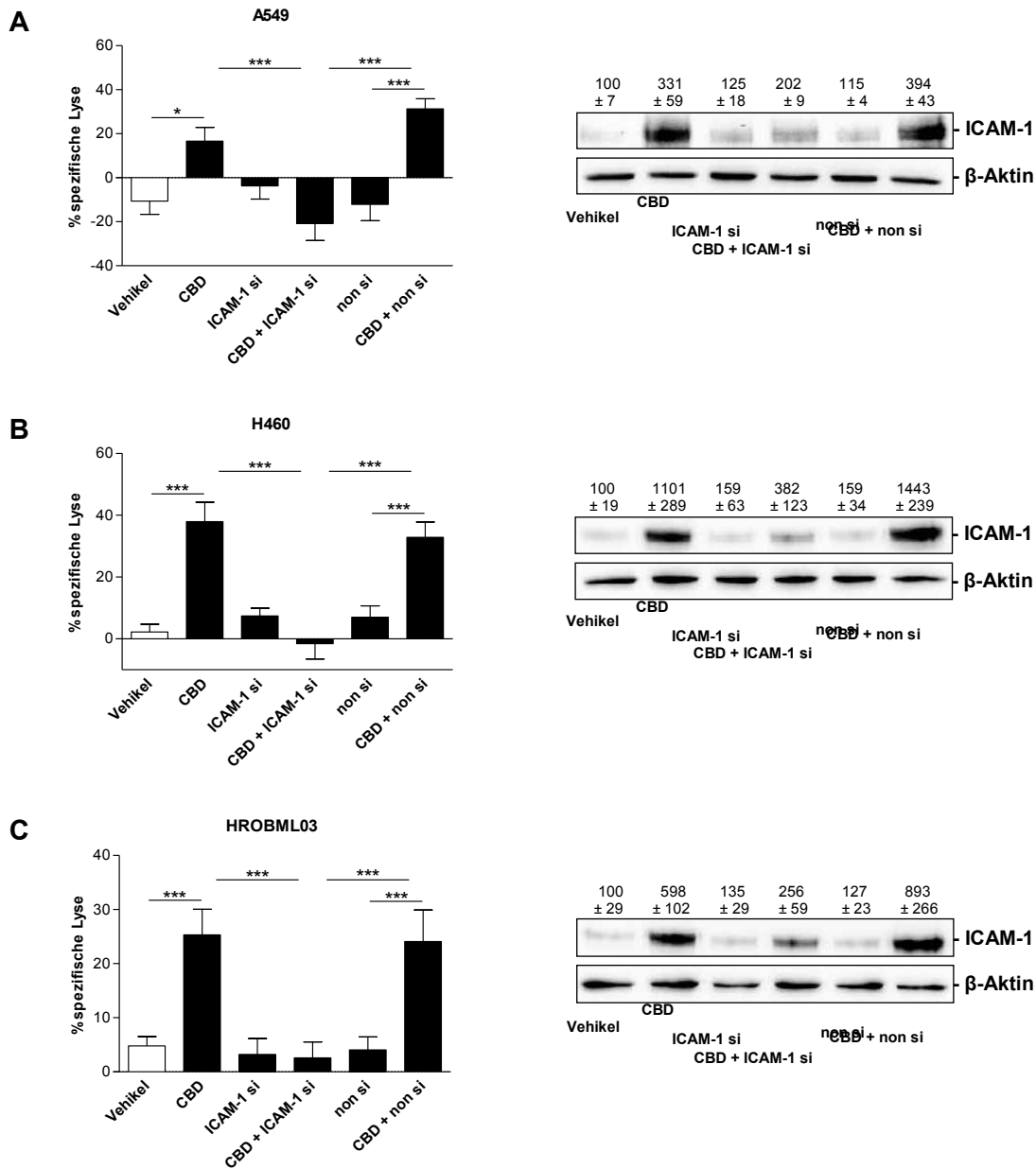


Abb. 3-8: Einfluss der ICAM-1 siRNA-Transfektion auf die LAK-Zell-vermittelte CBD-induzierte Lyse und ICAM-1-Proteinexpression von Tumorzellen

Linke Spalte: Einfluss von ICAM-1 siRNA auf die LAK-Zell-vermittelte Lyse der CBD-behandelten Tumorzellen A549 (A), H460 (B) und HROBML03 (C). Die Versuche wurden mit 10.000 Zellen/Well und E:Z = 4:1 (A549, HROBML03) bzw. 5.000 Zellen/Well und E:Z = 8:1 (H460) durchgeführt. Die Tumorzellen wurden mit ICAM-1 siRNA (ICAM-1 si, 1,25 µg/ml) bzw. non siRNA (non si) transfiziert und 48 h mit Vehikel oder 3 µM CBD stimuliert. Die Coinkubation mit LAK-Zellen erfolgte über 6 h. Die Säulen der Diagramme sind als Mittelwerte ± SEM von n = 32 (A, 7 Spender) oder n = 28 (B, C, 6 Spender) Wells dargestellt. * $P < 0,05$; *** $P < 0,001$; one-way ANOVA plus post hoc Bonferroni-Test.

Rechte Spalte: Western Blots zum Einfluss von ICAM-1 siRNA auf die CBD-induzierte ICAM-1-Proteinexpression in A549- (A), H460- (B) und HROBML03-Zellen (C). Die Tumorzellen wurden analog zum Zytotoxizitätsassay mit ICAM-1 siRNA (ICAM-1 si, 1,25 µg/ml) bzw. non siRNA (non si) transfiziert und 48 h mit Vehikel oder 3 µM CBD behandelt. Die Werte oberhalb der Blots sind die Mittelwerte ± SEM (%-Angaben) der densitometrischen Auswertung von n = 4 (A, B) oder n = 5 (C) Blots nach Normalisierung auf β-Aktin.

3.3.4 Rolle der CB-Rezeptoren und des TRPV1 bei der LAK-vermittelten Lyse von CBD-stimulierten Tumorzellen

Vor Kurzem wurde eine Involvierung der CB-Rezeptoren CB₁ und CB₂ wie auch von TRPV1 bei der über ICAM-1 vermittelten antimetastatischen Wirkung von CBD gezeigt (Ramer et al., 2012). Somit sollte auch im Rahmen dieser Arbeit überprüft werden, ob diese drei Rezeptoren bei der CBD-induzierten LAK-Zell-vermittelten Lyse von Tumorzellen beteiligt sind. Dazu wurden die Tumorzellen vor Stimulation mit CBD mit Rezeptorantagonisten präinkubiert. Dabei handelt es sich bei AM251 um einen CB₁-, bei AM630 um einen CB₂- und bei Capsazepin um einen TRPV1-Antagonisten. Die Antagonisten wurden mit einer Konzentration von 1 µM auf die Tumorzellen gegeben, womit die hier verwendete Konzentration in dem Bereich liegt, für den bereits gezeigt wurde, dass CB₁-, CB₂- bzw. TRPV1-abhängige Effekte blockiert werden (Jacobsson et al., 2001; Mukherjee et al., 2004; Ramer et al., 2010a und b).

In Abb. 3-9 sind die Ergebnisse zu den Zytotoxizitätsversuchen und die dazugehörigen Western Blot-Analysen der ICAM-1-Proteinexpression dargestellt. Wie bereits gezeigt, war die LAK-Zell-vermittelte Lyse von CBD-behandelten A549- ($46 \pm 7\%$), H460- ($30 \pm 4\%$) und HROBML03- ($25 \pm 3\%$) verglichen mit der vehikelbehandelter Zellen (A549, $-10 \pm 5\%$; H460, $9 \pm 2\%$; HROBML03, $3 \pm 1\%$) signifikant erhöht. Durch zusätzliche Inkubation der Tumorzellen mit den Antagonisten der CB-Rezeptoren wie auch mit dem TRPV1-Antagonisten wurde die CBD-induzierte Lyse aufgehoben bzw. verringert. So lag die spezifische Lyse der A549-Zellen zwischen $-11 \pm 8\%$ (Capsazepin) und $2 \pm 6\%$ (AM630), die der H460-Zellen zwischen $14 \pm 3\%$ (AM251) und $18 \pm 3\%$ (AM251 + AM630) und die der HROBML03-Zellen zwischen $-9 \pm 4\%$ (AM251) und $12 \pm 3\%$ (AM251 + AM630).

Die Bestimmung der Viabilität der Tumorzellen, die parallel zum Zytotoxizitätsassay erfolgte, zeigte bei diesen Zytotoxizitätsversuchen eine toxische Wirkung von CBD (Anhang Tab. 8-5). So verringerte die CBD-Stimulation die Viabilität der A549-Zellen auf $62 \pm 4\%$, die der H460-Zellen auf $55 \pm 5\%$ und die der HROBML03-Zellen auf $65 \pm 5\%$ in Bezug auf die jeweilige Viabilität der Tumorzellen bei der Vehikelkontrolle (100%). Die zusätzliche Anwesenheit der Rezeptorantagonisten hatte keinen signifikanten Effekt auf die Viabilität der Tumorzellen.

Die Western Blot-Analyse zum Einfluss der Rezeptorantagonisten auf die ICAM-1-Proteinexpression ist durch einen repräsentativen Blot in der rechten Spalte von Abb. 3-9 gezeigt. Die durch CBD-Stimulation hochregulierte ICAM-1-Proteinexpression in den Tumorzellen (zweite Bande) wurde durch Präinkubation der Zellen mit den Rezeptorantagonisten teilweise blockiert (dritte bis sechste Bande), wodurch das Proteinlevel von ICAM-1 weniger stark erhöht war.

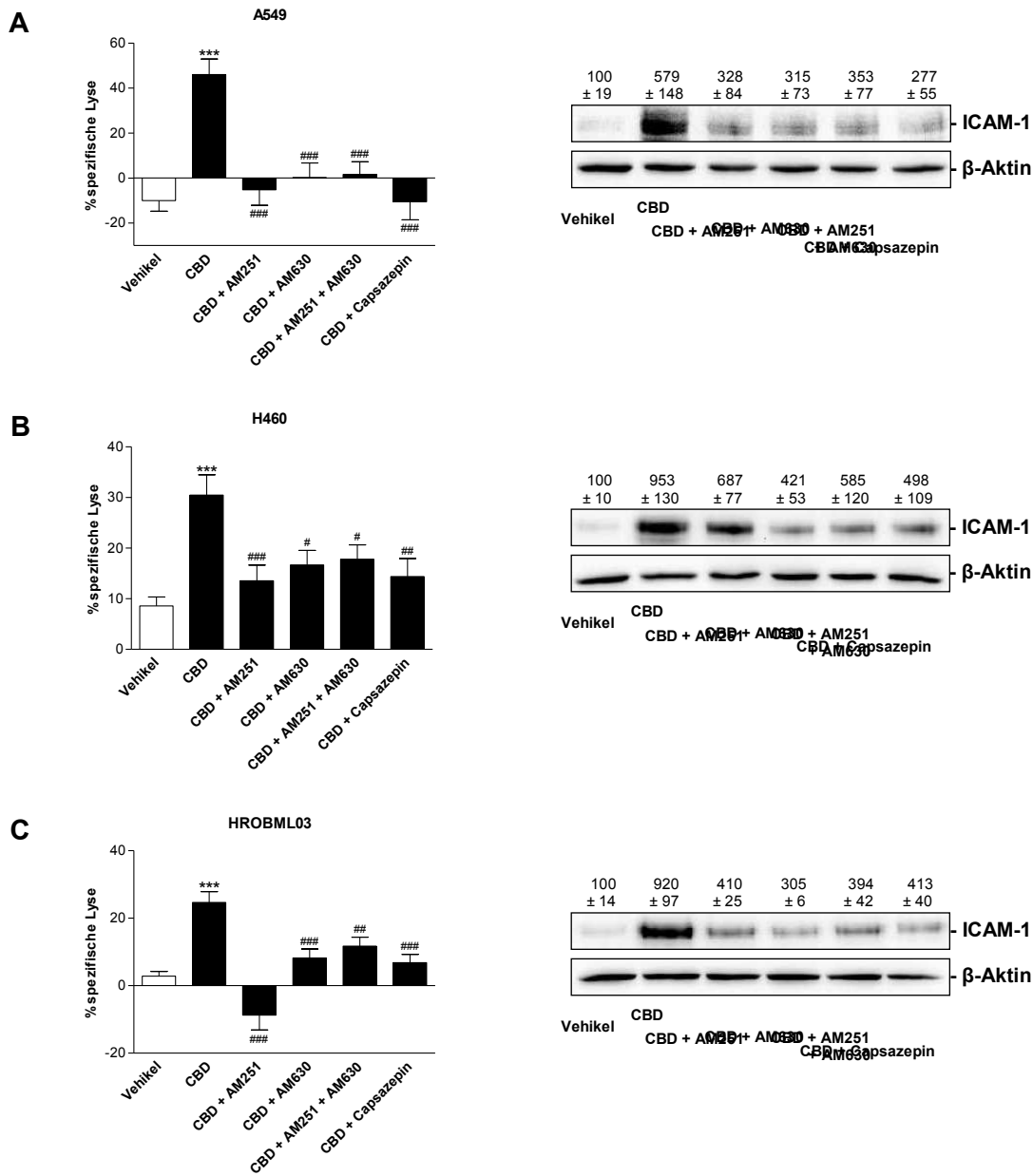


Abb. 3-9: Einfluss von Rezeptorantagonisten gegen CB₁, CB₂ und TRPV1 auf die LAK-Zell-vermittelte CBD-induzierte Lyse und ICAM-1-Proteinexpression von Tumorzellen

Linke Spalte: Wirkung von AM251 (CB₁-Antagonist, 1 µM), AM630 (CB₂-Antagonist, 1 µM) und Capsazepin (TRPV1-Antagonist, 1 µM) auf die spezifische Lyse von CBD-behandelten A549- (A), H460- (B) und HROBML03-Zellen (C). Die Tumorzellen (10.000 Zellen/Well) wurden 1 h mit den Rezeptorantagonisten präinkubiert, anschließend mit Vehikel oder 3 µM CBD stimuliert und die Inkubation über 48 h fortgeführt. Die Coinkubation mit den LAK-Zellen erfolgte über 6 h bei E:Z = 4:1. Die Säulen des Diagramme sind als Mittelwerte ± SEM von n = 28–32 (A, B, 5 Spender) oder n = 28 (C, 6 Spender) Wells dargestellt. ***P < 0,001 vs. Vehikel; #P < 0,05; ##P < 0,01; ###P < 0,001 vs. CBD; one-way ANOVA plus post hoc Bonferroni-Test.

Rechte Spalte: Western Blots zum Einfluss der Rezeptorantagonisten auf die CBD-induzierte ICAM-1-Proteinexpression in den A549- (A), H460- (B) und HROBML03-Zellen (C). Die Tumorzellen wurden analog zum Zytotoxizitätsassay 1 h mit den Antagonisten präinkubiert und dann mit Vehikel oder 3 µM CBD stimuliert (48 h). Die Werte oberhalb der Blots geben die Mittelwerte ± SEM (%-Angaben) der densitometrischen Auswertung von n = 6 (A, B) oder n = 7 (C) Blots nach Normalisierung auf β-Aktin wieder.

3.3.4.1 Eigeneffekt der Rezeptorantagonisten

Um die Wirkung der Rezeptorantagonisten auf die zytotoxische Lyse und auf die ICAM-1-Proteinexpression zu untersuchen, wurden Versuche durchgeführt, in denen die Tumorzellen nur mit den Rezeptorantagonisten ohne CBD-Stimulation inkubiert wurden. Die Ergebnisse sind in Abb. 3-10 zusammengefasst. Die Inkubation der Tumorzellen mit den Rezeptorantagonisten (AM251, AM630, Capsazepin) hatte im Allgemeinen keinen entscheidenden Einfluss auf die spezifische Lyse der Tumorzellen. Die LAK-Zell-vermittelte Lyse der A549-Zellen bewegte sich zwischen $-14 \pm 8 \%$ (AM251) und $14 \pm 5 \%$ (AM251 + AM630), die der H460-Zellen zwischen $3 \pm 3 \%$ (Vehikel) und $9 \pm 2 \%$ (AM251 + AM630) und die der HROBML03-Zellen zwischen $4 \pm 2 \%$ (Vehikel) und $14 \pm 3 \%$ (AM251 + AM630), wobei letztere im Vergleich zum Vehikel signifikant erhöht war. Im Ergebnis hatten die Rezeptorantagonisten allein keinen inhibitorischen Effekt auf die Tumorzellyse, womit die durch CBD-induzierte LAK-Zell-vermittelte Lyse durch die Antagonisten blockiert und die Verringerung der CBD-induzierten Lyse nicht durch eine an sich inhibitorische Wirkung der Antagonisten hervorgerufen wurde.

Die Ergebnisse zur parallel bestimmten Viabilität der Tumorzellen sind im Anhang in Tab. 8-6 zu finden. Die Antagonisten hatten keinen toxischen Einfluss auf die Viabilität der Tumorzellen.

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen zur spezifischen Lyse und Tumorzellviabilität konnte auch auf Proteinebene gezeigt werden, dass die verwendeten Rezeptorantagonisten die ICAM-1-Proteinexpression der Tumorzellen kaum beeinflussen (Abb. 3-10, rechte Spalte), insbesondere konnte kein inhibitorischer Effekt beobachtet werden.

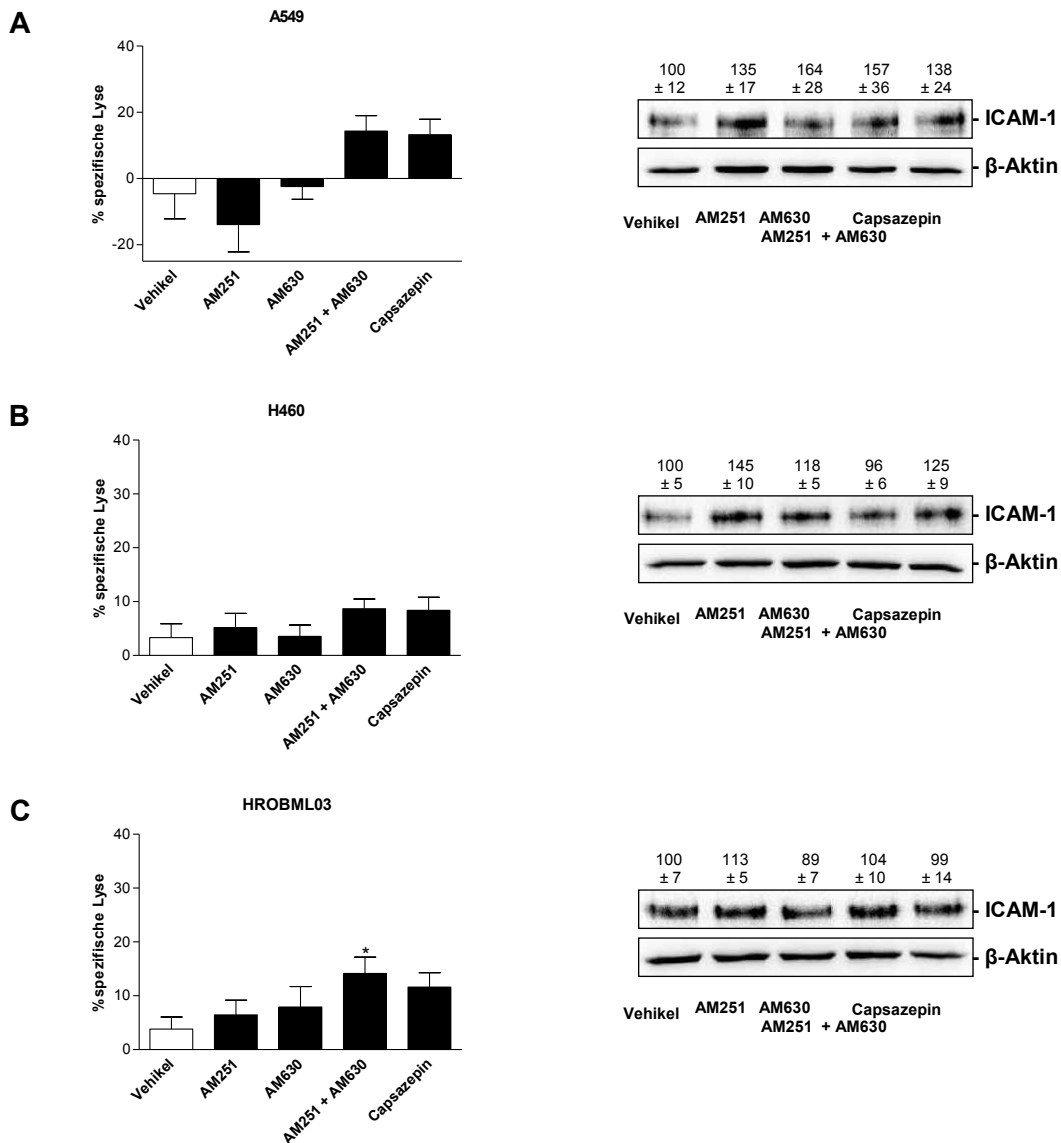


Abb. 3-10: Eigeneffekt der Rezeptorantagonisten auf die LAK-Zell-vermittelte Lyse und ICAM-1-Proteinexpression von Tumorzellen

Linke Spalte: Wirkung von AM251 (CB₁-Antagonist, 1 µM), AM630 (CB₂-Antagonist, 1 µM) und Capsazepin (TRPV1-Antagonist, 1 µM) auf die spezifische Lyse von A549- (A), H460- (B) und HROBML03-Zellen (C). Die Tumorzellen (10.000 Zellen/Well) wurden 1 h mit den Rezeptorantagonisten präinkubiert, anschließend mit Vehikel stimuliert und die Inkubation über 48 h fortgeführt. Die Coinkubation mit den LAK-Zellen erfolgte über 6 h bei E:Z = 4:1. Die Säulen der Diagramme sind als Mittelwerte ± SEM von n = 16 (A, 4 Spender) oder n = 20 (B, C, 5 Spender) Wells dargestellt. *P < 0,05 vs. Vehikel; one-way ANOVA plus post hoc Dunnett-Test.

Rechte Spalte: Western Blots zum Einfluss der Rezeptorantagonisten auf die ICAM-1-Proteinexpression in A549- (A), H460- (B) und HROBML03-Zellen (C). Die Tumorzellen wurden analog zum Zytotoxizitätsassay 1 h mit den Antagonisten präinkubiert und dann mit Vehikel stimuliert (48 h). Die Werte oberhalb der Blots zeigen die Mittelwerte ± SEM (%-Angaben) der densitometrischen Auswertung von n = 5 (A, B) oder n = 4 (C) Blots nach Normalisierung auf β-Aktin.

3.3.5 Rolle von LFA-1 bei der LAK-Zell-vermittelten Lyse von Tumorzellen

Neben der Rolle von ICAM-1 bei der spezifischen Lyse CBD-behandelter Tumorzellen wurde auch die Rolle des wichtigsten Bindungspartners LFA-1 untersucht. Dazu wurden Experimente analog zu denen mit dem neutralisierenden ICAM-1-Antikörper

durchgeführt, wobei hier aber die LAK- und nicht die Tumorzellen mit dem Antikörper vorbehandelt wurden. Der verwendete Antikörper bindet an die CD11a-Untereinheit von LFA-1 und blockiert so dessen Interaktion mit ICAM-1. Die Ergebnisse der Zytotoxizitätsversuche sind in Abb. 3-11 dargestellt. Die LAK-Zell-vermittelte Lyse von CBD-behandelten A549- ($27 \pm 8 \%$), H460- ($24 \pm 3 \%$) und HROBML03-Zellen ($30 \pm 6 \%$) wurde durch Inkubation der LAK-Zellen mit dem CD11a-Antikörper aufgehoben (A549, $1 \pm 6 \%$; H460, $-4 \pm 6 \%$; HROBML03, $9 \pm 2 \%$) und lag damit im Bereich der Lyse vehikelbehandelter Tumorzellen. Der Isotype Control-Antikörper hatte keinen Einfluss auf die zytotoxische Lyse der mit CBD behandelten Tumorzellen (A549, $29 \pm 6 \%$; H460, $25 \pm 3 \%$; HROBML03, $30 \pm 5 \%$), schien hier z. T. aber einen leichten Eigeneffekt auf die Lyse der Zellen (A549, HROBML03) zu besitzen.

Die Viabilität der Tumorzellen bei diesen Zytotoxizitätsversuchen (Tab. 8-7) war durch die CBD-Behandlung im Vergleich zur Vehikelkontrolle auf etwa die Hälfte reduziert.

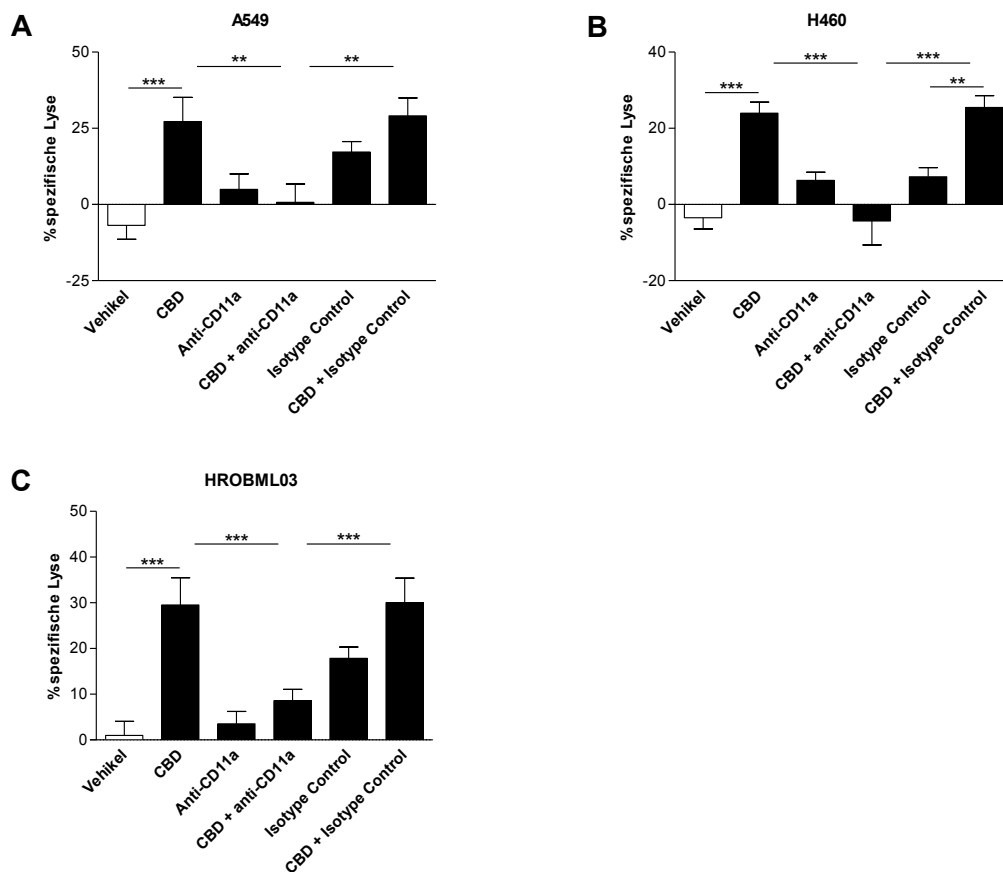


Abb. 3-11: Einfluss eines LFA-1-Antikörpers auf die LAK-Zell-vermittelte Lyse von CBD-behandelten Tumorzellen

A549- (A), H460- (B) und HROBML03-Zellen (C) (10.000 Zellen/Well) wurden für 48 h mit Vehikel oder 3 μ M CBD stimuliert. Die LAK-Zellen wurden vor dem Zytotoxizitätsassay 2 h mit einem CD11a- (α -Kette von LFA-1, 1 μ g/ml) bzw. Isotype Control-Antikörper (Negativkontrolle) behandelt und dann für 6 h mit den Tumorzellen coinkubiert (E:Z = 4:1). In den Diagrammen sind die Mittelwerte \pm SEM von n = 28 (A, C, 7 Spender) oder n = 24 (B, 6 Spender) Wells dargestellt. ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; one-way ANOVA plus post hoc Bonferroni-Test.

3.4 Wirkung anderer Cannabinoide auf die LAK-Zell-vermittelte Lyse von Tumorzellen

3.4.1 Testung verschiedener Cannabinoide

Neben CBD wurden die Tumorzellen auch mit anderen Cannabinoiden behandelt und anschließend die spezifische Lyse dieser Tumorzellen durch LAK-Zellen untersucht. Für diese Experimente wurden das hydrolyse stabile Anandamidanalogon (R)-(+)-Methanandamid (MA), das Phytocannabinoid THC und die synthetischen Cannabinoide WIN55,212-2 und JWH133 ausgewählt, wobei es sich bei Letzterem um einen CB₂-selektiven Agonisten handelt. Die Behandlung von Tumorzellen mit den vier Cannabinoiden führte jeweils zu einer Erhöhung der LAK-Zell-vermittelten zytotoxischen Lyse der entsprechend stimulierten Tumorzellen (Abb. 3-12). Die Lyse der A549- und HROBML03-Zellen lag nach Cannabinoidbehandlung bei ca. 30 % (Abb. 3-12A bzw. C) und die der H460-Zellen bei 31 ± 4 % nach WIN55,212-2- und 46 ± 3 % nach THC-Behandlung (Abb. 3-12B).

Der Einfluss dieser Cannabinoide auf die Viabilität der Tumorzellen ist im Anhang in Tab. 8-8 zusammengefasst. Es zeigte sich nur ein geringer Einfluss einiger Cannabinoide auf die Viabilität, wobei diese um maximal 25 % verringert war.

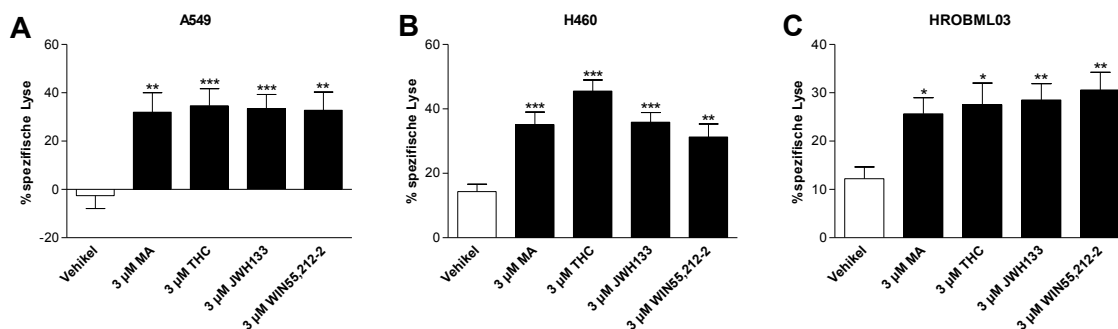


Abb. 3-12: Wirkung verschiedener Cannabinoide auf die LAK-Zell-vermittelte Lyse von Tumorzellen

Die Tumorzellen A549 (A), H460 (B) und HROBML03 (C) wurden für 48 h mit Vehikel und den Cannabinoiden MA, THC, JWH133 und WIN55,212-2 (jeweils 3 μM) inkubiert. Die Versuche wurden mit 10.000 Zellen/Well und E:Z = 4:1 (A549, HROBML03) bzw. 5.000 Zellen/Well und E:Z = 8:1 (H460) durchgeführt. Die Coinkubation mit den LAK-Zellen erfolgte über 6 h. Die Diagramme zeigen die Mittelwerte \pm SEM von $n = 28$ (A, 6 Spender), $n = 36$ (B, 8 Spender) und $n = 16$ (C, 4 Spender) Wells. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; one-way ANOVA plus post hoc Dunnett-Test.

3.4.2 Rolle von ICAM-1 bei der LAK-Zell-vermittelten Lyse von MA- und THC-stimulierten Tumorzellen

Für nachfolgende Zytotoxizitätsversuche wurden MA und THC ausgewählt. Dabei wurde die Rolle von ICAM-1 bei der Vermittlung der zytotoxischen Lyse von MA- bzw. THC-behandelten Tumor- durch LAK-Zellen mit Hilfe von entsprechenden Knockdown-Experimenten untersucht.

3.4.2.1 R-(+)-Methanandamid

Zunächst wurde die Rolle von ICAM-1 bei der MA-induzierten zytotoxischen Lyse von Tumor- durch LAK-Zellen untersucht. Die Ergebnisse zu diesen Zytotoxizitäts-experimenten, bei denen die Tumorzellen mit ICAM-1 siRNA transfiziert und mit MA stimuliert wurden, und die entsprechenden Effizienzblots zur siRNA-Transfektion sind in Abb. 3-13 dargestellt. Die Behandlung der Tumorzellen mit MA führte zu einer Erhöhung der spezifischen Lyse, so dass MA-stimulierte A549-Zellen zu $22 \pm 9 \%$, H460-Zellen zu $36 \pm 4 \%$ und HROBML03-Zellen zu $18 \pm 3 \%$ durch LAK-Zellen lysiert wurden, was jeweils einer signifikanten Steigerung im Vergleich zur dazugehörigen Vehikelkontrolle entsprach. Die Transfektion der Tumorzellen mit ICAM-1 siRNA verhinderte die MA-induzierte Lyse der Tumorzellen. Demnach wurden die A549-Zellen wie bei der Vehikelkontrolle nicht lysiert und sowohl die spezifische Lyse der H460-Zellen lag mit $17 \pm 3 \%$ im Bereich der Vehikelkontrolle ($14 \pm 3 \%$) als auch die der HROBML03-Zellen mit $4 \pm 2 \%$ (Vehikelkontrolle: $0 \pm 2 \%$). Die non siRNA hatte keinen negativen Effekt auf die MA-induzierte Lyse der Tumorzellen (A549, $37 \pm 4 \%$; H460, $34 \pm 3 \%$; HROBML03, $14 \pm 3 \%$).

Die Bestimmung der Viabilität (Anhang, Tab. 8-9) hatte zum Ergebnis, dass MA bei den H460-Zellen zu einer geringen Verminderung der Viabilität auf $85 \pm 4 \%$ im Vergleich zu der vehikelbehandelter Zellen mit $100 \pm 3 \%$ führte, wobei hier im Gegensatz zu den A549- und HROBML03-Zellen 5.000 Zellen für die Versuche verwendet wurden. Die Transfektion der Tumorzellen mit ICAM-1 siRNA oder non siRNA hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Tumorzellviabilität.

Die Western Blots zum Nachweis der Hochregulation der ICAM-1-Proteinexpression und der Effizienz der siRNA-Transfektion (Abb. 3-13, rechte Spalte, je ein repräsentativer Blot) untermauern die Ergebnisse der Zytotoxizitätsversuche. So führte die Stimulation der Tumorzellen mit MA zu einer Hochregulation von ICAM-1 (zweite Bande) um das etwa 2-Fache der Vehikelkontrolle. Die Transfektion mit ICAM-1 siRNA blockierte diese Hochregulation (vierte Bande), wobei die non siRNA-Transfektion die Hochregulation von ICAM-1 durch MA nicht beeinflusste (sechste Bande).

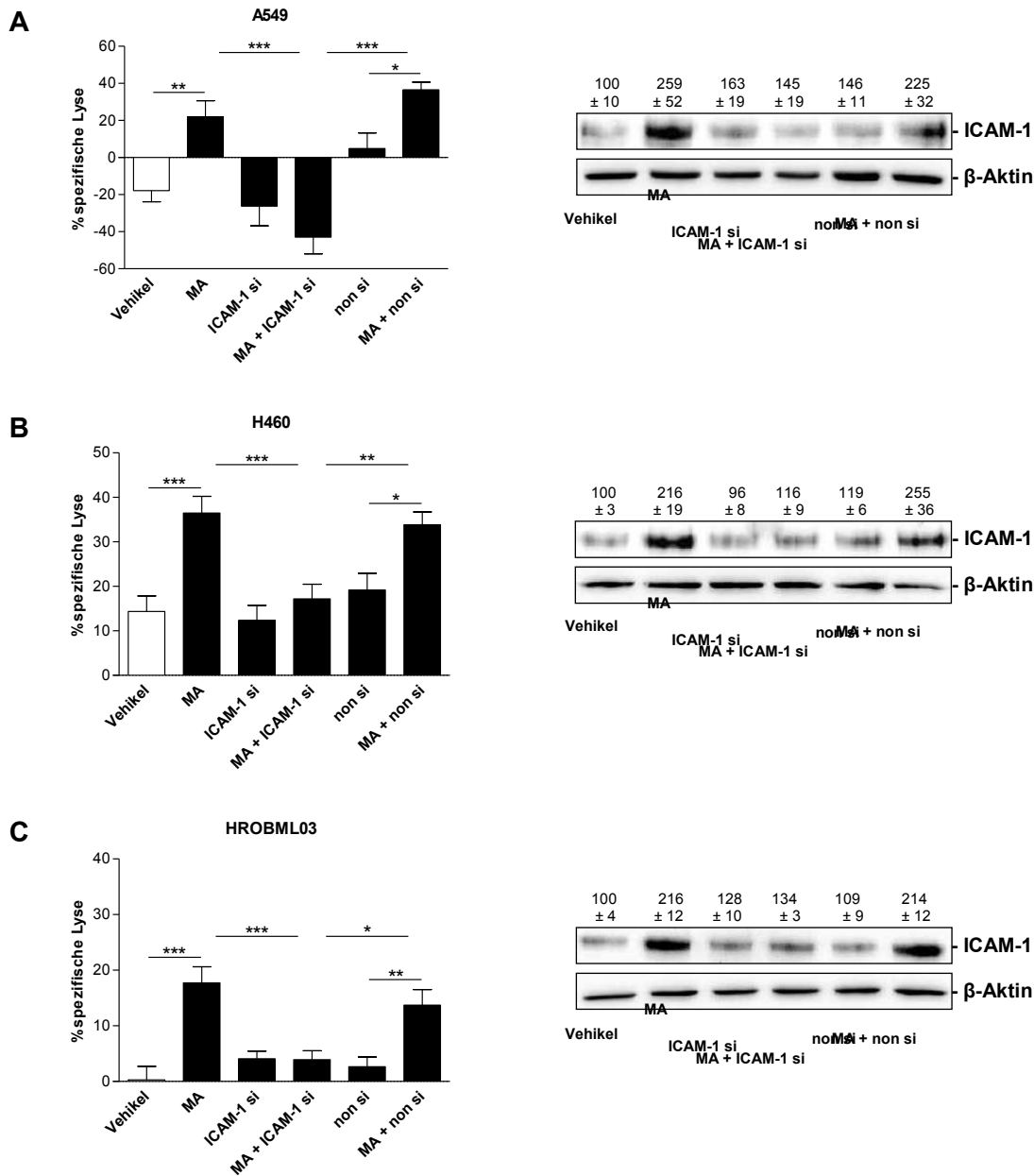


Abb. 3-13: Einfluss der ICAM-1 siRNA-Transfektion auf die LAK-Zell-vermittelte MA-induzierte Lyse und ICAM-1-Proteinexpression von Tumorzellen

Linke Spalte: Einfluss von ICAM-1 siRNA auf die spezifische Lyse der MA-behandelten A549- (A), H460- (B) und HROBML03-Zellen (C). Die Versuche wurden mit 10.000 Zellen/Well und E:Z = 4:1 (A549, HROBML03) bzw. 5.000 Zellen/Well und E:Z = 8:1 (H460) durchgeführt. Die Tumorzellen wurden mit ICAM-1 siRNA (ICAM-1 si, 1,25 µg/ml) bzw. non siRNA (non si) transfiziert und 48 h mit Vehikel oder 3 µM MA stimuliert. Die Coinkubation mit den LAK-Zellen erfolgte über 6 h. Die Säulen der Diagramme sind als Mittelwerte ± SEM von n = 20–24 (A, B, 5 Spender) oder n = 16 (C, 4 Spender) Wells dargestellt. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; one-way ANOVA plus post hoc Bonferroni-Test.

Rechte Spalte: Western Blots zum Einfluss von ICAM-1 siRNA auf die MA-induzierte ICAM-1-Proteinexpression in A549- (A), H460- (B) und HROBML03-Zellen (C). Die Tumorzellen wurden analog zum Zytotoxizitätsassay mit ICAM-1 siRNA (ICAM-1 si, 1,25 µg/ml) bzw. non siRNA (non si) transfiziert und 48 h mit Vehikel oder 3 µM MA stimuliert. Die Werte oberhalb der Blots sind die Mittelwerte ± SEM (%-Angaben) der densitometrischen Auswertung von n = 5 (A, C) oder n = 4 (B) Blots nach Normalisierung auf β-Aktin.

3.4.2.2 Δ^9 -Tetrahydrocannabinol

Die Ergebnisse zum Einfluss der siRNA-Transfektion auf die LAK-Zell-vermittelte Lyse und ICAM-1-Proteinexpression von THC-stimulierten Tumorzellen sind in Abb. 3-14 zusammengefasst. Wie bei CBD und MA führte die Behandlung der Tumorzellen mit THC zu einer Induktion bzw. Hochregulation der spezifischen Lyse dieser Zellen durch LAK-Zellen. Bei den A549-Zellen lag diese bei 26 ± 6 % (keine Lyse beim Vehikel), bei den H460-Zellen bei 29 ± 4 % (13 ± 3 % Lyse beim Vehikel) und bei den HROBML03-Zellen bei 19 ± 2 % (2 ± 1 % Lyse beim Vehikel). Die Transfektion mit ICAM-1 siRNA verhinderte auch hier die Hochregulation der ICAM-1-Proteinexpression (rechte Spalte) und folglich auch die spezifische Lyse der Tumorzellen (linke Spalte), so dass sich die Lyse im Bereich der vehikelbehandelter Zellen bewegte. Auch in diesem Fall hatte die non siRNA-Transfektion keinen Einfluss auf die Lyse von THC-stimulierten Tumorzellen (A549, 37 ± 6 %; H460, 27 ± 3 %; HROBML03, 24 ± 3 %).

Die Viabilitätsuntersuchungen zur Wirkung von THC und zum Effekt der siRNA- oder non siRNA-Transfektion sind in Tab. 8-10 zusammengestellt. Es konnte keine wesentliche Beeinflussung der Viabilität der Tumorzellen festgestellt werden.

In der rechten Spalte von Abb. 3-14 ist jeweils ein repräsentativer Blot zum Nachweis der Hochregulation der ICAM-1-Proteinexpression durch THC und der Effizienz der siRNA-Transfektion abgebildet. Die Stimulation der Tumorzellen führte zu einer etwa 3-fachen ICAM-1-Hochregulation bei den A549-Zellen, zu einer etwa 5-fachen bei den H460- und einer etwa 4-fachen bei den HROBML03-Zellen (jeweils zweite Bande). Wie erwähnt, hatte die Transfektion mit ICAM-1 siRNA eine Blockierung der Hochregulation der ICAM-1-Proteinexpression zur Folge (vierte Bande). Die Transfektion mit einer non siRNA hingegen hatte auch hier keinen Effekt auf die THC-induzierte Hochregulation der ICAM-1-Proteinexpression (sechste Bande).

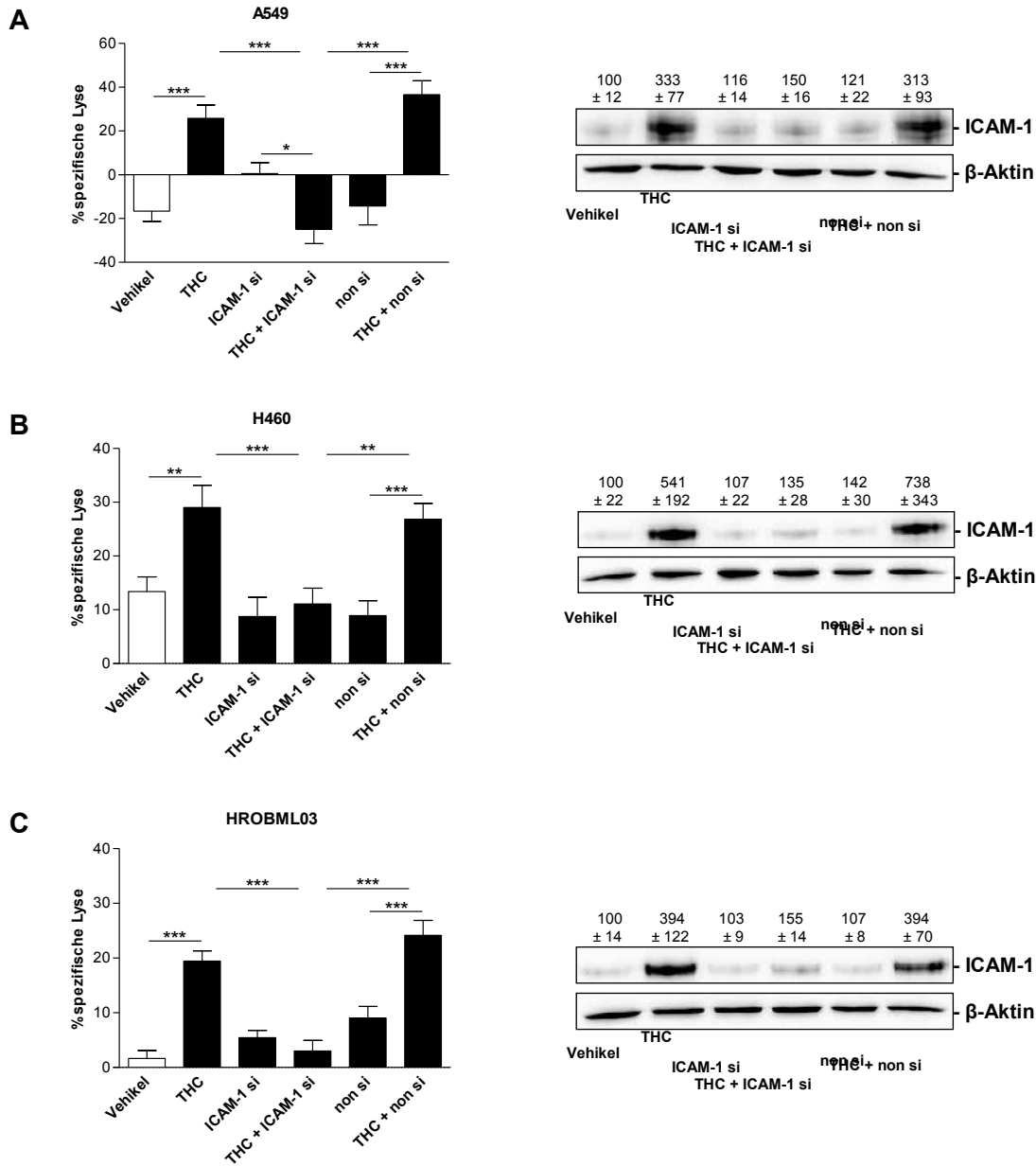


Abb. 3-14: Einfluss der ICAM-1 siRNA-Transfektion auf die LAK-Zell-vermittelte THC-induzierte Lyse und ICAM-1-Proteinexpression von Tumorzellen

Linke Spalte: Einfluss von ICAM-1 siRNA auf die spezifische Lyse der THC-behandelten A549- (A), H460- (B) und HROBML03-Zellen (C). Die Versuche wurden mit 10.000 Zellen/Well und E:Z = 4:1 (A549, HROBML03) bzw. 5.000 Zellen/Well und E:Z = 8:1 (H460) durchgeführt. Die Tumorzellen wurden mit ICAM-1 siRNA (ICAM-1 si, 1,25 µg/ml) bzw. non siRNA (non si) transfiziert und 48 h mit Vehikel oder 3 µM THC stimuliert. Die Coinkubation mit den LAK-Zellen erfolgte über 6 h. Die Säulen der Diagramme sind als Mittelwerte ± SEM von n = 20–24 (A, B, 5 Spender) oder n = 16 (C, 4 Spender) Wells dargestellt. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; one-way ANOVA plus post hoc Bonferroni-Test.

Rechte Spalte: Western Blots zum Einfluss von ICAM-1 siRNA auf die THC-induzierte ICAM-1-Proteinexpression in A549- (A), H460- (B) und HROBML03-Zellen (C). Die Tumorzellen wurden analog zum Zytotoxizitätsassay mit ICAM-1 siRNA (ICAM-1 si, 1,25 µg/ml) bzw. non siRNA (non si) transfiziert und 48 h mit Vehikel oder 3 µM THC stimuliert. Die Werte oberhalb der Blots sind die Mittelwerte ± SEM (%-Angaben) der densitometrischen Auswertung von n = 4 (A) oder n = 5 (B, C) Blots nach Normalisierung auf β-Aktin.

3.5 Wirkung von CBD, MA und THC auf Nicht-Tumorzellen

Die Cannabinoide CBD, MA und THC hatten Einfluss auf die ICAM-1-Proteinexpression und LAK-Zell-vermittelte Lyse von Tumorzellen (A549, H460, HROBML03). So hatte die Behandlung der Tumorzellen mit diesen Cannabinoiden eine Hochregulation des Proteins ICAM-1 und eine erhöhte LAK-Zell-vermittelte Lyse zur Folge. Demnach sollte auch untersucht werden, ob CBD, MA und THC die gleichen Effekte auf Nicht-Tumorzellen wie BEAS-2B-Zellen und Monozyten haben.

3.5.1 Einfluss auf die ICAM-1-Proteinexpression und LAK-Zell-vermittelte Lyse von BEAS-2B-Zellen

Für die Untersuchungen der Effekte von Cannabinoiden auf Nicht-Tumorzellen wurde die Bronchialepithelzelllinie BEAS-2B verwendet. Hierbei handelt es sich um Bronchialepithelzellen, die aus einer Autopsie von nicht kanzerogenen Individuen stammen und durch Transfektion mit dem Adenovirus-12 SV40 Hybridvirus etabliert wurden (Reddel et al., 1988).

Zunächst wurde untersucht, inwiefern Cannabinoide die ICAM-1-Proteinexpression der BEAS-2B-Zellen beeinflussen, wobei je ein repräsentativer Western Blot in Abb. 3-15 (linke Spalte) gezeigt ist. Die Cannabinoide CBD und THC bewirkten eine leichte Hochregulation des ICAM-1-Proteinlevels. So wurde die ICAM-1-Expression im Vergleich zur entsprechenden Vehikelkontrolle durch 3 μ M CBD etwa 1,5-fach (Abb. 3-15A, sechste Bande) und durch 3 μ M THC 1,4-fach (Abb. 3-15C, dritte Bande) hochreguliert. Bei einer Konzentration von 1 μ M CBD bzw. THC war eine ca. 1,2-fache Hochregulation zu beobachten. Die Inkubation der BEAS-2B-Zellen mit MA (Abb. 3-15B) und CBD-Konzentrationen von 0,001–0,1 μ M hatte keinen Einfluss auf die Proteinexpression von ICAM-1 durch diese Zellen. Zusätzlich zur Wirkung der Cannabinoide auf die ICAM-1-Proteinexpression wurde auch auf funktioneller Ebene des Zytotoxizitätsassays der Einfluss von CBD, MA und THC überprüft (Abb. 3-15, rechte Spalte). Hierbei zeigte sich, dass die drei Cannabinoide keinen signifikanten Einfluss auf die LAK-Zell-vermittelte Lyse der stimulierten im Vergleich zu vehikelbehandelten BEAS-2B-Zellen hatten. Die spezifische Lyse von vehikel- bzw. CBD-behandelten BEAS-2B-Zellen lag zwischen 5 ± 2 % (Vehikel) und 11 ± 2 % (1 μ M CBD), die von MA-stimulierten Zellen bewegte sich um 8 % und die von THC-behandelten Zellen lag zwischen 4 ± 1 % (Vehikel) und 7 ± 1 % (1 μ M THC).

Die parallel zum Zytotoxizitätsassay bestimmten Viabilitäten cannabinoidbehandelter BEAS-2B-Zellen sind in Tab. 8-11 zusammengestellt. MA und THC hatten keinen Einfluss auf die Viabilität der Zellen. CBD bewirkte eine minimale Verringerung der

Viabilität bei einer Konzentration von 3 μM CBD ($83 \pm 6 \%$) versus Vehikelkontrolle ($100 \pm 1 \%$).

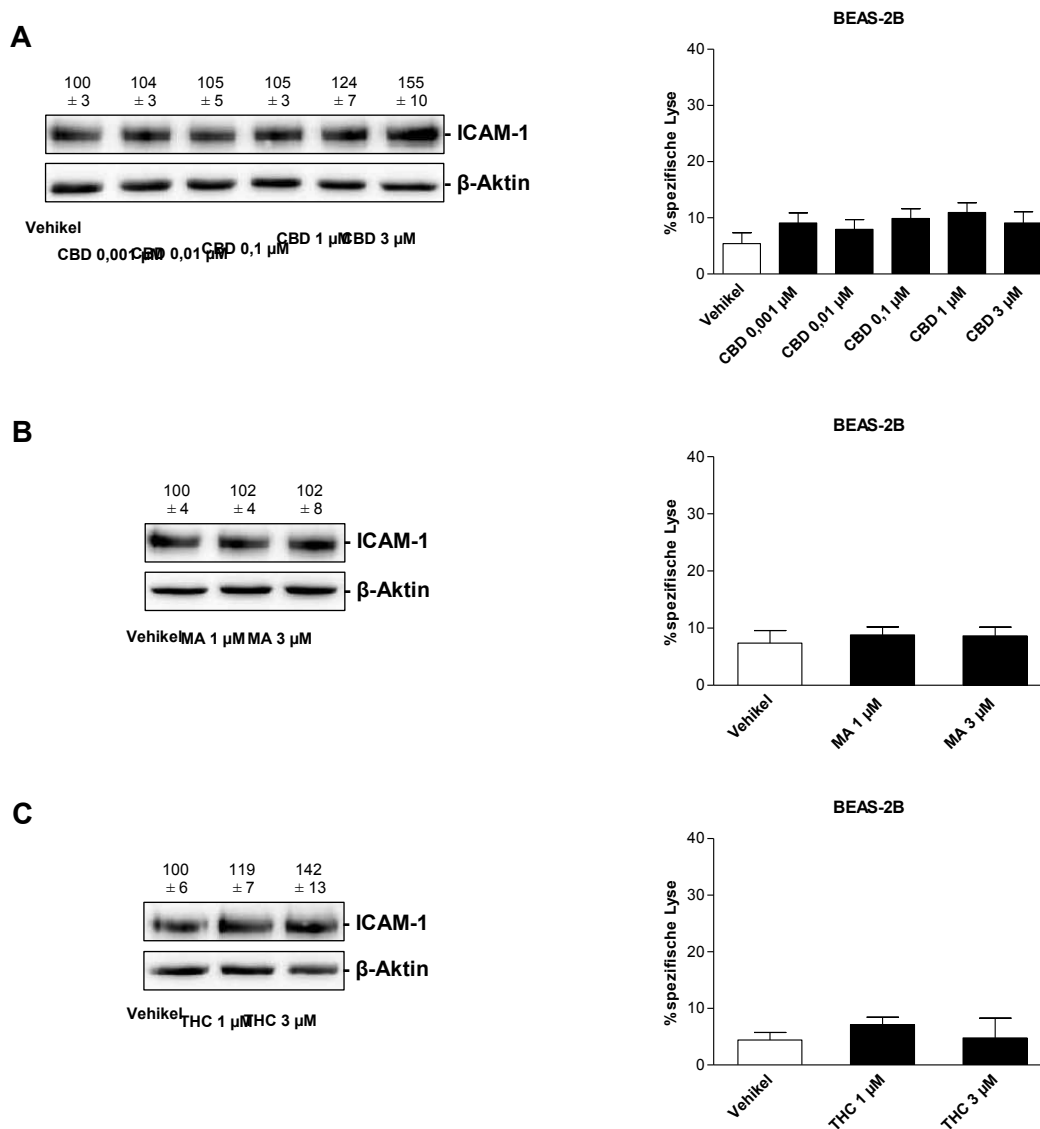


Abb. 3-15: Wirkung von CBD, MA und THC auf die ICAM-1-Proteinexpression und LAK-Zell-vermittelte Lyse von BEAS-2B-Zellen

Linke Spalte: Einfluss von CBD, THC und MA auf die ICAM-1-Proteinexpression in BEAS-2B-Zellen. Die Zellen wurden 48 h mit 0,001–3 μM CBD (A) oder 1 und 3 μM MA (B) bzw. THC (C) inkubiert. Die Werte oberhalb der Blots sind die Mittelwerte \pm SEM (%-Angabe) der densitometrischen Analyse von $n = 7$ (A) oder $n = 6$ (B, C) Blots nach der Normalisierung auf β -Aktin.

Rechte Spalte: LAK-Zell-vermittelte Lyse von BEAS-2B-Zellen. Die Zellen (10.000 Zellen/Well) wurden für 48 h mit CBD (A), MA (B) oder THC (C) behandelt. Die Coinkubation mit den LAK-Zellen erfolgte mit E:Z = 4:1 über 6 h. Die Säulen der Diagramme sind als Mittelwerte \pm SEM von $n = 48$ (7 Spender) Wells dargestellt. Die Analyse mittels ANOVA plus post hoc Dunnett-Test ergaben keine Signifikanzen.

3.5.2 Wirkung von CBD auf die ICAM-1-Proteinexpression in Monozyten

Der Einfluss von CBD auf die ICAM-1-Proteinexpression wurde zusätzlich zu den BEAS-2B-Zellen auch in Monozyten, die durch die Aufreinigung von PBMCs aus Buffy Coats zur Verfügung standen (siehe 2.2.2.2), untersucht. In Abb. 3-16 ist ein

repräsentativer Western Blot dargestellt. Eine Konzentration von 3 μM CBD bewirkte eine 2-fache Hochregulation der Proteinexpression von ICAM-1 (sechste Bande). Geringere CBD-Konzentrationen hatten kaum Einfluss auf das ICAM-1-Proteinlevel, nur bei 1 μM CBD war dieses 1,4-fach erhöht. Im Ergebnis ist eine konzentrationsabhängige Wirkung von CBD auf die ICAM-1-Proteinexpression durch Monozyten zu erkennen, die aber mit weitaus geringeren Induktionen als in Tumorzellen (Abb. 3-1) einherging.

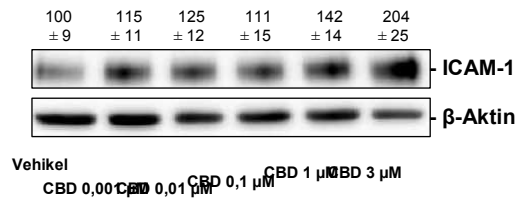


Abb. 3-16: Wirkung von CBD auf die ICAM-1-Proteinexpression von Monozyten

Die Monozyten wurden 48 h mit CBD (0,001–3 μM) inkubiert. Die Werte oberhalb der Blots sind die Mittelwerte \pm SEM (%-Angabe) der densitometrischen Analyse von $n = 5$ Blots (3 Spender) nach Normalisierung auf β -Aktin.

3.6 Einfluss des FAAH-Inhibitors AA-5HT auf die LAK-Zell-vermittelte Lyse von Tumorzellen

In Bezug auf das Endocannabinoidsystem stellt die Inhibition der FAAH neben der exogenen Verabreichung von Cannabinoiden einen weiteren therapeutischen Ansatz dar. Dabei kann es durch Hemmung der FAAH zum Anstieg der Konzentration von endogenen Cannabinoidverbindungen kommen, die dann antitumorigene Effekte über eine CB-Rezeptoraktivierung vermitteln (Ligresti et al., 2003; Bifulco et al., 2004; Maione et al., 2007; Micale et al., 2009). Zudem konnte für das Phytocannabinoid CBD ebenfalls eine inhibitorische Wirkung auf die FAAH gezeigt werden (Watanabe et al., 2005; de Filippis et al., 2008). Dementsprechend wurde der Einfluss des FAAH-Inhibitors Arachidonylserotonin (AA-5HT) auf die LAK-Zell-vermittelte Lyse der Lungentumorzellen untersucht.

3.6.1 Wirkung verschiedener AA-5HT-Konzentrationen auf die spezifische Tumorzelllyse

Zunächst wurden unterschiedliche AA-5HT-Konzentrationen getestet. Die Ergebnisse sind in Abb. 3-17 dargestellt und zeigen eine Hochregulation der LAK-Zell-vermittelten Lyse der AA-5HT- im Vergleich zu vehikelbehandelten Tumorzellen. Dabei kam es bei den H460- und den HROBML03-Zellen bereits bei 3 μM AA-5HT zu einer erhöhten spezifischen Lyse, wobei die Lyse der H460-Zellen von 6 ± 4 % beim Vehikel auf

22 ± 3 % bei 3 µM AA-5HT und bei den HROBML03-Zellen von 7 ± 3 % beim Vehikel auf 18 ± 4 % bei 3 µM AA-5HT anstieg. Ein deutlicher Effekt von AA-5HT auf die Tumorzelllyse wurde mit einer Konzentration von 10 µM AA-5HT erreicht, so betrug die Lyse der A549-Zellen 43 ± 6 %, die der H460-Zellen 41 ± 5 % und die der HROBML03-Zellen 47 ± 11 %. Die nachfolgenden Versuche wurden dann mit einer Konzentration von 10 µM AA-5HT durchgeführt.

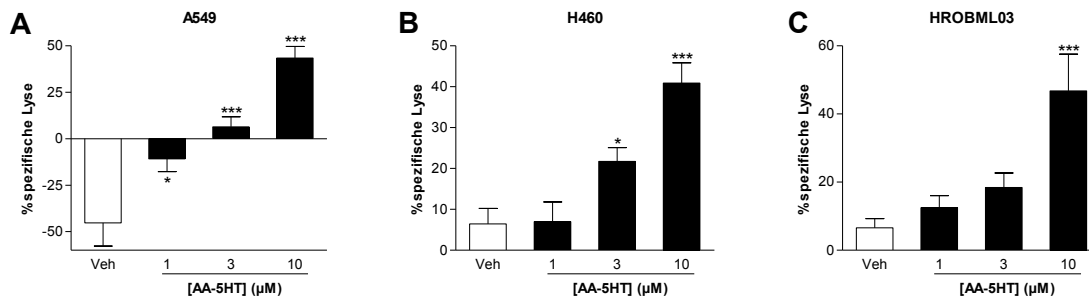


Abb. 3-17: Wirkung von AA-5HT auf die LAK-Zell-vermittelte Lyse von Tumorzellen

A549- (A), H460- (B) und HROBML03-Zellen (C) wurden für 48 h mit Vehikel und AA-5HT (1 µM, 3 µM und 10 µM) inkubiert. Die Versuche wurden mit 10.000 Zellen/Well und E:Z = 4:1 durchgeführt. Die Coinkubation mit den LAK-Zellen erfolgte über 6 h. Die Diagramme zeigen die Mittelwerte ± SEM von n = 16 (4 Spender) Wells. ***P* < 0,01; ****P* < 0,001; one-way ANOVA plus post hoc Dunnett-Test.

3.6.2 Rolle von ICAM-1 bei der LAK-vermittelten Lyse von AA-5HT-stimulierten Tumorzellen

Wie bei vorherigen Experimenten wurde auch hier die Rolle von ICAM-1 bei der LAK-Zell-vermittelten zytotoxischen Lyse der mit AA-5HT behandelten Tumorzellen untersucht. Dazu wurden Knockdown-Experimente mit ICAM-1 siRNA durchgeführt. Die Ergebnisse der Zytotoxizitätsversuche und die Western Blots zum Nachweis der Hochregulation von ICAM-1 durch AA-5HT und in diesem Zusammenhang auch die Effizienz der ICAM-1 siRNA-Transfektion sind in Abb. 3-18 dargestellt. So wurde auf Zytotoxizitätsebene die Lyse der Tumorzellen durch Behandlung mit AA-5HT auf 43 ± 5 % bei den A549-, auf 41 ± 3 % bei den H460- und auf 46 ± 5 % bei den HROBML03-Zellen gesteigert. Die ICAM-1 siRNA-Transfektion führte zu einer Verringerung der AA-5HT-induzierten Hochregulation der Tumorzelllyse (A549, 17 ± 4 %; H460, 23 ± 4 %; HROBML03, 9 ± 3 %), wobei die Transfektion mit non siRNA keinen negativen Einfluss auf die Lyse von AA-5HT-behandelten Tumorzellen hatte (A549, 57 ± 4 %; H460, 56 ± 6 %; HROBML03, 57 ± 6 %).

Die Western Blot-Analyse, die durch je einen repräsentativen Blot in der rechten Spalte von Abb. 3-18 dargestellt ist, zeigt eine Hochregulation der ICAM-1-Proteinexpression durch Stimulation der Tumorzellen mit AA-5HT. So war das ICAM-1-Proteinlevel bei den A549-Zellen etwa 2,5-fach, bei den H460-Zellen fast 8-fach und bei den HROBML03-Zellen etwa 4-fach (zweite Bande) erhöht. Diese AA-5HT-induzierte

Hochregulation des ICAM-1-Proteinexpression blieb durch non siRNA-Transfektion unbeeinflusst (sechste Bande) und wurde durch die Transfektion mit ICAM-1 siRNA nahezu aufgehoben (vierte Bande).

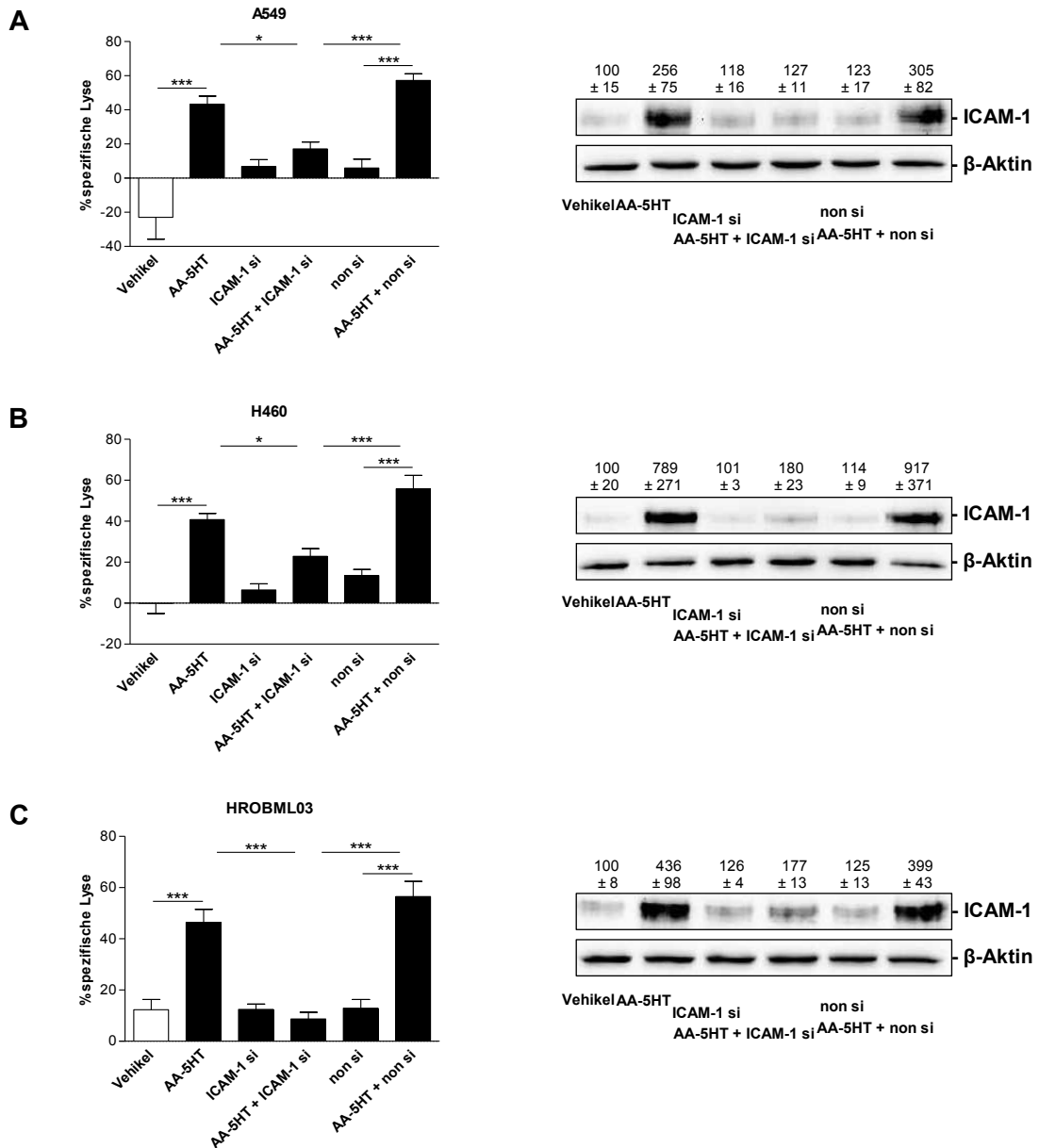


Abb. 3-18: Einfluss der ICAM-1 siRNA-Transfektion auf die LAK-Zell-vermittelte AA-5HT-induzierte Lyse und ICAM-1-Proteinexpression von Tumorzellen

Linke Spalte: Einfluss von ICAM-1 siRNA auf die spezifische Lyse von AA-5HT-behandelten A549- (A), H460- (B) und HROBML03-Zellen (C). Die Versuche wurden mit 10.000 Zellen/Well und E:Z = 4:1 durchgeführt. Die Tumorzellen wurden mit ICAM-1 siRNA (ICAM-1 si, 1,25 µg/ml) bzw. non siRNA (non si) transfiziert und 48 h mit Vehikel oder 10 µM AA-5HT stimuliert. Die Coinkubation mit den LAK-Zellen erfolgte über 6 h. Die Säulen der Diagramme sind als Mittelwerte ± SEM von n = 16 (4 Spender) Wells dargestellt. * $P < 0,05$; *** $P < 0,001$; one-way ANOVA plus post hoc Bonferroni-Test.

Rechte Spalte: Western Blots zum Einfluss von ICAM-1 siRNA auf die AA-5HT-induzierte ICAM-1-Proteinexpression in A549- (A), H460- (B) und HROBML03-Zellen (C). Die Tumorzellen wurden analog zum Zytotoxizitätsassay mit ICAM-1 siRNA (ICAM-1 si, 1,25 µg/ml) bzw. non siRNA (non si) transfiziert und 48 h mit Vehikel oder AA-5HT stimuliert. Die Werte oberhalb der Blots sind die Mittelwerte ± SEM (%-Angaben) der densitometrischen Auswertung von n = 5 (A) oder n = 6 (B, C) Blots nach Normalisierung auf β-Aktin.

3.6.3 Rolle der CB-Rezeptoren und des TRPV1 bei der LAK-vermittelten Lyse von AA-5HT-stimulierten Tumorzellen

Um festzustellen, ob die CB-Rezeptoren CB₁ und CB₂ sowie TRPV1 an der Vermittlung der AA-5HT-induzierten zytotoxischen Lyse der Tumorzellen beteiligt sind, wurden Zytotoxizitätsversuche mit den Rezeptorantagonisten AM251, AM630 und Capsazepin durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Abb. 3-19 aufgeführt. Die durch AA-5HT induzierte LAK-Zell-vermittelte zytotoxische Lyse der Lungentumorzellen (A549, 52 ± 5 %; H460, 52 ± 5 %; HROBML03, 53 ± 6 %) wurde durch die Behandlung der Zellen mit den Rezeptorantagonisten signifikant verringert, wobei die spezifische Lyse der Zellen dann unterhalb von 30 % lag.

Parallel zum Zytotoxizitätsassay wurde hier ebenfalls der Einfluss von AA-5HT auf die Viabilität der Tumorzellen bestimmt. Die Ergebnisse sind im Anhang in Tab. 8-12 zusammengefasst und zeigen, dass AA-5HT eine toxische Wirkung auf die Tumorzellen hatte. So verringerte sich die Tumorzellviabilität durch die Inkubation mit AA-5HT auf mindestens die Hälfte. Die A549-Zellen, die mit AA-5HT und Rezeptorantagonisten behandelt wurden zeigten eine Viabilität zwischen 40 ± 1 % (AA-5HT + AM251 + AM630) und 52 ± 2 % (Capsazepin), die H460-Zellen zwischen 29 ± 1 % (AA-5HT + AM251 + AM630) und 41 ± 1 % (AA-5HT) und die HROBML03-Zellen zwischen 28 ± 1 % (AA-5HT + AM251 + AM630) und 40 ± 2 % (AA-5HT).

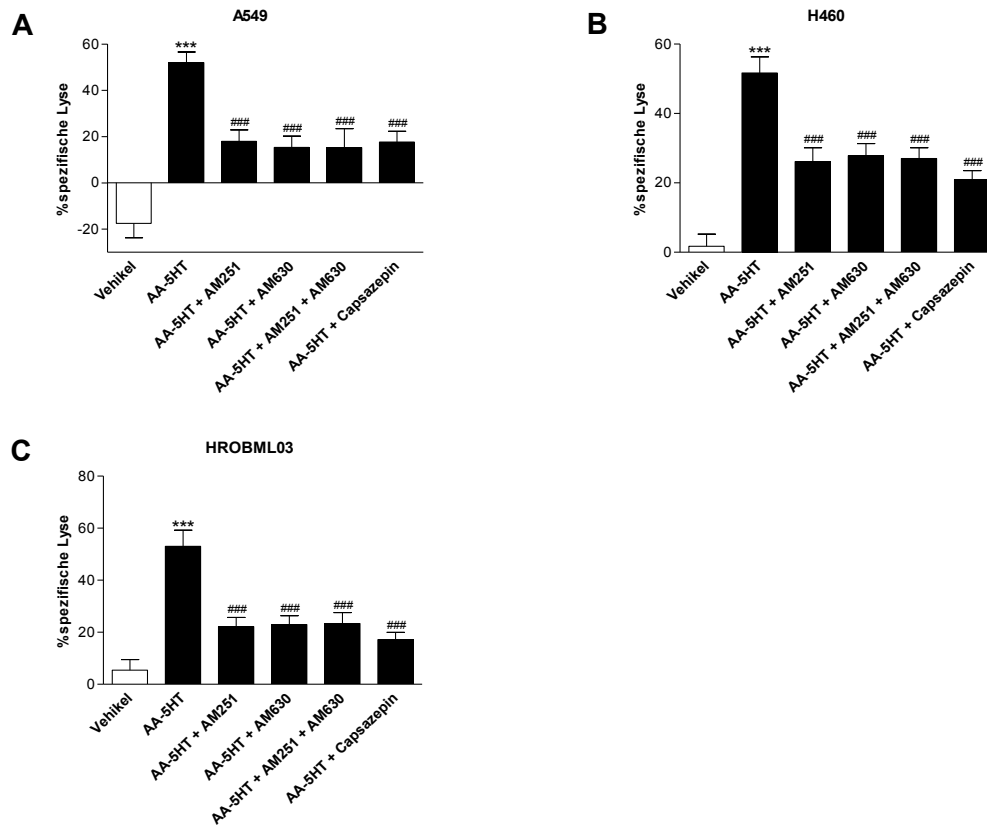


Abb. 3-19: Einfluss von Rezeptorantagonisten gegen CB₁, CB₂ und TRPV1 auf die LAK-Zell-vermittelte AA-5HT-induzierte Lyse von Tumorzellen

Wirkung von AM251 (CB₁-Antagonist, 1 μ M), AM630 (CB₂-Antagonist, 1 μ M) und Capsazepin (TRPV1-Antagonist, 1 μ M) auf die spezifische Lyse von AA-5HT-behandelten A549- (A), H460- (B) und HROBML03-Zellen (C). Die Tumorzellen (10.000 Zellen/Well) wurden 1 h mit den Rezeptorantagonisten präinkubiert, anschließend mit Vehikel oder 10 μ M AA-5HT stimuliert und die Inkubation über 48 h fortgeführt. Die Coinkubation mit den LAK-Zellen erfolgte über 6 h bei E:Z = 4:1. Die Säulen der Diagramme sind als Mittelwerte \pm SEM von n = 16 (4 Spender) Wells dargestellt. *** P < 0,001 vs. Vehikel; ### P < 0,001 vs. AA-5HT; one-way ANOVA plus post hoc Bonferroni-Test.

3.6.4 Rolle von LFA-1 bei der LAK-vermittelten Lyse von AA-5HT-stimulierten Tumorzellen

Weiterhin wurde neben der Rolle von ICAM-1 bei der zytotoxischen Lyse von AA-5HT-behandelten Tumor- durch LAK-Zellen auch die von LFA-1 ermittelt (Abb. 3-20). Dabei zeigte sich, dass die im Vergleich zum Vehikel erhöhte Lyse der AA-5HT-stimulierten Tumorzellen, welche sich jeweils um die 40 % bewegte, durch Inkubation der LAK-Zellen mit dem LFA-1-Antikörper aufgehoben (A549, 7 ± 5 %) bzw. verringert (H460, 18 ± 3 %; HROBML03, 8 ± 4 %) wurde. Der Isotype Control-Antikörper hatte keinen zusätzlichen Effekt auf die spezifische Lyse der Tumorzellen (A549, 53 ± 6 %; H460, 42 ± 2 %; HROBML03, 38 ± 5 %).

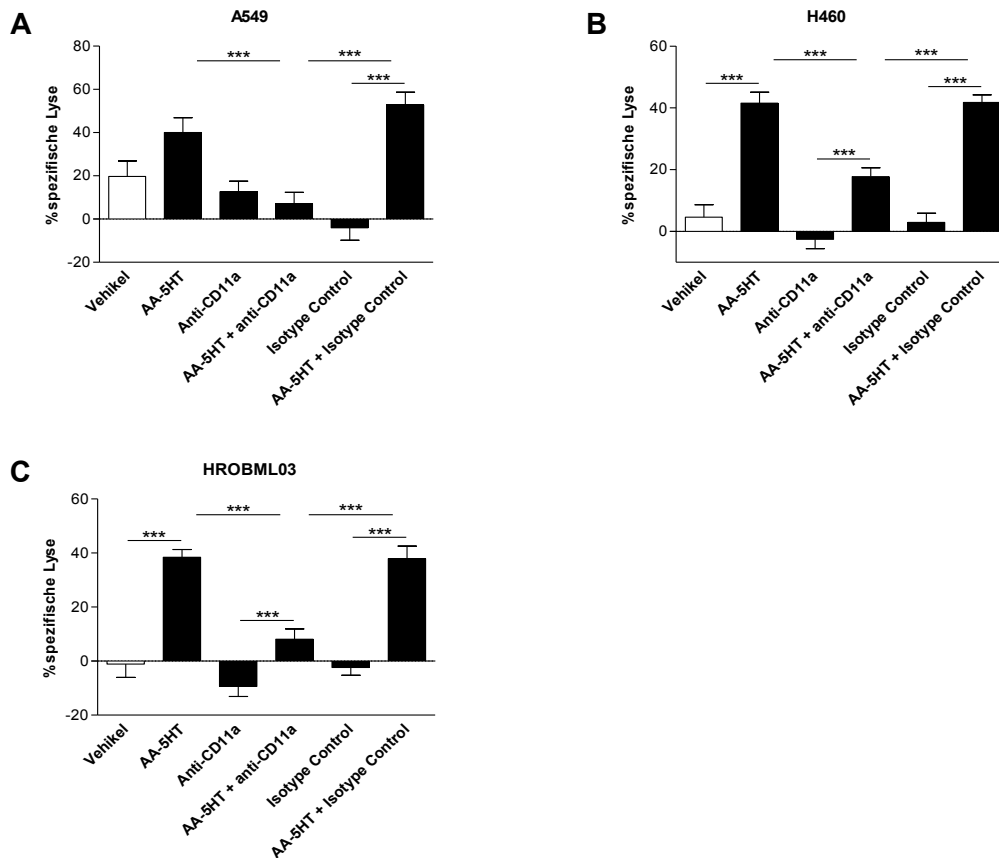


Abb. 3-20: Einfluss eines LFA-1-Antikörpers auf die LAK-Zell-vermittelte Lyse von AA-5HT-behandelten Tumorzellen

A549- (A), H460- (B) und HROBML03-Zellen (C; je 10.000 Zellen/Well) wurden für 48 h mit Vehikel oder 10 μ M AA-5HT stimuliert. Die LAK-Zellen wurden vor dem Zytotoxizitätsassay 2 h mit einem CD11a- (α -Kette von LFA-1, 1 μ g/ml) bzw. Isotype Control-Antikörper (Negativkontrolle) präinkubiert. Die Coinkubation mit den Tumorzellen erfolgte über 6 h bei E:Z = 4:1. In den Diagrammen sind die Mittelwerte \pm SEM von n = 16 (4 Spender) Wells dargestellt. *** $P < 0,001$; one-way ANOVA plus post hoc Bonferroni-Test.

3.7 Einfluss von Endocannabinoiden und ähnlichen Verbindungen auf die LAK-Zell-vermittelte Lyse von Tumorzellen

Da es sich bei AA-5HT um einen Inhibitor des Enzyms FAAH handelt (Bisogno et al., 1998), das u. a. am Abbau von Endocannabinoiden wie AEA und 2-AG beteiligt ist (Cravatt et al, 1996), wurde zunächst die Wirkung der Endocannabinoide AEA und 2-AG und der endocannabinoidähnlichen Verbindungen OEA und PEA auf die LAK-Zell-vermittelte Lyse der Tumorzellen untersucht.

Dabei zeigte sich, dass sowohl die Behandlung der Tumorzellen mit AEA und 2-AG als auch die mit OEA und PEA eine signifikant erhöhte Lyse der Zellen im Vergleich zur Vehikelkontrolle zur Folge hatte (Abb. 3-21). Demnach bewegte sich die spezifische Lyse der A549-Zellen zwischen 44 ± 6 % (2-AG) und 57 ± 11 % (AEA). Die H460- und HROBML03-Zellen wurden durch die LAK-Zellen am stärksten nach AEA-Behandlung lysiert, wobei die Lyse der H460-Zellen bei 41 ± 7 % (Vehikel: 2 ± 3 %) und die der

HROBML03-Zellen bei 42 ± 4 % (Vehikel: 3 ± 2 %) lag. Die Behandlung der H460- bzw. HROBML03-Zellen mit 2-AG, OEA und PEA führte zu einer spezifische Zelllyse, die sich zwischen 20 und 30 % bewegte.

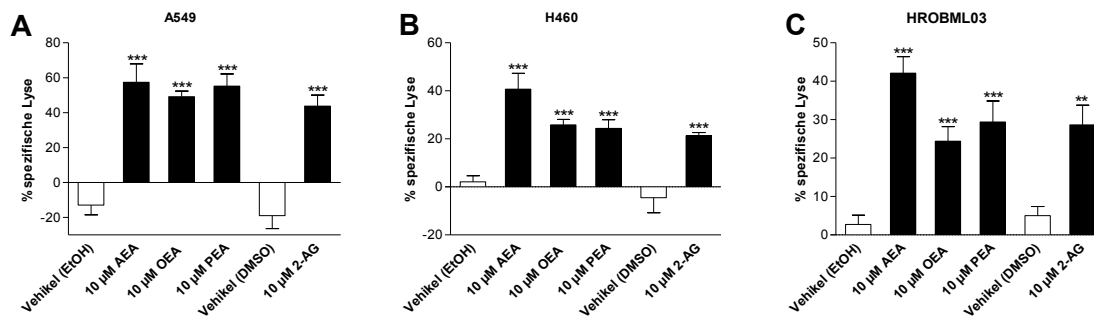


Abb. 3-21: Wirkung von Endocannabinoiden und ähnlichen Verbindungen auf die LAK-Zell-vermittelte Lyse von Tumorzellen

A549- (A), H460- (B) und HROBML03-Zellen (C; je 10.000 Zellen/Well) wurden für 48 h mit Vehikel und Endocannabinoiden (AEA, 2-AG) bzw. endocannabinoidähnlichen Verbindungen (OEA, PEA) inkubiert. Die Coinkubation mit den LAK-Zellen erfolgte über 6 h bei E:Z = 4:1. Die Diagramme zeigen die Mittelwerte \pm SEM von $n = 12$ (3 Spender) Wells. ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; one-way ANOVA plus post hoc Bonferroni-Test.

3.7.1 Rolle von ICAM-1 bei der LAK-vermittelten Lyse von AEA-stimulierten Tumorzellen

Für weitere Experimente wurde das Endocannabinoid AEA ausgewählt und die Rolle von ICAM-1 bei der LAK-Zell-vermittelten Lyse der AEA-stimulierten Tumorzellen mittels Transfektion mit ICAM-1 siRNA bestimmt (Abb. 3-22). Die durch AEA induzierte spezifische Lyse der Tumorzellen (A549, 40 ± 5 %; H460, 28 ± 7 %; HROBML03, 42 ± 7 %) wurde durch die siRNA-Transfektion verringert (A549, 13 ± 8 %) bzw. aufgehoben (H460 und HROBML03; Lyse im Bereich der der Vehikelkontrolle). Die Transfektion mit non siRNA hatte keinen Einfluss auf die Lyse der mit AEA behandelten Tumorzellen und war somit im Vergleich zur Lyse vehikelbehandelter Zellen erhöht (A549, 33 ± 9 %; H460, 36 ± 4 %; HROBML03, 33 ± 7 %).

Die Ermittlung der ICAM-1-Proteinexpression von vehikel- und AEA-behandelten Tumorzellen ist durch einen repräsentativen Blot in der rechten Spalte von Abb. 3-22 gezeigt. Die Stimulation der Tumorzellen mit AEA hatte bei den A549-Zellen eine 2-fache und bei den H460- und HROBML03-Zellen jeweils eine fast 3-fache Hochregulation der ICAM-1-Proteinexpression zur Folge (zweite Bande), welche durch die Transfektion mit non siRNA nicht beeinflusst (sechste Bande), aber durch Transfektion mit ICAM-1 siRNA verringert wurde (vierte Bande).

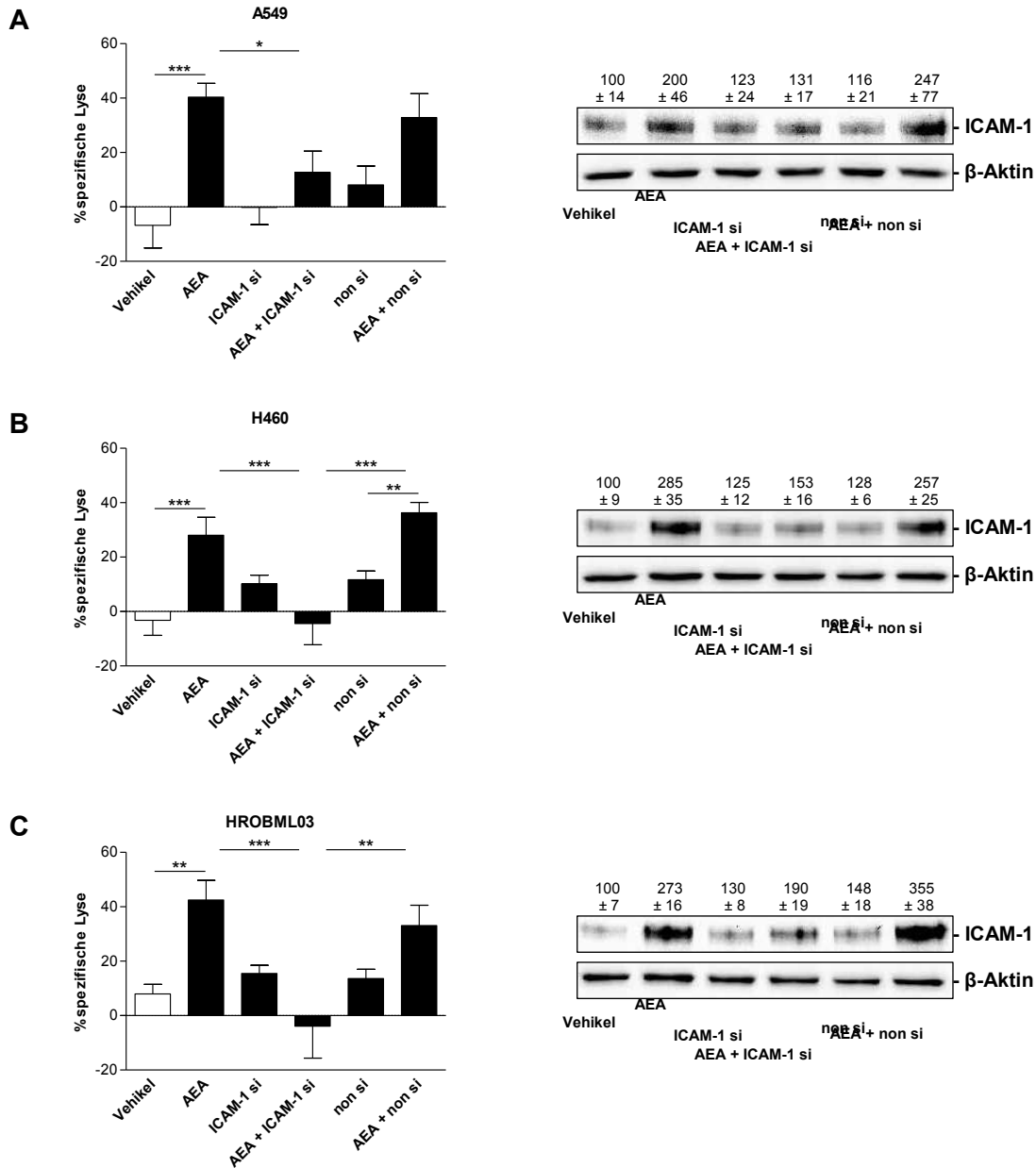


Abb. 3-22: Einfluss der ICAM-1 siRNA-Transfektion auf die LAK-Zell-vermittelte AEA-induzierte Lyse und ICAM-1-Proteinexpression von Tumorzellen

Linke Spalte: Einfluss von ICAM-1 siRNA auf die spezifische Lyse von AEA-behandelten A549- (A), H460- (B) und HROBML03-Zellen (C). Die Tumorzellen (10.000 Zellen/Well) wurden mit ICAM-1 siRNA (ICAM-1 si, 1,25 µg/ml) bzw. non siRNA (non si) transfiziert und 48 h mit Vehikel oder 10 µM AEA stimuliert. Die Coinkubation mit den LAK-Zellen erfolgte über 6 h bei E:Z = 4:1. Die Säulen der Diagramme sind als Mittelwerte ± SEM von n = 16 (4 Spender) Wells dargestellt. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; one-way ANOVA plus post hoc Bonferroni-Test.

Rechte Spalte: Western Blots zum Einfluss von ICAM-1 siRNA auf die AEA-induzierte ICAM-1-Proteinexpression in A549- (A), H460- (B) und HROBML03-Zellen (C). Die Tumorzellen wurden analog zum Zytotoxizitätsassay mit ICAM-1 siRNA (ICAM-1 si, 1,25 µg/ml) bzw. non siRNA (non si) transfiziert und 48 h mit Vehikel oder AEA stimuliert. Die Werte oberhalb der Blots sind die Mittelwerte ± SEM (%-Angaben) der densitometrischen Auswertung von n = 4 Blots nach Normalisierung auf β-Aktin.

3.7.2 Rolle der CB-Rezeptoren und des TRPV1 bei der LAK-vermittelten Lyse von AEA-stimulierten Tumorzellen

AEA kann sowohl die CB-Rezeptoren als auch TRPV1 aktivieren (Mechoulam et al., 1995; Zygmunt et al., 1999). Vor diesem Hintergrund wurde deren Rolle bei der AEA-induzierten Tumorzelllyse überprüft. Die Zytotoxizitätsversuche mit den Rezeptorantagonisten (Abb. 3-23) zeigen, dass die durch AEA induzierte spezifische Lyse der Tumorzellen, welche bei den A549-Zellen bei 37 ± 10 %, bei den H460-Zellen bei 43 ± 5 % und bei den HROBML03-Zellen bei 31 ± 3 % lag, durch die Behandlung der Tumorzellen mit den Rezeptorantagonisten signifikant inhibiert wurde.

Die parallel zum Zytotoxizitätsassay ermittelte Viabilität von AEA-behandelten Tumorzellen (Tab. 8-13) zeigt eine toxische Wirkung von $10 \mu\text{M}$ AEA. So verringerte AEA die Viabilität der A549-Zellen auf 56 ± 2 %, die der H460-Zellen auf 67 ± 2 % und die der HROBML03-Zellen auf 72 ± 3 % (Vehikel = 100 %). Die Rezeptorantagonisten (v. a. AM251) verstärkten diesen Viabilitätsverlust teilweise.

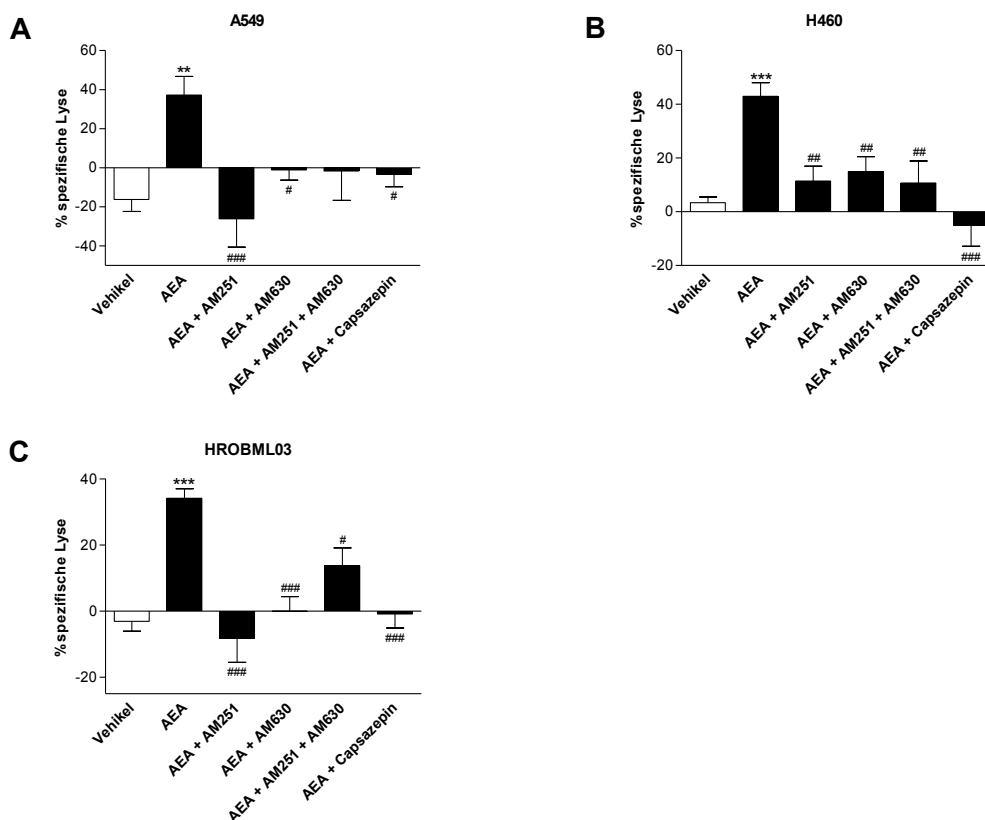


Abb. 3-23: Einfluss von Rezeptorantagonisten gegen CB₁, CB₂ und TRPV1 auf die LAK-Zell-vermittelte AEA-induzierte Lyse von Tumorzellen

Wirkung von AM251 (CB₁-Antagonist, 1 μM), AM630 (CB₂-Antagonist, 1 μM) und Capsazepin (TRPV1-Antagonist, 1 μM) auf die Lyse AEA-behandelter A549- (A), H460- (B) und HROBML03-Zellen (C). Die Tumorzellen (10.000 Zellen/Well) wurden 1 h mit den Rezeptorantagonisten präinkubiert, dann mit Vehikel oder 10 μM AEA stimuliert und die Inkubation über 48 h fortgeführt. Die Coinkubation mit den LAK-Zellen erfolgte über 6 h bei E:Z = 4:1. Die Säulen der Diagramme sind als Mittelwerte \pm SEM von n = 20 (A, 5 Spender), n = 16 (B, 4 Spender) oder n = 24 (C, 6 Spender) Wells dargestellt. ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ vs. Vehikel; # $P < 0,05$; ## $P < 0,01$; ### $P < 0,001$ vs. AEA; one-way ANOVA plus post hoc Bonferroni-Test.

4. Diskussion

In dieser Arbeit wurde der Einfluss von Cannabinoiden auf die LAK-Zell-vermittelte zytotoxische Lyse von Tumorzellen untersucht, wobei insbesondere das Phytocannabinoid CBD im Mittelpunkt stand, da es aufgrund seiner fehlenden Psychoaktivität von besonderem Interesse für eine therapeutischen Anwendung ist. Im Folgenden sollen nun die wichtigsten Aspekte wie die Bedeutung der ICAM-1/LFA-1-Interaktion und die der Cannabinoid-Rezeptoren CB₁ und CB₂ und des Vanilloid-Rezeptors TRPV1 diskutiert werden. Darüber hinaus soll der Einfluss von Cannabinoiden auf Tumorzellen und das Immunsystem sowie das therapeutische Potential von Cannabinoiden, v. a. von CBD, beleuchtet werden.

4.1 Negative Lysewerte und Tumorzellviabilitäten

In Bezug auf die spezifische Lyse von Tumor- durch LAK-Zellen kam es teilweise zu negativen Lysewerten (siehe Ergebnisse). Diese negativen Werte resultieren aus der Berechnung der Lyse durch die Formel: % spezifische Lyse = (Fluoreszenz der Überstände aus Wells mit LAK-Zellen - Fluoreszenz der spontanen Calcein-Abgabe) / (Fluoreszenz der maximalen Calcein-Abgabe - Fluoreszenz der spontanen Calcein-Abgabe). Im Fall von negativen Werten war die spontane Calcein-Abgabe durch die Tumorzellen höher als die in Anwesenheit von LAK-Zellen. Dies resultierte dann in einem negativen Zahlenwert im Zähler, wodurch letztlich auch die spezifische Lyse negativ wurde, was z. T. auch in anderen Arbeiten beobachtet werden konnte (Grimm et al., 1982; Kägi et al., 1994; Smyth et al., 1999; Chia et al., 2009; Wang et al., 2011).

Die Viabilitätsuntersuchungen (siehe Anhang 8.1), die parallel zum Adhäsions- bzw. Zytotoxizitätsassay erfolgten, zeigen, dass CBD und andere Substanzen z. T. toxisch auf die Tumorzellen wirkten, was im Einklang damit steht, dass CBD Apoptose in Tumorzellen induzieren kann (Ramer et al., 2013). Dabei waren die in der vorliegenden Arbeit für den Viabilitätstest verwendeten Zellzahlen i. d. R. höher, wodurch der Viabilitätsverlust der Tumorzellen letztlich auch geringer war. Somit scheint die toxische Wirkung von CBD auf die Tumorzellen mit steigender Zelldichte abzunehmen. Ähnliche Effekte konnten in anderen Arbeiten bei verschiedenen Cannabinoiden wie CBD, MA und THC (Ramer und Hinz, 2008; Ramer et al., 2010a) sowie bei Chemotherapeutika wie Doxorubicin und Vincristin beobachtet werden (Kobayashi et al., 1992). Die Verringerung der Tumorzellviabilität könnte vermuten lassen, dass die durch Stimulation verstärkte Lyse von Tumorzellen durch unterschiedliche E:Z-Verhältnisse bei vehikel- und cannabinoidstimulierten Zellen zustande kommt. Dem steht aber entgegen, dass sowohl der ICAM-1-Antikörper als auch die ICAM-1 siRNA die Viabilität

der Tumorzellen nicht beeinflussten, aber die gesteigerte Lyse der Zellen dennoch aufhoben bzw. verringerten. Hinzu kommt, dass auch die Rezeptorantagonisten die CBD-induzierte gesteigerte Lyse reduzierten, wobei der Viabilitätsverlust bei CBD in Kombination mit den Antagonisten ähnlich wie bei CBD allein war.

4.2 Rolle von ICAM-1, LFA-1 und zytotoxischen Lymphozyten bei der Tumorabwehr

Die Interaktion zwischen ICAM-1 und LFA-1 ist von essentieller Bedeutung bei der Bildung von stabilen Zell-Zell-Kontakten (immunologische Synapse) und verstärkt die Effektivität der Zielzelllyse durch zytotoxische Immunzellen (Beal et al., 2008). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Cannabinoide die ICAM-1-Expression in Lungentumorzellen hochregulieren. Diese verstärkte ICAM-1-Proteinexpression auf der Oberfläche der Tumorzellen führte zu einer erhöhten Adhäsion von LAK-Zellen und hatte schließlich eine gesteigerte zytotoxische Lyse von cannabinoid- bzw. AA-5HT-stimulierten im Vergleich zu vehikelbehandelten Tumorzellen zur Folge. Die Bedeutung von ICAM-1 und der Interaktion zwischen ICAM-1 und LFA-1 bei der LAK-Zell-vermittelten Lyse der Tumorzellen konnte mit Hilfe von Antikörpern nachgewiesen werden. So wurde die Tumorzelllyse sowohl durch Behandlung der Tumorzellen mit einem ICAM-1-Antikörper als auch durch Behandlung der LAK-Zellen mit einem LFA-1-Antikörper inhibiert. Darüber hinaus verhinderte die Transfektion der Tumorzellen mit ICAM-1 siRNA die durch Cannabinoide/AA-5HT induzierte Hochregulation der ICAM-1-Expression und blockierte auf funktioneller Ebene die zytotoxische Lyse entsprechend transfizierter Tumorzellen. Somit spielt ICAM-1 bei der Vermittlung der Adhäsion zwischen Tumor- und LAK-Zellen und folglich der LAK-Zell-vermittelten Lyse der Tumorzellen eine wichtige Rolle. Insbesondere ist dabei die Interaktion mit dem von Leukozyten exprimierten LFA-1 von Bedeutung.

Die Ergebnisse zur Rolle der ICAM-1/LFA-1-Interaktion bei der zytotoxischen Lyse von Tumor- durch Immunzellen werden auch durch Daten anderer Arbeitsgruppen gestützt. So wurde vor Kurzem gezeigt, dass die durch Zytokine (IFN- γ und TNF- α) induzierte ICAM-1-Expression in Leukämiezellen mit geringer basaler ICAM-1-Expression eine erhöhte Adhäsion von NK-Zellen und eine gesteigerte NK-Zell-vermittelte Lyse der Zellen zur Folge hatte (Wang et al., 2011). Die erhöhte NK-Zell-vermittelte Lyse der Zielzellen wurde durch Neutralisierung der Zytokine während der Zytolyse verringert und durch einen ICAM-1-Antikörper aufgehoben. Darüber hinaus führte ein ICAM-1-Knockdown zu einer Verringerung der ICAM-1-Expression und zytotoxischen Lyse von Leukämiezellen mit induzierter bzw. hoher basaler ICAM-1-Expression (Wang et al., 2011). Diese Ergebnisse zeigen, dass ICAM-1 bei der Vermittlung der Lyse von

Tumor- durch NK-Zellen eine entscheidende Rolle spielt. Zusätzlich erhöhte auch die durch IFN- γ -induzierte gesteigerte Expression von MHC-I und ICAM-1 in Neuroblastomzellen die Sensitivität dieser Zellen gegenüber der LAK-Zell-vermittelten Lyse, die durch einen ICAM-1-Antikörper inhibiert werden konnte (Naganuma et al., 1991). Im Einklang damit wurde gezeigt, dass Lymphozyten *in vitro* mit Tumorzellen (u. a. Lungen-, Brustkrebszellen) interagieren, wenn diese MHC-I- und ICAM-1-Proteine exprimieren, wobei eine durch Zytokine induzierte Hochregulation dieser Moleküle die Anfälligkeit der Zellen gegenüber der Lyse durch Lymphozyten erhöhte (Vánky et al., 1990). Die Behandlung von humanen Melanom- und Kolonkarzinomzellen mit TNF- α oder IFN- γ führte ebenfalls zum Anstieg der ICAM-1-Expression und zur verstärkten Lyse der Zellen durch Monozyten (Webb et al., 1991) bzw. durch allogene NK- und LAK-Zellen und autologe tumorinfiltrierende Lymphozyten (TILs) (Altomonte et al., 1993), wobei die Lyse durch ICAM-1-Antikörper blockiert wurde. Die Bedeutung von LFA-1 bei der Interaktion von Immun- mit ihren Zielzellen konnte durch Verwendung von LFA-1-Antikörpern gezeigt werden. So blockierte ein LFA-1-Antikörper die Adhäsion von NK-Zellen an primäre Keratinozyten mit induzierter und an Zervikalkarzinomzellen mit hoher ICAM-1-Expression, bei letzteren auch deren NK-Zell-vermittelte Lyse (Textor et al., 2011). Zudem verringerte die Inkubation von NK-Zellen mit einem LFA-1-Antikörper die durch diese Zellen vermittelte Tumorzellyse (Chen et al., 2007). Die erhöhte Adhäsion von Lymphozyten an Kolonkarzinomzellen mit IFN- γ -induzierter ICAM-1-Expression wurde durch Behandlung der Tumorzellen mit einem ICAM-1- oder der Lymphozyten mit einem LFA-1-Antikörper ebenfalls verringert (Kelly et al., 1992). Darüber hinaus konnte die Bedeutung der ICAM-1/LFA-1-Interaktion bei der Tumorabwehr anhand LFA-1-defizienter Mäuse gezeigt werden, die zwar eine normale Immunantwort von CTLs gegenüber Virusinfektionen aufwiesen, aber deren antitumorogene Abwehrantwort gestört war. So führte die Injektion von Tumorzellen in normale Mäuse zur Infiltration von Lymphozyten und letztlich zur Beseitigung der Tumorzellen, wohingegen diese Effekte bei LFA-1-defizienten Mäusen ausblieben und es zur Entwicklung von malignen Zellen kam (Schmits et al., 1996).

Die entscheidende Rolle von ICAM-1 bei Tumorwachstum und -abwehr konnte auch in diversen *in vivo*-Experimenten gezeigt werden. So verstärkte die Transfektion von Magen- und Kolorektalkarzinomzellen mit dem ICAM-1-Gen die ICAM-1-Expression der Zellen, was zu einer erhöhten Adhäsion von und zytotoxischen Lyse durch PBMCs im Vergleich zu vektortransfizierten Zellen führte. *In vivo* hatte die verstärkte ICAM-1-Expression von ICAM-1-transfizierten Zellen ein reduziertes Tumorwachstum und eine Verringerung der Anzahl und Größe von Metastasen zur Folge (Sunami et al., 2000; Tachimori et al., 2005). Darüber hinaus inhibierte die Inkubation der Karzinomzellen mit

einem ICAM-1-Antikörper die Adhäsion von und zytotoxische Lyse durch PBMCs (Tachimori et al., 2005). Zudem war die Infiltration von Leukozyten in den mit ICAM-1-Gen transfizierten Tumor und den dazugehörigen Metastasen höher als bei vektor-transfizierten Kontrollen (Sunami et al., 2000). Die durch Transfektion mit dem ICAM-1-Gen erhöhte ICAM-1-Expression auf der Oberfläche von Sarkomzellen führte ebenfalls zu einem signifikant reduzierten Tumorwachstum (Sator et al., 1995). In diesem Zusammenhang zeigte sich, dass die gesteigerte ICAM-1-Expression von ICAM-1-transfizierten Sarkomzellen *in vivo* auch eine erhöhte Adhäsion von Lymphozyten zur Folge hatte (Turner et al., 1997). Zudem wurden ICAM-1-transfizierte Sarkomzellen stärker von TILs lysiert als parentale Tumorzellen (Lefor und Fabian, 1998). Darüber hinaus hatte eine CBD-induzierte erhöhte ICAM-1-Expression auf den Lungentumorzellen eine geringere Anzahl von Metastasen zur Folge, wobei dieser Effekt durch einen ICAM-1-Antikörper aufgehoben wurde (Ramer et al., 2012). Umgekehrt reduzierte eine Herunterregulation der ICAM-1-Oberflächenexpression von Pankreas-krebszellen durch TGF- β 1 und die Blockade von ICAM-1 durch einen Antikörper die Adhäsion von und zytotoxische Lyse durch PBMCs *in vitro* und führte *in vivo* zur vermehrten Bildung von Lebermetastasen (Sawada et al., 2006). Demnach konnte in verschiedenen *in vitro*- und *in vivo*-Studien also gezeigt werden, dass die ICAM-1-Expression auf der Oberfläche von Tumorzellen eine entscheidende Rolle bei der Lyse von Tumor- durch Immunzellen spielt und dass eine geringe ICAM-1-Expression dazu beiträgt, dass Tumorzellen durch das Immunsystem nicht erkannt werden. Darüber hinaus verringerte eine erhöhte ICAM-1-Expression das Wachstum und das metastatische Potential von Tumorzellen. Demzufolge wurde die Bedeutung der ICAM-1-Expression von Tumorzellen auch in klinischen Studien ersichtlich. So hatten Kolorektal- und Magenkrebspatienten mit ICAM-1-positiven Tumoren signifikant weniger Lymphknoten- und Lungenmetastasen und zugleich eine höhere Anzahl von TILs als Patienten mit ICAM-1-negativen Tumoren, womit auch die Prognose für letztere schlechter war (Fujihara et al., 1999; Maeda et al., 2002). Im Einklang damit verringerte eine niedrige ICAM-1-Expression auf Magenkrebszellen die LFA-1-abhängige Adhäsion von und zytotoxische Lyse durch Lymphozyten (Fujihara et al., 1998). In anderen Studien konnte ebenfalls eine Korrelation zwischen der ICAM-1-Expression und der Infiltration von Lymphozyten in den Tumor von Patienten mit Kolorektalkrebs (Shibata et al., 1996; Maurer et al., 1998) und Nierenzellkarzinom (Tomita et al., 1990) gezeigt werden. Zudem korrelierte die ICAM-1-Expression im Tumor auch bei Brustkrebspatienten negativ mit der Tumorgröße und Lymphknoten-metastasierung und Patienten mit ICAM-1-positiven Tumoren hatten längere rückfallfreie Phasen und eine positivere Prognose als Patienten mit ICAM-1-negativen

Tumoren (Ogawa et al., 1998). Des Weiteren war die Coexpression von MHC-I und ICAM-1 mit rückfallfreiem Überleben von Patienten mit Speiseröhrenkrebs und einer erhöhten Anzahl von TILs verbunden (Hosch et al., 1997). Folglich scheint die ICAM-1-Expression auf der Tumorzelloberfläche eine erhöhte Infiltration von Lymphozyten in den Tumor und daher eine verstärkte Tumorabwehr zur Folge zu haben, was gleichzeitig eine bessere Prognose für die Krebspatienten bedeutet. So besitzen TILs antitumorogene Aktivität und sind mit einer besseren Prognose bei Brust- (Mahmoud et al., 2011), Kolorektal- (Naito et al., 1998; Diederichsen et al., 2003; Pagés et al., 2009), Eierstock- (Zhang et al., 2003; Sato et al., 2005) und Speiseröhrenkrebs (Schumacher et al., 2001; Ashida et al., 2006), beim Nierenzellkarzinom (Nakano et al., 2001) und bei Lungen- (Kawai et al., 2008) und Pankreaskrebs (Fukunaga et al., 2004) assoziiert.

Neben diesen Studien, die zeigen, dass eine hohe ICAM-1-Expression sich negativ auf die Tumorprogression auswirkt, eine verstärkte Abwehrantwort von Immunzellen hervorruft und somit mit einer besseren Prognose für die Patienten einhergeht, gibt es aber auch Arbeiten mit gegenteiligen Ergebnissen. So korrelierte das ICAM-1-Proteinlevel auf der Oberfläche von humanen Brustkrebszelllinien positiv mit dem metastatischen Potential dieser Zellen, so dass eine ICAM-1-Herunterregulation oder ICAM-1-Blockade mit einem Antikörper zu einer verringerten Invasion der Zellen führte (Rosette et al., 2005). Übereinstimmend damit war eine hohe ICAM-1-Expression mit einem aggressiveren Tumorphänotyp und einer ungünstigeren Prognose assoziiert (Schröder et al., 2011). Weiterhin hatte eine TNF- α -induzierte oder durch Transfektion mit dem ICAM-1-Gen hervorgerufene erhöhte ICAM-1-Expression auf Lungentumorzellen eine höhere Invasivität der Zellen *in vitro* und eine verstärkte Metastasierung *in vivo* zur Folge, wobei beide Effekte u. a. durch einen ICAM-1-Antikörper inhibiert wurden (Huang et al., 2004; Lin et al., 2006). In einer kürzlich veröffentlichten Studie wurde eine erhöhte ICAM-1-Expression v. a. in der invasiven Randregion des oralen Plattenepithelzellkarzinoms gefunden. Diese korrelierte dabei mit der Angiogenese, Tumorzellinvasion, Lymphknotenmetastasierung und Makrophageninfiltration, wobei ICAM-1 als Adhäsionsmolekül bei der Interaktion von Makrophagen und Tumorzellen agierte (Usami et al., 2013). Dabei scheinen hier die tumorassoziierten Makrophagen (TAMs), die bis zu 50 % der Tumormasse ausmachen können, die Progression des Tumors zu unterstützen. Diesbezüglich wurde gezeigt, dass TAMs die Tumorzellproliferation und Angiogenese fördern und zum Abbau der extrazellulären Matrix und so zur Invasion und Metastasierung beitragen und auch die adaptive Immunität supprimieren können (Mantovani et al., 2006; Allavena et al., 2008; Solinas et al., 2009; Qian et al., 2010). Des Weiteren war die ICAM-1-Expression bei malignen Melanomen stärker als bei gutartigen und nahm mit steigender Tumormasse zu (Natali

et al., 1990; Natali et al., 1997), wobei Patienten mit Tumoren, die eine höhere ICAM-1-Expression aufwiesen, mehr Metastasen, kürzere rückfallfreie Phasen und eine schlechtere Überlebensprognose als Patienten mit ICAM-1-negativen Tumoren hatten (Natali et al., 1997). In diesem Zusammenhang wurde die Hypothese aufgestellt, dass eine *de novo*-Expression von ICAM-1 durch Melanomzellen zu einer Interaktion mit Leukozyten führt, die den Verlust der Integrität und das Ablösen von Tumorzellen zur Folge hat, wodurch die Metastasierung unterstützt wird (Johnson et al., 1989).

Andererseits wurde aber auch gezeigt, dass Melanomzellen sICAM-1 freisetzen können und dass die sICAM-1-Abgabe *in vivo* positiv mit dem Tumorwachstum korreliert (Giavazzi et al., 1992). Somit könnte die schlechte Prognose, die mit erhöhter ICAM-1-Expression durch Melanomzellen gezeigt wurde, auch in der Abgabe von sICAM-1 begründet liegen. Dies wird dadurch gestützt, dass aufgereinigtes sICAM-1 und zellfreie Überstände von Melanomzellkulturen, die abgespaltenes ICAM-1 enthielten, die Adhäsion von NK- an Leukämiezellen wie auch die zwischen LAK- und Melanomzellen und folglich auch die zytotoxische Lyse der Krebszellen inhibierten. Die Abgabe von sICAM-1 könnte somit ein protektiver Mechanismus sein, der es Tumorzellen ermöglicht, der Immunüberwachung und Zerstörung durch zytotoxische Immunzellen zu entgehen (Becker et al., 1991). Zudem wurde in einer Studie mit kleinzelligen und nicht-kleinzelligen Lungentumorzelllinien gezeigt, dass die durch TNF- α induzierte ICAM-1-Hochregulation in Tumorzellen ohne sICAM-1-Abgabe (z. B. H460, H211) eine signifikant erhöhte Adhäsion und Zytotoxizität von LAK-Zellen zur Folge hatte, die durch ICAM-1- bzw. LFA-1-Antikörper blockiert werden konnten. Dagegen hatte die Hochregulation der ICAM-1-Expression in Tumorzellen mit (hoher) sICAM-1-Abgabe (z. B. H838) keinen Einfluss auf die Adhäsion und Zytotoxizität von LAK-Zellen. Als mögliche Erklärung führten die Autoren an, dass das von Tumorzellen abgegebene sICAM-1 mit dem LFA-1 auf den LAK-Zellen interagiert und es den Tumorzellen so ermöglicht, der Interaktion mit zytotoxischen Zellen zu entkommen, wohingegen dies bei Tumorzellen ohne signifikante sICAM-1-Abgabe nicht der Fall ist (Melis et al., 1996). Demnach weisen H460-Zellen also keine Abgabe von sICAM-1 auf, was auch durch die Ergebnisse dieser Arbeit gestützt wird, denn die erhöhte ICAM-Expression hatte auch hier eine erhöhte LAK-Zell-vermittelte Lyse der Zellen zur Folge. In Bezug auf die eigenen Daten zeigen A549- und HROBML03-Zellen wahrscheinlich auch keine erhöhte sICAM-1-Freisetzung, da diese Zellen nach Behandlung mit Cannabinoiden ebenfalls stärker lysiert wurden. Darüber hinaus scheinen Cannabinoide die Abspaltung von sICAM-1 auch nicht zu induzieren, so wie es für die Zytokine IFN- γ , IL-1 α und TNF- α gezeigt wurde (Lyons und Benveniste, 1998; Leung, 1999). In Übereinstimmung mit den Arbeiten von Becker bzw. Melis und Kollegen

verringerte sICAM-1 auch in anderen Studien die NK-Zell-vermittelte Lyse von Melanom- (Altomonte et al., 1993) und Brustkrebszellen (Fiore et al., 2002). Zugleich stimulierte exogen injiziertes sICAM-1 das Wachstum von humanen Tumoren *in vivo* (Gho et al., 2001). In klinischen Studien war eine erhöhte Konzentration von sICAM-1 im Serum von Krebspatienten mit dem Krankheitsstadium und/oder der Aggressivität des Tumors und einer schlechten Prognose bei Melanomen (Harning et al., 1991), Kolorektalkrebs (Sánchez-Rovira et al., 1998; Toiyama et al., 2008), malignen Lymphomen (Abdelrazik et al., 2008) und NSCLC (Shin et al., 2004) assoziiert. Darüber hinaus korrelierte eine hohe sICAM-1-Serumkonzentration in einigen Studien positiv mit der Metastasierung und bedeutete eine schlechtere Prognose für Patienten mit Nierenzellkarzinom (Heicappel et al., 1994), Kolorektal- (Alexioua et al., 2001), Magen- (Nakata et al., 1998; Maruo et al., 2002) und Brustkrebs (Zhang und Adachi, 1999), mit hepatozellulären Karzinomen (Sun et al., 1999) und NSCLC (Grothey et al., 1998).

Letztlich kann man schlussfolgern, dass das Adhäsionsmolekül ICAM-1 eine wichtige Rolle bei der Tumorabwehr durch das Immunsystem spielt, auch wenn z. T. kontroverse Ergebnisse veröffentlicht wurden. Die negative oder positive Korrelation von ICAM-1 mit der Tumorprogression könnte sich durch unterschiedliche experimentelle Setups und eine unterschiedliche basale tumorspezifische ICAM-1-Expression von Tumorzellen erklären lassen. Außerdem kommt der löslichen und membrangebundenen Form von ICAM-1 eine unterschiedliche Bedeutung bei Wachstum und Ausbreitung von Tumoren und somit bei der Tumorabwehr zu. So wirkte sich eine erhöhte Oberflächenexpression von ICAM-1 in den meisten Fällen positiv, eine verstärkte sICAM-1-Freisetzung hingegen negativ auf die Abwehr von Tumorzellen aus. In Bezug auf die ICAM-1-Expression von Zellen sind Zytokine wie IFN- γ , IL-1 und TNF- α von wichtiger Bedeutung, da sie diese verstärken können (Dustin et al., 1986; Pober et al., 1986; Fabry et al., 1992; Chen et al., 2001). T- und NK-Zellen sind dabei die Hauptquelle für IFN- γ , das wiederum Monozyten bzw. Makrophagen, die IL-1 α und TNF- α freisetzen (Leung, 1999), und CTLs und NK-Zellen aktiviert (Vitolo et al., 1994). Da diese Immunzellen bei der Tumorabwehr aktiv sind, könnte es möglich sein, dass die durch Immunzellen freigesetzten Zytokine, ähnlich wie CBD, die ICAM-1-Expression von Tumorzellen induzieren und so die Abwehr der Tumorzellen über Interaktion von ICAM-1 mit dem auf den Immunzellen exprimierten LFA-1 verstärken. Andererseits besteht die Möglichkeit, dass diese Zytokine zusätzlich die Abgabe von sICAM-1 durch Tumorzellen auslösen und die Zellen so der Interaktion mit den Immunzellen entgehen können, da das freigesetzte sICAM-1 ebenfalls mit dem LFA-1 auf den Immunzellen interagieren kann (Melis et al., 1996). Dafür spricht, dass sICAM-1 ebenfalls aus fünf Ig-ähnlichen Domänen besteht, wobei LFA-1 mit Domäne 1

interagiert (Staunton et al., 1990). Die Freisetzung von sICAM-1 ist tumorzellspezifisch, d. h. nicht alle Tumorzellen geben sICAM-1 ab, auch nicht als Folge der Stimulation mit Zytokinen (Melis et al., 1996). Schließlich zeigen die Ergebnisse dieser und vieler anderen Studien die essentielle Bedeutung von ICAM-1 und LFA-1 bei der Tumorabwehr durch das Immunsystem.

4.3 Rolle der CB-Rezeptoren und des TRPV1 bei der CBD-induzierten Tumorzelllyse

Cannabinoide können ihre Effekte über die CB-Rezeptoren CB₁ und CB₂, über nur einen dieser Rezeptoren oder rezeptorunabhängig vermitteln. Einige Cannabinoide zeigen darüber hinaus Aktivität am Vanilloid-Rezeptor TRPV1. In dieser Arbeit wurde eine Involvierung der beiden CB-Rezeptoren CB₁ und CB₂ und des TRPV1 bei der Vermittlung der Wirkung von CBD auf die ICAM-1-Expression und die LAK-Zellvermittelte Lyse von Tumorzellen untersucht, da diese Rezeptoren auch bei der CBD-induzierten Inhibition der Tumorzellinvasion eine Rolle spielen (Ramer et al., 2010a und b). Zudem konnte kürzlich gezeigt werden, dass CBD die ICAM-1-Proteinhochregulation über diese drei Rezeptoren vermittelt (Ramer et al., 2012). Demzufolge konnte unter Verwendung von entsprechenden Antagonisten gegen CB₁, CB₂ und TRPV1 auch in dieser Arbeit eine Beteiligung der drei Rezeptoren bei der LAK-Zellvermittelten Lyse von CBD-behandelten Tumorzellen gezeigt werden. Dabei löste CBD über die genannten Rezeptoren eine Hochregulation der ICAM-1-Oberflächenexpression aus, wodurch die Adhäsion von LAK- an Tumorzellen und folglich die Lyse der Tumorzellen erhöht wurde. Die zusätzliche Behandlung der Tumorzellen mit den Rezeptorantagonisten AM251 (CB₁-Antagonist), AM630 (CB₂-Antagonist) bzw. Capsazepin (TRPV1-Antagonist) verringerte die ICAM-1-Proteinexpression und die Lyse von CBD-behandelten Tumorzellen.

Bei AM251 handelt es sich um ein Analogon des CB₁-Antagonisten SR141716A (Rimonabant). AM251 weist eine höhere Affinität zum CB₁- als zum CB₂-Rezeptor auf (Gatley et al., 1996; Lan et al., 1999), kann sich allein verabreicht auch als inverser Agonist am CB₁-Rezeptor verhalten und ist im Gegensatz zu AM630 in der Lage, den GPR55 zu aktivieren (Pertwee, 2010). AM630 ist ein selektiver CB₂-Antagonist, der eine 165-fach höhere Affinität für CB₂ gegenüber CB₁ besitzt und sich allein als inverser Agonist am CB₂- und als partieller Agonist am CB₁-Rezeptor verhält (Ross et al., 1999). Abhängig von den Bedingungen und v. a. der Aktivität des Rezeptors kann sich AM630 als Agonist, Antagonist oder inverser Agonist am gleichen Rezeptor (CB₂) verhalten (Bolognini et al., 2012). Zudem scheinen mikromolare Konzentrationen von AM630 über CB₁-vermittelte Effekte blockieren zu können, was für eine antagoni-

sierende Wirkung am CB_1 spricht (Murataeva et al., 2012). Capsazepin wurde als spezifischer Antagonist der Capsaicin-Aktivität am TRPV1 beschrieben (Bevan et al., 1992) und kann ebenfalls Effekte von CBD aufheben (Bisogno et al., 2001).

Rolle von TRPV1

Im Einklang damit zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass der TRPV1 bei der CBD-induzierten LAK-Zell-vermittelten Tumorzelllyse involviert ist, da Capsazepin diese blockierte. Dabei verhält sich CBD, verglichen mit Capsaicin, als voller Agonist am TRPV1 und induziert den Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration – ein Effekt, der ebenfalls durch Capsazepin aufgehoben wurde (Bisogno et al., 2001). Die Eigenschaft von CBD, sich als voller Agonist am TRPV1 zu verhalten, tritt bei Konzentrationen auf, die durch *in vivo* verabreichte Dosen (10-50 mg/kg Mensch) erreicht werden können, wobei diese geringer sind als die, die für CB-Rezeptoraktivierung benötigt werden (Bisogno et al., 2001). Dementsprechend konnte eine Involvierung von TRPV1 bei der Vermittlung von CBD-Effekten auch in anderen Studien gezeigt werden. So spielte die Aktivierung von TRPV1 bei der antiproliferativen Wirkung von CBD auf Brustkrebszellen eine Rolle (Ligresti et al., 2006). Weiterhin war der TRPV1 bei der Vermittlung der analgetischen (Costa et al., 2004 und 2007) und antiinvasiven Wirkung von CBD beteiligt (Ramer et al., 2010a und b).

Rolle der CB-Rezeptoren CB_1 und CB_2

Wie in dieser Arbeit gezeigt, waren neben TRPV1, der direkt durch CBD aktiviert werden kann, auch der CB_1 - und CB_2 -Rezeptor bei der Vermittlung der LAK-Zell-vermittelten Lyse von CBD-behandelten Tumorzellen beteiligt, da die entsprechenden Antagonisten (AM251, AM630) diese verringerten bzw. aufhoben. Dem steht entgegen, dass durch Verdrängungsstudien mit radioaktiv markierten CB-Rezeptoragonisten für CBD im Vergleich zu anderen Cannabinoiden nur eine sehr geringe Affinität zu den CB-Rezeptoren nachgewiesen werden konnte (Showalter et al., 1996; Thomas et al., 1998; Bisogno et al., 2001). Dennoch zeigen die Daten dieser Studie eine Involvierung der Rezeptoren bei der Induktion der ICAM-1-Expression durch Tumorzellen, wie sie bereits zuvor gezeigt werden konnte (Ramer et al., 2012), und bei der LAK-Zell-vermittelten Lyse von CBD-behandelten Tumorzellen. Eine Beteiligung der CB-Rezeptoren bei CBD-vermittelten Effekten konnte auch in anderen Arbeiten gezeigt werden. So wurde die CBD-induzierte Modulation der Zytokinfreisetzung von Makrophagen über beide Rezeptoren vermittelt und die durch CBD verringerte Chemotaxis der Makrophagen durch Antagonisierung des CB_2 -Rezeptors verhindert (Sacerdote et al., 2005). Des Weiteren wurde die antiproliferative Wirkung von CBD auf humane Gliomzellen (Massi et al., 2004) und der proapoptotischer Effekt von CBD auf Leukämiezellen über den CB_2 -Rezeptor vermittelt (McKallip et al., 2006). Der antiproliferative

ferative Einfluss von CBD auf Brustkrebszellen wurde durch Verwendung eines CB₂-Antagonisten verringert (Ligresti et al., 2006). Ferner spielte der CB₂-Rezeptor auch bei der CBD-induzierten Migration von mesenchymalen Stammzellen eine Rolle (Schmuhl et al., 2014). Zudem erfolgte die CBD-induzierte Inhibition der Invasion von Zervikal- und Lungenkarzinomzellen nicht nur über TRPV1, sondern auch über die beiden CB-Rezeptoren (Ramer et al., 2010a und b). Die genannten Effekte suggerieren v. a. eine Involvierung des CB₂-Rezeptors bei CBD-vermittelten Wirkungen. Dies steht im Einklang damit, dass für CBD eine höhere Affinität zum CB₂- als zum CB₁-Rezeptor nachgewiesen werden konnte (Showalter et al., 1996; MacLennan et al., 1998). In anderen Arbeiten wurde aber auch gezeigt, dass sich CBD als potenter Antagonist von CB-Rezeptoragonisten und als inverser Agonist am CB₂-Rezeptor verhalten kann (Pertwee et al., 2002; Thomas et al., 2007).

Somit vermittelt CBD verschiedene Effekte wie antiproliferative, proapoptotische, antiinvasive und, wie in dieser Arbeit gezeigt, die Hochregulation von ICAM-1 und die damit einhergehende Lyse von Lungentumorzellen u. a. über den CB₁- und CB₂-Rezeptor, trotz geringer Affinität zu diesen Rezeptoren. Aufgrund dieser niedrigen Rezeptoraffinität von CBD könnte die Aktivierung der CB-Rezeptoren indirekt erfolgen, z. B. durch Erhöhung des Endocannabinoidlevels, durch inhibitorische Effekte auf die enzymatische AEA-Hydrolyse oder die AEA-Aufnahme durch Zellen (Bifulco et al., 2004). Die Hydrolyse von AEA wird durch die FAAH katalysiert (Cravatt et al., 1996), die auch in der Lage ist, andere Fettsäureamide (z. B. PEA, OEA) und 2-AG zu spalten (Maurelli et al., 1995; Cravatt et al., 1996; Bisogno et al., 1997; Goparaju et al., 1999; Saghatelian et al., 2004). Es wurde gezeigt, dass CBD die FAAH-Aktivität (Watanabe et al., 2005) und -Expression (de Filippis et al., 2008) inhibieren kann. In anderen Arbeiten inhibierte CBD zusätzlich zur AEA-Hydrolyse auch dessen Aufnahme durch Zellen (Bisogno et al., 2001; Ligresti et al., 2006). Dementsprechend blockierte CBD die AEA-Aufnahme über einen möglichen AEA-Membrantransporter mit vergleichbarer Potenz wie AM404 (Rakhshan et al., 2000), einem selektiven AEA-Transportinhibitor ohne Wirkung auf die FAAH-Aktivität (Beltramo et al., 1997). Die Inhibition des AEA-Metabolismus durch CBD hätte demnach zur Folge, dass AEA und andere mögliche Substrate der FAAH im extrazellulären Raum akkumulieren und so eine verstärkte Aktivierung der CB-Rezeptoren bewirken, die dann, wie auch in dieser Arbeit gezeigt, durch entsprechende Rezeptorantagonisten blockiert werden kann. Die Folge der Inhibition des AEA-Abbaus und einer möglichen Akkumulation von AEA auf die LAK-Zell-vermittelte Lyse von Tumorzellen wurde dementsprechend auch mit Hilfe des FAAH-Inhibitors AA-5HT und durch Versuche mit eCBs, dabei insbesondere AEA, und eCB-ähnlichen Verbindungen untersucht. Die Behandlung der Tumorzellen mit diesen

Substanzen resultierte dabei ebenfalls in einer gesteigerten Lyse entsprechend behandelter Zellen. Darüber hinaus wurde die durch AA-5HT induzierte erhöhte Lyse der Tumorzellen, ähnlich wie die von CBD, durch die beiden Rezeptorantagonisten AM251 und AM630 blockiert. Dies spricht für eine Aktivierung der CB-Rezeptoren, die sehr wahrscheinlich über die eCBs AEA und 2-AG erfolgt, da sowohl AEA als auch 2-AG an die beiden Rezeptoren binden und diese aktivieren können (Mechoulam et al., 1995; Showalter et al., 1996; Hillard et al., 1999; Ben-Shabat et al., 1998; Sugiura et al., 2006). In diesem Zusammenhang blockierten die verwendeten Rezeptorantagonisten auch die AEA-induzierte Lyse der Tumorzellen, was eine Rezeptoraktivierung durch AEA und die Möglichkeit einer inhibitorischen Wirkung von CBD auf den Metabolismus von AEA (und/oder ähnlicher Verbindungen) untermauert. Zudem kann PEA, das durch FAAH-Inhibition auch akkumulieren kann und keine Affinität zu den beiden CB-Rezeptoren besitzt (Felder et al., 1993; Sugiura et al., 2000), die Aktivierung der Rezeptoren durch AEA verstärken (Lambert und Di Marzo, 1999; Smart et al., 2002). Dies erfolgt vermutlich durch eine blockierende Wirkung auf den AEA-Abbau, die durch Konkurrenz um die katalytische Aktivität der FAAH entsteht (Costa et al., 2008). Ähnliches konnte auch für OEA, das ebenfalls keine Affinität zu den CB-Rezeptoren besitzt (Sheskin et al., 1997; Lambert et al., 1999), gezeigt werden (Jonsson et al., 2003). Somit könnte eine Akkumulation von eCBs und eCB-ähnlichen Verbindungen durch Inhibition des abbauenden Enzyms FAAH, die durch AA-5HT und möglicherweise durch CBD verursacht wird, eine Aktivierung der Rezeptoren zur Folge haben.

Bei AA-5HT handelt es sich um ein synthetisches Arachidonsäurederivat, das zunächst als potenter stabil aber nicht-kovalent bindender kompetitiver Inhibitor der FAAH und somit der AEA-Hydrolyse in intakten Zellen und in zellfreien Präparationen ($IC_{50} = 6\text{--}25 \mu\text{M}$) identifiziert wurde, wobei es selbst keine Aktivität an den CB-Rezeptoren aufweist (Bisogno et al., 1998). Später zeigten Maione et al. (2007), dass AA-5HT sich auch als Antagonist am humanen TRPV1 ($IC_{50} = 36,8\text{--}39,9 \text{ nM}$ gegen 100 nM für Capsaicin) verhält und die Aktivität von Capsaicin und AEA an diesem Vanilloid-Rezeptor antagonisiert. Damit besitzt AA-5HT eine duale Aktivität als FAAH-Inhibitor und TRPV1-Antagonist. Die FAAH-Inhibition durch AA-5HT führte zu einer Erhöhung der AEA-Konzentration und einer indirekten Aktivierung von CB_1 , die durch AM251 aufgehoben wurde (Maione et al., 2007). Darüber hinaus wurde auch in anderen Studien gezeigt, dass AA-5HT die Konzentration von eCBs erhöhen kann (de Lago et al., 2005; Suplita et al., 2005; de Novellis et al., 2008). Bifulco et al. (2004) zeigten, dass AA-5HT das Wachstum von Tumoren *in vivo* inhibiert, wobei dieser Effekt mit signifikant erhöhten eCB-Konzentrationen (AEA, 2-AG, PEA) in den Tumoren einherging. Darüber hinaus wurde die antiproliferative Wirkung von AA-5HT

und eCBs (2-AG, Met-F-AEA) teilweise über CB₁ vermittelt (Bifulco et al., 2004). Zudem erhöhte AA-5HT das eCB-Level in Kolorektalkrebszellen und inhibierte deren Proliferation über CB₁-Aktivierung (Ligresti et al., 2003). Die angstlösende Wirkung von AA-5HT, die durch AM251 aufgehoben wurde, war ebenfalls mit einem Anstieg von AEA und 2-AG assoziiert (Micale et al., 2009) und die entkrampfende Wirkung wurde auch durch AM251 blockiert (Vilela et al., 2014). Diese Arbeiten zeigen, dass die Inhibition der FAAH durch AA-5HT mit einer Erhöhung der eCB-Konzentration und z. T. der Aktivierung von CB-Rezeptoren einherging. Ein entsprechender Effekt könnte auch durch CBD, das die FAAH-Aktivität (Watanabe et al., 2005) und -Expression (de Filippis et al., 2008) inhibieren kann, hervorgerufen werden. Dies könnte die Beteiligung des CB₁- und CB₂-Rezeptors bei der Vermittlung der ICAM-1-Hochregulation und der LAK-Zell-vermittelten Tumorzellyse erklären. Darüber hinaus zeigen die Arbeiten auch, dass AA-5HT ähnliche Wirkungen wie CBD besitzt. Dies beinhaltet die durch AA-5HT vermittelte analgetische (Maione et al., 2007), antiproliferative (Bifulco et al., 2004), anxiolytische (Micale et al., 2009) und antikonvulsive Wirkung (Vilela et al., 2014). Die These der inhibitorischen Wirkung von CBD auf den eCB-Abbau wird dadurch zusätzlich unterstützt.

Im Ergebnis lässt sich schlussfolgern, dass CBD die Hochregulation von ICAM-1 und die damit einhergehende LAK-Zell-vermittelte Lyse von Tumorzellen wahrscheinlich über direkte Aktivierung von TRPV1 und indirekte Aktivierung der CB-Rezeptoren durch Inhibition des AEA-Metabolismus bewirkt. Dennoch besteht die Möglichkeit, dass CBD bei einer Konzentration von 3 µM auch direkt an den CB-Rezeptoren agiert, da es eine gewisse Affinität zu den Rezeptoren ausweist (CB₁: K_i = 4350 ± 390 nM; CB₂: K_i = 2860 ± 1230 nM), die im Vergleich zu AEA jedoch sehr gering ist (CB₁: K_i = 89 ± 10 nM; CB₂: K_i = 371 ± 102 nM) (Showalter et al., 1996).

Eigeneffekt der Rezeptorantagonisten und Viabilitäten

Ein möglicher Eigeneffekt der verwendeten Rezeptorantagonisten (AM251, AM630, Capsazepin) auf die zytotoxische Lyse und ICAM-1-Proteinexpression der Tumorzellen konnte durch Experimente ohne CBD-Stimulation ausgeschlossen werden, da die Antagonisten allein keinen entscheidenden Einfluss auf beide Parameter zeigten. Demnach blockierten sie die Wirkung von CBD auf die Lyse und ICAM-1-Proteinexpression ohne von sich aus eine inhibitorische Wirkung zu vermitteln. Die geringe, aber dennoch signifikante Hochregulation der Lyse der HROBML03-Zellen bei Kombination von AM251 und AM630 lässt sich möglicherweise dadurch erklären, dass sich AM630 unter bestimmten Bedingungen auch als Agonist am CB₂-Rezeptor verhalten kann (Bolognini et al., 2012). Die Viabilitätstests zur Wirkung von CBD in Zusammenhang mit den Rezeptorantagonisten zeigen ebenfalls, dass die Anta-

gonisten allein keine bzw. im Fall von A549 eine eher stimulierende Wirkung hatten. Zudem konnten auch keine signifikanten Effekte in Kombination mit CBD beobachtet werden, so dass die inhibitorische Wirkung der Rezeptorantagonisten auf die Lyse der Tumorzellen nicht von zusätzlichen Effekten auf die Viabilität beeinflusst wurde. Darüber hinaus zeigt dies, dass die gesteigerte Lyse von CBD- im Vergleich zu vehikelbehandelten Tumorzellen nicht auf die Verringerung der Viabilität der Tumorzellen zurückzuführen ist, da die Viabilität der Tumorzellen durch CBD in Kombination mit den Antagonisten im gleichen Ausmaß verringert, die spezifische Lyse aber dennoch inhibiert wurde. Ähnliches gilt auch für die Inhibitionsversuche mit AA-5HT und AEA.

Andere mögliche Bindestellen für CBD

Neben der direkten Aktivierung von TRPV1 und wahrscheinlich indirekten von CB₁ und CB₂ konnten auch andere Rezeptoren als Ziele für die Vermittlung von CBD-Effekten ausgemacht werden. So verhält sich CBD als Agonist am humanen 5HT1A-Rezeptor und kann mit ähnlicher Rezeptorbesetzung wie der Agonist Serotonin die GTP-Bindung an das rezeptorgekoppelte G_{v0}-Protein erhöhen und so die cAMP-Produktion verringern (Russo et al., 2005). Demnach vermittelt CBD seine angstlösenden Effekte über diesen Rezeptor (Gomes et al., 2011). Ein weiteres Ziel für CBD stellt PPAR- γ dar. So verursachte CBD eine z. T. über PPAR- γ vermittelte Vasorelaxation in isolierten Aorten. Zudem kann CBD die transkriptionelle Aktivität von PPAR- γ erhöhen, direkt an PPAR- γ binden und eine PPAR- γ -vermittelte Differenzierung von Fibroblasten zu Adipozyten stimulieren (O'Sullivan et al., 2009). CBD agiert damit wie THC als Ligand von PPAR- γ (O'Sullivan et al., 2005). Ferner kann der GPR55-Rezeptor (Sawzdargo et al., 1999) von Cannabinoiden wie AEA, abnormal CBD und THC aktiviert werden, wohingegen CBD als Antagonist an diesem Rezeptor agierte (Ryberg et al., 2007). Eine inhibitorische Wirkung von CBD am GPR55 wurde auch bei der Migration von mesenchymalen Stammzellen gezeigt (Schmuhl et al., 2014).

4.4 Antitumorogene Wirkungen von Cannabinoiden

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass Cannabinoide in Zusammenhang mit der Tumorabwehr durch das Immunsystem eine wichtige Rolle spielen. So vermitteln sie die Hochregulation des Adhäsionsmoleküls ICAM-1 und erhöhen die LAK-Zell-vermittelte zytotoxische Lyse von Tumorzellen. Dabei hatte die Stimulation der Lungentumorzellen mit den Phytocannabinoiden THC und CBD, den synthetischen Cannabinoiden MA, JWH133 und WIN55,212-2 und den eCB (AEA, 2-AG) oder eCB-ähnlichen Verbindungen (OEA, PEA) eine gesteigerte Tumorzelllyse verglichen mit der vehikelbehandelter Tumorzellen zur Folge. Demnach besitzen Cannabinoide

antitumorigene Aktivität auf Ebene der Tumorummunüberwachung, da sie durch ICAM-1-Hochregulation in den Tumorzellen zur erhöhten Adhäsion von Immunzellen und damit zur Eliminierung der Tumorzellen beitragen. Eine entsprechende Wirkung konnte auch für den FAAH-Inhibitor AA-5HT belegt werden.

Eine tumorregressive Wirkung von Cannabinoiden wurde bereits 1975 gezeigt. So inhibierten Δ^9 -THC, Δ^8 -THC und Cannabinol das Tumorzellwachstum *in vitro* und *in vivo* (Munson et al., 1975). Doch erst die Entdeckung des Endocannabinoidsystems Anfang der 1990er Jahre hatte eine verstärkte Forschung auf dem Gebiet der antikanzerogenen Eigenschaften von Cannabinoiden zur Folge. Dabei können Cannabinoide regressiv auf die Proliferation, v. a. durch Induktion von Apoptose, auf die Invasion und Metastasierung und auf die Angiogenese wirken (Reviews: Freimuth et al., 2010; Velasco et al., 2012) – Prozesse, die bei der Tumorprogression von entscheidender Bedeutung sind.

Demnach inhibierten Cannabinoide wie AEA, 2-AG, CP55,940, WIN55,212-2 und JWH015 die Proliferation von Gliomzellen (Jacobsson et al., 2001). Des Weiteren verursachten AEA, MA, 2-AG und HU-210 eine Inhibition der Proliferation von humanen Brustkrebszellen *in vitro* (De Petrocellis et al., 1998) und JWH133 verringerte das Wachstum von Gliomzellen *in vivo* (Sánchez et al., 2001). Darüber hinaus hatte AEA eine antiproliferative Wirkung auf metastatische Prostatakrebszellen (Mimeault et al., 2003) und THC und JWH015 verringerten das Wachstum von hepatozellulären Karzinomzellen *in vitro* und *in vivo* (Vara et al., 2011). Die Inhibition der Proliferation von Tumorzellen erfolgt dabei in erster Linie durch Induktion von Apoptose in den betreffenden Zellen. So induzierte AEA Apoptose in Zervikalkarzinom- (Contassot et al., 2003), Neuroblastom- und Lymphomzellen (Maccarrone et al., 2000). MA löste in humanen Neurogliom- (Hinz et al., 2004) und wie JWH015, das auch *in vivo* das Tumorwachstum inhibierte, in Prostatakrebszellen aus (Olea-Herrero et al., 2009). Das Phytocannabinoid THC induzierte ebenfalls Apoptose in Gliom- (Sánchez et al., 1998; Galve-Roperh et al., 2000) und Prostatakarzinomzellen (Ruiz et al., 1999) und inhibierte die Proliferation von Brustkrebszellen durch CB_2 -abhängige Induktion der Apoptose (Caffarel et al., 2006). Zusätzlich inhibierten THC und WIN55,212-2 das Melanomzellwachstum *in vitro* und WIN55,212-2 und JWH133 durch Induktion von Apoptose *in vivo* (Blázquez et al., 2006). Die Cannabinoide THC, HU-210 und AEA induzierten Apoptose in murinen und humanen Lymphomzellen, wobei THC das Tumorwachstum auch *in vivo* reduzierte (McKallip et al., 2002). Neben der Induktion der Apoptose beeinflussen Cannabinoide auch das invasive und metastatische Potential von Tumorzellen. So inhibierte Met-F-AEA die Migration von Brustkrebszellen *in vitro* und deren Metastasierung *in vivo* (Grimaldi et al., 2006; Laezza et al., 2008). Im

Einklang damit inhibierten 2-AG und WIN55,212-2 die Migration von Zervikalkarzinomzellen *in vitro* (Rudolph et al., 2008) und WIN55,212-2 die Metastasierung von Melanomzellen *in vivo* (Blázquez et al., 2006). Es wurde auch gezeigt, dass THC und WIN55,212-2 die Chemotaxis und Invasion von nicht-kleinzelligen Lungenkrebszellen *in vitro* und das Tumorwachstum und die Bildung von Lungenmetastasen *in vivo* inhibieren (Preet et al., 2008 und 2011). THC und MA wirkten zudem antiinvasiv auf Zervikal- und Lungentumorzellen (Ramer und Hinz, 2008). Ferner inhibierte WIN55,212-2 das Wachstum und die Metastasierung von Pankreastumorzellen (Carracedo et al., 2006) und die Invasion von Magenkrebszellen durch Herunterregulation der Expression der MMP-2 und von VEGF (Xian et al., 2010). Dabei spielen MMP-2 und VEGF eine wichtige Rolle bei der Angiogenese, die der Invasion und Metastasenbildung von Tumorzellen vorangeht. Dementsprechend wirkte Met-F-AEA antimetastatisch und antiangiogen auf Lungenkarzinomzellen, indem es die VEGF-Signalgebung inhibierte (Portella et al., 2003). In einer anderen Studie wurde für Met-F-AEA ebenfalls eine antiangiogene Aktivität gezeigt, wobei es die Aktivität der MMP-2, die Vaskularisation und die Proliferation von Endothelzellen unterdrückte (Pisanti et al., 2007). Darüber hinaus inhibierten JWH133, WIN55,212-2, THC und HU-210 die Tumorangiogenese durch direkte Inhibition der Migration von vaskulären Endothelzellen, durch Induktion von Apoptose in diesen Zellen und durch Suppression der Expression von proangiogenen Faktoren (VEGF, Angiopoietin-2) und der MMP-2 durch die Tumorzellen (Blázquez et al., 2003; Casanova et al., 2003). Zusätzlich vermitteln die Proteine ICAM-1 und TIMP-1 (tissue inhibitor of matrix metalloproteinases), wobei letzteres von Lungentumorzellen nach Cannabinoidbehandlung (CBD, JWH133, THC, MA) freigesetzt wird, antiangiogene Effekte auf Endothelzellen (Ramer et al., 2014).

Die Studien zu den antitumorigenen Wirkungen zeigen, dass Cannabinoide antiproliferative, proapoptotische, antimigrative und -invasive, antimetastatische und antiangiogene Effekte vermitteln. Das nicht-psychoaktive Phytocannabinoid CBD, das von therapeutischem Interesse ist, besitzt ebenfalls diverse antikanzerogene Eigenschaften. So verursachte CBD eine Inhibition der Migration (Vacca et al., 2005) und Proliferation von humanen Gliomzellen, wobei es in diesen Zellen Apoptose induzierte und das Gliomzellwachstum auch *in vivo* inhibierte (Massi et al., 2004). Die Induktion der Apoptose erfolgte dabei u. a. durch die Aktivierung von Caspasen, die Freisetzung von Cytochrom c und die frühe Produktion von ROS (Massi et al., 2006). Im Einklang damit induzierte CBD durch Aktivierung der Caspase-Kaskade mit Freisetzung von Cytochrom c und einer vermehrten Bildung von ROS auch in murinen und humanen Leukämiezellen Apoptose. *In vivo* führt eine CBD-Behandlung ebenfalls zur Apoptose und somit zu einem verringerten Tumorwachstum (McKallip et al., 2006).

CBD wirkte auch der Proliferation und Metastasierung von malignen Brustkrebszellen entgegen (Ligresti et al., 2006). Dementsprechend wurde auch in anderen Studien gezeigt, dass CBD die Proliferation und die Invasion von Brustkrebszellen (McAllister et al., 2007) und das Tumolvolumen und die Anzahl von Lungenmetastasen reduziert (McAllister et al., 2011). Übereinstimmend damit inhibierte CBD auch die Invasion von Glioblastomzellen *in vitro* und die Progression des Glioms *in vivo* (Soroceanu et al., 2013). Zusätzlich verringerte CBD die Viabilität von Brustkrebszellen, indem es Apoptose und Autophagie in den Zellen induzierte, wobei dies u. a. mit der Freisetzung von Cytochrom c und ROS und somit der Aktivierung des intrinsischen Apoptoseweges einherging (Shrivastava et al., 2011). Darüber hinaus verringerte CBD das Wachstum von Prostata- (De Petrocellis et al., 2011) und Kolorektalkarzinomzellen (Aviello et al., 2012) durch Induktion von Apoptose (Sreevalsan et al., 2011). CBD induzierte auch Apoptose in Lungenkrebszellen und inhibierte das Tumorzellwachstum *in vivo* (Ramer et al., 2013). Zusätzlich verringerte es die Invasion von humanen Zervikalkarzinom- und Lungentumorzellen *in vitro* und führte *in vivo* zur Inhibition der Bildung von Lungenmetastasen (Ramer et al., 2010 und 2012). Wie andere Cannabinoide auch vermittelt CBD antiangiogene Effekte auf vaskuläre Endothelzellen (Solinas et al., 2012; Ramer et al., 2014). So induzierte es die Endothelzellzytostase ohne Apoptose auszulösen oder einen toxischen Effekt auf die Zellen zu haben. Darüber hinaus inhibierte es die Migration und Invasion von Endothelzellen und die Ausbildung kapillarähnlicher Strukturen *in vitro* und *in vivo*. Diese Effekte waren mit Herunterregulation von mit Angiogenese verknüpften Molekülen wie MMP-2 und -9, Urokinasetyp Plasminogen Aktivator, Endothelin-1 und Platelet-derived growth factor-AA (PDGF-AA) assoziiert (Solinas et al., 2012).

In der vorliegenden Arbeit wurde zudem gezeigt, dass der FAAH-Inhibitor AA-5HT ebenso wie Cannabinoide die LAK-Zell-vermittelte Lyse von Lungentumorzellen erhöht und demnach, ob nun direkt oder indirekt über Erhöhung des Endocannabinoidlevels, antikanzerogene Eigenschaften besitzt. Im Einklang damit inhibierte AA-5HT die Proliferation von Gliomzellen (Jacobsson et al., 2001) und transformierten Schilddrüsenzellen *in vitro* und das Wachstum von Tumorenografts *in vivo*, wobei letzteres mit signifikant erhöhten Endocannabinoidkonzentrationen in den Tumoren einherging (Bifulco et al., 2004). Darüber hinaus erhöhte AA-5HT das Endocannabinoidlevel in Kolorektalkrebszellen und blockierte deren Proliferation (Ligresti et al., 2003).

Cannabinoide vermitteln demnach diverse Effekte, die dem Tumorwachstum entgegen wirken. So können sie Apoptose induzieren und die Proliferation inhibieren. Darüber hinaus hemmen sie die Angiogenese, die eine Voraussetzung für das kontinuierliche Tumorwachstum und die Metastasierung von Tumorzellen darstellt. Hinzu kommt, dass

im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass Cannabinoide die Immunüberwachung von Tumorzellen durch Hochregulation der ICAM-1-Expression auf deren Oberfläche verstärken und auch auf diese Weise der Tumorprogression entgegenwirken können.

4.5 Cannabinoide und das Immunsystem

In Bezug auf Immunzellen wurde in dieser Studie die Wirkung von CBD auf die LAK-Zellen und dabei insbesondere auf deren Vitalität und Aktivität untersucht. Im Ergebnis konnte weder eine verringerte Vitalität noch eine Beeinträchtigung der zytotoxischen Aktivität der LAK-Zellen gegenüber den Lungentumorzellen beobachtet werden.

Cannabinoide können die Funktion des Immunsystems auf verschiedene Weise beeinflussen (Reviews: Klein et al., 1998a und b; Croxford und Yamamura, 2005; Rieder et al., 2010; Tanasescu et al., 2010). Sie agieren v. a. als potente immunsuppressive und antiinflammatorische Agenzien und vermitteln positive Effekte bei vielen das Immunsystem betreffenden Krankheiten wie bei Multipler Sklerose, Diabetes, rheumatoider Arthritis und allergischem Asthma. Studien dieser Krankheitsmodelle zeigten, dass Cannabinoide ihre immunsuppressiven Eigenschaften über vier Hauptwege vermitteln: (1) Induktion der Apoptose, (2) Inhibition der Zellproliferation, (3) Inhibition der Zytokin- und Chemokinproduktion, (4) Induktion von regulatorischen T-Zellen (Rieder et al., 2010). Demnach inhibierte AEA die Proliferation (10–100 μM) von und löste Apoptose (ab 30 μM) in Lymphozyten aus (Schwarz et al., 1994). Ebenso induzierte auch THC (10–30 μM) Apoptose in Lymphozyten und Makrophagen (Zhu et al., 1998). Darüber hinaus kann THC Apoptose in Thymozyten (1–20 μM) und Splenozyten (10–20 μM) auslösen und *in vivo* (10–50 mg/kg) zur Atrophie von Thymus und Milz führen (McKallip et al., 2002; Do et al., 2004). CBD vermittelt ebenfalls proapoptotische Effekte und verstärkte so die Apoptose von frisch isolierten Lymphozyten (4–8 μM) (Wu et al., 2008) und Monozyten (4–16 μM), wohingegen Monozyten, die vor CBD-Behandlung 72 h präkultiviert wurden, unempfindlich für die Apoptoseinduktion (bei 16 μM CBD) waren (Wu et al., 2010). Des Weiteren induzierte CBD Apoptose auch in murinen Thymozyten (4–16 μM) (Lee et al., 2008). Gallily et al. (2003) hingegen zeigten, dass Monozyten aus gesunden Spendern im Gegensatz zu Leukämiezellen resistent gegenüber der CBD-induzierten Apoptose sind. Anhand dieser Studien lässt sich erkennen, dass Apoptose in Immunzellen v. a. durch hohe Cannabinoidkonzentrationen ausgelöst zu werden scheint. Dagegen waren die in dieser Arbeit verwendeten Konzentrationen i. d. R. geringer und es konnte somit auch keine Beeinträchtigung der Vitalität der LAK-Zellen durch CBD ausgemacht werden. Neben der Induktion der Apoptose in Immunzellen können Cannabinoide die Frei-

setzung einer Vielzahl proinflammatorischer Zytokine (IFN- γ , IL-1, IL-2, IL-6, TNF- α) inhibieren (Coxford und Yamamura, 2005). In Bezug auf CBD zeigte sich, dass diese Substanz die Zytokinfreisetzung von Makrophagen *in vitro* und *in vivo* moduliert, wobei es die IL-12-Produktion (proinflammatorisch) erhöhte und die von IL-10 (immunosuppressiv) verringerte (Sacerdote et al., 2005). Zudem verringerte CBD die Produktion von IL-8 und macrophage inflammatory protein-1 α/β in B-Zellen sowie die IL-10-Produktion von T-Zellen (Srivastava et al., 1998). THC- und CBD-Konzentrationen, die mit denen, die nach dem Rauchen von Marihuana im Plasma gefunden wurden (31,8–318 nM), vergleichbar sind, erhöhten die Konzentration von IFN- γ , wohingegen hohe Konzentrationen beider Cannabinoide (15,9–63,6 μ M) die Synthese und/oder Freisetzung dieses Zytokins komplett inhibierten (biphasischer Effekt, s. u.) (Watzl et al., 1991). Kürzlich wurde auch gezeigt, dass CBD die induzierte Produktion von IL-2 und IFN- γ durch aktivierte T-Zellen supprimiert (Kaplan et al., 2008). Cannabinoide können auch die Proliferation von Immunzellen beeinflussen. So supprimierte CBD die T-Zellproliferation *in vitro* (Jan et al., 2007). In frühen Studien, die sich auf die Untersuchung von T-Zellen aus Marihuana-Rauchern konzentrierten, konnten auf der einen Seite inhibitorische Effekte auf deren Proliferation und Sensitivität gegenüber Stimulation gezeigt werden (Nahas et al., 1974, Petersen et al., 1976), auf der anderen Seite konnten diese Effekte von anderen Autoren nicht bestätigt werden (White et al., 1975; Lau et al., 1976). In einer Untersuchung, in der Nichtraucher Cannabinoide durch 'bhang' über einem Zeitraum von 6–36 Monaten aufnahmen, äußerte sich der immunomodulatorische Effekt u. a. in einer Abnahme der absoluten Anzahl von mononukleären Lymphozytensubpopulationen des peripheren Blutes. So war die Zahl der T-, B- und NK-Zellen in der 'bhang'- im Vergleich zur Kontrollgruppe verringert (El-Gohary und Eid, 2004). Neben den hier beschriebenen Wirkungen beeinflussen Cannabinoide auch die Antikörperbildung, die Proliferation und die Migration von B-Zellen (Klein et al., 1998b; Coxford und Yamamura, 2005). So verringerte CBD beispielsweise die Antikörperproduktion (IgM, IgG₁, IgG_{2a}) von B-Zellen *in vivo* (Jan et al., 2007).

In Zusammenhang mit dieser Arbeit, in der die zytotoxische Lyse von Tumor- durch Immunzellen untersucht wurde, liegt der Fokus v. a. auf Cannabinoideffekten auf NK-Zellen, insbesondere auf deren zytotoxische Aktivität. Dabei gibt es nur wenige Studien, die die Effekte von Cannabinoiden auf die Funktion von NK-Zellen untersucht haben, wobei diese Studien die Wirkung von THC und nicht von CBD analysierten. So führte die THC-Injektion in Mäuse zur Inhibition der zytotoxischen Aktivität von NK-Zellen und zur Reduzierung des IFN- γ -Levels, wobei beide Effekte sowohl durch einen CB₁- als auch durch einen CB₂-Rezeptorantagonisten verringert wurden (Massi et al., 2000). THC kann also die zytotoxische Aktivität von NK-Zellen bei Involvierung der CB-

Rezeptoren als Vermittler dieses Effektes inhibieren. CBD besitzt im Gegensatz zu THC aber nur eine sehr geringe Affinität zu CB₁ und CB₂ (Showalter et al., 1996; Thomas et al., 1998; Bisogno et al., 2001). Zudem konnte in dieser Arbeit keine Beeinträchtigung der Tumorzelllyse durch LAK-Zellen, die mit CBD behandelt wurden, beobachtet werden. Für THC wurde auch gezeigt, dass es wichtige IL-2-Funktionen wie die Stimulation der Lymphozytenproliferation, die Generation von LAK-Zellen und die Stimulation der zytotoxischen NK-Zell-Aktivität inhibieren kann. So hatten LAK-Zellen, die vor der Kokultur mit den Zielzellen für 4 h mit THC inkubiert wurden, eine geringere zytotoxische Aktivität gegenüber Tumorzellen als unbehandelte LAK-Zellen. Zusätzlich supprimierte THC (16–32 µM) auch die zytolytische Aktivität einer NK-Zelllinie (Kawakami et al., 1988). Die Inkubation von PBMCs mit THC (ca. 30 µM) resultierte ebenfalls in der Inhibition der zytotoxischen Aktivität gegenüber Tumorzellen, die jedoch durch IL-2-Inkubation verhindert werden konnte (Specter et al., 1986; Specter et al., 1989). THC unterdrückte zudem IL-2-abhängige Lymphozytenfunktionen und verringerte die Aktivität humaner NK- (31,8 µM) und LAK-Zellen (3,18–31,8 µM) (Trisler und Specter, 1994) sowie muriner Splenozyten (10–32 µM) (Klein et al., 1987). Dagegen konnten in einer anderen Studie keine signifikanten Effekte von THC auf die NK-Zell-Aktivität gegen Tumorzellen beobachtet werden (Dax et al., 1989) und THC-Konzentrationen unter 10 µM hatten *in vitro* keinen Effekt auf die Zytotoxizität von NK-Zellen und CTLs (Lu und Ou, 1989). Anhand dieser Daten ist zu erkennen, dass v. a. hohe THC-Konzentrationen eine Verringerung der zytotoxischen Aktivität von Immunzellen bewirkten. Die in dieser Arbeit verwendeten Cannabinoidkonzentrationen waren i. d. R. geringer und CBD hatte keinen Einfluss auf die zytolytische Aktivität der LAK-Zellen.

Die meisten Studien zeigen, dass Cannabinoide inhibitorische Effekte auf Immunzellen haben. Einige Studien weisen aber darauf hin, dass Cannabinoide stimulatorisch auf das Immunsystem wirken und somit wichtig für die Homöostase und Kontrolle von Immunreaktionen sein können (Coxford und Yamamura, 2005). So induzierte 2-AG die Migration von NK-Zellen. Dabei ist die NK-Zell-Migration zu infizierten oder entarteten Zellen von essentieller Bedeutung für die effektive zytotoxische Aktivität von Killerzellen (Kishimoto et al., 2005). Des Weiteren konnte eine erhöhte Plasmakonzentration von IL-12 in einigen mit Cannabinoiden behandelten MS-Patienten nachgewiesen werden (Killestein et al., 2003). Die Stimulation mit dem bakteriellen Lipopolysaccharid erhöhte die Produktion von AEA und 2-AG durch Immunzellen (Makrophagen, PBMCs und DCs) und reduzierte die FAAH-Expression in PBMCs. Die eCBs wirkten dann zusammen mit den freigesetzten proinflammatorischen Zytokinen als chemoattraktive Agenzien für Leukozyten und trugen zur Inflammation bei (Klein et al., 2005).

Der Widerspruch von inhibitorischen und stimulatorischen Cannabinoideffekten auf das Immunsystem könnte durch die biphasische Wirkung von Cannabinoiden erklärt werden. So wurden viele inhibitorische Cannabinoideffekte *in vitro* durch μM -Konzentrationen hervorgerufen, wohingegen stimulatorische Konzentrationen im nM-Bereich lagen, womit die Konzentrationen im μM -Bereich etwa 10-fach höher sind als die im Blut von Marihuana-Rauchern (Coxford und Yamamura, 2005). Es gibt diverse Studien, in denen die biphasische Wirkung von Cannabinoiden beobachtet wurde. So erhöhten niedrige THC-Konzentrationen die Proliferation von Lymphozyten, wohingegen hohe Konzentrationen sie verringerten (Klein et al., 1985; Luo et al., 1992; Pross et al., 1992). Zusätzlich stimulierten nM-Konzentrationen von THC den Metabolismus von Lymphozyten (Oxidation von Glukose zu CO_2 , Phospholipidsynthese), wohingegen μM -Konzentrationen diesen inhibierten (Sánchez et al., 1997). Des Weiteren erhöhten niedrige THC- und CBD-Konzentrationen (31,8–318 nM) die IFN- γ -Produktion, während hohe Konzentrationen (15,9–63,6 μM) die Synthese und/oder Freisetzung dieses Zytokins hemmten (Watzl et al., 1991). Dementsprechend verstärkte die Behandlung von PBMCs mit nM-Konzentrationen von THC oder CBD die Phytohämagglutinin (PHA)-stimulierte IFN- γ -Sekretion. Im Gegensatz dazu inhibierten μM -Konzentrationen die PHA-induzierte Produktion dieses proinflammatorischen Zytokins (Jenny et al., 2009). Darüber hinaus führte die Behandlung von Ratten mit CP55,940 bei einer Dosis von 0,4 mg/kg zur Inhibition der NK-Zell-Aktivität, wohingegen die halbe Dosis (0,2 mg/kg) keinen Effekt hatte (Patrini et al., 1997).

Demnach scheinen niedrige Konzentrationen von Cannabinoiden, die bei *in vivo*-Applikation erreicht werden können, eine eher stimulierende als inhibierende Wirkung auf das Immunsystem zu haben. Die durchschnittliche Plasmakonzentration von CBD bei täglicher Dosis von 10 mg/kg bewegte sich zwischen 18,7 und 35,6 nM (Consroe, 1991a), wobei die in dieser Studie verwendeten 3 μM CBD die LAK-Zell-Aktivität, wie gezeigt (Abb. 3-6), auch nicht beeinträchtigten.

4.6 Therapeutisches Potential von CBD bei der Krebsbehandlung

Ein wichtiger Punkt bei möglicher therapeutischer Anwendung von Cannabinoiden ist ihr Einfluss auf gesunde Zellen und in Bezug auf diese Arbeit insbesondere auf deren ICAM-1-Expression. In diesem Zusammenhang wurde gezeigt, dass das Zytostatikum Cisplatin die ICAM-1-Expression in Endothelzellen hochreguliert, was zu einer erhöhten Interaktion von Endothelzellen und Leukozyten führt, die zu durch Cisplatin vermittelten Zytotoxizitäten wie der Beschädigung der Blutgefäße beitragen. So können Neutrophile nach Adhäsion ans Endothel Proteasen, toxische Sauerstoffmetabolite und vasoaktive Substanzen abgeben, die zusammen Blutungen, Gewebeverletzungen,

Ödeme und den Verlust der vaskulären Integrität bewirken können (Yu et al., 2008). Daher scheint die ICAM-1-Expression von gesunden Zellen von wichtiger Bedeutung zu sein. Um den Einfluss von Cannabinoiden, speziell von CBD, auf die ICAM-1-Expression und die LAK-Zell-vermittelte zytotoxische Lyse von gesunden Zellen zu untersuchen, wurde in dieser Arbeit die Bronchialepithelzelllinie BEAS-2B verwendet. Diese Zelllinie wurde von normalen Bronchialepithelzellen von nicht kanzerogenen Individuen durch Transfektion mit dem Adenovirus-12 SV40 Hybridvirus etabliert und als nicht kanzerogen charakterisiert (Reddel et al., 1988). So besitzen diese Zellen die typische Morphologie und viele funktionelle Charakteristika von Epithelzellen (Reddel et al., 1988; Atsuta et al., 1997; Schulz et al., 2002). BEAS-2B-Zellen zeigen darüber hinaus eine konstitutive ICAM-1-Expression, die durch Behandlung der Zellen mit den Zytokinen TNF- α , IL-1 β oder IFN- γ erhöht werden kann (Atsuta et al., 1997; Subauste et al., 2001). In dieser Arbeit konnte kein oder nur ein geringer Einfluss von Cannabinoiden auf die ICAM-1-Proteinexpression von BEAS-2B-Zellen ermittelt werden. So führte die Behandlung der BEAS-2B-Zellen mit 3 μ M CBD zu einer etwa 1,5-fachen und die mit 3 μ M THC zu einer 1,4-fachen Hochregulation von ICAM-1, wohingegen MA die ICAM-1-Expression nicht veränderte. Im Vergleich dazu hatten die gleichen Cannabinoidkonzentrationen eine stärkere Hochregulation des ICAM-1-Niveaus in Lungentumorzellen zur Folge. So war das ICAM-1-Proteinlevel durch CBD-Behandlung in A549-Zellen bis zu 6-fach (Abb. 3-9A), in H460-Zellen bis zu 11-fach (Abb. 3-8B) und in HROBML03-Zellen bis zu 9,2-fach (Abb. 3-9C) erhöht. Die Behandlung der Tumorzellen mit THC führte zu einer 3,3- (A549, Abb. 3-14A), 5,4- (H460, Abb. 3-14B) oder 3,9-fachen (HROBML03, Abb. 3-14B) und die mit MA zu einer 2,6- (A549, Abb. 3-13A) oder 2,2-fachen (H460, Abb. 3-13B; HROBML03, Abb. 3-13C) Erhöhung der ICAM-1-Proteinexpression. Im Einklang mit dem geringen Einfluss von CBD, THC und MA auf die ICAM-1-Proteinexpression hatten diese Cannabinoide auch keinen Einfluss auf die LAK-Zell-vermittelte Lyse der BEAS-2B-Zellen. Bezüglich der Viabilität der BEAS-2B-Zellen bewirkte CBD einen moderaten Abfall (83 ± 6 %), wobei dieses Cannabinoid die Viabilität der Tumorzellen meist in stärkerem Ausmaß verringerte (bis zu 50 % Viabilitätsverlust; siehe Angang unter 8.1). Des Weiteren hatte die Behandlung von Monozyten mit CBD eine 2-fache Erhöhung der ICAM-1-Proteinkonzentration zur Folge, was im Vergleich zur ICAM-1-Hochregulation in den Tumorzellen ebenfalls ein geringer Effekt war. In Bezug auf die Wirkung von CBD auf Nicht-Tumorzellen konnte gezeigt werden, dass CBD (4 μ M) die basale ICAM-1-Expression in humanen Konararterienendothelzellen nicht verändert und dass es die glukoseinduzierte Erhöhung der ICAM-1-Expression in diesen Zellen sogar inhibiert (Rajesh et al., 2007). Des Weiteren induzierte CBD Apoptose in myeloblastischen

Leukämiezellen, wohingegen Monozyten aus gesunden Spendern resistent gegenüber der CBD-induzierten Apoptose waren (Gallily et al., 2003). In einer Studie, in der der Einfluss von verschiedenen CBD-Konzentrationen (1–100 µM) auf die Proliferation von verschiedenen Tumor- (Kolorektal-, Brust-, Prostata-, Magenkrebszellen u. a.) und Nicht-Tumorzelllinien (Keratinocyten, Präadipozyten, Makrophagen) untersucht wurde, zeigte sich ebenfalls ein selektiver Effekt auf die Tumorzellen. So hatte CBD erst bei einer Konzentration, bei der das Tumorzellwachstum fast zu 100 % inhibiert wurde (25 µM), einen toxischen Effekt auf die Nicht-Tumorzellen (Ligresti et al., 2006). Zudem verringerte CBD die Viabilität von humanen Brustkrebs- und Brustepithelzellen, wobei aber signifikant mehr Nicht-Tumorzellen überlebten (Shrivastava et al., 2011). Des Weiteren zeigte CBD eine antiproliferative Wirkung auf humane Gliomzellen, wohingegen primäre Gliazellen nicht beeinflusst wurden (Massi et al., 2006). Zusätzlich zur selektiven Wirkung von CBD auf Tumorzellen, die in dieser und zahlreichen anderen Studien gezeigt werden konnte, wirkten auch THC und WIN55,212-2 selektiv und inhibierten das Wachstum von Melanomzellen, nicht aber das von normalen Melanozyten (Blázquez et al., 2006). Darüber hinaus inhibierte THC die Proliferation von Brustkrebszellen, wohingegen die von normalen Brustepithelzellen weniger stark beeinflusst wurde (Caffarel et al., 2006). Es existiert auch eine Reihe von *in vivo*-Studien, in denen keine signifikanten Nebenwirkungen von und keine Entwicklung einer Toleranz gegenüber CBD beobachtet werden konnten (Review: Bergamaschi et al., 2011b). So wurde schon früh gezeigt, dass alle gesunden freiwilligen Probanden wie auch Patienten mit Epilepsie CBD gut vertrugen, ohne dass dieses Cannabinoid eine wesentliche Toxizität und ernste Nebenwirkungen verursachte (Cunha et al., 1980). Eine Verabreichung von 10 mg/kg/Tag CBD über sechs Wochen hatte bei Chorea Huntington-Patienten keine toxischen Effekte und signifikanten Unterschiede im Vergleich zur Placebogruppe (Consroe et al., 1991b). Es konnten auch keine Nebenwirkungen von CBD bei der Untersuchung von CBD-Effekten bei Schizophrenie, bipolaren Störungen und Psychosen bei der Parkinson-Krankheit (Zuardi et al., 2006; Zuardi et al., 2009) sowie bei Untersuchung der angstlösenden Wirkung von CBD beobachtet werden (Bergamaschi et al., 2011a; Crippa et al., 2011). Aufgrund der selektiven Effekte von CBD auf Krebszellen und seiner relativ guten Verträglichkeit ist dieses Cannabinoid ein vielversprechender Kandidat für den therapeutischen Einsatz.

Im Rahmen der medizinischen Anwendung werden Cannabinoide derzeit insbesondere aufgrund ihrer palliativen Effekte eingesetzt. So haben Cannabinoide eine positive Wirkung bei Spastiken (z. B. bei MS-Patienten) und bei Übelkeit und Erbrechen, die mit Chemo- oder Strahlentherapie assoziiert sind. Des Weiteren wirken sie analgetisch und stimmungsaufhellend (z. B. bei Depressionen) und können bei Schlafstörungen

und Appetitlosigkeit angewendet werden. Sie haben auch positive Effekte bei einigen gastrointestinalen Funktionsstörungen, Arteriosklerose und Glaukomen, ADHS (Aufmerksamkeits-Defizit-Syndrom mit Hyperaktivität) und bei Tics und Verhaltensstörungen bei Patienten mit Tourette-Syndrom (Pacher et al., 2006; Pertwee, 2009). Derzeit existierende Medikamente auf *Cannabis*-Basis sind Dronabinol (Marinol[®]), Nabilon (Cesamet[®]) und Sativex[®] (Nabiximol). In diversen Studien hatte die Anwendung von Sativex[®] positive Effekte bei der Behandlung von Spastiken und neuropathischen Schmerzen bei MS-Patienten, wobei nur wenige Nebenwirkungen auftraten (Rog et al., 2005; Barnes, 2006; Nurmikko et al., 2007; Wade et al., 2010; Novotna et al., 2011). Die häufigsten Nebenwirkungen von Cannabinoiden sind Müdigkeit und Schwindel, psychische Effekte und Mundtrockenheit, wobei sich gegenüber diesen Nebenwirkungen innerhalb kurzer Zeit meist eine Toleranz entwickelt. Darüber hinaus spielen im therapeutischen Rahmen Entzugssymptome selten eine Rolle (Grotenhermen und Müller-Vahl, 2012). Nabilon (synthetisches THC-Analogon) wird zur Behandlung von chemotherapieassoziiertes Übelkeit und Erbrechen eingesetzt (Rog, 2010) und reduziert effektiv neuropathische Schmerzen (Wissel et al., 2006; Frank et al., 2008). Dronabinol (synthetische Form von THC) findet Anwendung bei chemotherapieassoziiertes Übelkeit und Erbrechen und als Appetitstimulans bei AIDS-assoziiertes Anorexie (Walsh et al., 2003), da es den Appetit steigert, Übelkeit verringert und keine ernsteren Nebenwirkungen (Euphorie, Schwindel, Beeinträchtigung der kognitiven Leistungen) hat (Beal et al., 1995).

In Bezug auf den Einsatz von Cannabinoiden bei der Krebsbehandlung konnte in einer präklinischen Studie gezeigt werden, dass eine kombinierte Applikation von THC und Temozolomid (TMZ; alkylierendes Zytostatikum, das die DNA-Replikation von Tumorzellen stört) eine starke antitumorogene Aktivität in Gliomxenografts besitzt. So verringerte die Kombination beider Substanzen das Tumorwachstum stärker als beide Substanzen allein. Die wachstumshemmenden Effekte konnten auch bei Tumoren, die resistent gegenüber einer TMZ-Behandlung waren, beobachtet werden. Darüber hinaus führte die Verabreichung von submaximalen Dosen von THC und CBD zu einem reduzierten Wachstum von Gliomxenografts. Die kombinierte Behandlung mit TMZ und submaximalen Dosen von THC und CBD rief ebenfalls eine starke antitumorogene Aktivität gegenüber TMZ-sensitiven und TMZ-resistenten Tumoren hervor (Torres et al., 2011). Die Fähigkeit von CBD die antitumorogene Aktivität von THC zu verstärken, bietet dabei die Möglichkeit, die Dosis des psychoaktiven THC zu reduzieren. Hinzu kommt, dass eine Kombination von CBD mit THC zu einer synergistischen Inhibition der Proliferation von Glioblastomzellen führte (Marcu et al., 2010). Dabei waren beide Cannabinoide allein in der Lage, Apoptose in den Zellen

auszulösen, wobei CBD die antiproliferative und proapoptotische Wirkung von THC verstärkte. Die Behandlung der Glioblastomzellen mit beiden Substanzen ging mit einer Modulation des Zellzyklus und der Produktion von ROS wie auch der Herunterregulation der ERK- und der Hochregulation der Caspase-Aktivitäten einher. Diese Effekte konnten mit einer der beiden Substanzen allein nicht beobachtet werden, womit CBD die Effektivität von THC zu verbessern scheint (Marcu et al., 2010).

Die Ergebnisse dieser beiden Studien zeigen, dass Cannabinoide bei der Krebstherapie Effekte vermitteln können, die die Tumorprogression inhibieren und so unterstützende und verstärkende Wirkung bei der konventionellen Therapie haben könnten. Hinzu kommt, dass das nicht-psychoaktive CBD antitumorogene Aktivitäten von THC verstärken kann, was die Möglichkeit einer Verringerung der THC-Dosis bietet. Zudem vermittelt CBD wie auch andere Cannabinoide eine Vielzahl von antitumorigenen Wirkungen auf Ebene der Proliferation, Angiogenese, Invasion und Metastasierung (4.4). In dieser Arbeit konnte zudem auch auf Ebene der Tumorumüberwachung ein positiver Einfluss von Cannabinoiden gezeigt werden. So tragen Cannabinoide durch Hochregulation der ICAM-1-Proteinexpression zur Erkennung und Eliminierung von Tumor- durch Immunzellen bei. Darüber hinaus scheinen v. a. hohe Cannabinoidkonzentrationen eine immunosuppressive Wirkung zu haben, wohingegen niedrige eher stimulierende Aktivität besitzen (4.5) und so *in vivo* erreichbare Konzentrationen (zwischen 18,7 nM und 35,6 nM (Consroe, 1991a)) vermutlich nicht zur Inhibition von Immunfunktionen führen, die bei der Tumorabwehr von Bedeutung sind (NK-Zellen und CTLs). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass CBD (auch in Kombination mit THC; Sativex[®]) im Allgemeinen gut vertragen wird, keine ernsteren Nebenwirkungen hervorruft und in Bezug auf Krebszellen scheinbar eine hohe Selektivität gegenüber diesen entarteten im Gegensatz zu gesunden Zellen aufweist. So scheint CBD abgesehen von den zugelassenen Indikationen auch weiterhin in Bezug auf die Behandlung von Krebserkrankungen, aber auch anderen krankheitsbedingten Störungen (siehe auch 1.2.3), ein vielversprechender Kandidat zu sein.

5. Zusammenfassung

Krebserkrankungen gehören zu den häufigsten Todesursachen. Cannabinoide vermitteln diverse antitumorigene Effekte. In diesem Zusammenhang wurde gezeigt, dass Cannabinoide als Teil ihrer antiinvasiven und antimetastatischen Wirkung die Expression des Adhäsionsmoleküls ICAM-1 hochregulieren (Ramer et al., 2012). Dabei spielt ICAM-1 auch eine wichtige Rolle bei der Interaktion von zytotoxischen Lymphozyten mit ihren Zielzellen, die von entscheidender Bedeutung bei der Eliminierung entarteter Zellen ist (Beal et al., 2008).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss der cannabinoidinduzierten Hochregulation der ICAM-1-Proteinexpression in Lungentumorzellen (A549, H460, Gehirnmastasenzellen aus Lungenkrebspatienten) auf die Adhäsion von Lymphokin-aktivierten Killer (LAK)-Zellen und auf die LAK-Zell-vermittelte zytotoxische Lyse der Tumorzellen untersucht. Dabei stand insbesondere das nicht-psychoaktive Phytocannabinoid Cannabidiol (CBD) im Mittelpunkt, das sowohl die Sensitivität der Lungentumorzellen gegenüber der Adhäsion von als auch gegenüber der zytotoxischen Lyse durch LAK-Zellen erhöhte. Diese beiden Effekte wurden durch Behandlung der Tumorzellen mit einem neutralisierenden ICAM-1-Antikörper verringert bzw. aufgehoben. Darüber hinaus blockierte die Transfektion der Tumorzellen mit ICAM-1 siRNA und die Behandlung der Tumorzellen mit Rezeptorantagonisten gegen die Cannabinoid-Rezeptoren CB₁ und CB₂ und gegen den Vanilloid-Rezeptor TRPV1 die CBD-induzierte gesteigerte ICAM-1-Expression und LAK-Zell-vermittelte Tumorzell-lyse. Die Inkubation der LAK-Zellen mit einem gegen LFA-1 gerichteten Antikörper hatte ebenfalls eine Inhibition der LAK-Zell-vermittelten Lyse der Tumorzellen zur Folge. Demzufolge spielt die ICAM-1/LFA-1-Interaktion eine entscheidende Rolle bei der LAK-Zell-vermittelten Lyse von Lungentumorzellen, wobei die CB-Rezeptoren und der TRPV1 bei der Vermittlung der ICAM-1-Hochregulation und der damit einhergehenden gesteigerten Lyse CBD-behandelter Tumorzellen involviert sind. Die Behandlung der LAK-Zellen mit CBD hatte dabei keinen Einfluss auf deren Vitalität, LFA-1-Expression und zytotoxische Aktivität. Zusätzlich zu CBD wurde auch die durch Δ^9 -Tetrahydrocannabinol (THC) und R(+)-Methanandamid (MA) erhöhte ICAM-1-Expression und LAK-Zell-vermittelte zytotoxische Tumorzelllyse mittels ICAM-1-Knockdown inhibiert.

Die Wirkung von CBD, THC und MA auf Nicht-Tumorzellen wurde mit Hilfe der Bronchialepithelzelllinie BEAS-2B und mit Monozyten überprüft. Dabei hatte keines der Cannabinoide einen signifikanten Einfluss auf die LAK-Zell-vermittelte Lyse der BEAS-2B-Zellen. Zudem bewirkten CBD und THC nur einen geringen Anstieg der

ICAM-1-Proteinexpression in BEAS-2B-Zellen verglichen zu der in den Tumorzellen. MA hatte keinen Einfluss auf die Expression von ICAM-1 durch die Bronchial-epithelzellen. Weiterhin führte CBD auch in den Monozyten zu einer geringeren Induktion der ICAM-1-Expression im Vergleich zu der in den Lungentumorzellen.

In weiterführenden Experimenten wurde der Einfluss von Arachidonylserotonin (AA-5HT), einem Inhibitor der FAAH (fatty acid amide hydrolase), die Endocannabinoide und endocannabinoidähnliche Verbindungen hydrolysiert, auf die LAK-Zell-vermittelte Lyse und ICAM-1-Proteinexpression der Lungentumorzellen untersucht. Die Behandlung der Tumorzellen mit AA-5HT hatte eine erhöhte Expression von ICAM-1 und eine gesteigerte Tumorzellyse zur Folge, wobei diese, ähnlich wie bei CBD, mittels ICAM-1 siRNA-Transfektion der Tumorzellen inhibiert wurde. Zudem konnte auch hier eine Beteiligung von LFA-1 und von CB₁, CB₂ sowie TRPV1 bei der Vermittlung der Lyse der Tumor- durch LAK-Zellen gezeigt werden. In Zusammenhang mit der FAAH-Inhibition resultierte die Behandlung der Lungentumorzellen mit den Endocannabinoiden Anandamid (AEA) und 2-Arachidonylglycerol und den endocannabinoidähnlichen Verbindungen Oleoyl- und Palmitoylethanolamid in einer erhöhten LAK-Zell-vermittelten Lyse. Die durch AEA induzierte erhöhte Tumorzellyse wurde ebenfalls durch Knockdown von ICAM-1 und durch Blockierungsexperimente mit Rezeptorantagonisten gegen CB₁, CB₂ und TRPV1 gehemmt.

Zusammenfassend konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass das nicht-psychoaktive Cannabinoid CBD wie auch andere Cannabinoide antitumorigene Aktivität auf Ebene der Tumorummunüberwachung besitzen. Dabei verstärken sie die Expression von ICAM-1 in Lungentumorzellen und erhöhen so deren Sensitivität gegenüber der zytotoxischen Lyse durch Immunzellen. Aufgrund seiner fehlenden Psychoaktivität, seiner zahlreichen antikanzerogenen Effekte und seiner relativ guten Verträglichkeit ist CBD damit auch weiterhin ein vielversprechender Kandidat für eine therapeutische Anwendung auf dem Gebiet der unterstützenden Krebsbehandlung.

6. Literaturverzeichnis

- Abbas AK, Murphy KM, Sher A** (1996) Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 383:787-93
- Abdelrazik N, Fouda M, Zaghloul MH, Abbas D** (2008) Serum level of intercellular adhesion molecule-1 in children with malignant lymphoma. *Med Princ Pract* 17:233-8
- Abood ME, Martin BR** (1992) Neurobiology of marijuana abuse. *Trends Pharmacol Sci* 13:201-6
- Adams R, Hunt M, Clark JH** (1940) Structure of cannabidiol, a product isolated from the marijuana extract of minnesota wild hemp. *J Am Chem Soc* 62:196-200
- Ahern GP** (2003) Activation of TRPV1 by the satiety factor oleoylethanolamide. *J Biol Chem* 278:30429-34
- Alexiou D, Karayiannakis AJ, Syrigos KN, Zbar A, Kremmyda A, Bramis I, Tsigris C** (2001) Serum levels of E-selectin, ICAM-1 and VCAM-1 in colorectal cancer patients: correlations with clinicopathological features, patient survival and tumour surgery. *Eur J Cancer* 37:2392-7
- Allavena P, Sica A, Solinas G, Porta C, Mantovani A** (2008) The inflammatory microenvironment in tumor progression: the role of tumor-associated macrophages. *Crit Rev Oncol Hematol* 66:1-9
- Altomonte M, Gloghini A, Bertola G, Gasparollo A, Carbone A, Ferrone S, Maio M** (1993) Differential expression of cell adhesion molecules CD54/CD11a and CD58/CD2 by human melanoma cells and functional role in their interaction with cytotoxic cells. *Cancer Res* 53:3343-8
- Appendino G, Chianese G, Tagliatela-Scafati O** (2011) Cannabinoids: occurrence and medicinal chemistry. *Curr Med Chem* 18:1085-99
- Appendino G, Gibbons S, Giana A, Pagani A, Grassi G, Stavri M, Smith E, Rahman MM** (2008) Antibacterial cannabinoids from *Cannabis sativa*: a structure-activity study. *J Nat Prod* 71:1427-30
- Ashida A, Boku N, Aoyagi K, Sato H, Tsubosa Y, Minashi K, Muto M, Ohtsu A, Ochiai A, Yoshida T, Yoshida S, Sasaki H** (2006) Expression profiling of esophageal squamous cell carcinoma patients treated with definitive chemoradiotherapy: clinical implications. *Int J Oncol* 28:1345-52
- Atsuta J, Sterbinsky SA, Plitt J, Schwiebert LM, Bochner BS, Schleimer RP** (1997) Phenotyping and cytokine regulation of the BEAS-2B human bronchial epithelial cell: demonstration of inducible expression of the adhesion molecules VCAM-1 and ICAM-1. *Am J Respir Cell Mol Biol* 17:571-82
- Aviello G, Romano B, Borrelli F, Capasso R, Gallo L, Piscitelli F, Di Marzo V, Izzo AA** (2012) Chemopreventive effect of the non-psychotropic phytocannabinoid cannabidiol on experimental colon cancer. *J Mol Med (Berl)* 90:925-34
- Barnes MP** (2006) Sativex®: clinical efficacy and tolerability in the treatment of symptoms of multiple sclerosis and neuropathic pain. *Expert Opin Pharmacother* 7:607-15
- Bassi V, Vitale M, Feliciello A, De Riu S, Rossi G, Fenzi G** (1995) Retinoic acid induces intercellular adhesion molecule-1 hyperexpression in human thyroid carcinoma cell lines. *J Clin Endocrinol Metab* 80:1129-35
- Battista N, Di Tommaso M, Bari M, Maccarrone M** (2012) The endocannabinoid system: an overview. *Front Behav Neurosci* 6:1-7

- Bayewitch M, Avidor-Reiss T, Levy R, Barg J, Mechoulam R, Vogel Z** (1995) The peripheral cannabinoid receptor: adenylate cyclase inhibition and G protein coupling. *FEBS Lett* 375:143-7
- Bayewitch M, Rhee MH, Avidor-Reiss T, Breuer A, Mechoulam R, Vogel Z** (1996) (-)- Δ^9 -tetrahydrocannabinol antagonizes the peripheral cannabinoid receptor-mediated inhibition of adenylyl cyclase. *J Biol Chem* 271:9902-5
- Beal AM, Anikeeva N, Varma R, Cameron TO, Norris PJ, Dustin ML, Sykulev Y** (2008) Protein kinase C θ regulates stability of the peripheral adhesion ring junction and contributes to the sensitivity of target cell lysis by CTL. *J Immunol* 181:4815-24
- Beal JE, Olson R, Laubenstein L, Morales JO, Bellman P, Yangco B, Lefkowitz L, Plasse TF, Shepard KV** (1995) Dronabinol as a treatment for anorexia associated with weight loss in patients with AIDS. *J Pain Symptom Manage* 10:89-97
- Becker JC, Dummer R, Hartmann AA, Burg G, Schmidt RE** (1991) Shedding of ICAM-1 from human melanoma cell lines induced by IFN- γ and tumor necrosis factor- α . Functional consequences on cell-mediated cytotoxicity. *J Immunol* 147:4398-401
- Bella J, Kolatkar PR, Marlor CW, Greve JM, Rossmann MG** (1998) The structure of the two amino-terminal domains of human ICAM-1 suggests how it functions as a rhinovirus receptor and as an LFA-1 integrin ligand. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:4140-5
- Beltramo M, Bernardini N, Bertorelli R, Campanella M, Nicolussi E, Fredduzzi S, Reggiani A** (2006) CB₂ receptor-mediated antihyperalgesia: possible direct involvement of neural mechanisms. *Eur J Neurosci* 23:1530-8
- Beltramo M, Piomelli D** (1999) Carrier-mediated transport and enzymatic hydrolysis of the endogenous cannabinoid 2-arachidonoylglycerol. *Neuroreport* 11:1231-5
- Beltramo M, Stella N, Calignano A, Lin SY, Makriyannis A, Piomelli D** (1997) Functional role of high-affinity anandamide transport, as revealed by selective inhibition. *Science* 277:1094-7
- Ben-Shabat S, Fride E, Sheskin T, Tamiri T, Rhee MH, Vogel Z, Bisogno T, De Petrocellis L, Di Marzo V, Mechoulam R** (1998) An entourage effect: inactive endogenous fatty acid glycerol esters enhance 2-arachidonoylglycerol cannabinoid activity. *Eur J Pharmacol* 353:23-31
- Berendt AR, McDowall A, Craig AG, Bates PA, Sternberg MJ, Marsh K, Newbold CI, Hogg N** (1992) The binding site on ICAM-1 for *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes overlaps, but is distinct from, the LFA-1-binding site. *Cell* 68:71-81
- Bergamaschi MM, Queiroz RH, Chagas MH, de Oliveira DC, De Martinis BS, Kapczinski F, Quevedo J, Roesler R, Schröder N, Nardi AE, Martín-Santos R, Hallak JE, Zuardi AW, Crippa JA** (2011a) Cannabidiol reduces the anxiety induced by simulated public speaking in treatment-naïve social phobia patients. *Neuropsychopharmacology* 36:1219-26
- Bergamaschi MM, Queiroz RH, Zuardi AW, Crippa JA** (2011b) Safety and side effects of cannabidiol, a *Cannabis sativa* constituent. *Curr Drug Saf* 6:237-49
- Berridge MV, Herst PM, Tan AS** (2005) Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Biotechnol Annu Rev* 11:127-52
- Bettelli E, Korn T, Oukka M, Kuchroo VK** (2008) Induction and effector functions of T_H17 cells. *Nature* 453:1051-7

- Bevan S, Hothi S, Hughes G, James IF, Rang HP, Shah K, Walpole CS, Yeats JC** (1992) Capsazepine: a competitive antagonist of the sensory neurone excitant capsaicin. *Br J Pharmacol* 107:544-52
- Bierie B, Moses HL** (2006) Tumour microenvironment: TGF- β : the molecular Jekyll and Hyde of cancer. *Nat Rev Cancer* 6:506-20
- Bifulco M, Laezza C, Pisanti S, Gazerro P** (2006) Cannabinoids and cancer: pros and cons of an antitumour strategy. *Br J Pharmacol* 148:123-35
- Bifulco M, Laezza C, Valenti M, Ligresti A, Portella G, Di Marzo V** (2004) A new strategy to block tumor growth by inhibiting endocannabinoid inactivation. *FASEB J* 18:1606-8
- Billaud M, Calender A, Seigneurin JM, Lenoir GM** (1987) LFA-1, LFA-3, and ICAM-1 expression in Burkitt's lymphoma. *Lancet* 2:1327-8
- Bisogno T, Hanuš L, De Petrocellis L, Tchilibon S, Ponde DE, Brandi I, Moriello AS, Davis JB, 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
- Bisogno T, Howell F, Williams G, Minassi A, Cascio MG, Ligresti A, Matias I, Schiano-Moriello A, Paul P, Williams EJ, Gangadharan U, Hobbs C, Di Marzo V, Doherty P** (2003) Cloning of the first sn1-DAG lipases points to the spatial and temporal regulation of endocannabinoid signaling in the brain. *J Cell Biol* 163:463-8
- Bisogno T, Maccarrone M, De Petrocellis L, Jarrahian A, Finazzi-Agrò A, Hillard C, Di Marzo V** (2001) The uptake by cells of 2-arachidonoylglycerol, an endogenous agonist of cannabinoid receptors. *Eur J Biochem* 268:1982-9
- Bisogno T, Maurelli S, Melck D, De Petrocellis L, Di Marzo V** (1997) Biosynthesis, uptake, and degradation of anandamide and palmitoylethanolamide in leukocytes. *J Biol Chem* 272:3315-23
- Bisogno T, Melck D, De Petrocellis L, Bobrov MYu, Gretskaya NM, Bezuglov VV, Sitachitta N, Gerwick WH, Di Marzo V** (1998) Arachidonoylserotonin and other novel inhibitors of fatty acid amide hydrolase. *Biochem Biophys Res Commun* 248:515-22
- Blake DR, Robson P, Ho M, Jubb RW, McCabe CS** (2006) Preliminary assessment of the efficacy, tolerability and safety of a *Cannabis*-based medicine (Sativex[®]) in the treatment of pain caused by rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 45:50-2
- Blázquez C, Carracedo A, Barrado L, Real PJ, Fernández-Luna JL, Velasco G, Malumbres M, Guzmán M** (2006) Cannabinoid receptors as novel targets for the treatment of melanoma. *FASEB J* 20:2633-5
- Blázquez C, Casanova ML, Planas A, Gómez Del Pulgar T, Villanueva C, Fernández-Aceñero MJ, Aragonés J, Huffman JW, Jorcano JL, Guzmán M** (2003) Inhibition of tumor angiogenesis by cannabinoids. *FASEB J* 17:529-31
- Bohlmann F, Hoffmann E** (1979) Cannabigerol-ähnliche Verbindungen aus *Helichrysum umbraculigerum*. *Phytochemistry* 18:1371-4
- Bolitho P, Street SE, Westwood JA, Edelman W, Macgregor D, Waring P, Murray WK, Godfrey DI, Trapani JA, Johnstone RW, Smyth MJ** (2009) Perforin-mediated suppression of B-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:2723-8

- Bolognini D, Cascio MG, Parolaro D, Pertwee RG** (2011) AM630 behaves as a protean ligand at the human cannabinoid CB₂ receptor. *Br J Pharmacol* 165:2561-74
- Bonhaus DW, Chang LK, Kwan J, Martin GR** (1998) Dual activation and inhibition of adenylyl cyclase by cannabinoid receptor agonists: evidence for agonist-specific trafficking of intracellular responses. *J Pharmacol Exp Ther* 287:884-8
- Bornheim LM, Kim KY, Chen B, Correia MA** (1995) Microsomal cytochrome P450-mediated liver and brain anandamide metabolism. *Biochem Pharmacol* 50:677-86
- Bouaboula M, Hilairat S, Marchand J, Fajas L, Le Fur G, Casellas P** (2005) Anandamide induced PPAR- γ transcriptional activation and 3T3-L1 preadipocyte differentiation. *Eur J Pharmacol* 517:174-81
- Bouaboula M, Poinot-Chazel C, Bourrié B, Canat X, Calandra B, Rinaldi-Carmona M, Le Fur G, Casellas P** (1995) Activation of mitogen-activated protein kinases by stimulation of the central cannabinoid receptor CB₁. *Biochem J* 312:637-41
- Bouaboula M, Poinot-Chazel C, Marchand J, Canat X, Bourrié B, Rinaldi-Carmona M, Calandra B, Le Fur G, Casellas P** (1996) Signaling pathway associated with stimulation of CB₂ peripheral cannabinoid receptor. Involvement of both mitogen-activated protein kinase and induction of Krox-24 expression. *Eur J Biochem* 237:704-11
- Braida D, Pegorini S, Arcidiacono MV, Consalez GG, Croci L, Sala M** (2003) Post-ischemic treatment with cannabidiol prevents electroencephalographic flattening, hyperlocomotion and neuronal injury in gerbils. *Neurosci Lett* 346:61-4
- Brailoiu GC, Oprea TI, Zhao P, Abood ME, Brailoiu E** (2011) Intracellular cannabinoid type 1 (CB₁) receptors are activated by anandamide. *J Biol Chem* 286:29166-74
- Breyne J, Vanheel B** (2006) Methanandamide hyperpolarizes gastric arteries by stimulation of TRPV1 receptors on perivascular CGRP containing nerves. *J Cardiovasc Pharmacol* 47:303-9
- Caffarel MM, Sarrió D, Palacios J, Guzmán M, Sánchez C** (2006) Δ^9 -tetrahydrocannabinol inhibits cell cycle progression in human breast cancer cells through Cdc2 regulation. *Cancer Res* 66:6615-21
- Campos AC, Moreira FA, Gomes FV, Del Bel EA, Guimarães FS** (2012) Multiple mechanisms involved in the large-spectrum therapeutic potential of cannabidiol in psychiatric disorders. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 367:3364-78
- Capobianco A, Rovere-Querini P, Rugarli C, Manfredi AA** (2006) Melanoma cells interfere with the interaction of dendritic cells with NK/LAK cells. *Int J Cancer* 119:2861-9
- Carracedo A, Gironella M, Lorente M, Garcia S, Guzmán M, Velasco G, Iovanna JL** (2006) Cannabinoids induce apoptosis of pancreatic tumor cells via endoplasmic reticulum stress-related genes. *Cancer Res* 66:6748-55
- Casanova ML, Blázquez C, Martínez-Palacio J, Villanueva C, Fernández-Aceñero MJ, Huffman JW, Jorcano JL, Guzmán M** (2003) Inhibition of skin tumor growth and angiogenesis *in vivo* by activation of cannabinoid receptors. *J Clin Invest* 111:43-50
- Caterina MJ, Leffler A, Malmberg AB, Martin WJ, Trafton J, Petersen-Zeit KR, Koltzenburg M, Basbaum AI, Julius D** (2000) Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science* 288:306-13

- Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D** (1997) The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 389:816-24
- Cella M, Engering A, Pinet V, Pieters J, Lanzavecchia A** (1997) Inflammatory stimuli induce accumulation of MHC class II complexes on dendritic cells. *Nature* 388:782-7
- Chemin J, Monteil A, Perez-Reyes E, Nargeot J, Lory P** (2001) Direct inhibition of T-type calcium channels by the endogenous cannabinoid anandamide. *EMBO J* 20:7033-40
- Chen C, Chou C, Sun Y, Huang W** (2001) Tumor necrosis factor α -induced activation of downstream NF- κ B site of the promoter mediates epithelial ICAM-1 expression and monocyte adhesion. Involvement of PKC α , tyrosine kinase, and IKK2, but not MAPKs pathway. *Cell Signal* 13:543-53
- Chen X, Trivedi PP, Ge B, Krzewski K, Strominger JL** (2007) Many NK cell receptors activate ERK2 and JNK1 to trigger microtubule organizing center and granule polarization and cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:6329-34
- Chia J, Yeo KP, Whisstock JC, Dunstone MA, Trapani JA, Voskoboinik I** (2009) Temperature sensitivity of human perforin mutants unmasks subtotal loss of cytotoxicity, delayed FHL, and a predisposition to cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:9809-14
- Chong AS, Boussy IA, Jiang XL, Lamas M, Graf LH Jr** (1994) CD54/ICAM-1 is a costimulator of NK cell-mediated cytotoxicity. *Cell Immunol* 157:92-105
- Christiansen I, Gidlöf C, Wallgren AC, Simonsson B, Tötterman TH** (1994) Serum levels of soluble intercellular adhesion molecule-1 are increased in chronic B-lymphocytic leukemia and correlate with clinical stage and prognostic markers. *Blood* 84:3010-6
- Clevers H, Alarcon B, Wileman T, Terhorst C** (1988) The T cell receptor/CD3 complex: a dynamic protein ensemble. *Annu Rev Immunol* 6:629-62
- Consroe P, Kennedy K, Schram K** (1991a) Assay of plasma cannabidiol by capillary gas chromatography/ion trap mass spectroscopy following high-dose repeated daily oral administration in humans. *Pharmacol Biochem Behav* 40:517-22
- Consroe P, Laguna J, Allender J, Snider S, Stern L, Sandyk R, Kennedy K, Schram K** (1991b) Controlled clinical trial of cannabidiol in Huntington's disease. *Pharmacol Biochem Behav* 40:701-8
- Consroe P, Martin A, Singh V** (1981) Antiepileptic potential of cannabidiol analogs. *J Clin Pharmacol* 21:428S-36S
- Contassot E, Tenan M, Schnüriger V, Pelte MF, Dietrich PY** (2003) Arachidonyl ethanolamide induces apoptosis of uterine cervix cancer cells via aberrantly expressed vanilloid receptor-1. *Gynecol Oncol* 93:182-8
- Cooper MA, Fehniger TA, Caligiuri MA** (2001) The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol* 22:633-40
- Costa B, Comelli F, Bettoni I, Colleoni M, Giagnoni G** (2008) The endogenous fatty acid amide, palmitoylethanolamide, has anti-allodynic and anti-hyperalgesic effects in a murine model of neuropathic pain: involvement of CB₁, TRPV1 and PPAR- γ receptors and neurotrophic factors. *Pain* 139:541-50

- Costa B, Giagnoni G, Franke C, Trovato AE, Colleoni M** (2004) Vanilloid TRPV1 receptor mediates the antihyperalgesic effect of the nonpsychoactive cannabinoid, cannabidiol, in a rat model of acute inflammation. *Br J Pharmacol* 143:247-50
- Costa B, Trovato AE, Comelli F, Giagnoni G, Colleoni M** (2007) The non-psychoactive *Cannabis* constituent cannabidiol is an orally effective therapeutic agent in rat chronic inflammatory and neuropathic pain. *Eur J Pharmacol* 556:75-83
- Cravatt BF, Giang DK, Mayfield SP, Boger DL, Lerner RA, Gilula NB** (1996) Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides. *Nature* 384:83-7
- Crippa JA, Derenusson GN, Ferrari TB, Wichert-Ana L, Duran FL, Martin-Santos R, Simões MV, Bhattacharyya S, Fusar-Poli P, Atakan Z, Santos Filho A, Freitas-Ferrari MC, McGuire PK, Zuardi AW, Busatto GF, Hallak JE** (2011) Neural basis of anxiolytic effects of cannabidiol (CBD) in generalized social anxiety disorder: a preliminary report. *J Psychopharmacol* 25:121-30
- Croxford JL, Yamamura T** (2005) Cannabinoids and the immune system: potential for the treatment of inflammatory diseases? *J Neuroimmunol* 166:3-18
- Cunha JM, Carlini EA, Pereira AE, Ramos OL, Pimentel C, Gagliardi R, Sanvito WL, Lander N, Mechoulam R** (1980) Chronic administration of cannabidiol to healthy volunteers and epileptic patients. *Pharmacology* 21:175-85
- Cush JJ, Rothlein R, Lindsley HB, Mainolfi EA, Lipsky PE** (1993) Increased levels of circulating intercellular adhesion molecule-1 in the sera of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 36:1098-102
- Davignon D, Martz E, Reynolds T, Kürzinger K, Springer TA** (1981) Monoclonal antibody to a novel lymphocyte function-associated antigen (LFA-1): mechanism of blockade of T lymphocyte-mediated killing and effects on other T and B lymphocyte functions. *J Immunol* 127:590-5
- Davis JB, Gray J, Gunthorpe MJ, Hatcher JP, Davey PT, Overend P, Harries MH, Latcham J, Clapham C, Atkinson K, Hughes SA, Rance K, Grau E, Harper AJ, Pugh PL, Rogers DC, Bingham S, Randall A, Sheardown SA** (2000) Vanilloid receptor-1 is essential for inflammatory thermal hyperalgesia. *Nature* 405:183-7
- Dax EM, Pilotte NS, Adler WH, Nagel JE, Lange WR** (1989) The effects of 9-ene-tetrahydrocannabinol on hormone release and immune function. *J Steroid Biochem* 34:263-70
- de Filippis D, Iuvone T, d'amico A, Esposito G, Steardo L, Herman AG, Pelckmans PA, de Winter BY, de Man JG** (2008) Effect of cannabidiol on sepsis-induced motility disturbances in mice: involvement of CB receptors and fatty acid amide hydrolase. *Neurogastroenterol Motil* 20:919-27
- de Lago E, Petrosino S, Valenti M, Morera E, Ortega-Gutierrez S, Fernandez-Ruiz J, Di Marzo V** (2005) Effect of repeated systemic administration of selective inhibitors of endocannabinoid inactivation on rat brain endocannabinoid levels. *Biochem Pharmacol* 70:446-52
- Demuth DG, Molleman A** (2006) Cannabinoid signalling. *Life Sci* 78:549-63
- de Novellis V, Palazzo E, Rossi F, De Petrocellis L, Petrosino S, Guida F, Luongo L, Migliozzi A, Cristino L, Marabese I, Starowicz K, Di Marzo V, Maione S** (2008) The analgesic effect of N-arachidonoylserotonin, a FAAH inhibitor and TRPV1 receptor antagonist, associated with changes in rostral ventromedial medulla and locus coeruleus cell activity in rats. *Neuropharmacology* 55:1105-13

- De Petrocellis L, Bisogno T, Ligresti A, Bifulco M, Melck D, Di Marzo V** (2002) Effect on cancer cell proliferation of palmitoylethanolamide, a fatty acid amide interacting with both the cannabinoid and vanilloid signalling systems. *Fundam Clin Pharmacol* 16:297-302
- De Petrocellis L, Davis JB, Di Marzo V** (2001) Palmitoylethanolamide enhances anandamide stimulation of human vanilloid VR1 receptors. *FEBS Lett* 506:253-6
- De Petrocellis L, Ligresti A, Schiano Moriello A, Iappelli M, Verde R, Stott CG, Cristino L, Orlando P, Di Marzo V** (2012) Non-THC cannabinoids inhibit prostate carcinoma growth *in vitro* and *in vivo*: pro-apoptotic effects and underlying mechanisms. *Br J Pharmacol* 168:79-102
- De Petrocellis L, Melck D, Palmisano A, Bisogno T, Laezza C, Bifulco M, Di Marzo V** (1998) The endogenous cannabinoid anandamide inhibits human breast cancer cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:8375-80
- de Saint Basile G, Ménasché G, Fischer A** (2010) Molecular mechanisms of biogenesis and exocytosis of cytotoxic granules. *Nat Rev Immunol* 10:568-79
- Deutsch DG, Chin SA** (1993) Enzymatic synthesis and degradation of anandamide, a cannabinoid receptor agonist. *Biochem Pharmacol* 46:791-6
- Devane WA, Dysarz FA III, Johnson MR, Melvin LS, Howlett AC** (1988) Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Mol Pharmacol* 34:605-13
- Devane WA, Hanuš L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, Griffin G, Gibson D, Mandelbaum A, Etinger A, Mechoulam R** (1992) Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science* 258:1946-9
- de Visser KE, Eichten A, Coussens LM** (2006) Paradoxical roles of the immune system during cancer development. *Nat Rev Cancer* 6:24-37
- De Vita F, Infusino S, Auriemma A, Orditura M, Catalano G** (1998) Circulating levels of soluble intercellular adhesion molecule-1 in non-small cell lung cancer patients. *Oncol Rep* 5:393-6
- Diamond MS, Garcia-Aguilar J, Bickford JK, Corbi AL, Springer TA** (1993) The I domain is a major recognition site on the leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18) for four distinct adhesion ligands. *J Cell Biol* 120:1031-43
- Diederichsen AC, Hjelmberg JV, Christensen PB, Zeuthen J, Fenger C** (2003) Prognostic value of the CD4⁺/CD8⁺ ratio of tumour infiltrating lymphocytes in colorectal cancer and HLA-DR expression on tumour cells. *Cancer Immunol Immunother* 52:423-8
- Dighe AS, Richards E, Old LJ, Schreiber RD** (1994) Enhanced *in vivo* growth and resistance to rejection of tumor cells expressing dominant negative IFN- γ receptors. *Immunity* 1:447-56
- Di Marzo V, Bifulco M, De Petrocellis L** (2004) The endocannabinoid system and its therapeutic exploitation. *Nat Rev Drug Discov* 3:771-84
- Di Marzo V, Fontana A, Cadas H, Schinelli S, Cimino G, Schwartz JC, Piomelli D** (1994) Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. *Nature* 372:686-91
- Di Marzo V, Melck D, Orlando P, Bisogno T, Zagoory O, Bifulco M, Vogel Z, De Petrocellis L** (2001) Palmitoylethanolamide inhibits the expression of fatty acid amide hydrolase and enhances the anti-proliferative effect of anandamide in human breast cancer cells. *Biochem J* 358:249-55

- Dinh TP, Carpenter D, Leslie FM, Freund TF, Katona I, Sensi SL, Kathuria S, Piomelli D** (2002) Brain monoglyceride lipase participating in endocannabinoid inactivation. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:10819-24
- Dippold W, Wittig B, Schwaeble W, Mayet W, Meyer zum Büschenfelde KH** (1993) Expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1, CD54) in colonic epithelial cells. *Gut* 34:1593-7
- Do Y, McCallip RJ, Nagarkatti M, Nagarkatti PS** (2004) Activation through cannabinoid receptors 1 and 2 on dendritic cells triggers NF- κ B-dependent apoptosis: novel role for endogenous and exogenous cannabinoids in immunoregulation. *J Immunol* 173:2373-82
- Dougherty GJ, Murdoch S, Hogg N** (1988) The function of human intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in the generation of an immune response. *Eur J Immunol* 18:35-9
- Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD** (2002) Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol* 3:991-8
- Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD** (2004) The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity* 21:137-48
- Durst R, Danenberg H, Gallily R, Mechoulam R, Meir K, Grad E, Beerl R, Pugatsch T, Tarsish E, Lotan C** (2007) Cannabidiol, a nonpsychoactive *Cannabis* constituent, protects against myocardial ischemic reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293:H3602-7
- Dustin ML, Rothlein R, Bhan AK, Dinarello CA, Springer TA** (1986) Induction by IL-1 and interferon- γ : tissue distribution, biochemistry, and function of a natural adherence molecule (ICAM-1). *J Immunol* 137:245-54
- EI-Gohary M, Eid MA** (2004) Effect of cannabinoid ingestion (in the form of bhang) on the immune system of high school and university students. *Hum Exp Toxicol* 23:149-56
- Elmore S** (2007) Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 35:495-516
- EISOHLY MA, Slade D** (1995) Chemical constituents of marijuana: the complex mixture of natural cannabinoids. *Life Sci* 78:539-48
- Fabry Z, Waldschmidt MM, Hendrickson D, Keiner J, Love-Homan L, Takei F, Hart MN** (1992) Adhesion molecules on murine brain microvascular endothelial cells: expression and regulation of ICAM-1 and Lgp 55. *J Neuroimmunol* 36:1-11
- Felder CC, Briley EM, Axelrod J, Simpson JT, Mackie K, Devane WA** (1993) Anandamide, an endogenous cannabimimetic eicosanoid, binds to the cloned human cannabinoid receptor and stimulates receptor-mediated signal transduction. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:7656-60
- Felder CC, Joyce KE, Briley EM, Mansouri J, Mackie K, Blond O, Lai Y, Ma AL, Mitchell RL** (1995) Comparison of the pharmacology and signal transduction of the human cannabinoid CB₁ and CB₂ receptors. *Mol Pharmacol* 48:443-50
- Fidler IJ** (2003) The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer* 3:453-8
- Fiore E, Fusco C, Romero P, Stamenkovic I** (2002) Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9/gelatinase B) proteolytically cleaves ICAM-1 and participates in tumor cell resistance to natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Oncogene* 21:5213-23
- Flores-Sanchez IJ, Verpoorte R** (2008) Secondary metabolism in cannabis. *Phytochem Rev* 7:615-639

- Fox SB, Turner GD, Leek RD, Whitehouse RM, Gatter KC, Harris AL** (1995) The prognostic value of quantitative angiogenesis in breast cancer and role of adhesion molecule expression in tumor endothelium. *Breast Cancer Res Treat* 36:219-26
- Frank B, Serpell MG, Hughes J, Matthews JN, Kapur D** (2008) Comparison of analgesic effects and patient tolerability of nabilone and dihydrocodeine for chronic neuropathic pain: randomised, crossover, double blind study. *BMJ* 336:199-201
- Freimuth N, Ramer R, Hinz B** (2010) Antitumorigenic effects of cannabinoids beyond apoptosis. *J Pharmacol Exp Ther* 332:336-44
- Fu J, Bottegoni G, Sasso O, Bertorelli R, Rocchia W, Masetti M, Guijarro A, Lodola A, Armirotti A, Garau G, Bandiera T, Reggiani A, Mor M, Cavalli A, Piomelli D** (2012) A catalytically silent FAAH-1 variant drives anandamide transport in neurons. *Nat Neurosci* 15:64-9
- Fujihara T, Sawada T, Hirakawa K, Chung YS, Yashiro M, Inoue T, Sowa M** (1998) Establishment of lymph node metastatic model for human gastric cancer in nude mice and analysis of factors associated with metastasis. *Clin Exp Metastasis* 16:389-98
- Fujihara T, Yashiro M, Inoue T, Sawada T, Kato Y, Ohira M, Nishiguchi Y, Ishikawa T, Sowa M, Chung KH** (1999) Decrease in ICAM-1 expression on gastric cancer cells is correlated with lymph node metastasis. *Gastric Cancer* 2:221-5
- Fukunaga A, Miyamoto M, Cho Y, Murakami S, Kawarada Y, Oshikiri T, Kato K, Kurokawa T, Suzuoki M, Nakakubo Y, Hiraoka K, Itoh T, Morikawa T, Okushiba S, Kondo S, Katoh H** (2004) CD8⁺ tumor-infiltrating lymphocytes together with CD4⁺ tumor-infiltrating lymphocytes and dendritic cells improve the prognosis of patients with pancreatic adenocarcinoma. *Pancreas* 28:e26-31
- Fuss IJ, Kanof ME, Smith PD, Zola H** (2009) Isolation of whole mononuclear cells from peripheral blood and cord blood. *Curr Protoc Immunol* Chapter 7:Unit7.1
- Galiègue S, Mary S, Marchand J, Dussossoy D, Carrière D, Carayon P, Bouaboula M, Shire D, Le Fur G, Casellas P** (1995) Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations. *Eur J Biochem* 232:54-61
- Galli SJ, Nakae S, Tsai M** (2005) Mast cells in the development of adaptive immune responses. *Nat Immunol* 6:135-42
- Gallily R, Even-Chena T, Katzavian G, Lehmann D, Dagan A, Mechoulam R** (2003) γ -irradiation enhances apoptosis induced by cannabidiol, a non-psychotropic cannabinoid, in cultured HL-60 myeloblastic leukemia cells. *Leuk Lymphoma* 44:1767-73
- Galve-Roperh I, Rueda D, Gómez del Pulgar T, Velasco G, Guzmán M** (2002) Mechanism of extracellular signal-regulated kinase activation by the CB₁ cannabinoid receptor. *Mol Pharmacol* 62:1385-92
- Galve-Roperh I, Sánchez C, Cortés ML, Gómez del Pulgar T, Izquierdo M, Guzmán M** (2000) Anti-tumoral action of cannabinoids: involvement of sustained ceramide accumulation and extracellular signal-regulated kinase activation. *Nat Med* 6:313-9
- Gamen S, Hanson DA, Kaspar A, Naval J, Krensky AM, Anel A** (1998) Granulysin-induced apoptosis. I. Involvement of at least two distinct pathways. *J Immunol* 161:1758-64

- Gaoni Y, Mechoulam R** (1964) Isolation, structure, and partial synthesis of an active constituent of hashish. *J Am Chem Soc* 86:1646-47
- Gatley SJ, Gifford AN, Volkow ND, Lan R, Makriyannis A** (1996) ¹²³I-labeled AM251: a radioiodinated ligand which binds *in vivo* to mouse brain cannabinoid CB₁ receptors. *Eur J Pharmacol* 307:331-8
- Gebremedhin D, Lange AR, Campbell WB, Hillard CJ, Harder DR** (1999) Cannabinoid CB₁ receptor of cat cerebral arterial muscle functions to inhibit L-type Ca²⁺ channel current. *Am J Physiol* 276:H2085-93
- Gérard CM, Mollereau C, Vassart G, Parmentier M** (1991) Molecular cloning of a human cannabinoid receptor which is also expressed in testis. *Biochem J* 279:129-34
- Gho YS, Kim PN, Li HC, Elkin M, Kleinman HK** (2001) Stimulation of tumor growth by human soluble intercellular adhesion molecule-1. *Cancer Res* 61:4253-7
- Gho YS, Kleinman HK, Sosne, G** (1999) Angiogenic activity of human soluble intercellular adhesion molecule-1. *Cancer Res* 59:5128-32
- Giavazzi R, Chirivi RG, Garofalo A, Rambaldi A, Hemingway I, Pigott R, Gearing AJ** (1992) Soluble intercellular adhesion molecule-1 is released by human melanoma cells and is associated with tumor growth in nude mice. *Cancer Res* 52:2628-30
- Glass M, Felder CC** (1997) Concurrent stimulation of cannabinoid CB₁ and dopamine D₂ receptors augments cAMP accumulation in striatal neurons: evidence for a G_s linkage to the CB₁ receptor. *J Neurosci* 17:5327-33
- GLOBOCAN 2012**: Estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012 (IARC = International Agency for Research on Cancer) Section of Cancer Information (30/6/2014); http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_population.aspx
- Gomes FV, Resstel LB, Guimarães FS** (2011) The anxiolytic-like effects of cannabidiol injected into the bed nucleus of the stria terminalis are mediated by 5-HT_{1A} receptors. *Psychopharmacology (Berl)* 213:465-73
- Gong JP, Onaivi ES, Ishiguro H, Liu QR, Tagliaferro PA, Brusco A, Uhl GR** (2006) Cannabinoid CB₂ receptors: immunohistochemical localization in rat brain. *Brain Res* 1071:10-23
- Goparaju SK, Ueda N, Taniguchi K, Yamamoto S** (1999) Enzymes of porcine brain hydrolyzing 2-arachidonoylglycerol, an endogenous ligand of cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol* 57:417-23
- Grakoui A, Bromley SK, Sumen C, Davis MM, Shaw AS, Allen PM, Dustin ML** (1999) The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science* 285:221-7
- Grimaldi C, Pisanti S, Laezza C, Malfitano AM, Santoro A, Vitale M, Caruso MG, Notarnicola M, Iacuzzo I, Portella G, Di Marzo V, Bifulco M** (2006) Anandamide inhibits adhesion and migration of breast cancer cells. *Exp Cell Res* 312:363-73
- Grimm EA, Mazumder A, Zhang HZ, Rosenberg SA** (1982) Lymphokine-activated killer cell phenomenon. Lysis of natural killer-resistant fresh solid tumor cells by interleukin-2-activated autologous human peripheral blood lymphocytes. *J Exp Med* 155:1823-41
- Grimm EA, Robb RJ, Roth JA, Neckers LM, Lachman LB, Wilson DJ, Rosenberg SA** (1983) Lymphokine-activated killer cell phenomenon. III. Evidence that IL-2 is sufficient for direct activation of peripheral blood lymphocytes into lymphokine-activated killer cells. *J Exp Med* 158:1356-61

- Grotenhermen F, Müller-Vahl K** (2012) Das therapeutische Potenzial von *Cannabis* und Cannabinoiden. Dtsch Arztebl Int 109:495–501; DOI:10.3238/arztebl.2012.0495
- Grothey A, Heistermann P, Philippou S, Voigtmann R** (1998) Serum levels of soluble intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1, CD54) in patients with non-small-cell lung cancer: correlation with histological expression of ICAM-1 and tumour stage. Br J Cancer 77:801-7
- Guimarães FS, de Aguiar JC, Mechoulam R, Breuer A** (1994) Anxiolytic effect of cannabidiol derivatives in the elevated plus-maze. Gen Pharmacol 25:161-4
- Guzmán M** (2003) Cannabinoids: potential anticancer agents. Nat Rev Cancer 3:745-55
- Hájos N, Kathuria S, Dinh T, Piomelli D, Freund TF** (2004) Endocannabinoid transport tightly controls 2-arachidonoyl glycerol actions in the hippocampus: effects of low temperature and the transport inhibitor AM404. Eur J Neurosci 19:2991-6
- Hampson AJ, Grimaldi M, Axelrod J, Wink D** (1998) Cannabidiol and (-)- Δ^9 -tetrahydrocannabinol are neuroprotective antioxidants. Proc Natl Acad Sci USA 95:8268-73
- Hampson AJ, Hill WA, Zan-Phillips M, Makriyannis A, Leung E, Eglen RM, Bornheim LM** (1995) Anandamide hydroxylation by brain lipoxygenase: metabolite structures and potencies at the cannabinoid receptor. Biochim Biophys Acta 1259:173-9
- Hanahan D, Weinberg RA** (2000) The hallmarks of cancer. Cell 100:57-70
- Hanahan D, Weinberg RA** (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. Cell 144:646-74
- Hanuš L, Breuer A, Tchilibon S, Shiloah S, Goldenberg D, Horowitz M, Pertwee RG, Ross RA, Mechoulam R, Fride E** (1999) HU-308: a specific agonist for CB₂, a peripheral cannabinoid receptor. Proc Natl Acad Sci USA 96:14228-33
- Harning R, Mainolfi EC, Henn M, Merluzzi VJ, Rothlein R** (1991) Serum levels of circulating intercellular adhesion molecule-1 in human malignant melanoma. Cancer Res 51:5003-5
- Hayakawa K, Mishima K, Abe K, Hasebe N, Takamatsu F, Yasuda H, Ikeda T, Inui K, Egashira N, Iwasaki K, Fujiwara M** (2004) Cannabidiol prevents infarction via the non-CB₁ cannabinoid receptor mechanism. Neuroreport 15:2381-5
- Heicappell R, Podlinski J, Buszello H, Ackermann R** (1994) Cell surface expression and serum levels of intercellular adhesion molecule-1 in renal cell carcinoma. Urol Res 22:9-15
- Herberman RB, Hiserodt J, Vujanovic N, Balch C, Lotzova E, Bolhuis R, Golub S, Lanier LL, Phillips JH, Riccardi C, Ritz J, Santoni A, Schmidt RE, Uchida A** (1987) Lymphokine-activated killer cell activity: Characteristics of effector cells and their progenitors in blood and spleen. Immunology Today 8:178-81
- Hiebert SW, Chellappan SP, Horowitz JM, Nevins JR** (1992) The interaction of RB with E2F coincides with an inhibition of the transcriptional activity of E2F. Genes Dev 6:177-85
- Hillard CJ, Edgemond WS, Jarrahan A, Campbell WB** (1997) Accumulation of N-arachidonoyl-ethanolamine (anandamide) into cerebellar granule cells occurs via facilitated diffusion. J Neurochem 69:631-8
- Hillard CJ, Manna S, Greenberg MJ, DiCamelli R, Ross RA, Stevenson LA, Murphy V, Pertwee RG, Campbell WB** (1999) Synthesis and characterization of potent and selective agonists of the neuronal cannabinoid receptor (CB₁). J Pharmacol Exp Ther 289:1427-33

- Hinz B, Ramer R, Eichele K, Weinzierl U, Brune K** (2004) Upregulation of cyclooxygenase-2 expression is involved in R(+)-methanandamide-induced apoptotic death of human neuroglioma cells. *Mol Pharmacol* 66:1643-51
- Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC** (1991) p53 mutations in human cancers. *Science* 253:49-53
- Hosch SB, Meyer AJ, Schneider C, Stoecklein N, Prenzel KL, Pantel K, Broelsch CE, Izbicki JR** (1997) Expression and prognostic significance of HLA class I, ICAM-1, and tumor-infiltrating lymphocytes in esophageal cancer. *J Gastrointest Surg* 1:316-23
- Hoves S, Trapani JA, Voskoboinik I** (2010) The battlefield of perforin/granzyme cell death pathways. *J Leukoc Biol* 87:237-43
- Howlett AC, Barth F, Bonner TI, Cabral G, Casellas P, Devane WA, Felder CC, Herkenham M, Mackie K, Martin BR, Mechoulam R, Pertwee RG** (2002) International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacol Rev* 54:161-202
- Howlett AC, Qualy JM, Khachatryan LL** (1986) Involvement of G_i in the inhibition of adenylate cyclase by cannabimimetic drugs. *Mol Pharmacol* 29:307-13
- Huang C, Springer TA** (1995) A binding interface on the I domain of lymphocyte function-associated antigen-1 (LFA-1) required for specific interaction with intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1). *J Biol Chem* 270:19008-16
- Huang WC, Chan ST, Yang TL, Tzeng CC, Chen CC** (2004) Inhibition of ICAM-1 gene expression, monocyte adhesion and cancer cell invasion by targeting IKK complex: molecular and functional study of novel α -methylene- γ -butyrolactone derivatives. *Carcinogenesis* 25:1925-34
- Hubbard AK, Rothlein R** (2000) Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression and cell signaling cascades. *Free Radic Biol Med* 28:1379-86
- Huffman JW, Liddle J, Yu S, Aung MM, Abood ME, Wiley JL, Martin BR** (1999) 3-(1',1'-Dimethylbutyl)-1-deoxy- Δ^8 -THC and related compounds: synthesis of selective ligands for the CB₂ receptor. *Bioorg Med Chem* 7:2905-14
- Hviid L, Theander TG, Elhassan IM, Jensen JB** (1993) Increased plasma levels of soluble ICAM-1 and ELAM-1 (E-selectin) during acute *Plasmodium falciparum* malaria. *Immunol Lett* 36:51-8
- Iuvone T, Esposito G, Esposito R, Santamaria R, Di Rosa M, Izzo AA** (2004) Neuroprotective effect of cannabidiol, a non-psychoactive component from *Cannabis sativa*, on beta-amyloid-induced toxicity in PC12 cells. *J Neurochem* 89:134-41
- Jacobsson SO, Wallin T, Fowler CJ** (2001) Inhibition of rat C6 glioma cell proliferation by endogenous and synthetic cannabinoids. Relative involvement of cannabinoid and vanilloid receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 299:951-9
- Jan TR, Su ST, Wu HY, Liao MH** (2007) Suppressive effects of cannabidiol on antigen-specific antibody production and functional activity of splenocytes in ovalbumin-sensitized BALB/c mice. *Int Immunopharmacol* 7:773-80
- Jenny M, Santer E, Pirich E, Schennach H, Fuchs D** (2009) Δ^9 -tetrahydrocannabinol and cannabidiol modulate mitogen-induced tryptophan degradation and neopterin formation in peripheral blood mononuclear cells *in vitro*. *J Neuroimmunol* 207:75-82

- Johnson JP, Stade BG, Holzmann B, Schwäble W, Riethmüller G** (1989) *De novo* expression of intercellular adhesion molecule-1 in melanoma correlates with increased risk of metastasis. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:641-4
- Jones RG, Thompson CB** (2009) Tumor suppressors and cell metabolism: a recipe for cancer growth. *Genes Dev* 23:537-48
- Jonsson KO, Vandevoorde S, Lambert DM, Tiger G, Fowler CJ** (2001) Effects of homologues and analogues of palmitoylethanolamide upon the inactivation of the endocannabinoid anandamide. *Br J Pharmacol* 133:1263-75
- Kägi D, Vignaux F, Ledermann B, Bürki K, Depraetere V, Nagata S, Hengartner H, Golstein P** (1994) Fas and perforin pathways as major mechanisms of T cell-mediated cytotoxicity. *Science* 265:528-30
- Kaplan BL, Springs AE, Kaminski NE** (2008) The profile of immune modulation by cannabidiol (CBD) involves deregulation of nuclear factor of activated T cells (NFAT). *Biochem Pharmacol* 76:726-37
- Kaplan DH, Shankaran V, Dighe AS, Stockert E, Aguet M, Old LJ, Schreiber RD** (1998) Demonstration of an interferon- γ -dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:7556-61
- Karlsson M, Contreras JA, Hellman U, Tornqvist H, Holm C** (1997) cDNA cloning, tissue distribution, and identification of the catalytic triad of monoglyceride lipase. Evolutionary relationship to esterases, lysophospholipases and haloperoxidases. *J Biol Chem* 272:27218-23
- Kawai O, Ishii G, Kubota K, Murata Y, Naito Y, Mizuno T, Aokage K, Saijo N, Nishiwaki Y, Gemma A, Kudoh S, Ochiai A** (2008) Predominant infiltration of macrophages and CD8⁺ T cells in cancer nests is a significant predictor of survival in stage IV non-small cell lung cancer. *Cancer* 113:1387-95
- Kawakami Y, Klein TW, Newton C, Djeu JY, Dennert G, Specter S, Friedman H** (1988) Suppression by cannabinoids of a cloned cell line with natural killer cell activity. *Proc Soc Exp Biol Med* 187:355-9
- Kawakami Y, Klein TW, Newton C, Djeu JY, Specter S, Friedman H** (1988) Suppression by Δ^9 -tetrahydrocannabinol of interleukin-2-induced lymphocyte proliferation and lymphokine-activated killer cell activity. *Int J Immunopharmacol* 10:485-8
- Kelly CP, O'Keane JC, Orellana J, Schroy PC 3rd, Yang S, LaMont JT, Brady HR** (1992) Human colon cancer cells express ICAM-1 *in vivo* and support LFA-1-dependent lymphocyte adhesion *in vitro*. *Am J Physiol* 263:G864-70
- Khong HT, Restifo NP** (2002) Natural selection of tumor variants in the generation of "tumor escape" phenotypes. *Nat Immunol* 3:999-1005
- Kiefel V** (Hrsg.): *Transfusionsmedizin und Immunhämatologie: Grundlagen, Therapie, Methodik*. 4. überarbeitete und erweiterte Auflage, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2011
- Killestein J, Hoogervorst EL, Reif M, Blauw B, Smits M, Uitdehaag BM, Nagelkerken L, Polman CH** (2003) Immunomodulatory effects of orally administered cannabinoids in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 137:140-3
- Kim HI, Kim TH, Shin YK, Lee CS, Park M, Song JH** (2005) Anandamide suppression of Na⁺ currents in rat dorsal root ganglion neurons. *Brain Res* 1062:39-47

- Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PL, Coviello GM, Wright WE, Weinrich SL, Shay JW** (1994) Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 266:2011-5
- Kimura T, Ohta T, Watanabe K, Yoshimura H, Yamamoto I** (1998) Anandamide, an endogenous cannabinoid receptor ligand, also interacts with 5-hydroxytryptamine (5-HT) receptor. *Biol Pharm Bull* 21:224-6
- Kishimoto S, Muramatsu M, Gokoh M, Oka S, Waku K, Sugiura T** (2005) Endogenous cannabinoid receptor ligand induces the migration of human natural killer cells. *J Biochem* 137:217-23
- Kishimoto TK, Larson RS, Corbi AL, Dustin ML, Staunton DE, Springer TA** (1989) The leukocyte integrins. *Adv Immunol* 46:149-82
- Klein G** (1966) Tumor antigens. *Annu Rev Microbiol* 20:223-52
- Klein TW** (2005) Cannabinoid-based drugs as anti-inflammatory therapeutics. *Nat Rev Immunol* 5:400-11
- Klein TW, Friedman H, Specter S** (1998a) Marijuana, immunity and infection. *J Neuroimmunol* 83:102-15
- Klein TW, Newton CA, Friedman H** (1998b) Cannabinoid receptors and immunity. *Immunol Today* 19:373-81
- Klein TW, Newton CA, Friedman H** (1987) Inhibition of natural killer cell function by marijuana components. *J Toxicol Environ Health* 20:321-32
- Klein TW, Newton CA, Widen R, Friedman H** (1985) The effect of Δ^9 -tetrahydrocannabinol and 11-hydroxy- Δ^9 -tetrahydrocannabinol on T-lymphocyte and B-lymphocyte mitogen responses. *J Immunopharmacol* 7:451-66
- Kobayashi H, Takemura Y, Ohnuma T** (1992) Relationship between tumor cell density and drug concentration and the cytotoxic effects of doxorubicin or vincristine: mechanism of inoculum effects. *Cancer Chemother Pharmacol* 31:6-10
- Kobayashi Y, Arai S, Waku K, Sugiura T** (2001) Activation by 2-arachidonoylglycerol, an endogenous cannabinoid receptor ligand, of p42/44 mitogen-activated protein kinase in HL-60 cells. *J Biochem* 129:665-9
- Koebel CM, Vermi W, Swann JB, Zerafa N, Rodig SJ, Old LJ, Smyth MJ, Schreiber RD** (2007) Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state. *Nature* 450:903-7
- Koyama S, Ebihara T, Fukao K** (1992) Expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) during the development of invasion and/or metastasis of gastric carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 118:609-14
- Kozak KR, Rowlinson SW, Marnett LJ** (2000) Oxygenation of the endocannabinoid, 2-arachidonoylglycerol, to glyceryl prostaglandins by cyclooxygenase-2. *J Biol Chem* 275:33744-9
- Kozela E, Lev N, Kaushansky N, Eilam R, Rimmerman N, Levy R, Ben-Nun A, Juknat A, Vogel Z** (2011) Cannabidiol inhibits pathogenic T cells, decreases spinal microglial activation and ameliorates multiple sclerosis-like disease in C57BL/6 mice. *Br J Pharmacol* 163:1507-19
- Laemmli UK** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-5

- Laezza C, Pisanti S, Malfitano AM, Bifulco M** (2008) The anandamide analog, Met-F-AEA, controls human breast cancer cell migration via the RHOA/RHO kinase signaling pathway. *Endocr Relat Cancer* 15:965-74
- Lambert DM, Di Marzo V** (1999) The palmitoylethanolamide and oleamide enigmas: are these two fatty acid amides cannabimimetic? *Curr Med Chem* 6:757-73
- Lambert DM, Di Paolo FG, Sonveaux P, Kanyonyo M, Govaerts SJ, Hermans E, Bueb J, Delzenne NM, Tschirhart EJ** (1999) Analogues and homologues of N-palmitoylethanolamide, a putative endogenous CB₂ cannabinoid, as potential ligands for the cannabinoid receptors. *Biochim Biophys Acta* 1440:266-74
- Lan R, Liu Q, Fan P, Lin S, Fernando SR, McCallion D, Pertwee R, Makriyannis A** (1999) Structure-activity relationships of pyrazole derivatives as cannabinoid receptor antagonists. *J Med Chem* 42:769-76
- Lanier LL** (2005) NK cell recognition. *Annu Rev Immunol* 23:225-74
- Lanier LL** (2008) Up on the tightrope: natural killer cell activation and inhibition. *Nat Immunol* 9:495-502
- Lastres-Becker I, Molina-Holgado F, Ramos JA, Mechoulam R, Fernández-Ruiz J** (2005) Cannabinoids provide neuroprotection against 6-hydroxydopamine toxicity *in vivo* and *in vitro*: relevance to Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* 19:96-107
- Lau RJ, Tubergen DG, Barr M Jr, Domino EF, Benowitz N, Jones RT** (1976) Phytohemagglutinin-induced lymphocyte transformation in humans receiving Δ^9 -tetrahydrocannabinol. *Science* 192:805-7
- Lee CY, Wey SP, Liao MH, Hsu WL, Wu HY, Jan TR** (2008) A comparative study on cannabidiol-induced apoptosis in murine thymocytes and EL-4 thymoma cells. *Int Immunopharmacol* 8:732-40
- Lee D, Karschner EL, Milman G, Barnes AJ, Goodwin RS, Huestis MA** (2013) Can oral fluid cannabinoid testing monitor medication compliance and/or *cannabis* smoking during oral THC and oromucosal Sativex[®] administration? *Drug Alcohol Depend* 130:68-76
- Lefor AT, Fabian DF** (1998) Enhanced cytolytic activity of tumor infiltrating lymphocytes (TILs) derived from an ICAM-1 transfected tumor in a murine model. *J Surg Res* 75:49-53
- Leung K, Elmes MW, Glaser ST, Deutsch DG, Kaczocha M** (2013) Role of FAAH-like anandamide transporter in anandamide inactivation. *PLoS One* 8:e79355
- Leung KH** (1999) Release of soluble ICAM-1 from human lung fibroblasts, aortic smooth muscle cells, dermal microvascular endothelial cells, bronchial epithelial cells, and keratinocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 260:734-9
- Lieberman J** (2003) The ABCs of granule-mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal. *Nat Rev Immunol* 3:361-70
- Ligresti A, Bisogno T, Matias I, De Petrocellis L, Cascio MG, Cosenza V, D'argenio G, Scaglione G, Bifulco M, Sorrentini I, Di Marzo V** (2003) Possible endocannabinoid control of colorectal cancer growth. *Gastroenterology* 125:677-87
- Ligresti A, Moriello AS, 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

- Lin S, Khanolkar AD, Fan P, Goutopoulos A, Qin C, Papahadjis D, Makriyannis A** (1998) Novel analogues of arachidonylethanolamide (anandamide): affinities for the CB₁ and CB₂ cannabinoid receptors and metabolic stability. *J Med Chem* 41:5353-61
- Lin YC, Shun CT, Wu MS, Chen CC** (2006) A novel anticancer effect of thalidomide: inhibition of intercellular adhesion molecule-1-mediated cell invasion and metastasis through suppression of nuclear factor-κB. *Clin Cancer Res* 12:7165-73
- Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ** (2001) The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* 104:487-501
- Lopez JA, Susanto O, Jenkins MR, Lukoyanova N, Sutton VR, Law RH, Johnston A, Bird CH, Bird PI, Whisstock JC, Trapani JA, Saibil HR, Voskoboinik I** (2013) Perforin forms transient pores on the target cell plasma membrane to facilitate rapid access of granzymes during killer cell attack. *Blood* 121:2659-68
- Lottspeich F, Engels JW** (Hrsg.): *Bioanalytik*; Elsevier, Spektrum Akademischer Verlag, München, 2006
- Lu F, Ou DW** (1989) Cocaine or Δ⁹-tetrahydrocannabinol does not affect cellular cytotoxicity *in vitro*. *Int J Immunopharmacol* 11:849-52
- Luo YD, Patel MK, Wiederhold MD, Ou DW** (1992) Effects of cannabinoids and cocaine on the mitogen-induced transformations of lymphocytes of human and mouse origins. *Int J Immunopharmacol* 14:49-56
- Lyons PD, Benveniste EN** (1998) Cleavage of membrane-associated ICAM-1 from astrocytes: involvement of a metalloprotease. *Glia* 22:103-12
- Maccarrone M, Lorenzon T, Bari M, Melino G, Finazzi-Agro A** (2000) Anandamide induces apoptosis in human cells via vanilloid receptors. Evidence for a protective role of cannabinoid receptors. *J Biol Chem* 275:31938-45
- Mackie K, Devane WA, Hille B** (1993) Anandamide, an endogenous cannabinoid, inhibits calcium currents as a partial agonist in N18 neuroblastoma cells. *Mol Pharmacol* 44:498-503
- Mackie K, Lai Y, Westenbroek R, Mitchell R** (1995) Cannabinoids activate an inwardly rectifying potassium conductance and inhibit Q-type calcium currents in AtT20 cells transfected with rat brain cannabinoid receptor. *J Neurosci* 15:6552-61
- MacLennan SJ, Reynen PH, Kwan J, Bonhaus DW, Martin GR** (1998) [³⁵S]GTPγS binding to assess inverse agonist actions of ligands at human recombinant CB₁ and CB₂ receptors. Symposium on the Cannabinoids; Burlington, Vermont, USA; International Cannabinoid Research Society; p7
- Maeda K, Kang SM, Sawada T, Nishiguchi Y, Yashiro M, Ogawa Y, Ohira M, Ishikawa T, Hirakawa-YS Chung K** (2002) Expression of intercellular adhesion molecule-1 and prognosis in colorectal cancer. *Oncol Rep* 9:511-4
- Mahmoud SM, Paish EC, Powe DG, Macmillan RD, Grainge MJ, Lee AH, Ellis IO, Green AR** (2011) Tumor-infiltrating CD8⁺ lymphocytes predict clinical outcome in breast cancer. *J Clin Oncol* 29:1949-55
- Maione S, De Petrocellis L, de Novellis V, Moriello AS, Petrosino S, Palazzo E, Rossi FS, Woodward DF, Di Marzo V** (2007) Analgesic actions of N-arachidonoylserotonin, a fatty acid amide hydrolase inhibitor with antagonistic activity at vanilloid TRPV1 receptors. *Br J Pharmacol* 150:766-81

- Malfait AM, Gallily R, Sumariwalla PF, Malik AS, Andreakos E, Mechoulam R, Feldmann M** (2000) The nonpsychoactive *Cannabis* constituent cannabidiol is an oral anti-arthritic therapeutic in murine collagen-induced arthritis. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:9561-6
- Mantovani A, Schioppa T, Porta C, Allavena P, Sica A** (2006) Role of tumor-associated macrophages in tumor progression and invasion. *Cancer Metastasis Rev* 25:315-22
- Marcu JP, Christian RT, Lau D, Zielinski AJ, Horowitz MP, Lee J, Pakdel A, Allison J, Limbad C, Moore DH, Yount GL, Desprez PY, McAllister SD** (2010) Cannabidiol enhances the inhibitory effects of Δ^9 -tetrahydrocannabinol on human glioblastoma cell proliferation and survival. *Mol Cancer Ther* 9:180-9
- Marlin SD, Springer TA** (1987) Purified intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) is a ligand for lymphocyte function-associated antigen-1 (LFA-1). *Cell* 51:813-9
- Maruo Y, Gochi A, Kaihara A, Shimamura H, Yamada T, Tanaka N, Orita K** (2002) ICAM-1 expression and the soluble ICAM-1 level for evaluating the metastatic potential of gastric cancer. *Int J Cancer* 100:486-90
- Massi P, Fuzio D, Viganò D, Sacerdote P, Parolaro D** (2000) Relative involvement of cannabinoid CB₁ and CB₂ receptors in the Δ^9 -tetrahydrocannabinol-induced inhibition of natural killer activity. *Eur J Pharmacol* 387:343-7
- Massi P, Solinas M, Cinquina V, Parolaro D** (2013) Cannabidiol as potential anticancer drug. *Br J Clin Pharmacol* 75:303-12
- Massi P, Vaccani A, Bianchessi 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
- Massi P, Vaccani A, Ceruti S, Colombo A, Abbraccio MP, Parolaro D** (2004) Antitumor effects of cannabidiol, a nonpsychoactive cannabinoid, on human glioma cell lines. *J Pharmacol Exp Ther* 308:838-45
- Masson D, Tschopp J** (1985) Isolation of a lytic, pore-forming protein (perforin) from cytolytic T-lymphocytes. *J Biol Chem* 260:9069-72
- Matias I, Di Marzo V** (2006) Endocannabinoid synthesis and degradation, and their regulation in the framework of energy balance. *J Endocrinol Invest* 29:15-26
- Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein MJ, Young AC, Bonner TI** (1990) Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature* 346:561-4
- Maurelli S, Bisogno T, De Petrocellis L, Di Luccia A, Marino G, Di Marzo V** (1995) Two novel classes of neuroactive fatty acid amides are substrates for mouse neuroblastoma 'anandamide amidohydrolase'. *FEBS Lett* 377:82-6
- Maurer CA, Friess H, Kretschmann B, Wildi S, Müller C, Graber H, Schilling M, Büchler MW** (1998) Over-expression of ICAM-1, VCAM-1 and ELAM-1 might influence tumor progression in colorectal cancer. *Int J Cancer* 79:76-81
- McAllister SD, Christian RT, Horowitz MP, Garcia A, Desprez PY** (2007) Cannabidiol as a novel inhibitor of Id-1 gene expression in aggressive breast cancer cells. *Mol Cancer Ther* 6:2921-7

- McAllister SD, Griffin G, Satin LS, Aboud ME** (1999) Cannabinoid receptors can activate and inhibit G protein-coupled inwardly rectifying potassium channels in a xenopus oocyte expression system. *J Pharmacol Exp Ther* 291:618-26
- McAllister SD, Murase R, Christian RT, Lau D, Zielinski AJ, Allison J, Almanza C, Pakdel A, Lee J, Limbad C, Liu Y, Debs RJ, Moore DH, Desprez PY** (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
- McHeyzer-Williams MG** (2003) B cells as effectors. *Curr Opin Immunol* 15:354-61
- McKallip RJ, Jia W, Schlomer J, Warren JW, Nagarkatti PS, Nagarkatti M** (2006) Cannabidiol-induced apoptosis in human leukemia cells: A novel role of cannabidiol in the regulation of p22^{phox} and Nox4 expression. *Mol Pharmacol* 70:897-908
- McKallip RJ, Lombard C, Fisher M, Martin BR, Ryu S, Grant S, Nagarkatti PS, Nagarkatti M** (2002) Targeting CB₂ cannabinoid receptors as a novel therapy to treat malignant lymphoblastic disease. *Blood* 100:627-34
- McKallip RJ, Lombard C, Martin BR, Nagarkatti M, Nagarkatti PS** (2002) Δ^9 -tetrahydrocannabinol-induced apoptosis in the thymus and spleen as a mechanism of immunosuppression *in vitro* and *in vivo*. *J Pharmacol Exp Ther* 302:451-65
- Mechoulam R, Ben-Shabat S, Hanuš L, Ligumsky M, Kaminski NE, Schatz AR, Gopher A, Almog S, Martin BR, Compton DR, Pertwee RG, Griffin G, Bayewitch M, Barg J, Vogel Z** (1995) Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol* 50:83-90
- Mechoulam R, Gaoni Y** (1967) The absolute configuration of Δ^1 -tetrahydrocannabinol, the major active constituent of hashish. *Tetrahedron Lett* 12:1109-11
- Mechoulam R, Shvo Y** (1963) Hashish-I: The structure of cannabidiol. *Tetrahedron* 19:2073-8
- Melis M, Spatafora M, Melodia A, Pace E, Gjomarkaj M, Merendino AM, Bonsignore G** (1996) ICAM-1 expression by lung cancer cell lines: effects of upregulation by cytokines on the interaction with LAK cells. *Eur Respir J* 9:1831-8
- Micale V, Cristino L, Tamburella A, Petrosino S, Leggio GM, Drago F, Di Marzo V** (2009) Anxiolytic effects in mice of a dual blocker of fatty acid amide hydrolase and transient receptor potential vanilloid type-1 channels. *Neuropsychopharmacology* 34:593-606
- Mimeault M, Pommery N, Watzel N, Bailly C, Hénichart JP** (2003) Anti-proliferative and apoptotic effects of anandamide in human prostatic cancer cell lines: implication of epidermal growth factor receptor down-regulation and ceramide production. *Prostate* 56:1-12
- Moreira FA, Aguiar DC, Guimarães FS** (2006) Anxiolytic-like effect of cannabidiol in the rat Vogel conflict test. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 30:1466-71
- Moretta A, Marcenaro E, Sivori S, Della Chiesa M, Vitale M, Moretta L** (2005) Early liaisons between cells of the innate immune system in inflamed peripheral tissues. *Trends Immunol* 26:668-75
- Mosmann TR, Sad S** (1996) The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol Today* 17:138-46

- Mu J, Zhuang SY, Kirby MT, Hampson RE, Deadwyler SA** (1999) Cannabinoid receptors differentially modulate potassium A and D currents in hippocampal neurons in culture. *J Pharmacol Exp Ther* 291:893-902
- Mukherjee S, Adams M, Whiteaker K, Daza A, Kage K, Cassar S, Meyer M, Yao BB** (2004) Species comparison and pharmacological characterization of rat and human CB₂ cannabinoid receptors. *Eur J Pharmacol* 505:1-9
- Munro S, Thomas KL, Abu-Shaar M** (1993) Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature* 365:61-5
- Munson AE, Harris LS, Friedman MA, Dewey WL, Carchman RA** (1975) Antineoplastic activity of cannabinoids. *J Natl Cancer Inst* 55:597-602
- Murataeva N, Mackie K, Straiker A** (2012) The CB₂-preferring agonist JWH015 also potently and efficaciously activates CB₁ in autaptic hippocampal neurons. *Pharmacol Res* 66:437-42
- Naganuma H, Kiessling R, Patarroyo M, Hansson M, Handgretinger R, Grönberg A** (1991) Increased susceptibility of IFN- γ -treated neuroblastoma cells to lysis by lymphokine-activated killer cells: participation of ICAM-1 induction on target cells. *Int J Cancer* 47:527-32
- Nahas GG, Suci-Foca N, Armand JP, Morishima A** (1974) Inhibition of cellular mediated immunity in marihuana smokers. *Science* 183:419-20
- Naito Y, Saito K, Shiiba K, Ohuchi A, Saigenji K, Nagura H, Ohtani H** (1998) CD8⁺ T cells infiltrated within cancer cell nests as a prognostic factor in human colorectal cancer. *Cancer Res* 58:3491-4
- Nakano O, Sato M, Naito Y, Suzuki K, Orikasa S, Aizawa M, Suzuki Y, Shintaku I, Nagura H, Ohtani H** (2001) Proliferative activity of intratumoral CD8⁺ T-lymphocytes as a prognostic factor in human renal cell carcinoma: clinicopathologic demonstration of antitumor immunity. *Cancer Res* 61:5132-6
- Nakata B, Hori T, Sunami T, Ogawa Y, Yashiro M, Maeda K, Sawada T, Kato Y, Ishikawa T, Hirakawa K** (2000) Clinical significance of serum soluble intercellular adhesion molecule-1 in gastric cancer. *Clin Cancer Res* 6:1175-9
- Narizhneva NV, Razorenova OV, Podrez EA, Chen J, Chandrasekharan UM, DiCorleto PE, Plow EF, Topol EJ, Byzova TV** (2005) Thrombospondin-1 up-regulates expression of cell adhesion molecules and promotes monocyte binding to endothelium. *FASEB J* 19:1158-60
- Natali PG, Hamby CV, Felding-Habermann B, Liang B, Nicotra MR, Di Filippo F, Giannarelli D, Temponi M, Ferrone S** (1997) Clinical significance of $\alpha(v)\beta 3$ integrin and intercellular adhesion molecule-1 expression in cutaneous malignant melanoma lesions. *Cancer Res* 57:1554-60
- Natali PG, Nicotra MR, Cavaliere R, Bigotti A, Romano G, Temponi M, Ferrone S** (1990) Differential expression of intercellular adhesion molecule-1 in primary and metastatic melanoma lesions. *Cancer Res* 50:1271-8
- Nicholson RA, Liao C, Zheng J, David LS, Coyne L, Errington AC, Singh G, Lees G** (2003) Sodium channel inhibition by anandamide and synthetic cannabimimetics in brain. *Brain Res* 978:194-204

- 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 Group** (2011) A randomized, double-blind, placebo-controlled, parallel-group, enriched-design study of nabiximols* (Sativex[®]), as add-on therapy, in subjects with refractory spasticity caused by multiple sclerosis. *Eur J Neurol* 18:1122-31
- Núñez E, Benito C, Pazos MR, Barbachano A, Fajardo O, González S, Tolón RM, Romero J** (2004) Cannabinoid CB₂ receptors are expressed by perivascular microglial cells in the human brain: an immunohistochemical study. *Synapse* 53:208-13
- Nurmikko TJ, Serpell MG, Hoggart B, Toomey PJ, Morlion BJ, Haines D** (2007) Sativex[®] successfully treats neuropathic pain characterised by allodynia: a randomised, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Pain* 133:210-20
- Ogawa Y, Hirakawa K, Nakata B, Fujihara T, Sawada T, Kato Y, Yoshikawa K, Sowa M** (1998) Expression of intercellular adhesion molecule-1 in invasive breast cancer reflects low growth potential, negative lymph node involvement, and good prognosis. *Clin Cancer Res* 4:31-6
- Okamoto Y, Morishita J, Tsuboi K, Tonai T, Ueda N** (2004) Molecular characterization of a phospholipase D generating anandamide and its congeners. *J Biol Chem* 279:5298-305
- Olea-Herrero N, Vara D, Malagarie-Cazenave S, Díaz-Laviada I** (2009) Inhibition of human tumour prostate PC-3 cell growth by cannabinoids R(+)-Methanandamide and JWH-015: involvement of CB₂. *Br J Cancer* 101:940-50
- Olivier M, Hollstein M, Hainaut P** (2010) TP53 mutations in human cancers: origins, consequences, and clinical use. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2:a001008
- Oracki SA, Walker JA, Hibbs ML, Corcoran LM, Tarlinton DM** (2010) Plasma cell development and survival. *Immunol Rev* 237:140-59
- Orange JS** (2008) Formation and function of the lytic NK-cell immunological synapse. *Nat Rev Immunol* 8:713-25
- O'Sullivan SE, Sun Y, Bennett AJ, Randall MD, Kendall DA** (2009) Time-dependent vascular actions of cannabidiol in the rat aorta. *Eur J Pharmacol* 612:61-8
- O'Sullivan SE, Tarling EJ, Bennett AJ, Kendall DA, Randall MD** (2005) Novel time-dependent vascular actions of Δ^9 -tetrahydrocannabinol mediated by peroxisome proliferator-activated receptor- γ . *Biochem Biophys Res Commun* 337:824-31
- Pacher P, Bátkai S, Kunos G** (2006) The endocannabinoid system as an emerging target of pharmacotherapy. *Pharmacol Rev* 58:389-462
- Pagès F, Galon J, Dieu-Nosjean MC, Tartour E, Sautès-Fridman C, Fridman WH** (2010) Immune infiltration in human tumors: a prognostic factor that should not be ignored. *Oncogene* 29:1093-102
- Pagès F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Asslaber M, Tosolini M, Bindea G, Lagorce C, Wind P, Marliot F, Bruneval P, Zatloukal K, Trajanoski Z, Berger A, Fridman WH, Galon J** (2009) *In situ* cytotoxic and memory T cells predict outcome in patients with early-stage colorectal cancer. *J Clin Oncol* 27:5944-51
- Pandolfi F, Trentin L, Boyle LA, Stamenkovic I, Byers HR, Colvin RB, Kurnick JT** (1992) Expression of cell adhesion molecules in human melanoma cell lines and their role in cytotoxicity mediated by tumor-infiltrating lymphocytes. *Cancer* 69:1165-73

- Patarroyo M, Makgoba MW** (1989) Leukocyte adhesion to cells in immune and inflammatory responses. *Lancet* 2:1139-42
- Patrini G, Sacerdote P, Fuzio D, Manfredi B, Parolaro D** (1997) Regulation of immune functions in rat splenocytes after acute and chronic *in vivo* treatment with CP55,940, a synthetic cannabinoid compound. *J Neuroimmunol* 80:143-8
- Pertwee RG** (2009) Emerging strategies for exploiting cannabinoid receptor agonists as medicines. *Br J Pharmacol* 156:397-411
- Pertwee RG** (2010) Receptors and channels targeted by synthetic cannabinoid receptor agonists and antagonists. *Curr Med Chem* 17:1360-81
- Pertwee RG, Howlett AC, Abood ME, Alexander SP, Di Marzo V, Elphick MR, Greasley PJ, Hansen HS, Kunos G, Mackie K, Mechoulam R, Ross RA** (2010) International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXIX. Cannabinoid receptors and their ligands: beyond CB₁ and CB₂. *Pharmacol Rev* 62:588-631
- Pertwee RG, Ross RA** (2002) Cannabinoid receptors and their ligands. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 66:101-21
- Pertwee RG, Ross RA, Craib SJ, Thomas A** (2002) (-)-Cannabidiol antagonizes cannabinoid receptor agonists and noradrenaline in the mouse *vas deferens*. *Eur J Pharmacol* 456:99-106
- Petersen BH, Graham J, Lemberger L** (1976) Marihuana, tetrahydrocannabinol and T-cell function. *Life Sci* 19:395-400
- Pisanti S, Borselli C, Oliviero O, Laezza C, Gazzero P, Bifulco M** (2007) Antiangiogenic activity of the endocannabinoid anandamide: correlation to its tumor-suppressor efficacy. *J Cell Physiol* 211:495-503
- Pober JS, Gimbrone MA Jr, Lapierre LA, Mendrick DL, Fiers W, Rothlein R, Springer TA** (1986) Overlapping patterns of activation of human endothelial cells by interleukin-1, tumor necrosis factor, and immune interferon. *J Immunol* 137:1893-6
- Portella G, Laezza C, Laccetti P, De Petrocellis L, Di Marzo V, Bifulco M** (2003) Inhibitory effects of cannabinoid CB₁ receptor stimulation on tumor growth and metastatic spreading: actions on signals involved in angiogenesis and metastasis. *FASEB J* 17:1771-3
- Preet A, Ganju RK, Groopman JE** (2008) Δ^9 -Tetrahydrocannabinol inhibits epithelial growth factor-induced lung cancer cell migration *in vitro* as well as its growth and metastasis *in vivo*. *Oncogene* 27:339-46
- Preet A, Qamri Z, Nasser MW, Prasad A, Shilo K, Zou X, Groopman JE, Ganju RK** (2011) Cannabinoid receptors, CB₁ and CB₂, as novel targets for inhibition of non-small cell lung cancer growth and metastasis. *Cancer Prev Res (Phila)* 4:65-75
- Pross SH, Nakano Y, Widen R, McHugh S, Newton CA, Klein TW, Friedman H** (1992) Differing effects of Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC) on murine spleen cell populations dependent upon stimulators. *Int J Immunopharmacol* 14:1019-27
- Qian BZ, Pollard JW** (2010) Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell* 141:39-51

- Qin N, Neeper MP, Liu Y, Hutchinson TL, Lubin ML, Flores CM** (2008) TRPV2 is activated by cannabidiol and mediates CGRP release in cultured rat dorsal root ganglion neurons. *J Neurosci* 28:6231-8
- Rajesh M, Mukhopadhyay P, Bátkai S, Haskó G, Liaudet L, Drel VR, Obrosova IG, Pacher P** (2007) Cannabidiol attenuates high glucose-induced endothelial cell inflammatory response and barrier disruption. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293:H610-9
- Rakhshan F, Day TA, Blakely RD, Barker EL** (2000) Carrier-mediated uptake of the endogenous cannabinoid anandamide in RBL-2H3 cells. *J Pharmacol Exp Ther* 292:960-7
- Ramer R, Bublitz K, Freimuth N, Merkord J, Rohde H, Haustein M, Borchert P, Schmuhl E, Linnebacher M, Hinz B** (2012) Cannabidiol inhibits lung cancer cell invasion and metastasis via intercellular adhesion molecule-1. *FASEB J* 26:1535-48
- Ramer R, Fischer S, Haustein M, Manda K, Hinz B** (2014) Cannabinoids inhibit angiogenic capacities of endothelial cells via release of tissue inhibitor of matrix metalloproteinases-1 from lung cancer cells. *Biochem Pharmacol* 91:202-16
- Ramer R, Heinemann K, Merkord J, Rohde H, Salamon A, Linnebacher M, Hinz B** (2013) COX-2 and PPAR- γ confer cannabidiol-induced apoptosis of human lung cancer cells. *Mol Cancer Ther* 12:69-82
- Ramer R, Hinz B** (2008) Inhibition of cancer cell invasion by cannabinoids via increased expression of tissue inhibitor of matrix metalloproteinases-1. *J Natl Cancer Inst* 100:59-69
- Ramer R, Merkord J, Rohde H, Hinz B** (2010a) Cannabidiol inhibits cancer cell invasion via upregulation of tissue inhibitor of matrix metalloproteinases-1. *Biochem Pharmacol* 79:955-66
- Ramer R, Rohde A, Merkord J, Rohde H, Hinz B** (2010b) Decrease of plasminogen activator inhibitor-1 may contribute to the anti-invasive action of cannabidiol on human lung cancer cells. *Pharm Res* 27:2162-74
- Raulet DH** (2004) Interplay of natural killer cells and their receptors with the adaptive immune response. *Nat Immunol* 5:996-1002
- Reddel RR, Ke Y, Gerwin BI, McMenamin MG, Lechner JF, Su RT, Brash DE, Park JB, Rhim JS, Harris CC** (1988) Transformation of human bronchial epithelial cells by infection with SV40 or adenovirus-12 SV40 hybrid virus, or transfection via strontium phosphate coprecipitation with a plasmid containing SV40 early region genes. *Cancer Res* 48:1904-9
- Rieder SA, Chauhan A, Singh U, Nagarkatti M, Nagarkatti P** (2010) Cannabinoid-induced apoptosis in immune cells as a pathway to immunosuppression. *Immunobiology* 215:598-605
- Robert Koch-Institut** (Hrsg.) und Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V. (GEKID; Hrsg.) (2013) Krebs in Deutschland 2009/2010; Berlin, 9. Ausgabe
- Rockwell CE, Snider NT, Thompson JT, Vanden Heuvel JP, Kaminski NE** (2006) Interleukin-2 suppression by 2-arachidonylglycerol is mediated through peroxisome proliferator-activated receptor γ independently of cannabinoid receptors 1 and 2. *Mol Pharmacol* 70:101-11
- Rog DJ** (2010) Cannabis-based medicines in multiple sclerosis - a review of clinical studies. *Immunobiology* 215:658-72
- Rog DJ, Nurmikko TJ, Friede T, Young CA** (2005) Randomized, controlled trial of cannabis-based medicine in central pain in multiple sclerosis. *Neurology* 65:812-9

- Rosette C, Roth RB, Oeth P, Braun A, Kammerer S, Ekblom J, Denissenko MF** (2005) Role of ICAM-1 in invasion of human breast cancer cells. *Carcinogenesis* 26:943-50
- Ross RA, Brockie HC, Stevenson LA, Murphy VL, Templeton F, Makriyannis A, Pertwee RG** (1999) Agonist-inverse agonist characterization at CB₁ and CB₂ cannabinoid receptors of L759633, L759656, and AM630. *Br J Pharmacol* 126:665-72
- Rothlein R, Dustin ML, Marlin SD, Springer TA** (1986) A human intercellular adhesion molecule (ICAM-1) distinct from LFA-1. *J Immunol* 137:1270-4
- Rudolph MI, Boza Y, Yefi R, Luza S, Andrews E, Penissi A, Garrido P, Rojas IG** (2008) The influence of mast cell mediators on migration of SW756 cervical carcinoma cells. *J Pharmacol Sci* 106:208-18
- Ruiz L, Miguel A, Díaz-Laviada I** (1999) Δ^9 -tetrahydrocannabinol induces apoptosis in human prostate PC-3 cells via a receptor-independent mechanism. *FEBS Lett* 458:400-4
- Russo EB, Burnett A, Hall B, Parker KK** (2005) Agonistic properties of cannabidiol at 5-HT_{1a} receptors. *Neurochem Res* 30:1037-43
- Ryberg E, Larsson N, Sjögren S, Hjorth S, Hermansson NO, Leonova J, Elebring T, Nilsson K, Drmota T, Greasley PJ** (2007) The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor. *Br J Pharmacol* 152:1092-101
- Sacerdote P, Martucci C, Vaccani A, Bariselli F, Panerai AE, Colombo A, Parolaro D, Massi P** (2005) The nonpsychoactive component of marijuana cannabidiol modulates chemotaxis and IL-10 and IL-12 production of murine macrophages both *in vivo* and *in vitro*. *J Neuroimmunol* 159:97-105
- Saghatelian A, Trauger SA, Want EJ, Hawkins EG, Siuzdak G, Cravatt BF** (2004) Assignment of endogenous substrates to enzymes by global metabolite profiling. *Biochemistry* 43:14332-9
- Sagredo O, Ramos JA, Decio A, Mechoulam R, Fernández-Ruiz J** (2007) Cannabidiol reduced the striatal atrophy caused 3-nitropropionic acid *in vivo* by mechanisms independent of the activation of cannabinoid, vanilloid TRPV1 and adenosine A_{2A} receptors. *Eur J Neurosci* 26:843-51
- Sakai M, Miyake H, Tashiro S, Okumura Y, Kido H** (2004) Inhibitory effect of FK506 and cyclosporine A on the growth and invasion of human liver cancer cells. *J Med Invest* 51:63-9
- Sánchez C, de Ceballos ML, Gomez del Pulgar T, Rueda D, Corbacho C, Velasco G, Galve-Roperh I, Huffman JW, Ramón y Cajal S, Guzmán M** (2001) Inhibition of glioma growth *in vivo* by selective activation of the CB₂ cannabinoid receptor. *Cancer Res* 61:5784-9
- Sánchez C, Galve-Roperh I, Canova C, Brachet P, Guzmán M** (1998) Δ^9 -tetrahydrocannabinol induces apoptosis in C6 glioma cells. *FEBS Lett* 436:6-10
- Sánchez C, Velasco G, Guzmán M** (1997) Metabolic stimulation of mouse spleen lymphocytes by low doses of Δ^9 -tetrahydrocannabinol. *Life Sci* 60:1709-17
- Sanchez-Madrid F, Krensky AM, Ware CF, Robbins E, Strominger JL, Burakoff SJ, Springer TA** (1982) Three distinct antigens associated with human T-lymphocyte-mediated cytotoxicity: LFA-1, LFA-2, and LFA-3. *Proc Natl Acad Sci USA* 79:7489-93
- Sánchez-Rovira P, Jimenez E, Carracedo J, Barneto IC, Ramirez R, Aranda E** (1998) Serum levels of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in patients with colorectal cancer: inhibitory effect on cytotoxicity. *Eur J Cancer* 34:394-8

- Sapna S, Shivakumar K** (2007) Hypoxia and antioxidants enhance soluble ICAM-1 release from cardiac fibroblasts. *Mol Cell Biochem* 303:259-62
- Sartor WM, Kyprianou N, Fabian DF, Lefor AT** (1995) Enhanced expression of ICAM-1 in a murine fibrosarcoma reduces tumor growth rate. *J Surg Res* 59:66-74
- Sativex® Product Monograph** (2012) GW Pharma Ltd., Salisbury, Wiltshire UK, SP4 0JQ; Submission Control No: 091289
- Sato E, Olson SH, Ahn J, Bundy B, Nishikawa H, Qian F, Jungbluth AA, Frosina D, Gnjatic S, Ambrosone C, Kepner J, Odunsi T, Ritter G, Lele S, Chen YT, Ohtani H, Old LJ, Odunsi K** (2005) Intraepithelial CD8⁺ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8⁺/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:18538-43
- Sawada T, Kimura K, Nishihara T, Onoda N, Teraoka H, Yamashita Y, Yamada N, Yashiro M, Ohira M, Hirakawa K** (2006) TGF- β 1 down-regulates ICAM-1 expression and enhances liver metastasis of pancreatic cancer. *Adv Med Sci* 51:60-5
- Sawzdargo M, Nguyen T, Lee DK, Lynch KR, Cheng R, Heng HH, George SR, O'Dowd BF** (1999) Identification and cloning of three novel human G protein-coupled receptor genes GPR52, PsiGPR53 and GPR55: GPR55 is extensively expressed in human brain. *Brain Res Mol Brain Res* 64:193-8
- Schlicker E, Kathmann M** (2001) Modulation of transmitter release via presynaptic cannabinoid receptors. *Trends Pharmacol Sci* 22:565-72
- Schmal H, Czermak BJ, Lentsch AB, Bless NM, Beck-Schimmer B, Friedl HP, Ward PA** (1998) Soluble ICAM-1 activates lung macrophages and enhances lung injury. *J Immunol* 161:3685-93
- Schmits R, Kündig TM, Baker DM, Shumaker G, Simard JJ, Duncan G, Wakeham A, Shahinian A, van der Heiden A, Bachmann MF, Ohashi PS, Mak TW, Hickstein DD** (1996) LFA-1-deficient mice show normal CTL responses to virus but fail to reject immunogenic tumor. *J Exp Med* 183:1415-26
- Schmuhl E, Ramer R, Salamon A, Peters K, Hinz B** (2014) Increase of mesenchymal stem cell migration by cannabidiol via activation of p42/44 MAPK. *Biochem Pharmacol* 87:489-501
- Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ** (2011) Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science* 331:1565-70
- Schröder C, Witzel I, Müller V, Krenkel S, Wirtz RM, Jänicke F, Schumacher U, Milde-Langosch K** (2011) Prognostic value of intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 expression in breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 137:1193-201
- Schulz C, Farkas L, Wolf K, Kratzel K, Eissner G, Pfeifer M** (2002) Differences in LPS-induced activation of bronchial epithelial cells (BEAS-2B) and type II-like pneumocytes (A549). *Scand J Immunol* 56:294-302
- Schumacher K, Haensch W, Röefzaad C, Schlag PM** (2001) Prognostic significance of activated CD8⁺ T cell infiltrations within esophageal carcinomas. *Cancer Res* 61:3932-6
- Schwaeble W, Kerlin M, Meyer zum Büschenfelde KH, Dippold W** (1993) *De novo* expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1, CD54) in pancreas cancer. *Int J Cancer* 53:328-33
- Schwarz H, Blanco FJ, Lotz M** (1994) Anadamide, an endogenous cannabinoid receptor agonist inhibits lymphocyte proliferation and induces apoptosis. *J Neuroimmunol* 55:107-15

- Segal AW** (2005) How neutrophils kill microbes. *Annu Rev Immunol* 23:197-223
- Shankaran V, Ikeda H, Bruce AT, White JM, Swanson PE, Old LJ, Schreiber RD** (2001) IFN- γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* 410:1107-11
- Sheskin T, Hanuš L, Slager J, Vogel Z, Mechoulam R** (1997) Structural requirements for binding of anandamide-type compounds to the brain cannabinoid receptor. *J Med Chem* 40:659-67
- Shibata M, Ando K, Amano S, Kurosu Y** (1996) Local expression and circulating form of ICAM-1 in colorectal cancer. *Ann Cancer Res Ther* 5:29-33
- Shin HS, Jung CH, Park HD, Lee SS** (2004) The relationship between the serum intercellular adhesion molecule-1 level and the prognosis of the disease in lung cancer. *Korean J Intern Med* 19:48-52
- Showalter VM, Compton DR, Martin BR, Aboud ME** (1996) Evaluation of binding in a transfected cell line expressing a peripheral cannabinoid receptor CB₂: identification of cannabinoid receptor subtype selective ligands. *J Pharmacol Exp Ther* 278:989-99
- Shresta S, MacIvor DM, Heusel JW, Russell JH, Ley TJ** (1995) Natural killer and lymphokine-activated killer cells require granzyme B for the rapid induction of apoptosis in susceptible target cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:5679-83
- Shrivastava A, Kuzontkoski PM, Groopman JE, 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
- Sirikantaramas S, Taura F, Tanaka Y, Ishikawa Y, Morimoto S, Shoyama Y** (2005) Tetrahydrocannabinolic acid synthase, the enzyme controlling marijuana psychoactivity, is secreted into the storage cavity of the glandular trichomes. *Plant Cell Physiol* 46:1578-82
- Slipetz DM, O'Neill GP, Favreau L, Dufresne C, Gallant M, Gareau Y, Guay D, Labelle M, Metters KM** (1995) Activation of the human peripheral cannabinoid receptor results in inhibition of adenylyl cyclase. *Mol Pharmacol* 48:352-61
- Smart D, Jonsson KO, Vandevoorde S, Lambert DM, Fowler CJ** (2002) 'Entourage' effects of N-acyl ethanolamines at human vanilloid receptors. Comparison of effects upon anandamide-induced vanilloid receptor activation and upon anandamide metabolism. *Br J Pharmacol* 136:452-8
- Smith KA** (1988) Interleukin-2: inception, impact, and implications. *Science* 240:1169-76
- Smyth MJ, Thia KY, Cretney E, Kelly JM, Snook MB, Forbes CA, Scalzo AA** (1999) Perforin is a major contributor to NK cell control of tumor metastasis. *J Immunol* 162:6658-62
- Smyth MJ, Thia KY, Street SE, MacGregor D, Godfrey DI, Trapani JA** (2000) Perforin-mediated cytotoxicity is critical for surveillance of spontaneous lymphoma. *J Exp Med* 192:755-60
- Snider NT, Kornilov AM, Kent UM, Hollenberg PF** (2007) Anandamide metabolism by human liver and kidney microsomal cytochrome p450 enzymes to form hydroxyeicosatetraenoic and epoxyeicosatrienoic acid ethanolamides. *J Pharmacol Exp Ther* 321:590-7
- Solinas G, Germano G, Mantovani A, Allavena P** (2009) Tumor-associated macrophages (TAM) as major players of the cancer-related inflammation. *J Leukoc Biol* 86:1065-73

- Solinas M, Massi P, Cantelmo AR, Cattaneo MG, Cammarota R, Bartolini D, Cinquina V, Valenti M, Vicentini LM, Noonan DM, Albini A, Parolaro D** (2012) Cannabidiol inhibits angiogenesis by multiple mechanisms. *Br J Pharmacol* 167:1218-31
- Soroceanu L, Murase R, Limbad C, Singer E, Allison J, Adrados I, Kawamura R, Pakdel A, Fukuyo Y, Nguyen D, Khan S, Arauz R, Yount GL, Moore DH, Desprez PY, McAllister SD** (2013) Id-1 is a key transcriptional regulator of glioblastoma aggressiveness and a novel therapeutic target. *Cancer Res* 73:1559-69
- Specter SC, Klein TW, Newton C, Mondragon M, Widen R, Friedman H** (1986) Marijuana effects on immunity: suppression of human natural killer cell activity of Δ^9 -tetrahydrocannabinol. *Int J Immunopharmacol* 8:741-5
- Specter S, Rivenbark M, Newton C, Kawakami Y, Lancz G** (1989) Prevention and reversal of Δ^9 -tetrahydrocannabinol induced depression of natural killer cell activity by interleukin-2. *Int J Immunopharmacol* 11:63-9
- Springer TA** (1990) Adhesion receptors of the immune system. *Nature* 346:425-34
- Sreevalsan S, Joseph S, Jutooru I, Chadalapaka G, Safe SH** (2011) Induction of apoptosis by cannabinoids in prostate and colon cancer cells is phosphatase dependent. *Anticancer Res* 31:3799-807
- Srivastava MD, Srivastava BI, Brouhard B** (1998) Δ^9 -tetrahydrocannabinol and cannabidiol alter cytokine production by human immune cells. *Immunopharmacology* 40:179-85
- Statistisches Bundesamt - Wiesbaden** (2013) Gesundheit - Todesursachen in Deutschland; Fachserie 12 Reihe 4; Erschienen am 12.12.2013; Artikelnummer: 2120400127004
- Staunton DE, Dustin ML, Erickson HP, Springer TA** (1990) The arrangement of the immunoglobulin-like domains of ICAM-1 and the binding sites for LFA-1 and rhinovirus. *Cell* 61:243-54
- Stenger S, Hanson DA, Teitelbaum R, Dewan P, Niazi KR, Froelich CJ, Ganz T, Thoma-Uszynski S, Melián A, Bogdan C, Porcelli SA, Bloom BR, Krensky AM, Modlin RL** (1998) An antimicrobial activity of cytolytic T cells mediated by granulysin. *Science* 282:121-5
- Street SE, Cretney E, Smyth MJ** (2001) Perforin and interferon- γ activities independently control tumor initiation, growth, and metastasis. *Blood* 97:192-7
- Street SE, Trapani JA, MacGregor D, Smyth MJ** (2002) Suppression of lymphoma and epithelial malignancies effected by interferon- γ . *J Exp Med* 196:129-34
- Subauste MC, Choi DC, Proud D** (2001) Transient exposure of human bronchial epithelial cells to cytokines leads to persistent increased expression of ICAM-1. *Inflammation* 25:373-80
- Sugiura T, Kishimoto S, Oka S, Gokoh M** (2006) Biochemistry, pharmacology and physiology of 2-arachidonoylglycerol, an endogenous cannabinoid receptor ligand. *Prog Lipid Res* 45:405-46
- Sugiura T, Kondo S, Kishimoto S, Miyashita T, Nakane S, Kodaka T, Suhara Y, Takayama H, Waku K** (2000) Evidence that 2-arachidonoylglycerol but not N-palmitoylethanolamine or anandamide is the physiological ligand for the cannabinoid CB₂ receptor. Comparison of the agonistic activities of various cannabinoid receptor ligands in HL-60 cells. *J Biol Chem* 275:605-12

- Sugiura T, Kondo S, Sukagawa A, Nakane S, Shinoda A, Itoh K, Yamashita A, Waku K** (1995) 2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. *Biochem Biophys Res Commun* 215:89-97
- Sun JJ, Zhou XD, Liu YK, Tang ZY, Feng JX, Zhou G, Xue Q, Chen J** (1999) Invasion and metastasis of liver cancer: expression of intercellular adhesion molecule-1. *J Cancer Res Clin Oncol* 125:28-34
- Sun YX, Tsuboi K, Okamoto Y, Tonai T, Murakami M, Kudo I, Ueda N** (2004) Biosynthesis of anandamide and N-palmitoylethanolamine by sequential actions of phospholipase A2 and lysophospholipase D. *Biochem J* 380:749-56
- Sunami T, Yashiro M, Chung KH** (2000) ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1) gene transfection inhibits lymph node metastasis by human gastric cancer cells. *Jpn J Cancer Res* 91:925-33
- Suplita II RL, Farthing JN, Gutierrez T, Hohmann AG** (2005) Inhibition of fatty-acid amide hydrolase enhances cannabinoid stress-induced analgesia: sites of action in the dorsolateral periaqueductal gray and rostral ventromedial medulla. *Neuropharmacology* 49:1201-9
- Tachimori A, Yamada N, Sakate Y, Yashiro M, Maeda K, Ohira M, Nishino H, Hirakawa K** (2005) Up regulation of ICAM-1 gene expression inhibits tumour growth and liver metastasis in colorectal carcinoma. *Eur J Cancer* 41:1802-10
- Tanasescu R, Constantinescu CS** (2010) Cannabinoids and the immune system: an overview. *Immunobiology* 215:588-97
- Textor S, Accardi R, Havlova T, Hussain I, Sylla BS, Gissmann L, Cerwenka A** (2011) NF- κ B-dependent upregulation of ICAM-1 by HPV16-E6/E7 facilitates NK cell/target cell interaction. *Int J Cancer* 128:1104-13
- Thomas A, Baillie GL, Phillips AM, Razdan RK, Ross RA, Pertwee RG** (2007) Cannabidiol displays unexpectedly high potency as an antagonist of CB₁ and CB₂ receptor agonists *in vitro*. *Br J Pharmacol* 150:613-23
- Thomas BF, Gilliam AF, Burch DF, Roche MJ, Seltzman HH** (1998) Comparative receptor binding analyses of cannabinoid agonists and antagonists. *J Pharmacol Exp Ther* 285:285-92
- Thompson C, Powrie F** (2004) Regulatory T cells. *Curr Opin Pharmacol* 4:408-14
- Thomson AW, Satoh S, Nüssler AK, Tamura K, Woo J, Gavalier J, van Thiel DH** (1994) Circulating intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in autoimmune liver disease and evidence for the production of ICAM-1 by cytokine-stimulated human hepatocytes. *Clin Exp Immunol* 95:83-90
- Toiyama Y, Miki C, Inoue Y, Okugawa Y, Koike Y, Yokoe T, Tanaka K, Kusunoki M** (2008) Soluble intercellular adhesion molecule-1 as a prognostic marker for stage II colorectal cancer patients. *Ann Surg Oncol* 15:1617-24
- Tominaga M, Caterina MJ, Malmberg AB, Rosen TA, Gilbert H, Skinner K, Raumann BE, Basbaum AI, Julius D** (1998) The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. *Neuron* 21:531-43
- Tomita Y, Nishiyama T, Watanabe H, Fujiwara M, Sato S** (1990) Expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) on renal-cell cancer: possible significance in host immune responses. *Int J Cancer* 46:1001-6

- Torres S, Lorente M, Rodríguez-Fornés F, Hernández-Tiedra S, Salazar M, García-Taboada E, Barcia J, Guzmán M, Velasco G** (2011) A combined preclinical therapy of cannabinoids and temozolomide against glioma. *Mol Cancer Ther* 10:90-103
- Townsend A, Bodmer H** (1989) Antigen recognition by class I-restricted T lymphocytes. *Annu Rev Immunol* 7:601-24
- Toyota M, Shimamura T, Ishii H, Renner M, Braggins J, Asakawa Y** (2002) New bibenzyl cannabinoid from the New Zealand liverwort *Radula marginata*. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 50:1390-2
- Trapani JA, Smyth MJ** (2002) Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. *Nat Rev Immunol* 2:735-47
- Trisler K, Specter S** (1994) Δ^9 -tetrahydrocannabinol treatment results in a suppression of interleukin-2-induced cellular activities in human and murine lymphocytes. *Int J Immunopharmacol* 16:593-603
- Tsakadze NL, Sen U, Zhao Z, Sithu SD, English WR, D'Souza SE** (2004) Signals mediating cleavage of intercellular adhesion molecule-1. *Am J Physiol Cell Physiol* 287:C55-63
- Tsukada N, Matsuda M, Miyagi K, Yanagisawa N** (1993) Increased levels of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and tumor necrosis factor receptor in the cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. *Neurology* 43:2679-82
- Turner J, Rhee JG, Fabian DF, Lefor AT** (1997) Expression of ICAM-1 enhances *in vivo* lymphocyte adhesion in a murine fibrosarcoma. *J Surg Oncol* 66:39-44
- Twitchell W, Brown S, Mackie K** (1997) Cannabinoids inhibit N- and P/Q-type calcium channels in cultured rat hippocampal neurons. *J Neurophysiol* 78:43-50
- Ueda N, Yamamoto K, Yamamoto S, Tokunaga T, Shirakawa E, Shinkai H, Ogawa M, Sato T, Kudo I, Inoue K, Takizawa H, Nagano T, Hirobe M, Matsuki N, Saito H** (1995) Lipoxygenase-catalyzed oxygenation of arachidonylethanolamide, a cannabinoid receptor agonist. *Biochim Biophys Acta* 1254:127-34
- Ueda N, Yamanaka K, Yamamoto S** (2001) Purification and characterization of an acid amidase selective for N-palmitoylethanolamine, a putative endogenous anti-inflammatory substance. *J Biol Chem* 276:35552-7
- Unanue ER, Allen PM** (1987) The basis for the immunoregulatory role of macrophages and other accessory cells. *Science* 236:551-7
- Usami Y, Ishida K, Sato S, Kishino M, Kiryu M, Ogawa Y, Okura M, Fukuda Y, Toyosawa S** (2013) Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression correlates with oral cancer progression and induces macrophage/cancer cell adhesion. *Int J Cancer* 133:568-78
- Vaccani A, Massi P, Colombo A, Rubino T, Parolaro D** (2005) Cannabidiol inhibits human glioma cell migration through a cannabinoid receptor-independent mechanism. *Br J Pharmacol* 144:1032-6
- van Agthoven A, Terhorst C, Reinherz E, Schlossman S** (1981) Characterization of T cell surface glycoproteins T1 and T3 present on all human peripheral T lymphocytes and functionally mature thymocytes. *Eur J Immunol* 11:18-21
- van den Broek ME, Kägi D, Ossendorp F, Toes R, Vamvakas S, Lutz WK, Melief CJ, Zinkernagel RM, Hengartner H** (1996) Decreased tumor surveillance in perforin-deficient mice. *J Exp Med* 184:1781-90

- van de Stolpe A, van der Saag PT** (1996) Intercellular adhesion molecule-1. *J Mol Med (Berl)* 74:13-33
- Van Klinger B, Ten Ham M** (1976) Antibacterial activity of Δ^9 -tetrahydrocannabinol and cannabidiol. *Antonie Van Leeuwenhoek* 42:9-12
- Vánky F, Wang P, Patarroyo M, Klein E** (1990) Expression of the adhesion molecule ICAM-1 and major histocompatibility complex class I antigens on human tumor cells is required for their interaction with autologous lymphocytes *in vitro*. *Cancer Immunol Immunother* 31:19-27
- Van Seventer GA, Shimizu Y, Horgan KJ, Shaw S** (1990) The LFA-1 ligand ICAM-1 provides an important costimulatory signal for T cell receptor-mediated activation of resting T cells. *J Immunol* 144:4579-86
- Van Sickle MD, Duncan M, Kingsley PJ, Mouihate A, Urbani P, Mackie K, Stella N, Makriyannis A, Piomelli D, Davison JS, Marnett LJ, Di Marzo V, Pittman QJ, Patel KD, Sharkey KA** (2005) Identification and functional characterization of brainstem cannabinoid CB₂ receptors. *Science* 310:329-32
- Vara D, Salazar M, Olea-Herrero N, Guzmán M, Velasco G, Díaz-Laviada I** (2011) Anti-tumoral action of cannabinoids on hepatocellular carcinoma: role of AMPK-dependent activation of autophagy. *Cell Death Differ* 18:1099-111
- Vásquez C, Navarro-Polanco RA, Huerta M, Trujillo X, Andrade F, Trujillo-Hernández B, Hernández L** (2003) Effects of cannabinoids on endogenous K⁺ and Ca²⁺ currents in HEK293 cells. *Can J Physiol Pharmacol* 81:436-42
- Velasco G, Sánchez C, Guzmán M** (2012) Towards the use of cannabinoids as antitumour agents. *Nat Rev Cancer* 12:436-44
- Vesely MD, Kershaw MH, Schreiber RD, Smyth MJ** (2011) Natural innate and adaptive immunity to cancer. *Annu Rev Immunol* 29:235-71
- Vilela LR, Medeiros DC, de Oliveira AC, Moraes MF, Moreira FA** (2014) Anticonvulsant Effects of N-Arachidonoylserotonin, a Dual Fatty Acid Amide Hydrolase Enzyme and Transient Receptor Potential Vanilloid Type-1 (TRPV1) Channel Blocker, on Experimental Seizures: The Roles of Cannabinoid CB₁ Receptors and TRPV1 Channels. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*; DOI:10.1111/bcpt.12232
- Vitolo D, Palmieri MB, Ruco LP, Rendina E, Bonsignore G, Baroni CD** (1994) Cytokine production and expression of adhesion molecules and integrins in tumor infiltrating lymphomononuclear cells of non-small cell carcinomas of the lung. *Am J Pathol* 145:322-9
- Vivier E, Raulet DH, Moretta A, Caligiuri MA, Zitvogel L, Lanier LL, Yokoyama WM, Ugolini S** (2011) Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. *Science* 331:44-9
- Voraberger G, Schäfer R, Stratowa C** (1991) Cloning of the human gene for intercellular adhesion molecule-1 and analysis of its 5'-regulatory region. Induction by cytokines and phorbol ester. *J Immunol* 147:2777-86
- Voskoboinik I, Smyth MJ, Trapani JA** (2006) Perforin-mediated target-cell death and immune homeostasis. *Nat Rev Immunol* 6:940-52
- Voskoboinik I, Thia MC, Fletcher J, Ciccone A, Browne K, Smyth MJ, Trapani JA** (2005) Calcium-dependent plasma membrane binding and cell lysis by perforin are mediated through its C2 domain: A critical role for aspartate residues 429, 435, 483, and 485 but not 491. *J Biol Chem* 280:8426-34

- Wade DT, Collin C, Stott C, Duncombe P** (2010) Meta-analysis of the efficacy and safety of Sativex[®] (nabiximols), on spasticity in people with multiple sclerosis. *Mult Scler* 16:707-14
- Walsh D, Nelson KA, Mahmoud FA** (2003) Established and potential therapeutic applications of cannabinoids in oncology. *Support Care Cancer* 11:137-43
- Wang R, Jaw JJ, Stutzman NC, Zou Z, Sun PD** (2011) Natural killer cell-produced IFN- γ and TNF- α induce target cell cytolysis through up-regulation of ICAM-1. *J Leukoc Biol* 91:299-309
- Watanabe K, Kayano Y, Matsunaga T, Yamamoto I, Yoshimura H** (1996) Inhibition of anandamide amidase activity in mouse brain microsomes by cannabinoids. *Biol Pharm Bull* 19:1109-11
- Watzl B, Scuderi P, Watson RR** (1991) Marijuana components stimulate human peripheral blood mononuclear cell secretion of interferon- γ and suppress interleukin-1 α *in vitro*. *Int J Immunopharmacol* 13:1091-7
- Webb DS, Mostowski HS, Gerrard TL** (1991) Cytokine-induced enhancement of ICAM-1 expression results in increased vulnerability of tumor cells to monocyte-mediated lysis. *J Immunol* 146:3682-6
- West EJ, Scott KJ, Jennings VA, Melcher AA** (2011) Immune activation by combination human lymphokine-activated killer and dendritic cell therapy. *Br J Cancer* 105:787-95
- White SC, Brin SC, Janicki BW** (1975) Mitogen-induced blastogenic responses of lymphocytes from marihuana smokers. *Science* 188:71-2
- Wissel J, Haydn T, Müller J, Brenneis C, Berger T, Poewe W, Schelosky LD** (2006) Low dose treatment with the synthetic cannabinoid Nabilone significantly reduces spasticity-related pain: a double-blind placebo-controlled cross-over trial. *J Neurol* 253:1337-41
- Wu HY, Chang AC, Wang CC, Kuo FH, Lee CY, Liu DZ, Jan TR** (2010) Cannabidiol induced a contrasting pro-apoptotic effect between freshly isolated and precultured human monocytes. *Toxicol Appl Pharmacol* 246:141-7
- Wu HY, Chu RM, Wang CC, Lee CY, Lin SH, Jan TR** (2008) Cannabidiol-induced apoptosis in primary lymphocytes is associated with oxidative stress-dependent activation of caspase-8. *Toxicol Appl Pharmacol* 226:260-70
- Xian XS, Park H, Cho YK, Lee IS, Kim SW, Choi MG, Chung IS, Han KH, Park JM** (2010) Effect of a synthetic cannabinoid agonist on the proliferation and invasion of gastric cancer cells. *J Cell Biochem* 110:321-32
- Yu M, Han J, Cui P, Dai M, Li H, Zhang J, Xiu R** (2008) Cisplatin up-regulates ICAM-1 expression in endothelial cell via a NF- κ B dependent pathway. *Cancer Sci* 99:391-7
- Yu M, Ives D, Ramesha CS** (1997) Synthesis of prostaglandin E2 ethanolamide from anandamide by cyclooxygenase-2. *J Biol Chem* 272:21181-6
- Zhang GJ, Adachi I** (1999) Serum levels of soluble intercellular adhesion molecule-1 and E-selectin in metastatic breast carcinoma: correlations with clinicopathological features and prognosis. *Int J Oncol* 14:71-7
- Zhang L, Conejo-Garcia JR, Katsaros D, Gimotty PA, Massobrio M, Regnani G, Makrigiannakis A, Gray H, Schlienger K, Liebman MN, Rubin SC, Coukos G** (2003) Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer. *N Engl J Med* 348:203-13

- Zheng ZM, Specter S, Friedman H** (1993) Serum proteins affect the inhibition by Δ^9 -tetrahydrocannabinol of tumor necrosis factor- α production by mouse macrophages. *Adv Exp Med Biol* 335:89-93
- Zhu W, Friedman H, Klein TW** (1998) Δ^9 -tetrahydrocannabinol induces apoptosis in macrophages and lymphocytes: involvement of Bcl-2 and caspase-1. *J Pharmacol Exp Ther* 286:1103-9
- Zuardi AW, Crippa JA, Hallak JE, Moreira FA, Guimarães FS** (2006) Cannabidiol, a *Cannabis sativa* constituent, as an antipsychotic drug. *Braz J Med Biol Res* 39:421-9
- Zuardi AW, Crippa JA, Hallak JE, Pinto JP, Chagas MH, Rodrigues GG, Dursun SM, Tumas V** (2009) Cannabidiol for the treatment of psychosis in Parkinson's disease. *J Psychopharmacol* 23:979-83
- Zygmunt PM, Petersson J, Andersson DA, Chuang H, Sörgård M, Di Marzo V, Julius D, Högestätt ED** (1999) Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. *Nature* 400:452-7

7. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abb. 1-1: Strukturformeln von Endocannabinoiden und ähnlichen Verbindungen	5
Abb. 1-2: Strukturformeln von synthetischen Cannabinoiden	8
Abb. 1-3: Strukturformeln von CBD und THC	10
Abb. 1-4: Schematische Darstellung der Struktur von ICAM-1	12
Abb. 1-5: Zytotoxische Lyse von Zielzellen über den Perforin/Granzym-Weg.....	20
Abb. 2-1: Trennung der Blutbestandteile durch Dichtegradientenzentrifugation.....	32
Abb. 2-2: Spaltung von Calcein-AM durch Esterasen	35
Abb. 2-3: Reduktion des Tetrazoliums Salzes WST-1 zu Formazan.....	40
Abb. 2-4: Proteinmarker und Chemilumineszenz bei ICAM-1-Nachweis.....	45
Abb. 3-1: Einfluss von CBD auf die ICAM-1-Proteinexpression von Lungen- tumorzellen	47
Abb. 3-2: Einfluss eines ICAM-1-Antikörpers auf die Adhäsion von LAK-Zellen an CBD-stimulierte Tumorzellen	49
Abb. 3-3: LAK-Zell-vermittelte Lyse von CBD-stimulierten Tumorzellen bei unterschiedlichen E:Z-Verhältnissen.....	51
Abb. 3-4: LAK-Zell-vermittelte Lyse von CBD-stimulierten HROBML01-Zellen bei unterschiedlichen E:Z-Verhältnissen.....	52
Abb. 3-5: Einfluss von CBD auf die LFA-1-Proteinexpression von LAK-Zellen	53
Abb. 3-6: Wirkung von CBD auf die zytotoxische Aktivität von LAK-Zellen	54
Abb. 3-7: Einfluss eines ICAM-1-Antikörpers auf die LAK-Zell-vermittelte Lyse von CBD-behandelten Tumorzellen	56
Abb. 3-8: Einfluss der ICAM-1 siRNA-Transfektion auf die LAK-Zell-vermittelte CBD-induzierte Lyse und ICAM-1-Proteinexpression von Tumorzellen	58
Abb. 3-9: Einfluss von Rezeptorantagonisten gegen CB ₁ , CB ₂ und TRPV1 auf die LAK-Zell-vermittelte CBD-induzierte Lyse und ICAM-1-Protein- expression von Tumorzellen.....	60
Abb. 3-10: Eigeneffekt der Rezeptorantagonisten auf die LAK-Zell-vermittelte Lyse und ICAM-1-Proteinexpression von Tumorzellen	62
Abb. 3-11: Einfluss eines LFA-1-Antikörpers auf die LAK-Zell-vermittelte Lyse von CBD-behandelten Tumorzellen.....	63
Abb. 3-12: Wirkung verschiedener Cannabinoide auf die LAK-Zell-vermittelte Lyse von Tumorzellen	64
Abb. 3-13: Einfluss der ICAM-1 siRNA-Transfektion auf die LAK-Zell-vermittelte MA-induzierte Lyse und ICAM-1-Proteinexpression von Tumorzellen	66
Abb. 3-14: Einfluss der ICAM-1 siRNA-Transfektion auf die LAK-Zell-vermittelte THC-induzierte Lyse und ICAM-1-Proteinexpression von Tumorzellen	68

Abb. 3-15: Wirkung von CBD, MA und THC auf die ICAM-1-Proteinexpression und LAK-Zell-vermittelte Lyse von BEAS-2B-Zellen.....	70
Abb. 3-16: Wirkung von CBD auf die ICAM-1-Proteinexpression von Monozyten.....	71
Abb. 3-17: Wirkung von AA-5HT auf die LAK-Zell-vermittelte Lyse von Tumorzellen	72
Abb. 3-18: Einfluss der ICAM-1 siRNA-Transfektion auf die LAK-Zell-vermittelte AA-5HT-induzierte Lyse und ICAM-1-Proteinexpression von Tumorzellen	73
Abb. 3-19: Einfluss von Rezeptorantagonisten gegen CB ₁ , CB ₂ und TRPV1 auf die LAK-Zell-vermittelte AA-5HT-induzierte Lyse von Tumorzellen	75
Abb. 3-20: Einfluss eines LFA-1-Antikörpers auf die LAK-Zell-vermittelte Lyse von AA-5HT-behandelten Tumorzellen	76
Abb. 3-21: Wirkung von Endocannabinoiden und ähnlichen Verbindungen auf die LAK-Zell-vermittelte Lyse von Tumorzellen	77
Abb. 3-22: Einfluss der ICAM-1 siRNA-Transfektion auf die LAK-Zell-vermittelte AEA-induzierte Lyse und ICAM-1-Proteinexpression von Tumorzellen.....	78
Abb. 3-23: Einfluss von Rezeptorantagonisten gegen CB ₁ , CB ₂ und TRPV1 auf die LAK-Zell-vermittelte AEA-induzierte Lyse von Tumorzellen.....	79

Tab. 2-1: Mittlere Dichte von Blutbestandteilen	31
Tab. 2-2: Einstellungen für die Fluoreszenzmessungen.....	36
Tab. 2-3: Pipettierschema zur Erstellung der Eichreihen für die Proteinbestimmung	42
Tab. 2-4: Ansätze für zwei 10 %ige SDS-Polyacrylamidgele	43
Tab. 2-5: Zusammensetzung der Chemilumineszenzlösung	45
Tab. 8-1: Viabilität CBD-behandelter A549-, H460- und HROBML03-Zellen parallel zum Adhäsionsassay	140
Tab. 8-2: Viabilität CBD-behandelter Tumorzellen parallel zum Zytotoxizitäts- assay mit LAK-Zellen, die ebenfalls mit CBD behandelt wurden	140
Tab. 8-3: Viabilität CBD-behandelter und mit ICAM-1-Antikörper präinkubierter Tumorzellen	141
Tab. 8-4: Viabilität ICAM-1 siRNA-transfizierter und CBD-behandelter Tumorzellen	141
Tab. 8-5: Viabilität CBD-behandelter und mit Rezeptorantagonisten präinkubierter Tumorzellen	141
Tab. 8-6: Viabilität der mit Rezeptorantagonisten inkubierten Tumorzellen.....	141
Tab. 8-7: Viabilität CBD-behandelter Tumorzellen parallel zum Zytotoxizitätsassay mit dem LFA-1-Antikörper	142
Tab. 8-8: Viabilität von MA-, THC-, JWH133- bzw. WIN55,212-2-stimulierten Tumorzellen	142
Tab. 8-9: Viabilität ICAM-1 siRNA-transfizierter und MA-behandelter Tumorzellen	142
Tab. 8-10: Viabilität ICAM-1 siRNA-transfizierter und THC-behandelter Tumorzellen	142
Tab. 8-11: Viabilität CBD-, MA- und THC-behandelter BEAS-2B-Zellen	143
Tab. 8-12: Viabilität AA-5HT-behandelter und mit Rezeptorantagonisten präinkubierter Tumorzellen	143
Tab. 8-13: Viabilität AEA-behandelter und mit Rezeptorantagonisten präinkubierter Tumorzellen	143

8. Anhang

8.1 Tabellarische Übersichten zu den Viabilitäten der Tumor- und Nicht-Tumorzellen

Die Viabilitäten der Tumorzellen wurden parallel zum Adhäsions- bzw. jeweiligen Zytotoxizitätsassay bestimmt. Die Werte in den Tabellen geben die Viabilität der Tumorzellen in % \pm SEM wieder, wobei die Vehikelkontrolle immer 100 % gesetzt und die anderen Daten auf diese bezogen wurden. Die n-Zahl bezeichnet die Anzahl unterschiedlicher Versuche, wobei je Ansatz vier (x4) bzw. fünf (x5) Wells mitgeführt wurden. Die Viabilitätstests wurden mit 10.000 Zellen/Well (96-Well-Platten) durchgeführt mit Ausnahme der H460-Zellen in den Tabellen Tab. 8-4, Tab. 8-8, Tab. 8-9 und Tab. 8-10, bei denen wie beim Zytotoxizitätsassay 5.000 Zellen/Well verwendet wurden.

Tab. 8-1: Viabilität CBD-behandelter A549-, H460- und HROBML03-Zellen parallel zum Adhäsionsassay

	A549	H460	HROBML03
Vehikel	100 \pm 2	100 \pm 1	100 \pm 1
1 μ M CBD	118 \pm 2	96 \pm 3	93 \pm 2
3 μ M CBD	83 \pm 6	59 \pm 5	80 \pm 4
Anti-ICAM-1	98 \pm 2	94 \pm 2	102 \pm 2
1 μ M CBD + anti-ICAM-1	119 \pm 3	95 \pm 3	97 \pm 2
3 μ M CBD + anti-ICAM-1	82 \pm 5	58 \pm 5	86 \pm 5
Isotype Control	99 \pm 2	95 \pm 2	98 \pm 2
1 μ M CBD + Isotype Control	114 \pm 1	97 \pm 3	92 \pm 1
3 μ M CBD + Isotype Control	79 \pm 5	58 \pm 4	82 \pm 4
n-Zahl	8 (x4)	7 (x4)	5 (x4)

Tab. 8-2: Viabilität CBD-behandelter Tumorzellen parallel zum Zytotoxizitätsassay mit LAK-Zellen, die ebenfalls mit CBD behandelt wurden

	A549	H460	HROBML03
Vehikel	100 \pm 2	100 \pm 2	100 \pm 1
3 μ M CBD	88 \pm 5	76 \pm 7	67 \pm 5
n-Zahl	5 (x5)	5 (x5)	5 (x5)

Tab. 8-3: Viabilität CBD-behandelter und mit ICAM-1-Antikörper präinkubierter Tumorzellen

	A549	H460	HROBML03
Vehikel	100 ± 1	100 ± 1	100 ± 2
3 µM CBD	80 ± 7	60 ± 5	78 ± 6
Anti-ICAM-1	99 ± 2	98 ± 2	94 ± 3
3 µM CBD + anti-ICAM-1	72 ± 6	60 ± 5	73 ± 5
Isotype Control	98 ± 2	96 ± 2	91 ± 3
3 µM CBD + Isotype Control	75 ± 7	59 ± 4	76 ± 4
n-Zahl	8 (x4)	7 (x4)	4 (x4)

Tab. 8-4: Viabilität ICAM-1 siRNA-transfizierter und CBD-behandelter Tumorzellen

	A549	H460	HROBML03
Vehikel	100 ± 1	100 ± 2	100 ± 1
3 µM CBD	101 ± 2	77 ± 3	85 ± 2
ICAM-1 siRNA	102 ± 2	96 ± 2	93 ± 2
3 µM CBD + ICAM-1 siRNA	109 ± 2	83 ± 3	82 ± 3
non siRNA	99 ± 2	97 ± 2	90 ± 3
3 µM CBD + non siRNA	107 ± 2	85 ± 3	86 ± 3
n-Zahl	3 (x5)	7 (x5)	4 (x5)

Tab. 8-5: Viabilität CBD-behandelter und mit Rezeptorantagonisten präinkubierter Tumorzellen

	A549	H460	HROBML03
Vehikel	100 ± 1	100 ± 2	100 ± 1
3 µM CBD	62 ± 4	55 ± 5	65 ± 5
3 µM CBD + AM251	57 ± 5	49 ± 5	57 ± 5
3 µM CBD + AM630	61 ± 5	48 ± 4	64 ± 5
3 µM CBD + AM251 + AM630	57 ± 6	47 ± 5	54 ± 4
3 µM CBD + Capsazepin	72 ± 7	53 ± 4	56 ± 4
n-Zahl	5 (x5)	4 (x5)	4 (x5)

Tab. 8-6: Viabilität der mit Rezeptorantagonisten inkubierten Tumorzellen

	A549	H460	HROBML03
Vehikel	100 ± 1	100 ± 2	100 ± 1
AM251	120 ± 4	101 ± 2	94 ± 3
AM630	117 ± 3	98 ± 1	100 ± 2
AM251 + AM630	119 ± 5	100 ± 2	99 ± 2
Capsazepin	115 ± 5	101 ± 2	102 ± 2
n-Zahl	3 (x5)	3 (x5)	3 (x5)

Tab. 8-7: Viabilität CBD-behandelter Tumorzellen parallel zum Zytotoxizitätsassay mit dem LFA-1-Antikörper

	A549	H460	HROBML03
Vehikel	100 ± 1	100 ± 2	100 ± 1
3 µM CBD	64 ± 5	54 ± 4	49 ± 4
n-Zahl	5 (x5)	5 (x5)	5 (x5)

Tab. 8-8: Viabilität von MA-, THC-, JWH133- bzw. WIN55,212-2-stimulierten Tumorzellen

	A549	H460	HROBML03
Vehikel	100 ± 2	100 ± 1	100 ± 2
3 µM MA	94 ± 2	79 ± 2	95 ± 3
3 µM THC	113 ± 3	74 ± 4	86 ± 2
3 µM JWH133	105 ± 3	99 ± 2	93 ± 3
3 µM WIN55,212-2	81 ± 5	88 ± 3	88 ± 4
n-Zahl	6 (x5)	8 (x5)	4 (x5)

Tab. 8-9: Viabilität ICAM-1 siRNA-transfizierter und MA-behandelter Tumorzellen

	A549	H460	HROBML03
Vehikel	100 ± 1	100 ± 3	100 ± 1
3 µM MA	94 ± 2	85 ± 4	102 ± 2
ICAM-1 siRNA	98 ± 2	100 ± 2	92 ± 2
3 µM MA + ICAM-1 siRNA	101 ± 2	78 ± 4	103 ± 3
non siRNA	103 ± 3	87 ± 3	91 ± 2
3 µM MA + non siRNA	107 ± 2	79 ± 3	106 ± 4
n-Zahl	3 (x5)	3 (x5)	3 (x5)

Tab. 8-10: Viabilität ICAM-1 siRNA-transfizierter und THC-behandelter Tumorzellen

	A549	H460	HROBML03
Vehikel	100 ± 2	100 ± 1	100 ± 2
3 µM THC	102 ± 3	90 ± 3	94 ± 2
ICAM-1 siRNA	99 ± 2	97 ± 6	103 ± 3
3 µM THC + ICAM-1 siRNA	102 ± 3	93 ± 5	96 ± 2
non siRNA	98 ± 2	105 ± 4	99 ± 2
3 µM THC + non siRNA	97 ± 2	98 ± 2	108 ± 3
n-Zahl	3 (x5)	3 (x5)	3 (x5)

Tab. 8-11: Viabilität CBD-, MA- und THC-behandelter BEAS-2B-Zellen

	CBD	MA	THC
Vehikel	100 ± 1	100 ± 1	100 ± 1
0,001 µM	94 ± 1	-	-
0,01 µM	92 ± 1	-	-
0,1 µM	92 ± 1	-	-
1 µM	103 ± 2	99 ± 2	104 ± 2
3 µM	83 ± 6	106 ± 2	99 ± 8
n-Zahl	6 (x5)	6 (x5)	6 (x5)

Tab. 8-12: Viabilität AA-5HT-behandelter und mit Rezeptorantagonisten präinkubierter Tumorzellen

	A549	H460	HROBML03
Vehikel	100 ± 1	100 ± 1	100 ± 2
10 µM AA-5HT	48 ± 2	41 ± 1	40 ± 2
10 µM AA-5HT + AM251	45 ± 2	36 ± 1	33 ± 1
10 µM AA-5HT + AM630	48 ± 3	33 ± 2	32 ± 2
10 µM AA-5HT + AM251 + AM630	40 ± 1	29 ± 1	28 ± 1
10 µM AA-5HT + Capsazepin	52 ± 2	41 ± 2	39 ± 1
n-Zahl	3 (x5)	3 (x5)	3 (x5)

Tab. 8-13: Viabilität AEA-behandelter und mit Rezeptorantagonisten präinkubierter Tumorzellen

	A549	H460	HROBML03
Vehikel	100 ± 1	100 ± 1	100 ± 1
10 µM AEA	56 ± 2	67 ± 2	72 ± 3
10 µM AEA + AM251	40 ± 2	47 ± 3	53 ± 4
10 µM AEA + AM630	46 ± 1	68 ± 3	67 ± 5
10 µM AEA + AM251 + AM630	37 ± 2	49 ± 4	55 ± 5
10 µM AEA + Capsazepin	55 ± 2	68 ± 2	73 ± 4
n-Zahl	3 (x5)	3 (x5)	3 (x5)

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei allen Personen bedanken, die diese Dissertation ermöglicht oder mich bei deren Erstellung unterstützt haben:

Zunächst danke ich Herrn Prof. Dr. Burkhard Hinz für die Bereitstellung des interessanten Themas und die Möglichkeit der praktischen Bearbeitung sowie für die wissenschaftliche Betreuung und Unterstützung.

Vielen Dank an Frau Prof. Dr. Birgit Piechulla für die Betreuung meiner Doktorarbeit seitens der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät.

Ein Dankeschön geht an Herrn Dr. Robert Ramer für die praktische und wissenschaftliche Mitbetreuung der Arbeit und für seine stetige Bereitschaft, offene Fragen zu diskutieren.

Darüber hinaus danke ich Herrn PD Dr. Michael Linnebacher für die Bereitstellung der Gehirnmastasenzellen der Lungenkrebspatienten und Frau Dr. Katrin Manda für die Bereitstellung der BEAS-2B-Zellen. Zudem geht ein Dank an Herrn Prof. Dr. Volker Kiefel und die Arbeitsgruppe für Transfusionsmedizin für die Bereitstellung der Buffy Coats.

Ich bedanke mich weiterhin bei allen anderen ehemaligen und derzeitigen Mitarbeitern des Instituts für Toxikologie und Pharmakologie für das sehr angenehme Arbeitsklima, die gute Zusammenarbeit und jegliche Diskussions- und Hilfsbereitschaft.

Ein besonderes Dankeschön geht an meine Familie und meinen Freund Stefan. Durch ihre Unterstützung, Motivation und Geduld gaben sie mir während der gesamten Zeit den nötigen Rückhalt und trugen zum Gelingen dieser Arbeit bei.

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, Maria Haustein, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt und ohne fremde Hilfe verfasst habe, keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Rostock, den 20. Oktober 2014

Maria Haustein