Aus dem Institut für Toxikologie und Pharmakologie der Universitätsmedizin Rostock

Direktor: Prof. Dr. rer. nat. Burkhard Hinz

Hemmung der Tumorangiogenese durch Cannabinoide via Hochregulation des Tissue inhibitor of matrix metalloproteinases-1

Inauguraldissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin

der Universitätsmedizin Rostock

vorgelegt von

Sascha Fischer, geb. am 15.12.1981 in Berlin,

aus Rostock

Rostock, den 30.03.2015

urn:nbn:de:gbv:28-diss2015-0176-0

Gutachter:

1. Gutachter:
   Prof. Dr. Burkhard Hinz
   Institut für Toxikologie und Pharmakologie, Universitätsmedizin Rostock

2. Gutachter:
   Prof. Dr. Karin Kraft
   Lehrstuhl für Naturheilkunde, Universitätsmedizin Rostock

3. Gutachter:
   Prof. Dr. Bernhard Rauch
   Institut für Pharmakologie, Universitätsmedizin Greifwald

Datum der Einreichung: 30. März 2015

Datum der Verteidigung: 13. Oktober 2015

Teile dieser Arbeit wurden unter dem Titel „Cannabinoids inhibit angiogenic capacities of endothelial cells via release of tissue inhibitor of matrix metalloproteinases-1 from lung cancer cells“ in *Biochemical Pharmacology* 91 (2014); 202-216 publiziert.

Thesen

Die Hemmung der Neovaskularisierung von Tumoren ist ein Mechanismus der Tumor-regressiven Wirkung von Cannabinoiden. Die genaue Funktionsweise dieses Mechanismus ist Gegenstand derzeitiger Forschung. Die vorliegende Arbeit untersucht den Einfluss von Cannabinoiden auf die Kommunikation zwischen Tumor- und Endothelzellen sowie deren funktionellen Einfluss auf die Tumorangiogenese. Hierfür wurden verschiedene für die Angiogenese wichtige Verhaltensmuster von Endothelzellen aus humanen Umbilikalvenen (HUVEC) untersucht. Die Migration der Gefäßzellen wurde mittels modifiziertem Boyden-Chamber-Assay getestet. Die Fähigkeit, geschlossene tubuläre Strukturen zu bilden, wurde mit einem zweidimensionalen Tubulogenese-Assay untersucht. Die Quantifizierung der zellulären Viabilität erfolgte mittels eines kolorimetrischen Tests (WST-1-Test).

Konditionierte Medien (KM) der Lungentumor-Zelllinie A549, die für 48 Stunden mit den Cannabinoiden Cannabidiol, Δ^9-Tetrahydrocannabinol, R(+)-Methanandamid oder JWH-133 (jeweils 3 µM) inkubiert wurde, führten sowohl zu einer Verringerung der Migration der Endothelzellen als auch zu einer Abnahme der Tubulogenese im Vergleich zu KM von Vehikel-behandelten Tumorzellen. Die Beteiligung von Cannabinoid-Rezeptoren bzw. des *transient receptor potential vanilloid 1* (TRPV1) an der antimigrativen Wirkung der Cannabinoide konnte durch den Einsatz entsprechender Rezeptor-Antagonisten gezeigt werden. Ein kausaler Zusammenhang zwischen der Abnahme der HUVEC-Migration und der Cannabinoid-induzierten Expression des *Tissue inhibitor of matrix metalloproteinases-1* (TIMP-1) bzw. seines Upstream-Regulators *Intercellular Adhesion Molecule-1* wurde mit Hilfe von siRNA-Versuchen nachgewiesen. In Übereinstimmung mit diesen Befunden führte exogen zugeführtes rekombinantes TIMP-1 ebenso zu einer Hemmung der Migration von HUVEC.

Bei einer direkten Exposition von HUVEC mit Cannabinoiden war ein vergleichbarer Hemm-Effekt nicht zu beobachten. Durch analoge Experimente mit Tumorzellen anderer Zelllinien (H460, H358) konnte jedoch der indirekte antimigrative Effekt aller getesteten Cannabinoide bestätigt werden.

Zusammenfassend weisen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit darauf hin, dass die Cannabinoid-induzierte TIMP-1-Freisetzung aus Lungentumorzellen einen entscheidenden Faktor bei der Kommunikation zwischen Tumor- und Endothelzellen darstellt, der letztlich zu einer Hemmung proangiogener Eigenschaften von Endothelzellen im Mikromilieu von Tumoren führen könnte.

Meinen lieben Eltern

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung 1

1.1 Tumorerkrankungen - statistische Aspekte 1

1.2 Tumorerkrankungen - Säulen der Therapie 2

1.3 Vaskulogenese und Angiogenese 4

1.4 Tumorangiogenese 5

1.5 Cannabinoide und ihre Rezeptoren 8

1.5.1 Cannabinoide 8

1.5.2 Endocannabinoide 9

1.5.3 Cannabinoid-Rezeptoren 9

1.5.4 TRPV1 11

1.6 Cannabinoide und antitumorigene Effekte 12

1.7 *In vivo*-Einflüsse von Cannabinoiden auf Angiogenese 13

1.8 Direkte Effekte von Cannabinoiden auf Endothelzellen 14

1.9 Regulation pro- und antiangiogener Faktoren durch Cannabinoide 16

1.10 Matrix-Metalloproteinasen und Tumorprogression 17

1.11 Tissue inhibitor of matrix metalloproteinases-1 (TIMP-1) 18

1.12 Intercellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1) 19

1.13 Zielsetzung dieser Arbeit 20

2 Material und Methoden 21

2.1 Material 21

2.1.1 Zelllinien 21

2.1.2 Zellkulturmedium 21

2.1.3 Antikörper 22

2.1.4 Oligonukleotide 22

2.1.5 Puffer und Lösungen 24

2.1.6 Chemikalien 27

2.1.7 Verbrauchsmaterialien 29

2.1.8 Geräte 29
2.1.9 Software 30
2.2 Zellbiologische Methoden 30
2.2.1 Kultivierung von Zellen 30
2.2.2 Stimulation von Zellen 33
2.2.3 Transfektion mit siRNA 34
2.2.4 Vorinkubation der A549-Zellen mit Rezeptorantagonisten 35
2.2.5 Migrations-Assay mit konditionierten Medien (indirekte Stimulation) 37
2.2.6 Migrations-Assay mit unkonditionierten Medien (direkte Stimulation) 38
2.2.7 Viabilitäts-Assay mit konditionierten Medien (indirekte Stimulation) 39
2.2.8 Viabilitäts-Assay mit unkonditionierten Medien (direkte Stimulation) 39
2.2.9 Tube Formation Assay 40
2.2.10 Stimulation der HUVEC mit rekombinantem TIMP-1 41
2.2.11 WST-1-Test 42
2.3 Proteinbiochemische Methoden 43
2.3.1 Lyse von Zellen 43
2.3.2 Proteinbestimmung 43
2.3.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese 44
2.3.4 Western Blot 45
2.3.5 Immundetektion und Chemilumineszenz-Analyse 45
2.3.6 Strippen von Membranen 47
2.3.7 Auswertung und Statistik 47
3 Ergebnisse 48
3.1 Direkter Effekt von Cannabinoiden auf das angiogene Verhalten von HUVEC 48
3.2 Einfluss konditionierter Medien von Cannabinoid-stimulierten Tumorzellen auf das angiogene Verhalten von HUVEC 50
3.3 Involvierung von Cannabinoid-Rezeptoren und TRPV1 in den antimigratorischen Effekt von Cannabinoiden 54
3.4 Untersuchung des angiogenen Verhaltens von HUVEC unter dem Einfluss von rekombinantem TIMP-1 56

3.5 Knockdown von TIMP-1 in Cannabinoid-behandelten A549-Zellen 58

3.6 Knockdown von ICAM-1 in Cannabinoid-behandelten A549-Zellen.....60

3.7 Untersuchung des angiogenen Verhaltens von HUVEC unter Verwendung konditionierter Medien anderer Lungentumor-Zelllinien.....62

3.8 Untersuchung des angiogenen Verhaltens von HUVEC unter Verwendung konditionierter Medien von Nicht-Tumor-Bronchialepithelzellen 64

4 Diskussion..... 66

5 Zusammenfassung und Ausblick..... 71

6 Literaturverzeichnis..... 72

7 Abbildungsverzeichnis..... 81

8 Tabellenverzeichnis..... 82

9 Abkürzungsverzeichnis..... 83

10 Danksagung..... IV

11 Selbstständigkeitserklärung..... V

1 Einleitung

1.1 Tumorerkrankungen - statistische Aspekte

Einer Schätzung des Zentrums für Krebsregisterdaten (ZfKD) am Robert-Koch-Institut (RKI) zufolge wurden für das Jahr 2014 501.000 neu auftretende Krebserkrankungen prognostiziert. Trifft diese Prognose zu, so stellt dies einen erneuten Anstieg der Inzidenz neoplastischer Erkrankungen in Deutschland dar (www.rki.de). Im Jahr 2010 wurden laut ZfKD-Schätzungen in Deutschland rund 477.300 Krebserkrankungen erstmalig diagnostiziert. Zwischen den Jahren 2000 und 2010 nahm demnach die Zahl der Krebsneuerkrankungen in Deutschland bei Männern um insgesamt 21% und bei Frauen um insgesamt 14% zu (Krebs in Deutschland 2009/2010, ZfKD 9.2013). Neoplastische Erkrankungen stellen diesen statistischen Daten zufolge nach Herz-Kreislauf-Erkrankungen die zweithäufigste Todesursache in Deutschland dar. Global betrachtet belegen laut Schätzungen der Welt-Gesundheits-Organisation (*World Health Organization*, WHO) zufolge Krebserkrankungen den ersten Rang in der Todesursachenstatistik. Bis 2030 erwartet die WHO eine Verdopplung der Zahl der an Krebserkrankungen Verstorbenen (http://www.euro.who.int/en/health-topics/noncommunicable-diseases/cancer; Freimuth et al., 2010). Nach Berechnungen des Statistischen Bundesamtes steht bei Männern im Alter von 65 Jahren oder älter das Lungenkarzinom an dritter Stelle der zehn häufigsten Todesursachen. Das Prostata- und Kolonkarzinom stehen hierbei an Rang sechs und sieben. Die siebthäufigste Todesursache für Frauen ab 65 Jahren und älter ist das Mammakarzinom. Die Absolutzahl der Sterbefälle an Neoplasien im Alter von 65 und mehr Jahren stieg von 1980 bis 2009 um 17%. Unter Berücksichtigung des demografischen Wandels zeigt die davon bereinigte altersstandardisierte Sterbeziffer der über 65-jährigen allerdings eine sinkende Tendenz der Sterblichkeit bei gleichzeitig steigendem Sterbealter der an Neoplasien Erkrankten (Deutsches Zentrum für Altersfragen, *report altersdaten,* Heft 1-2/2011). Ungeachtet dieser Tatsache wird der demografische Wandel und die damit verbundene Alterung der Bevölkerung weiterhin ein entscheidender Risikofaktor für das Entstehen neoplastischer Erkrankungen sein und somit das gesamte Gesundheitswesen vor große Herausforderungen stellen, denn neben Lebensstil, umweltbedingten Belastungen und genetischen Einflüssen gilt auch das Lebensalter als Risikofaktor für die Entstehung von Krebserkrankungen (Deutsches Zentrum für Altersfragen, *report altersdaten,* Heft 1-2/2011, S. 26).

1.2 Tumorerkrankungen - Säulen der Therapie

Grundsätzlich baut die Therapie neoplastischer Erkrankungen auf drei Säulen auf. Hierzu gehören operative Verfahren, Strahlentherapie und medikamentöse Therapie (sog. Chemotherapie).

Ziel einer operativen Therapie, die mittlerweile häufig auch mit weniger invasiven Methoden wie Laserchirurgie oder Endoskopie (sog. Schlüssellochchirurgie) durchführbar ist, ist es, eine Heilung durch komplette Entfernung des Tumors zu erreichen. Als geheilt gilt ein/e Patient/in dann, wenn innerhalb von fünf Jahren nach der operativen Entfernung kein Rezidiv aufgetreten ist. Wie hoch das Risiko für ein Rezidiv ist, hängt neben der Tumorentität vom *Grading* und *Staging* ab. *Grading* ist ein histopathologischer Begriff und erlaubt eine Beurteilung über den Grad der Differenzierung des neoplastischen Gewebes. Die *Union Internationale Contre le Cancer* (UICC) unterteilt Tumorgewebe in vier Kategorien beginnend von Grad 1 gut differenziert bis Grad 4 entdifferenziert. Diese Einteilung ermöglicht es einzuschätzen, inwieweit das Tumorgewebe noch dem physiologischen Gewebe ähnelt. Unter *Staging* versteht man die Einteilung der Tumorerkrankung in Schweregrade. Hierbei kommt die sog. TNM-Klassifikation zum Einsatz: Diese Einteilung ermöglicht es, den Schweregrad mehrdimensional zu betrachten und berücksichtigt dabei die Merkmale Tumorgröße und Infiltrationstiefe des Primärtumors (T), Lymphknotenstatus (N, *Nodus lymphaticus* lat. für Lymphknoten) und Metastasierung (M). Das *Grading* und auch das *Staging* sind einerseits prognostische Größen, aber auch wichtige Parameter für die Therapieentscheidung. So kann es beispielsweise sinnvoll sein, vor operativen Eingriffen die Tumorgröße durch das Miteinbeziehen von Bestrahlung und/oder Chemotherapie in das Therapieregime zu reduzieren (*Down-sizing*). Man spricht dann von neoadjuvanter Therapie. Andererseits ist es auch möglich, nach erfolgter Operation Bestrahlung und/oder Chemotherapie einzusetzen, um eventuell verbliebenes Resttumorgewebe oder auch nur vereinzelte Tumorzellen zu zerstören. Man spricht in diesem Fall von adjuvanter Therapie. Ein Beispiel für die adjuvante Therapie ist die Bestrahlung des Operationsgebietes nach brusterhaltender Therapie des Mammakarzinoms (Deutsche Krebsgesellschaft, 2014).

Die Strahlentherapie ist, wie auch die operative Therapie, primär auf Heilung der Tumorerkrankung ausgerichtet, kann aber auch in Kombination mit einer oder beiden anderen Säulen zur Anwendung kommen. Je nach angewendetem Verfahren kommen sowohl elektromagnetische als auch Teilchenstrahler zum Einsatz. Durch gezielte perkutane oder interstitielle Bestrahlung soll das Erbgut der malignen Zellen so geschädigt werden, dass sie nicht mehr teilungsfähig sind und so das Tumorgewebe in seinem Progress aufgehalten wird. Eine große Herausforderung liegt hierbei in der Schonung des gesunden Gewebes (Deutsche Krebsgesellschaft, 2014).

Chemotherapeutika oder auch Zytostatika genannt greifen in den Vermehrungszyklus maligner Zellen ein. Zahlreiche heute verfügbare Wirkstoffklassen wirken modulierend auf verschiedene Bereiche des Zellzyklus ein. Deshalb sind Zytostatika besonders wirksam gegen Tumorzellen mit kurzer Verdopplungszeit, also kurzen Intervallen zwischen den Zellteilungszyklen. Zytostatika sind sowohl intravenös als auch peroral applizierbar und somit systemisch wirksam. Der Vorteil liegt hierbei darin, dass man im Idealfall auch Regionen erreicht, die der Chirurgie oder Strahlentherapie nicht oder nur schwer zugänglich sind. Nachteile der zytostatischen Therapie ergeben sich direkt aus der Wirkweise der Medikamente. Zytostatika wirken auch auf Zellen gesunden Gewebes, vorausgesetzt sie sind teilungsfähig. Besonders davon betroffen sind Zellen der Mucosa, der Haarwurzeln und des Knochenmarks. Die sich daraus ergebenden unerwünschten Arzneimittelwirkungen (UAW) sind Immunsuppression und erhöhte Blutungsneigung durch Knochenmarksdepression, Mucositis, Stomatitis, Diarrhö, Übelkeit und Erbrechen, Haarausfall und Hautveränderungen sowie viele andere teilweise wirkstoffspezifische UAW. Insbesondere Antiemetika kommen im Rahmen der sog. supportiven Therapie bereits vor Beginn einer Chemotherapie zum Einsatz. Die Entwicklung von Arzneimitteln, die spezifisch am Ort des Tumorwachstums wirken, um so die Rate der UAW zu minimieren, ist nach wie vor Gegenstand der Forschung (Deutsche Krebsgesellschaft, 2014). Ein weiterer Nachteil der zytostatischen Therapie ist die Bildung von Resistenzen der Tumorzellen gegenüber den eingesetzten Präparaten. Der erste beschriebene Mechanismus ist auf Modulationen der membranständigen Effluxpumpe MDR1/P-Glykoprotein zurückzuführen (Kartner et al., 1983). Dieses Protein, das u.a. physiologisch wichtige Funktionen auf Zellen der Blut-Hirn-Schranke, der Leber und der Niere erfüllt, wird auch von Tumorzellen in unterschiedlichem Ausmaß exprimiert und ist fähig, Verbindungen im Sinne eines Effluxes aktiv aus dem Intrazellularraum zu entfernen. Andere Resistenzmechanismen basieren beispielsweise auf Mutationen an der Effektorstruktur oder vermehrter Bildung von DNA-Reparaturenzymen (Lage und Kellner, 2013). Um Resistenzbildungen möglichst schon vor Therapiebeginn zu verhindern bzw. während laufender Therapien entgegenzuwirken, werden heute Zytostatika mit möglichst verschiedenartigen Wirkmechanismen kombiniert (Lage und Kellner, 2013; Deutsche Krebsgesellschaft, 2014).

Insgesamt steht der heutigen Medizin eine vergleichsweise breite Palette an therapeutischen Möglichkeiten im Kampf gegen Krebserkrankungen zur Verfügung. Allerdings ist es vor allem im Hinblick auf die genannten Nachteile der medikamentösen Behandlung erstrebenswert, durch weitere Forschung neue und verbesserte Pharmaka zu entwickeln, die spezifischer und damit nebenwirkungsärmer wirken. Darüber hinaus scheinen neue Therapieansätze oder die Verbesserung der bestehenden unbedingt notwendig. Dieser Umstand wird deutlich bei Betrachtung der relativen Gesamtüberlebensrate aller Krebserkrankungen in den Jahren

2009 - 2010 bezogen auf fünf Jahre nach Diagnosestellung, welche für Männer bei 61% und für Frauen bei 67% lag (Zentrum für Krebsregisterdaten, RKI, 2014).

1.3 Vaskulogenese und Angiogenese

Um dem Organismus eine ausreichende Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen zu gewährleisten, ist die Ausbildung eines adäquaten Blutgefäßsystems essenziell. Grundsätzlich können zwei Mechanismen, die an der Entstehung von Gefäßen beteiligt sind, unterschieden werden. Als Vaskulogenese wird jener Prozess bezeichnet, bei dem aus endothelialen Progenitorzellen, den sog. Angioblasten, ein primitives Gefäßgeflecht entsteht. Dieser Prozess spielt insbesondere in der embryonalen Entwicklung eine Rolle. Angiogenese beschreibt die Entstehung bzw. Ausdifferenzierung weiterer Gefäße aus bereits bestehenden Gefäßen. Wundheilungen, Menstruation und Ovulation sind Beispiele für physiologische Prozesse, bei denen Angiogenese eine wichtige Rolle spielt (Risau, 1997). Auch pathologische Zustände wie beispielsweise Durchblutungsstörungen, rheumatoide Arthritis, Retinopathien sowie die Entstehung von Krebserkrankungen werden durch Angiogenese begleitet (Carmeliet und Jain, 2000). Anhand dieser Beispiele wird deutlich, dass Angiogenese, pharmakologisch betrachtet, zwei therapeutisch gegensätzliche Strategien liefert: proangiogene Therapeutika zur Behandlung von Durchblutungsstörungen (Zhou et al., 2007) einerseits und antiangiogene Pharmaka zur Behandlung von Krebserkrankungen, diabetischer Retinopathie, Hämangiomen, Arthritis, Psoriasis, Atherosklerose (Quesada et al., 2006), chronisch granulomatöser Entzündungen (Filippis et al., 2010), fibrotischer Erkrankungen (Reichenbach et al., 2012) und Leberzirrhose (Huang et al., 2012) andererseits. Zwei Mechanismen werden bei der Angiogenese unterschieden: Bei der sprossenden Angiogenese (*sprouting angiogenesis*) kommt es durch proteolytischen Abbau der Extrazellulärmatrix (EZM) und Invasion sowie Proliferation von Endothelzellen entlang eines chemotaktischen Gradienten schließlich zur Formation und Ausreifung eines Gefäßlumens. Die nicht-sprossende Angiogenese (*Intussusception*) ist gekennzeichnet durch eine Teilung bestehender Gefäße in Längsrichtung. Zwei sich gegenüberliegende Endothelflächen stülpen sich ein und bilden so ein neues Gefäßlumen (Carmeliet, 2003). Mehrere Arbeiten konnten bereits belegen, dass Angiogenese einen multifaktoriellen Prozess darstellt, an dem viele verschiedene proangiogene als auch antiangiogene Modulatoren beteiligt sind (Risau, 1997; Carmeliet und Jain, 2000). Tabelle 1 gibt einen Überblick über ausgewählte pro- und antiangiogene Faktoren.

Tab. 1: Auswahl pro- und antiangiogener Modulatoren (Übersicht in Bergers und Benjamin, 2003)

Modulator	
angiogen	**antiangiogen**
Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)	Thrombospondin-1
Fibroblast Growth Factor (FGF)	Angiostatin
Platelet-derived Growth Factor (PDGF)	Endostatin
Epidermal Growth Factor (EGF)	Canstatin
Lysophosphatidsäure (LPA)	Tumstatin

1.4 Tumorangiogenese

Vor mehr als 40 Jahren konnte bereits belegt werden, dass das Wachstum solider Tumoren mit der Neuausbildung von Gefäßstrukturen und dem damit verbundenen Anschluss an das bestehende Blutgefäßsystem assoziiert ist (Folkman, 1971). Diese Vaskularisierung des Tumorgewebes ist bereits ab Tumorvolumina von nur wenigen mm³ (1 – 2 mm^3) notwendig. Ohne sie ist das neoplastische Gewebe auf die Versorgung durch Diffusion angewiesen, was einen beschränkenden Faktor für das weitere Wachstum des Tumors darstellt. In Autopsiestudien konnte gezeigt werden, dass in den Körpern vieler Menschen, die zu Lebzeiten weder die Diagnose Krebs erhielten noch an Symptomen einer Tumorerkrankung litten, in unterschiedlichsten Organen Neoplasien in mikroskopischen Größenordnungen zu finden waren (Folkman, 1971). Verharrt das Wachstum der Tumorzellen in einem stillen Stadium, spricht man vom sog. ruhenden Tumor (*tumor dormancy*). Hierbei handelt es sich um ein Gleichgewicht aus proliferativem und apoptotischem Verhalten der Tumorzellen, das maßgeblich über angiogene und antiangiogene Faktoren reguliert wird (siehe Tabelle 1). Dieser Zustand kann über Jahre anhalten bis das Gleichgewicht in Richtung Angiogenese kippt und es zu einem Überwiegen angiogener Modulatoren kommt. Man spricht dann vom sog. angiogenen Wechsel (*angiogenic switch*). Dieser Schritt ist entscheidend für das exponentielle Wachstum neoplastischer Zellen. Wann es zu einem Übergang von *tumor dormancy* hin zur Angiogenese kommt, ist abhängig von der jeweiligen Tumorentität und den Umgebungsbedingungen des neoplastischen Gewebes (Carmeliet und Jain, 2000; Bergers und Benjamin, 2003). Zu den auslösenden Faktoren für den *angiogenic switch* werden u.a. metabolischer Stress durch Hypoxie, Hypoglykämie oder ein erniedrigter pH-Wert, mechanischer Stress durch entstehenden Druck proliferierender Zellen, aber auch entzündliche Prozesse gezählt (Carmeliet und Jain, 2000). Tumorzellen antworten auf Zustände wie Hypoxie oder Hypoglykämie mit einer vermehrten Sekretion proangiogener Faktoren wie z.B. dem *vascular endothelial growth factor* (VEGF), der durch seine Bindung an endotheliale Rezeptor-Tyrosinkinasen die Neovaskularisierung fördert (Ferrara et al., 2003).

Der Aufbau des Gefäßnetzes um und in das Tumorgewebe ist vergleichsweise chaotisch. Aus unebenen Gefäßlumina, ungleichmäßigen Gefäßdurchmessern, teils stark dilatierten und extrem gewundenen Gefäßästen resultieren lokal massive Unterschiede in der Durchblutung und somit auch in der Nähr-/ Sauerstoffversorgung des Tumorgewebes (Dvorak et al., 1995; Chang et al., 2000). Nicht nur das Gefäßgeflecht in seiner Gesamtheit, auch die Gefäßwände im Einzelnen weisen Besonderheiten im Vergleich zur physiologischen Angiogenese auf. Vergrößerte interendotheliale Abstände, Gefäßlöcher (Fensterendothel) und unfertige Basalmembranen führen ebenfalls zu ungleichmäßiger und teilweise inadäquater Durchblutung. In der Summe entstehen so innerhalb des Tumors immer wieder Inseln aus nekrotischem Gewebe aufgrund von Hypoxie und Hypoglykämie, wodurch in der Folge die Angiogenese zusätzlich induziert wird (Shweiki et al., 1995; Ferrara et al., 2003).

Seitdem Folkman im Jahre 1971 erstmals die Neovaskularisierung des Tumorgewebes als entscheidenden Faktor für die Progression von Tumoren beschrieben hat, existiert die Idee, durch Inhibierung der Angiogenese (Antiangiogenese) ein weiteres therapeutisches Werkzeug – sog. Angiogeneseinhibitoren – in der Therapie von Malignomen zu etablieren. So sind seit einigen Jahren Arzneimittel wie Bevacizumab, Sunitinib, Sorafenib und Pazopanib, deren Ziel die Hemmung der Neovaskularisierung von Tumoren ist, wichtige Bestandteile in der Krebstherapie geworden (Iacovelli et al., 2014). Beispielsweise führte die Behandlung mit Bevacizumab, einem monoklonalen Antikörper gegen VEGF, in verschiedenen Studien zu signifikant verbesserten Überlebensraten bei Patienten und Patientinnen mit metastasierten Nierenkarzinomen (Yang et al., 2003), kolorektalen Karzinomen (Hurwitz et al., 2004), nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom (NSCLC) (Sandler et al., 2006) und Ovarialkarzinomen (Perren et al., 2011).

Auch für Cannabinoide konnten in verschiedenen Studien, sowohl *in vitro* also auch *in vivo*, antiangiogene Effekte nachgewiesen werden. Die genauen Mechanismen, die zur Cannabinoid-induzierten Abnahme des Gefäßwachstums in Richtung Tumorgewebe führen, sind bis heute jedoch noch nicht vollständig aufgeklärt.

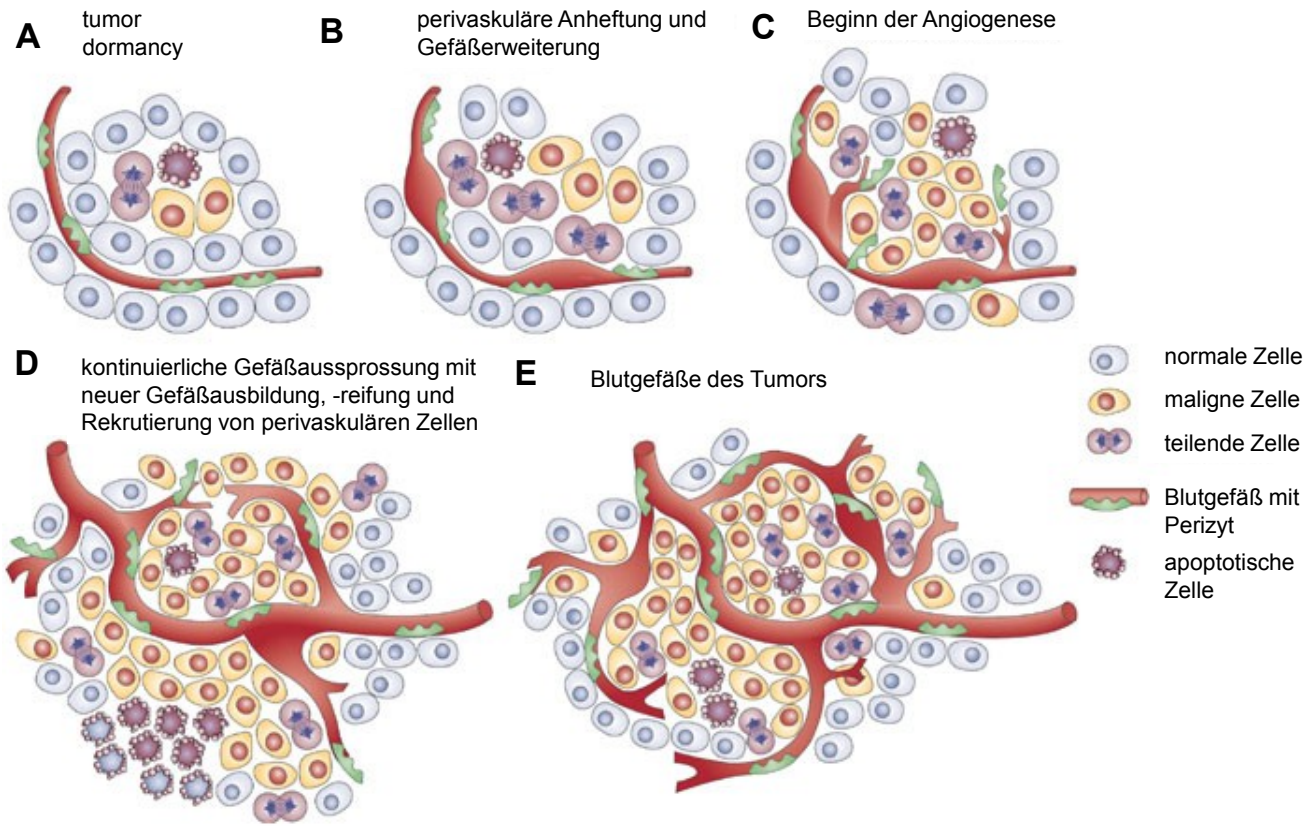

Abb. 1: Schematische Darstellung des angiogenic switch

Der *angiogenic switch* ist ein eigenständiger und entscheidender Schritt in der Entwicklung eines Tumors und kann, abhängig von den Umgebungsbedingungen und der Tumorentität, innerhalb des Tumorgewebes in unterschiedlichen Stadien zu finden sein. In den meisten Fällen entwickeln sich Tumore aus avaskulären Zellhaufen (A). Um ein exponentielles Wachstum der Tumorzellen zu ermöglichen, brauchen die Zellen Anschluss an das Blutgefäßsystem durch Initiierung der Angiogenese bzw. des *angiogenic switch*. Zu Beginn haften sich die Tumorzellen an umliegende Gefäße an und die Gefäße beginnen zu dilatieren (B). Anschließend kommt es zur Gefäßaussprossung (C). Die Gefäße formieren sich und reifen aus. Außerdem werden weitere Tumorzellen um die Gefäße rekrutiert (D). Während des weiteren Wachstums des Tumors bilden sich immer weitere Gefäße, insbesondere in Richtung hypoxischer und nekrotischer Areale innerhalb des Tumorgewebes aus, um die Tumorzellen mit Nährstoffen und Sauerstoff zu versorgen (E) (modifiziert nach Bergers und Benjamin, 2003).

1.5 Cannabinoide und ihre Rezeptoren

1.5.1 Cannabinoide

Cannabis sativa L. (Gewöhnlicher oder auch Echter Hanf) ist eine Nutzpflanze, deren Bestandteile bereits vor mehr als fünftausend Jahren ihren Nutzen in der medizinischen Anwendung oder für religiöse Zwecke fanden (Pertwee, 2006). Etwa 400 verschiedene Verbindungen der Hanfpflanze sind heute bekannt. Die für die Nutzung verwendbaren Inhaltsstoffe des Hanfs gehören zu den sog. Cannabinoiden. Mehr als 80 heute bekannte und pharmakologisch aktive Cannabinoide werden von *Cannabis sativa* in Form sekundärer Verbindungen synthetisiert und als Phytocannabinoide bezeichnet. Dabei handelt es sich um lipophile Phenole, die in Drüsenhaaren akkumulieren (Niesink et al., 2013). Zu den Phytocannabinoiden zählt unter anderem Δ^9-Tetrahydrocannabinol (THC), das Mitte des letzten Jahrhunderts erstmals isoliert wurde und zu den stärksten psychoaktiven Wirkstoffen der Cannabispflanze zählt (Gaoni et al., 1964; Piomelli, 2003; Niesink et al., 2013). Ein nicht-psychoaktives Phytocannabinoid ist Cannabidiol (CBD), das erstmals 1940 von Adams *et al.* isoliert wurde (Adams et al., 1940; Zuardi, 2008). Weitere zur Gruppe der Cannabinoide gehörende Verbindungen sind sowohl synthetische Cannabinoid-Rezeptor-Agonisten wie R(+)-Methanandamid (MA) und JWH-133 als auch –Antagonisten wie AM-251 und AM-630 sowie die vom menschlichen Körper endogen synthetisierten Cannabinoide, die als Endocannabinoide bezeichnet werden (Devane et al., 1992; Mechoulam et al., 1995). Tabelle 2 gibt einen Überblick, über die in dieser Arbeit verwendeten Cannabinoide.

Tab. 2: Überblick über verwendete Cannabinoide (modifiziert nach Freimuth et al., 2010)

Cannabinoid	Abkürzung	Zielprotein	Referenz
Phytocannabinoide			
Cannabidiol	CBD	geringe Affinität zu CB_1- und CB_2-Rezeptoren; TRPV1	Pertwee *et al.*, 2002 Bisogno *et al.*, 2001
Δ^9-Tetrahydrocannabinol	THC	Nichtselektiver Rezeptoragonist (CB_1 und CB_2)	Felder *et al.*, 1995 Bayewitch *et al.*, 1996
synthetische Cannabinoide			
R(+)-Methanandamid	MA	Nichtselektiver Rezeptoragonist ($CB_1 > CB_2$)	Lin *et al.*, 1998
JWH-133	JWH-133	selektiver CB_2-Rezeptoragonist	Huffman *et al.*, 1999

1.5.2 Endocannabinoide

Bereits zwei Jahre nach der Erstbeschreibung des CB_1-Rezeptors gelang es, den ersten endogenen, also von körpereigenem Gewebe synthetisierten, Liganden zu identifizieren. Es handelte sich hierbei um das erstmals in Schweinehirnen nachgewiesene *N*-Arachidonoyl-Ethanolamin (Devane et al., 1992). Aufgrund ihrer cannabisähnlichen Wirkungen und chemischen Eigenschaften nannte man diese Verbindung Anandamid; in Anlehnung an das aus dem Sanskrit stammende Wort für Glückseligkeit „*ananda*“. 1995 konnte ein zweites Endocannabinoid, 2-Arachidonoyl-Glycerol (2-AG), aus Kaninchendärmen isoliert werden. 2-AG war der bis dahin erste endogene Cannabinoid-Rezeptor-Ligand, der in peripherem Gewebe identifiziert werden konnte. (Mechoulam et al., 1995). In beiden Fällen handelt es sich jeweils um lipophile Derivate der Arachidonsäure, die im Bedarfsfall hydrolytisch aus Lipid-Vorläufern vom Körper synthetisiert werden (Piomelli, 2003). Endocannabinoide bilden zusammen mit ihren Rezeptoren das sog. Endocannabinoid-System.

1.5.3 Cannabinoid-Rezeptoren

Im Jahr 1990 wurde erstmals die Existenz eines Cannabinoid-Rezeptors in Rattenhirnen nachgewiesen (Matsuda et al., 1990). Nur drei Jahre später konnte ein weiterer Cannabinoid-Rezeptor auf humanen promyeloischen Leukämiezellen der Linie HL60 identifiziert werden (Munro et al., 1993). Die Nomenklatur der Cannabinoid-Rezeptoren resultiert aus ihrer Affinität zu Cannabinoiden wie THC und anderen synthetischen Analoga. Diese Rezeptoren werden durch die Abkürzung CB beschrieben und in der Reihenfolge ihrer Entdeckung nummeriert. Die derzeit bekannten zwei Typen von Cannabinoid-Rezeptoren werden dementsprechend als CB_1 und CB_2 bezeichnet (Pertwee., 1997; Howlett et al., 2002). In beiden Fällen handelt es sich um Pertussistoxin-sensitive, $G_{i/o}$-Protein gekoppelte Rezeptoren, die ihre Wirkung ersten Erkenntnissen zufolge über die Inhibierung der Adenylatzyklase und Aktivierung der mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK) entfalten (Mackie et al., 1995; Bouaboula et al., 1995; Bouaboula et al., 1996; Howlett et al., 2002; Mackie et al., 2005; Übersicht in Pertwee et al., 2010). Darüber hinaus moduliert der CB_1-Rezeptor, anders als der CB_2-Rezeptor, durch die Aktivierung einwärtsgerichteter Kaliumkanäle (*inwardly rectifying potassium currents*, K_{ir}) und Inaktivierung spannungsabhängiger Kalziumkanäle (*high voltage-activated calcium currents*, I_{ca}) das Membranpotenzial von CB_1-Rezeptor-exprimierenden Zellen und somit die Freisetzung synaptischer Neurotransmitter wie z.B. GABA (*γ-aminobutyric acid*) im zentralen Nervensystem (ZNS) (Mackie et al., 1995; Twitchell et al., 1997; Piomelli, 2003; Pertwee et al., 2010). Über diese Mechanismen beeinflussen Cannabinoid-Rezeptoren nach deren Aktivierung die Gemütslage, Wahrnehmung und das Gedächtnis und kontrollieren

motorische Funktionen (Mackie et al., 1995; Pertwee et al., 2010). CB_1-Rezeptoren sind in hoher Dichte vor allem auf Zellen des ZNS exprimiert. In vergleichsweise hoher Zahl sind sie besonders auf Zellen des Neokortex, des Hippocampus und der Amygdala zu finden. Darüber hinaus verfügen neben den Zellen des peripheren Nervensystems (PNS) auch jene des Knochenmarks, des Herzens, der Lunge, Prostata, Nebenniere und des Hodens über CB_1-Rezeptoren, wenn auch in deutlich geringerer Dichte (Howlett et al., 2002; Pertwee und Ross, 2002; Piomelli, 2003; Mackie et al., 2005). Cannabinoid-Rezeptoren vom Typ 2 werden ebenfalls von Neuronen des ZNS und PNS exprimiert, allerdings in wesentlich geringerem Ausmaß als CB_1-Rezeptoren. Sie sind in erster Linie auf Zellen des Immunsystems zu finden. Hierzu gehören Zellen des Thymus, der Milz und des Knochenmarks ebenso wie Mastzellen, B-Lymphozyten, Makrophagen und natürliche Killerzellen (Galiègue, 1995; Buckley, 2000; Pertwee und Ross, 2002; Jiang et al., 2007). Aufgrund dieser Distribution der CB_2-Rezeptoren wurden in vergangenen Untersuchungen auch immunmodulatorische Effekte durch Beteiligung von Cannabinoid-Rezeptoren, insbesondere vom Typ 2 postuliert (Buckley, 2000). Agonisten für CB_1- und CB_2-Rezeptoren befinden sich heute bereits im klinischen Einsatz. So ist Δ^9-THC als orales Präparat Dronabinol (Marinol®) in den Vereinigten Staaten zur Behandlung der Kachexie bei AIDS-Patienten und zur Therapie der Zytostatika-induzierten Nausea im Rahmen der Krebstherapie als Antiemetikum zugelassen (Pertwee, 1999). In Großbritannien hat Nabilone (Cesamet®), ein Δ^9-THC-Analogon, ebenfalls die Zulassung zur Therapie der Übelkeit im Zusammenhang mit Krebstherapie (Pertwee, 1999). Darüber hinaus findet eine fixe Kombination aus Δ^9-THC und CBD (Sativex®) in der Behandlung von Muskelspasmen und chronischen Schmerzen im Rahmen von Multipler Sklerose Anwendung (Pertwee, 2007). Präklinische Untersuchungen weisen außerdem auf ein therapeutisches Potenzial von Cannabinoid-Rezeptor-Agonisten bei den Indikationen Asthma bronchiale, Krebs und Glaukom hin (Übersicht in Pertwee und Ross, 2002). Beispiele potenzieller therapeutischer Einsatzmöglichkeiten für selektive CB_2-Rezeptor-Agonisten sind in Tabelle 3 aufgeführt (Pertwee und Ross, 2002).

Tab. 3: Beispiele potenzieller therapeutischer Einsatzmöglichkeiten selektiver CB_2-Rezeptor-Agonisten (modifiziert nach Pertwee und Ross, 2002)

Erkrankung bzw. Symptom	Referenz
Neuropathische Schmerzen	van der Stelt *et al.*, 2011; Gijsen *et al.*, 2012
Morbus Parkinson	Little *et al.*, 2011; Fernández-Ruiz *et al.*, 2011
Morbus Huntington	Fernández-Ruiz *et al.*, 2011
Amyotrophe Lateralsklerose	Kim *et al.*, 2006; Shoemaker *et al.*, 2007
Osteoporose	Bab *et al.*, 2009
Entzündliche Darmerkrankungen	Wright *et al.*, 2008; Basu *et al.*, 2011
Diabetische Nephropathie	Barutta *et al.*, 2011

1.5.4 TRPV1

Eine weitere Zielstruktur für Cannabinoide stellt der *transient receptor potential vanilloid 1* (TRPV1) dar. TRPV1 ist ein nichtselektiver Kationenkanal, welcher durch Ligandenbindung oder thermische Reize aktiviert wird und eine wichtige Rolle in der Nozizeption spielt. Der wohl bekannteste Agonist dieses Rezeptors ist das in rotem Pfeffer enthaltene Capsaizin. Dieses bewirkt nach Bindung das typische Gefühl des brennenden Schmerzes sowie der subjektiv empfundenen Erwärmung des Körpers (Tominaga et al., 1998; Bisogno et al., 2001). Im Zusammenhang mit Cannabinoiden findet TRPV1 in der Literatur erstmalig 1999 Erwähnung. In der Arbeit von Zygmunt *et al.* konnte eine Schlüsselrolle von TRPV1 beim vasodilatatorischen Effekt von Anandamid nachgewiesen werden (Zygmunt et al., 1999). In späteren Untersuchungen konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass dieser Rezeptor auch einen modulatorischen Einfluss auf den antihyperalgetischen Effekt des nichtpsychoaktiven Cannabinoids CBD zu haben scheint (Costa et al., 2004). Des Weiteren gibt es Belege für die Beteiligung des TRPV1 an der Hemmung der Proliferation und Invasion neoplastischer Zellen (Ligresti et al., 2006; Ramer und Hinz, 2008; Ramer et al., 2010a; 2012).

1.6 Cannabinoide und antitumorigene Effekte

Antineoplastische Wirkungen von Cannabinoiden wurden erstmals 1975 beschrieben. In diesen Untersuchungen zeigten Lungentumorzellen, die Mäusen implantiert wurden, nach der Behandlung mit Δ^9-THC, Δ^8-THC oder Cannabinol ein verlangsamtes Wachstum (Munson et al., 1975). Trotz dieser schon recht frühen Erkenntnis kommen Cannabinoide bislang in der Krebstherapie lediglich zur Schmerzbehandlung oder in der Therapie Zytostatika-bedingter Nebenwirkungen wie Übelkeit und Erbrechen (siehe Kapitel 1.5.3) zum Einsatz. Die Entdeckung der Tumor-regressiven Wirkung von Cannabinoiden auf Glioblastome durch die Gruppe von Manuel Guzman (Galve-Roperh et al., 2000) führte bis heute zu einer Vielzahl von Folgearbeiten, die eine systemische Antitumorwirkung von Cannabinoiden *in vitro* und *in vivo* nachweisen konnten (Übersicht in Freimuth et al., 2010; Velasco et al., 2012). Der klinische Einsatz von Cannabinoiden ist vor allem durch deren psychoaktive Wirkung limitiert. Aus diesem Grund sind in den letzten Jahren immer mehr nicht-psychoaktive Verbindungen wie CBD ins Zentrum des wissenschaftlichen Interesses gerückt. Hinsichtlich der tierexperimentellen Befunde antitumorigener Eigenschaften der Cannabinoide, konnten zahlreiche Arbeiten der letzten Jahre Tumor-regressive Wirkungen in verschiedenen Tumorentitäten bestätigen. Hierzu gehören Phäochromozytome (Sarker et al., 2000), Gliome (Galve-Roperh et al., 2000; Sánchez et al., 2001), Epitheliome der Schilddrüse (Bifulco et al., 2001), Lymphome (McKallip et al., 2002), Karzinome der Haut (Casanova et al., 2003), Prostatakarzinome (Nithipatikom et al., 2004), leukämische Tumore (McKallip et al., 2006), Mammakarzinome (McAllister et al., 2007; Qamri et al., 2009), Rhabdomyosarkome (Oesch et al., 2009), Zervixkarzinome (Ramer und Hinz, 2008; Ramer et al., 2010a), cholangiozelluläre Karzinome (Leelawat et al., 2010), nicht-kleinzellige Lungenkarzinome (Ramer et al., 2012) und hepatozelluläre Karzinome (Pourkhalili et al., 2013). Neben den Einflüssen auf das Wachstum von Tumorzellen und der Induktion proapoptotischer Faktoren werden heute auch andere antitumorigene Mechanismen von Cannabinoiden diskutiert und erforscht. Mittlerweile bekannte Mechanismen der Tumorregression durch Cannabinoide sind antiinvasive (Nithipatikom et al., 2004), antimigrative (Casanova et al., 2003), antiadhäsive und antimetastatische (Portella et al., 2003) Eigenschaften (Übersicht in Freimuth et al., 2010). Ein weiterer beschriebener Mechanismus ist die Hemmung der Neovaskularisierung von Tumorgeweben (Blázquez et al., 2003; Casanova et al., 2003). Dieser Effekt wurde in experimentellen Studien mit Tumoren von Gliomzellen (Blázquez et al., 2003), Haut- (Casanova et al., 2003), Kolon- (Kogan et al., 2006) und Lungenkrebszellen (Preet et al., 2008; Ramer et al., 2013) beschrieben. Diese antiangiogenen Eigenschaften von Cannabinoiden scheinen in kausalem Zusammenhang mit der Herunterregulation verschiedener proangiogener Proteine wie Angiopoietin-2, dem Plazenta-Wachstums-Faktor (*placental growth factor*, PlGF) oder dem

vascular endothelial growth factor (VEGF) zu stehen. Von allen diesen Proteinen ist bekannt, an der Neovaskularisierung von Tumorgeweben beteiligt zu sein (Blázquez et al., 2003; Casanova et al., 2003; Portella et al., 2003; Blázquez et al., 2004). In den folgenden Kapiteln soll auf den Zusammenhang zwischen Cannabinoiden und Angiogenese näher eingegangen werden (siehe Kapitel 1.7-1.9).

1.7 *In vivo*-Einflüsse von Cannabinoiden auf Angiogenese

Antiangiogene Effekte von Cannabinoiden konnten *in vivo* bereits in verschiedenen Untersuchungen unter Verwendung von Tumorzell-Xenografts von sowohl immundefizienten als auch immunkompetenten Tieren nachgewiesen werden.

Im Jahr 2003 wurde die erste umfassende Untersuchung veröffentlicht, die sich mit dem Einfluss von Cannabinoiden auf die Tumorangiogenese beschäftigt. Es gelang Blázquez *et al.* tierexperimentell anhand von Färbungen von Tumorschnitten mit dem Endothelzellmarker CD31 nachzuweisen, dass nach Behandlung der Tiere mit dem CB_2-Agonisten JWH-133 die Gefäßgröße in murinen Glioblastomen und humanen Astrozytomen abnimmt (Blázquez et al., 2003). Die Autoren beschrieben des Weiteren eine Verringerung der Anzahl erweiterter unreifer Gefäße und konnten funktionell eine Verringerung der Permeabilität von Tumoren aus Mäusen nachweisen, die mit JWH-133 behandelt worden waren. Im selben Jahr publizierten Casanova *et al.* eine Untersuchung, in der gezeigt werden konnte, dass eine Behandlung mit Cannabinoiden zu veränderter Gefäßmorphologie und in diesem Zusammenhang zu reduzierter Angiogenese führt. Hierbei wurden Tiere mit epidermalen Tumoren mit JWH-133 und dem sowohl am CB_1- als auch am CB_2-Rezeptor agonistisch wirksamen WIN55,212-2 behandelt (Casanova et al., 2003). Eine signifikante Hemmung des Tumorwachstums und der Lungenmetastasierung von A549-Zellen THC-behandelter Mäuse konnte in einer Studie von Preet *et al.* nachgewiesen werden. Entnommene Gewebeproben aus diesen Tumoren zeigten dabei sowohl eine antiproliferative als auch antiangiogene Wirkung von THC (Preet et al., 2008). Hernan Perez de la Ossa *et al.* veröffentlichten im Jahr 2013 eine tierexperimentelle Untersuchung, in der Mäuse mit subkutan injizierten Glioblastomzellen mit den Phytocannabinoiden CBD und THC behandelt wurden. Um eine verzögerte Freisetzung der Cannabinoide zu erreichen, wurden letztere entweder separat oder in einem 1:1 Mischungsverhältnis an resorbierbare Mikropartikel gebunden. Vor allem die Behandlung mit CBD- und THC-beladenen Mikropartikeln führte zu einer deutlichen Reduktion der Dichte CD-31-positiver Zellen und somit zu einer Abnahme der Vaskularisierung der Glioblastome (Hernan Perez de la Ossa et al., 2013).

Weiterhin gibt es tierexperimentelle Untersuchungen an Ratten, die zeigen, dass neben der Behandlung von Tumorerkrankungen antiangiogene Effekte von Cannabinoiden auch zur Therapie anderer Erkrankungen wie chronisch inflammatorischer Entzündung (de Filippis et al., 2010), Fibrose (Reichenbach et al., 2012) oder Leberzirrhose (Huang et al., 2012) mögliche therapeutische Ansätze bieten.

1.8 Direkte Effekte von Cannabinoiden auf Endothelzellen

In der Vergangenheit wurden bereits verschiedene Studien, in denen der direkte Einfluss von Cannabinoiden auf Endothelzellen untersucht wurde, im Hinblick auf ein mögliches antiangiogenes Potenzial publiziert. Die erste Untersuchung zu diesem Thema, in der der hemmende Einfluss von WIN55-212,2 und JWH-133 auf die Migration von humanen Umbilikalvenen Endothelzellen (HUVEC) nachgewiesen werden konnte, stammt aus dem Jahr 2003. Apoptoseinduktion und Viabilitätsverlust der Endothelzellen wurden als ursächlich für den antiangiogenen Einfluss von WIN55-212,2 beschrieben (Blázquez et al., 2003). Seitdem wurden weitere Cannabinoide im Hinblick auf ihren antiangiogenen Einfluss auf Endothelzellen untersucht. So konnten beispielsweise antiangiogene Eigenschaften für 2-Methyl-Arachidonyl-2'-Fluoro-Ethylamid (Met-F-AEA) in verschiedenen experimentellen Settings, einschließlich der *in vitro*-Formation dreidimensionaler Sphäroide, Tubulogenese-Assays und in *chick chorioallantoic membrane*-(CAM)-Assays nachgewiesen werden (Pisanti et al., 2007). Weitere Vertreter der Cannabinoide, für die antiangiogene Effekte auf Endothelzellen beschrieben wurden, sind der Topoisomerase-II-Inhibitor HU-331 (Kogan et al., 2006) und die Hexahydrocannabinol-Analoga LYR-7 und LYR-8 (Thapa et al., 2011). Für die hochpotenten nicht-selektiven Cannabinoidrezeptor-Agonisten HU-212 und AEA beschrieben Rajesh *et al.* 2010 die Apoptoseinduktion humaner Koronararterien-Endothelzellen bei Konzentrationen ≥ 30 nM (HU-210) bzw. ≥ 5 µM (AEA) (Rajesh et al., 2010). Weiterhin wurde 2012 eine Studie publiziert, in der die Hemmung der Migration von HUVEC durch JWH-133 in nicht-toxischen Konzentrationen bzw. der Viabilitätsverlust der Zellen bei Konzentrationen von 100 µM nachgewiesen werden konnte (Vidinský et al., 2012). Auch für das Cannabinoid CBD wurden antiangiogene Effekte beschrieben. So wiesen Solinas *et al.* eine Hemmung der Proliferation von HUVEC bei CBD-Konzentrationen ≥ 9 µM sowie, in geringeren Konzentrationen, eine Hemmung der HUVEC-Migration nach. Darüberhinaus zeigten die Autoren dieser Arbeit in sogenannten *Matrigel sponge assays* - ein Test, bei dem ein halbfestes Polymer aus Matrigel (Matrigel-Schwämme), welches mit VEGF, *Tumor Necrosis Factor-α* (TNF- α), Heparin sowie mit Vehikel oder Testsubstanzen angereichert ist und in die Flanken von Mäusen injiziert wird - eine Verringerung der in diese Strukturen eingewachsenen Gefäße in CBD-behandelten Mäusen (Solinas et al., 2012). Die

Konzentrationen von CBD in den Matrigel-Schwämmen waren bei diesen Experimenten jedoch in einem Konzentrationsbereich zwischen 0,0625 und 0,5 mg gewählt, was bei einem Volumen der Matrigel-Schwämme von 0,6 ml einem Konzentrationsbereich zwischen 0,33 und 2,65 mM entspricht. Weitere Arbeiten zur Wirkung von Cannabinoiden auf Endothelzellen konnten eine Hemmung der Migration humaner Endothelzellen nachweisen, die mit den Hexahydrocannabinol-Analoga LYR-7 und LYR-8 behandelt wurden (Thapa et al., 2011). Interessanterweise konnte für diese Cannabinoide auch eine Hemmung des Gefäßwachstums im CAM-Assay gezeigt werden.

Im Bezug auf die Wirkung von Cannabinoiden auf die Migration von Zellen allgemein muss erwähnt werden, dass auch zahlreiche Publikationen vorliegen, in denen gegenteilige, d.h. eher pro- als antimigrative, Effekte beschrieben werden. So gibt es verschiedene Untersuchungen, in denen Cannabinoiden Wundheilungseffekte durch promigratorischen Einfluss auf Kolon-Epithelzellen (Wright et al., 2005), korneale Epithelzellen (Yang et al., 2010), Osteoblasten-ähnliche Zellen (Sophocleous et al., 2011) und mesenchymale Stammzellen (Schmuhl et al., 2014) zugeschrieben werden. In Übereinstimmung hiermit konnte darüber hinaus auch eine promigrative Wirkung von abnormal-Cannabidiol auf HUVEC (Mo et al., 2004) und für N-Arachidonoyl-L-Serine in mikrovaskulären Zellen (Zhang et al., 2010) nachgewiesen werden.

Zusammenfassend lässt sich anhand der *in vitro*-Daten feststellen, dass Cannabinoide die körpereigene Wundheilung eher durch Steigerung der Migration von Endothel- und Epithelzellen zu unterstützen scheinen. Dennoch war es in der Vergangenheit wiederholt möglich, *in vivo* zu zeigen, dass Cannabinoide auch antitumorigene Eigenschaften durch Inhibierung der Tumorangiogenese besitzen. Momentan gibt es demnach keinen einheitlichen Konsens im Hinblick auf den direkten Einfluss von Endo-, Phyto- oder synthetischen Cannabinoiden auf Endothelzellen. Angesichts dieser Tatsache ist zu vermuten, dass die hier beschriebenen unterschiedlichen Eigenschaften der Cannabinoide eng mit den jeweils verwendeten Konzentrationen zusammenhängen. So wiesen Kogan *et al.* für CBD und THC in Konzentrationen von rund 50 nM (Kogan et al., 2006) bzw. Pisanti *et al.* für AEA in Konzentrationen von 0,0001 – 0,1 µM proangiogene Effekte nach, während für die gleichen Phytocannabinoide (Kogan et al., 2006; Solinas et al., 2012) bzw. AEA (Rajesh et al., 2010; Pisanti et al., 2011) in höheren Konzentrationen antiangiogene Effekte beschrieben wurden.

1.9 Regulation pro- und antiangiogener Faktoren durch Cannabinoide

Wie bereits in Abschnitt 1.3 beschrieben, handelt es sich bei der Angiogenese um einen multifaktoriellen Prozess, in dem sowohl pro- als auch antiangiogene Faktoren ebenso wie verschiedene Zelltypen an der Beeinflussung des Mikromillieus von Entzündungen, hypoxischen Zuständen oder Tumoren involviert sind. Von besonderer Bedeutung für die Tumorangiogenese ist dabei die Kommunikation zwischen Tumor- und Endothelzellen. Im Folgenden werden daher einige Aspekte der Regulation angiogener Faktoren, die durch Cannabinoide in Tumorzellen moduliert werden, dargestellt.

Erste Untersuchungen im Bezug auf die Modulation angiogener Faktoren in Tumorzellen durch Cannabinoide wurden vor etwas mehr als zehn Jahren publiziert. Blázquez *et al.* beschrieben 2003 durch *in vitro*- und *in vivo*-Experimente die Abnahme proangiogener Faktoren wie VEGF und Angiopoietin-2 sowie der Matrix-Metalloproteinase-2 in humanem Glioblastomgewebe in Mäusen, die mit JWH-133 behandelt wurden, als einen möglichen Mechanismus der Inhibierung der Tumorangiogenese durch Cannabinoide (Blázquez et al., 2003). Die Abnahme von VEGF, Angiopoietin-2 und *placental growth factor* (PlGF) in Hauttumoren durch die Behandlung mit den Cannabinoiden JWH-133 und WIN55,212-2 konnte experimentell im selben Jahr auch von Casanova *et al.* nachgewiesen werden (Casanova et al., 2003). Eine hemmende Wirkung von THC auf die Freisetzung von VEGF aus Lungenkrebszellen wurde 2008 durch tierexperimentelle Untersuchungen bestätigt (Preet et al., 2008).

Neben den bereits genannten proangiogenen Faktoren spielen auch von Tumorzellen sezernierte proteolytische Enzyme eine wichtige Rolle bei der Anbindung des Tumorgewebes an das Blutgefäßsystem. Hierzu gehören proangiogene Vertreter der Matrix-Metalloproteinasen, die als weitere Zielstrukturen der Cannabinoide identifiziert werden konnten (Zetter, 1998; Murphy und Gavrilovic, 1999; Stetler-Stevenson, 1999) und auf die im folgenden Kapitel näher eingegangen wird (siehe Kapitel 1.10).

Im Jahr 2008 konnten Ramer und Hinz durch *in vitro*-Experimente mit humanen Zervixkarzinom- und Lungenkrebszellen, die mit den Cannabinoiden THC und MA behandelt wurden, eine Hochregulation des *tissue inhibitor of matrix metalloproteinases-1* (TIMP-1) nachweisen und beschrieben somit einen weiteren potenziell antiangiogenen Mechanismus, der durch Cannabinoide moduliert wird (Ramer und Hinz, 2008). Zwei Jahre später wurde der gleiche Effekt auch für das Cannabinoid CBD nachgewiesen (Ramer et al., 2010a). Beide Untersuchungen belegten die Hochregulation von TIMP-1 durch die Aktivierung sowohl von CB_1- bzw. CB_2-Rezeptoren als auch von TRPV1. Weitere zwei Jahre später

identifizierten Ramer *et al. Intercellular Adhesion Molecule-1* (ICAM-1) als Induktor der Cannabinoid-induzierten Freisetzung von TIMP-1 aus Lungenkarzinomzellen (Ramer et al., 2012).

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass neben den direkten Effekten der Cannabinoide auf Endothelzellen (siehe Kapitel 1.8) auch solche in die antiangiogenen Wirkmechanismen von Cannabinoiden involviert sind, die auf indirektem Wege, über die Beteiligung zwischengeschalteter Zelltypen, zu einer Abnahme der Endothelzelldichte und somit der Vaskularisierung von Tumoren führen. Trotz der umfangreichen Untersuchungen und Ergebnisse zu potenziellen Modulatoren der Angiogenese, die in den letzten Jahren im Zusammenhang mit Cannabinoiden publiziert wurden, fehlt es heute noch an Studien, die sich insbesondere mit der Rolle der Kommunikation zwischen Tumor- und Endothelzellen beschäftigen und somit diese indirekten Effekte mit Hilfe von Inhibitor-basierten Experimenten evaluieren. So könnten zukünftig in der systemischen Tumortherapie Cannabinoide als eine mögliche Wirkstoffklasse eingesetzt werden, die den gängigen Angiogeneseinhibitoren vor allem im Hinblick auf deren UAW, wie Hauterscheinungen, Hypertension, Proteinurie, erhöhtes Blutungsrisiko u.a., wie dies beispielsweise für Bevacizumab, einem monoklonalem Antikörper gegen VEGF, nachgewiesen werden konnte (Fakhrejahani und Toi, 2014), überlegen ist.

1.10 Matrix-Metalloproteinasen und Tumorprogression

Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) bilden eine Familie proteolytischer Enzyme, deren physiologische Funktion im Umbau von Geweben besteht. Mindestens 20 verschiedene humane MMPs sind bekannt. Es handelt sich um zinkabhängige Endopeptidasen, die auch von Tumorzellen sezerniert werden und in der Lage sind, sowohl die Basalmembran als auch andere Bestandteile der extrazellulären Matrix zu degradieren (Liotta et al., 1980). Diese Eigenschaft bildet einerseits die Grundlage für die Invasion und Metastasierung von Tumorzellen, andererseits ist sie essenziell für die Ausbildung neuer Blutgefäße (Angiogenese) zur Versorgung des Tumorgewebes (Liotta et al., 1977). Die vermehrte Expression von MMPs ist ein bekanntes Charakteristikum der meisten malignen Tumoren (Curran und Murray, 2000). Darüber hinaus haben Untersuchungen gezeigt, dass erhöhte Konzentrationen der MMPs mit einer verringerten Überlebensrate der betroffenen Patienten einhergehen (Curran und Murray, 1999).

In vivo-Experimente mit Glioblastomzellen konnten eine Abnahme der MMP-2-Konzentration nach Behandlung mit JWH-133, THC und MA belegen (Blázquez et al., 2003; Blázquez et al., 2008). Gleiches gelang Caffarel *et al.* in Versuchen mit Zellen aus Brustkrebsgeweben (Caffarel et al., 2010). Auch Untersuchungen mit Zellen aus Zervixkarzinomgeweben zeigten eine vergleichbar verminderte Sezernierung von MMP-2 nach Behandlung mit den Cannabinoiden THC und MA (Ramer und Hinz, 2008). Für verschiedene MMPs konnte ebenso eine Involvierung in die Tumorangiogenese nachgewiesen werden (Zetter, 1998; Murphy et al., 1999; Stetler-Stevenson, 1999). Endogene MMP-Inhibitoren wie TIMP-1 sind entsprechend in der Lage, die Prozesse der Neovaskularisierung zu unterbinden (Moses et al., 1990; Johnson et al., 1994; Seandel et al., 2001).

1.11 Tissue inhibitor of matrix metalloproteinases-1 (TIMP-1)

Tissue inhibitor of matrix metalloproteinases (TIMPs) sind physiologische Antagonisten der MMPs. Es handelt sich um Proteine, die fähig sind, die aktiven Formen der MMPs spezifisch zu inhibieren (Curran und Murray, 1999). Bislang konnten vier Vertreter der TIMPs identifiziert werden (TIMP-1 – TIMP-4) von denen jeder mit verschiedenen MMPs komplexe Verbindungen eingehen kann (Gomez et al., 1997, Nagase und Woessner, 1999). TIMPs sind grundsätzlich aus zwei Domänen aufgebaut, einer N-terminalen und einer C-terminalen Domäne, wobei jede dieser Domänen aus drei Disulfidbrücken besteht, die aus jeweils sechs Cysteinresten gebildet werden (Nagase et al., 2006). Das N-terminale Ende ist für die MMP-inhibitorische Aktivität verantwortlich (Murphy et al., 1991).

Die vorliegende Arbeit fokussiert auf die Rolle von TIMP-1 bei der Modulation der Tumorangiogenese. TIMP-1 ist ein Glykoprotein, das erstmals aus Knochenmaterial von Kaninchen isoliert wurde. Es besteht aus 184 Aminosäuren und besitzt ein Molekulargewicht von 28,5 kDa. In der Vergangenheit konnten verschiedene Arbeiten zeigen, dass TIMPs fähig sind, sowohl die Invasion und Metastasierung von Tumorzellen als auch die Angiogenese zu inhibieren und so die Progression des Tumorwachstums zu hemmen (Gomez et al., 1997, Ramer und Hinz, 2008; Ramer et al., 2012). Im Bezug auf die Wirkung von TIMP-1 auf die angiogenen Eigenschaften von Endothelzellen konnte 1994 von Johnson *et al.* mit Hilfe von *in vitro*-Experimenten die Hemmung der Endothelzell-Migration durch TIMP-1 nachgewiesen werden (Johnson et al., 1994). *In vitro*-Untersuchungen sowie Experimente mit humanen und tierexperimentellen Tumormodellen belegen eine negative Korrelation zwischen der Expression von TIMP-1 und der Metastasierung von Tumorzellen (Curran und Murray, 1999). Darüber hinaus gibt es Hinweise, die nahe legen, dass TIMPs

als multifunktionale Moleküle auch MMP-unabhängige Effekte aufweisen. So konnten sowohl für TIMP-1 als auch für TIMP-2 paradoxerweise Wachstumsfaktor-ähnliche Eigenschaften nachgewiesen werden (Gomez et al., 1997; Stetler-Stevenson, 2008). Hinsichtlich dieser Tatsache werden auch antitumorigene Eigenschaften der TIMPs untersucht, die jenseits der Inhibition von MMPs liegen. So wurde vor einigen Jahren auf humanen Brustepithelzellen ein Protein, welches als CD63 bezeichnet wird, identifiziert, das mit der β1-Untereinheit eines Integrin-Rezeptors assoziiert ist. Dieses Oberflächenprotein dient TIMP-1 als Rezeptor (Jung et al., 2006). Durch Bindung an CD63 greift TIMP-1 modulierend in die Signalwege des programmierten Zelltodes ein (Stetler-Stevenson, 2008).

1.12 Intercellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1)

2012 wurde erstmals ein Zusammenhang zwischen vermehrter Expression von *Intercellular Adhesion Molecule-1* (ICAM-1) und der durch Cannabinoide vermittelten TIMP-1-abhängigen Hemmung der Tumorzellinvasion beschrieben (Ramer et al., 2012). Entsprechend wurde ICAM-1 bei der Cannabinoid-induzierten TIMP-1-Expression als essenzieller Upstream-Regulator identifiziert, dessen Induktion durch Cannabinoide kausal mit einer vermehrten TIMP-1-Freisetzung aus Lungentumorzellen assoziiert ist (Ramer et al., 2012).

Bei ICAM-1 handelt es sich um ein Immunglobulin-ähnliches Zelloberflächenprotein der Immunglobulin-Gensuperfamilie (Hopkins et al., 2004). Es setzt sich aus 505 Aminosäuren zusammen und hat je nach Grad seiner zellspezifischen Glykosylierung ein Molekulargewicht von 80 bis 114 kDa (van de Stolpe und van der Saag, 1996). Sein Aufbau lässt sich in drei Domänen unterteilen: eine kurze C-terminale intrazelluläre, eine transmembranäre und eine extrazelluläre Domäne, die sich wiederum in fünf Immunglobulin-ähnliche Abschnitte gliedern lässt. Letztere ist für die Vermittlung der spezifischen Zell-Zell- und Zell-Matrix-Adhäsion verantwortlich. Exprimiert wird ICAM-1 vorrangig auf Zelltypen wie Leukozyten, Epithel- und Endothelzellen sowie auf Fibroblasten (Roebuck und Finnegan, 1999; Hopkins et al., 2004). Auch eine lösliche Form von ICAM-1 (sICAM-1), die sich sowohl im Blut als auch im Liquor nachweisen lässt, ist bekannt (van de Stolpe und van der Saag, 1996). Zu den Liganden von ICAM-1 zählen vor allem das auf Leukozyten exprimierte membrangebundene β2-Integrin *Lymphocyte Function Associated Antigen-1* (LFA-1) und das *Macrophage-1 Antigen* (Mac-1) (van de Stolpe und van der Saag, 1996). Die Bindung von ICAM-1 an diese Liganden ist entscheidend für die Fähigkeit der Leukozyten transendothelial in Richtung Entzündungsgeschehen zu migrieren und spielt darüber hinaus eine wichtige Rolle in der Aktivierung von T-Zellen. Weiterhin steht ICAM-1 in Verbindung mit einer Vielzahl von inflammatorischen Erkrankungen, bzw. Autoimmunerkrankungen wie z.B.

Asthma, Atherosklerose und entzündlichen Darmerkrankungen. ICAM-1 wird zellspezifisch konstitutiv auf der Oberfläche der oben genannten Zelltypen exprimiert und kann in Abhängigkeit einer Vielzahl inflammatorischer Mediatoren wie Retinsäure, oxidativem Stress (z.B. durch H_2O_2) und Virusinfektionen hochreguliert werden. Ein weiterer und wichtiger Mechanismus der Hochregulation von ICAM-1 wird über die proinflammatorischen Zytokine Tumor-Nekrose-Faktor-α (TNF-α), Interleukin-1β (IL-1β) und Interferon-γ (IFN-γ) mediiert (Roebuck und Finnegan, 1999). Im Hinblick auf maligne Prozesse ist die Rolle der veränderten Expressionsrate von ICAM-1 derzeit noch Gegenstand der Forschung. Es gibt allerdings Hinweise, dass verminderte ICAM-1-Expressionsraten mit erhöhten Graden an Metastasierung sowie mit einer schlechteren Prognose für Patienten mit Magentumoren (Fujihara et al., 1999), kolorektalen Tumoren (Maeda et al., 2002), ösophagealen (Hosch et al., 1997) und Hauttumoren (Natali et al., 1990) einhergehen.

1.13 Zielsetzung dieser Arbeit

Cannabinoide weisen ein breites Spektrum antikarzinogener Eigenschaften auf. Funktionelle Inhibitor-basierte Untersuchungen, die sich mit Cannabinoid-induzierten Modulationen antiangiogener Mediatoren in Tumorzellen auseinandersetzen, wurden allerdings bislang weitestgehend vernachlässigt. Kausale Verknüpfungen zwischen der Regulation von Angiogenesefaktoren in Tumorzellen durch Cannabinoide mit deren funktionellen antiangiogenen Effekten auf Endothelzellen als Basis einer Tumor-endothelialen Zell/Zell-Kommunikation wurden bislang noch nicht publiziert.

In dem Bemühen, die beiden Erkenntnisse – TIMP-1 als Inhibitor der Angiogenese und Cannabinoide als Induktoren der TIMP-1-Expression in Tumorzellen - im Bezug auf einen möglichen funktionellen Zusammenhang hin zu untersuchen, soll die vorliegende Arbeit eine wahrscheinliche Beteiligung von Cannabinoid-induziertem TIMP-1 an der Kommunikation zwischen Tumor- und Endothelzellen im Zusammenhang mit Antiangiogenese analysieren. Die im Folgenden beschriebenen Untersuchungen bieten erstmals den Nachweis, dass die Cannabinoid-induzierte Freisetzung von TIMP-1 aus Lungenkarzinomzellen dazu führt, angiogene Eigenschaften von HUVEC zu hemmen. Diese Entdeckung stellt einen neuen Mechanismus innerhalb der Vielfalt der antikarzinogenen Fähigkeiten der Cannabinoide dar.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zelllinien

A549:	humane Lungenkarzinomzelllinie
	DSMZ GmbH, Braunschweig
BEAS-2B:	humane Bronchialepithelzelllinie
	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
H358:	humane Lungenkarzinomzelllinie
	American Type Culture Collection, Wesel
H460:	humane Lungenkarzinomzelllinie
	American Type Culture Collection, Wesel
HUVEC:	Human Umbilical Vein Endothelial Cells
	PromoCell, Heidelberg

Alle Zelllinien befanden sich in der zweiten bis siebten Passage.

2.1.2 Zellkulturmedium

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) - Komplettmedium:

DMEM mit 4,5 g/l Glucose und 4 mM L-Glutamin	Lonza, Köln
10% hitzeinaktiviertes FCS	PAN Biotech., Aidenbach
10 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin	Invitrogen, Darmstadt

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) – serumfreies Komplettmedium:

DMEM mit 4,5 g/l Glucose und 4 mM L-Glutamin	Lonza, Köln

10 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin	Invitrogen, Darmstadt

Zellkulturmedium für die HUVEC

Endothelial Cell Growth Medium Kit (C-22110)	PromoCell, Heidelberg

2.1.3 Antikörper

2.1.3.1 Primäre Antikörper

Tab. 4: Auflistung der verwendeten primären Antikörper

Antikörper	Spezies	Verdünnung[1]	Bezugsquelle
anti-humanes TIMP-1	Maus	1:1000	Merck KGaA, Darmstadt
anti-humanes ICAM-1	Maus	1:1000	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
anti-humanes β-Aktin	Maus	1:10.000	Sigma-Aldrich, Steinheim

2.1.3.2 Sekundäre Antikörper

Tab. 5: Auflistung der verwendeten sekundären Antikörper

Antikörper	Verdünnung[2]	Bezugsquelle
Anti-Maus IgG	1:1000	New England BioLabs GmbH, Frankfurt

2.1.4 Oligonukleotide

2.1.4.1 siRNA

TIMP-1 siRNA:

Qiagen; Hilden

Produktname: Hs_TIMP1_2_HP siRNA (Art.-Nr. SI00745318)

Target Sequenz: TCC CAT CTT TCT TCC GGA CAA

Sense: r(CCA UCU UUC UUC CGG ACA A)dTdT

Antisense: r(UUG UCC GGA AGA AAG AUG G)dGdA

[1] Verdünnung in 1% Milchpulver gelöst in TBS/T
[2] Verdünnung in 1% Milchpulver gelöst in TBS/T

ICAM-1 siRNA:

Qiagen, Hilden

Produktname: Hs_ICAM1_3 (Art.-Nr. SI00004347)

Target Sequenz: 5‘-CGG CCA GCT TAT ACA CAA GAA-3‘

Sense: 5‘-GCC AGC UUA UAC ACA AGA ATT-3’

Antisense: 5’-UUC UUG UGU AUA AGC UGG CCG-3’

siRNA negativ-Kontrolle:

EUROGENTEC, Köln

Sense: dTdT 3‘ Überhang

Antisense: dTdT 3‘ Überhang

Transfektionsreagenz RNAiFect:

Qiagen, Hilden

2.1.5 Puffer und Lösungen

1,5 M Tris pH 8,8:	Tris Base	181,71 g
	Aqua dest.	ad 1.000 ml
Blockierungslösung:	Milchpulver	25 g
	TBS-T	ad 500 ml
Blotpuffer:	Transfer-Puffer	32 ml
	Aqua dest.	768 ml
	Methanol	200 ml
Glycin-Strip-Puffer (pH 2,5):	Glycin	15,01 g
	NaCl	29,22 g
	Aqua dest.	ad 1.000 ml
Protein-Lysispuffer:	HEPES	5,98 g
	NaCl	4,38 g
	EDTA	0,146 g
	Triton® X-100	5 ml
	Glycerin	50 ml
	Aqua dest.	ad 500 ml
Lämmli-Puffer (5x):	Tris HCL (0,625 M, pH 6,8)	2 ml
	SDS	1,0 g
	Glycerin	5 ml

	Bromphenolblau	0,5 ml
	β-Mercaptoethanol	0,5 ml
	Aqua dest.	ad 10 ml
Laufpuffer:	Tris Base	15,14 g
	Glycin	72,07 g
	SDS	5 g
	Aqua dest.	ad 1.000 ml
Lysispuffer:	Protein-Lysispuffer	1 ml
	Aprotinin (2 mg/ml)	5,2 µl
	Leupeptin (1,9 mg/ml)	2 µl
	Orthovanadat (100 mM)	5 µl
	PMSF (100 mM)	10 µl
PBS (pH 7,4):	NaCl	8 g
	KCl	0,2 g
	Na_2HPO_4 (x 12 H_2O)	2,9 g
	KH_2PO_4	0,2 g
	Aqua dest.	ad 1.000 ml
Ponceau S-Lösung:	Ponceau S	0,5 g
	Essigsäure	1 ml
	Aqua dest.	ad 1.000 ml

TBS (pH 7,5):	Tris Base	12,11 g
	NaCl	8,77 g
	Aqua dest.	ad 1.000 ml
TBS-T:	TBS (pH 7,5)	1.000 ml
	Tween®20	1 ml
Transfer-Puffer:	Tris Base	6,06 g
	Glycin	28,52 g
	SDS	1 g
	Aqua dest.	ad 1.000 ml
Trypsin/EDTA:	Trypsin/EDTA	5 ml
	PBS	ad 50 ml

Trypsin/EDTA ist eine 10fach konzentrierte Fertiglösung der Firma Invitrogen, Karlsruhe

2.1.6 Chemikalien

AM-251	Enzo Life Sciences GmbH, Lörrach
AM-630	Enzo Life Sciences GmbH, Lörrach
Aprotinin	Sigma-Aldrich, Steinheim
APS	Sigma-Aldrich, Steinheim
BCA™ Protein Assay Kit	Pierce, Rockford, USA
β-Mercaptoethanol	Ferak, Berlin
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Steinheim
(-)-Cannabidiol	Biotrend AG, Köln
Capsazepin	Sigma-Aldrich, Steinheim
DMSO	Applichem, Darmstadt
ECL Plus™ Western Blotting Detection Reagent	Amersham Biosciences, Freiburg
EDTA	Applichem, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Glycerin	Applichem, Darmstadt
Glycin	Applichem, Darmstadt
H_2O_2	Applichem, Darmstadt
HEPES	Ferak, Berlin
JWH-133	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt
KCl	Merck, Darmstadt
KH_2PO_4	Merck, Darmstadt
Leupeptin	Biomol, Hamburg

Luminol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Matrigel™ Basement Membrane Matrix	BD Biosciences, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Methanandamid	Tocris Bioscience, Wiesbaden-Nordenstadt
Milchpulver	Bio-Rad, München
NaCl	Allied Signal, Seelze
Na_2HPO_4 (x 12 H_2O)	Applichem, Darmstadt
Orthovanadat	Sigma-Aldrich, Steinheim
PBS	PAN Biotech, Aidenbach
PMSF	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ponceau S	Applichem, Darmstadt
Presteined SDS-PAGE Standards Broad Range	Bio-Rad, München
SDS	Applichem, Darmstadt
siRNA Suspensionspuffer	Qiagen, Hilden
TEMED	Sigma-Aldrich, Steinheim
Δ^9-Tetrahydrocannabinol	LIPOMED GmbH, Weil am Rhein
TIMP-1 (rekombinant)	Merck KGaA, Darmstadt
Tris Base/Tris-HCl	Applichem, Darmstadt
Triton® X-100	Roth, Karlsruhe
Trypsin/EDTA	Invitrogen, Karlsruhe
Tween®20	Serva, Heidelberg
WST-1 Reagenz	Roche Applied Science, Mannheim

2.1.7 Verbrauchsmaterialien

24-Well Platten Falcon®		BD Biosciences, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
48-Well Platten Falcon®		BD Biosciences, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
96-Well Platten Falcon®		BD Biosciences, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Migrationsplatten 24-Well Bio Coat®		BD Biosciences, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Nitrozellulose Membranen		Roth, Karlsruhe
Pipettenspitzen:	- Mikropipetten	Sarstedt, Nürmbrecht
	- Multipettenaufsätze	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Wattestäbchen		Lemoine Group, Athis de L'Orne
Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml)		Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Seropipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)		Sarstedt, Nürmbrecht
Zellkulturflaschen (75 cm²)		Sarstedt, Nürmbrecht

2.1.8 Geräte

Brutschrank APT.line™CB210	Binder, Tuttlingen
Licht-Mikroskop Wilovert	Hund, Wetzlar
Neubauer Zählkammer	Fein-Optik, Bad Blankenburg
ELISA-Reader	Anthos, Krefeld
SDS-Elektrophoresekammer:	
- Mini-PROTEAN®Tetra Cell	Bio-Rad, München
Tank-Blot Kammer:	
- Mini Trans-Blot®Electrophorectic Transfer Cell	Bio-Rad, München

Netzgerät PowerPac™Basic Power Supply	Bio-Rad, München
Geldokumentationsanlage:	
- Molecular Imager® ChemiDoc™XRS	Bio-Rad, München

2.1.9 Software

Quantity One 1-D Analysis Software	Bio-Rad, München
GraphPad Prism 5.0	GraphPad Software, San Diego, USA

2.2 Zellbiologische Methoden

2.2.1 Kultivierung von Zellen

2.2.1.1 Allgemeine Bedingungen

Das Kultivieren aller Zelllinien erfolgte grundsätzlich im Brutschrank bei einer Temperatur von 37°C und einer CO_2-Konzentration von 5% in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre. Aussaat und Passagierung der Zellen erfolgte unter sterilen Bedingungen durch Arbeiten unter einer *Clean Bench* (sterile Arbeitsbank). Während der Kultivierung wurde das Wachstum und während der Passagierung das Ablösen der Zellen regelmäßig unter einem Lichtmikroskop beobachtet und kontrolliert.

2.2.1.2 Kryokonservierung und Auftauen der Tumorzelllinien

Die Lungenkarzinomzelllinien wurden in entsprechenden Kryogefäßen bei -196 °C in flüssigem Stickstoff gelagert. Um eine Schädigung der Zellen durch Ausbildung von Eiskristallen zu verhindern wurde das Kryoprotektikum Dimetyl-Sulfoxid (DMSO) verwendet. Da DMSO bei Raumtemperatur zelltoxisch wirkt, erfolgte das Auftauen der Zelllinien rasch, indem die Kryogefäße kurz in einem Wasserbad bei 37 °C angetaut wurden. Sodann wurde die Zellsuspension mit DMEM-Komplettmedium vermischt und zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes erfolgte die Resuspension der Zellen in DMEM-Komplettmedium und die Überführung der Zellsuspensionen in Zellkulturflaschen.

2.2.1.3 Passagieren (Splitting) der Tumorzelllinien und der BEAS-2B

Alle drei Tumorzelllinien sowie die BEAS-2B wurden jeweils in sterilen Zellkulturflaschen mit einer Oberfläche von 75 cm² kultiviert, wobei pro Flasche eine Zelldichte von ca. 13.000 bis 20.000 Zellen je cm² angestrebt wurde. Bei den Zelllinien handelt es sich um adhärente als Monolayer wachsende Zellen. Als Nährmedium wurde DMEM-Komplettmedium verwendet. Anschließend ruhten die Zellen für drei bis fünf Tage im Brutschrank, um eine Konfluenz von 80-90% zu erreichen. Nach Erreichen der gewünschten Dichte wurde das Medium mittels Absaugung abgenommen und die Zellen mit 5 ml vorgewärmten PBS gewaschen. Im Folgenden wurden die Zellen mit ca. 3-4 ml Trypsin/EDTA versetzt und für vier Minuten im Brutschrank inkubiert. Um bei beiden Arbeitsschritten eine Beschädigung der Zellen zu vermeiden, wurde sowohl beim Waschen als auch beim Trypsinieren der Zellen darauf geachtet, den Zellrasen nicht mit den Spitzen der Seropipetten zu berühren und die jeweiligen Lösungen mit mäßigem Druck in die Zellkulturflaschen laufen zu lassen. Nach erfolgter Inkubation wurde die Trypsinierung sofort mit 5 ml DMEM-Komplettmedium gestoppt. Durch leichtes Anstoßen gegen die Wand der Zellkulturflaschen wurden alle Zellen vom Flaschenboden abgelöst. Das vollständige Ablösen der Zellen wurde noch einmal unter zu Hilfenahme eines Lichtmikroskops kontrolliert. Die Zellsuspension wurde in ein steriles 50 ml Falcon®-Röhrchen überführt und anschließend bei 100 x g und Raumtemperatur für 5 min zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand vorsichtig abgesaugt und verworfen, das Zellpellet in frischem DMEM-Komplettmedium resuspendiert, die Zellen mittels Neubauer Zählkammer ausgezählt und anschließend in neuen sterilen Zellkulturflaschen in der gewünschten Dichte erneut ausgesät.

2.2.1.4 Passagieren (Splitting) der HUVEC

Das Passagieren der HUVEC erfolgte analog dem Protokoll zum Passagieren der Tumorzelllinien. Abweichend davon wurde als Nährmedium das Endothelial Cell Growth Medium Kit verwendet.

2.2.1.5 Zellauszählung

Zur Ermittlung der Zellzahlen wurde eine Neubauer Zählkammer (siehe Abb. 2) verwendet. Diese Kammer besteht aus vier voneinander getrennten Großquadraten. Nach Auszählung von jeweils vier Großquadraten wurde der daraus resultierende Mittelwert mit dem Faktor 10^4 multipliziert. Daraus ergab sich die Zellzahl pro Milliliter. Die Multiplikation mit dem genannten Faktor ergibt sich aus der Fläche eines Großquadrats, seiner Tiefe und der Darstellung der Konzentration als Zellanzahl pro Milliliter.

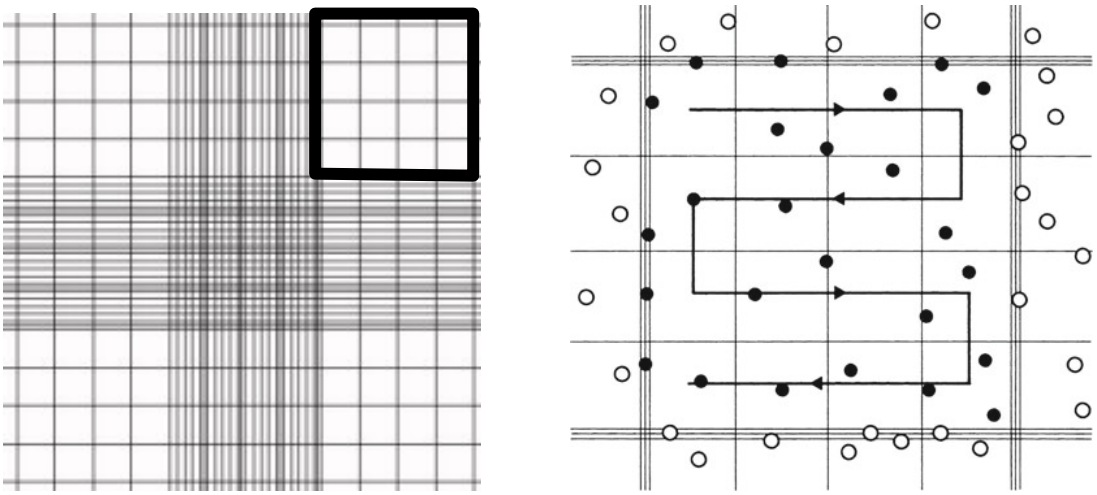

Abb. 2: Neubauer Zählkammer (modifiziert nach Schmitz, 2011)

links: Darstellung aller vier auszuzählenden Großquadrate, rechts: Schema zum Auszählen der Zellen eines Großquadrates: Zellen, die die obere und linke Kante des Quadrates berührten wurden mitgezählt. Die Zellen der unteren und rechten Kante wurden bei der Auszählung nicht berücksichtigt.

2.2.2 Stimulation von Zellen

Zur Stimulation wurden die vorab kultivierten Zellen unter sterilen Bedingungen mit vorgewärmten PBS gewaschen, anschließend trypsiniert, in DMEM-Komplettmedium (10% FCS) resuspendiert und mittels Neubauer Zählkammer ausgezählt. Es wurden jeweils 10^5 Zellen in die Wells (Kammern) einer 24-Well Platte ausgesät Die Zellen ruhten dann bis zum Erreichen einer Adhäsion für einige Stunden im Brutschrank. Nach der Ruhephase erfolgte nach erneutem Waschen der Zellen mit warmen PBS ein Mediumwechsel mit DMEM (0% FCS). Diesmal wurden jedoch nur 270 µl Medium in jedes Well pipettiert, da im nächsten Schritt noch 30 µl des jeweiligen Reagenz hinzugefügt wurden. So entstand ein Endvolumen von 300 µl mit einer 3 µM Konzentration der zu testenden Substanz bzw. 0,1% EtOH als Vehikelkontrolle. Die fertige Platte wurde dann für 48 h im Brutschrank inkubiert.

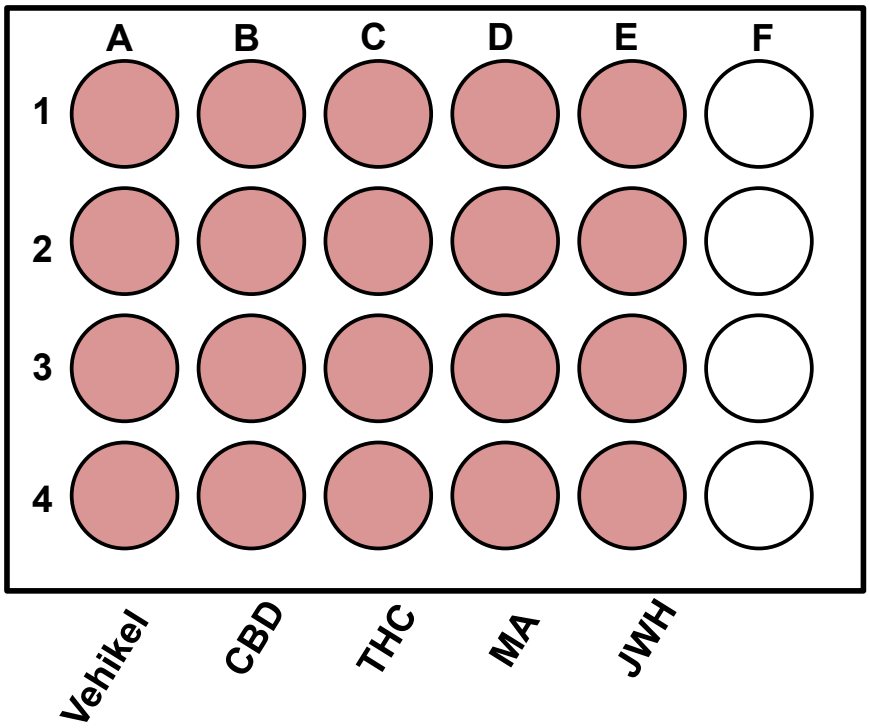

Abb. 3: Schematische Darstellung eines Stimulationsansatzes

24-Well Platte, 10^5 Zellen pro Well (A1 bis E4), Endvolumen: 300 µl (270 µl DMEM + 30 µl Stimulations-Lösung), Vehikel = 0,1% EtOH, CBD 3 µM, THC 3 µM, MA 3 µM, JWH 3 µM, n = 4 Experimente

2.2.3 Transfektion mit siRNA

Für den Nachweis eines kausalen Zusammenhanges zwischen antiangiogenen Effekten der Cannabinoide und der Hochregulation von TIMP-1 und ICAM-1 wurden Transfektionsversuche durchgeführt. Hierbei handelt es sich um ein etabliertes *in vitro*-Verfahren (Ramer et al., 2012), bei dem Zellen mit einer spezifischen doppelsträngigen RNA, einer siRNA, transfiziert werden. Bindet ein Einzelstrang der siRNA an den komplementären Bereich der zugehörigen mRNA, so wird diese gespalten und kann somit nicht mehr translatiert werden. Dieser Knockdown führt zu einer Unterbindung der Expression des entsprechenden Proteins. Für den Versuch wurden jeweils 10^5 A549-Zellen pro Well in einer 24-Well Platte jeweils in DMEM-Komplettmedium (10% FCS) ausgesät und anschließend mit Transfektionslösung (Endkonzentrationen der jeweiligen siRNA: TIMP-1 siRNA: 0,25 µg/ml, ICAM-1 siRNA: 1,25 µg/ml) im Brutschrank für 21 Stunden inkubiert. Nach 21 Stunden wurden die Zellen nach Abnahme der Überstände erneut mit den gleichen Endkonzentrationen der jeweiligen siRNA transfiziert. Diesmal wurde das Volumen der Transfektionen auf 270 µl begrenzt, um anschließend die Stimulationen mit jeweils 30 µl Cannabinoid-Lösung (final: 3 µM) oder einem Vehikel (final: 0,1% EtOH) in serumfreien DMEM durchzuführen. Es erfolgte eine 48-stündige Inkubation im Brutschrank. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden Migrations-Assays wie in Abschnitt 2.2.5 beschrieben bzw. Proteinbiochemische Untersuchungen der Zellüberstände (siehe 2.3) durchgeführt.

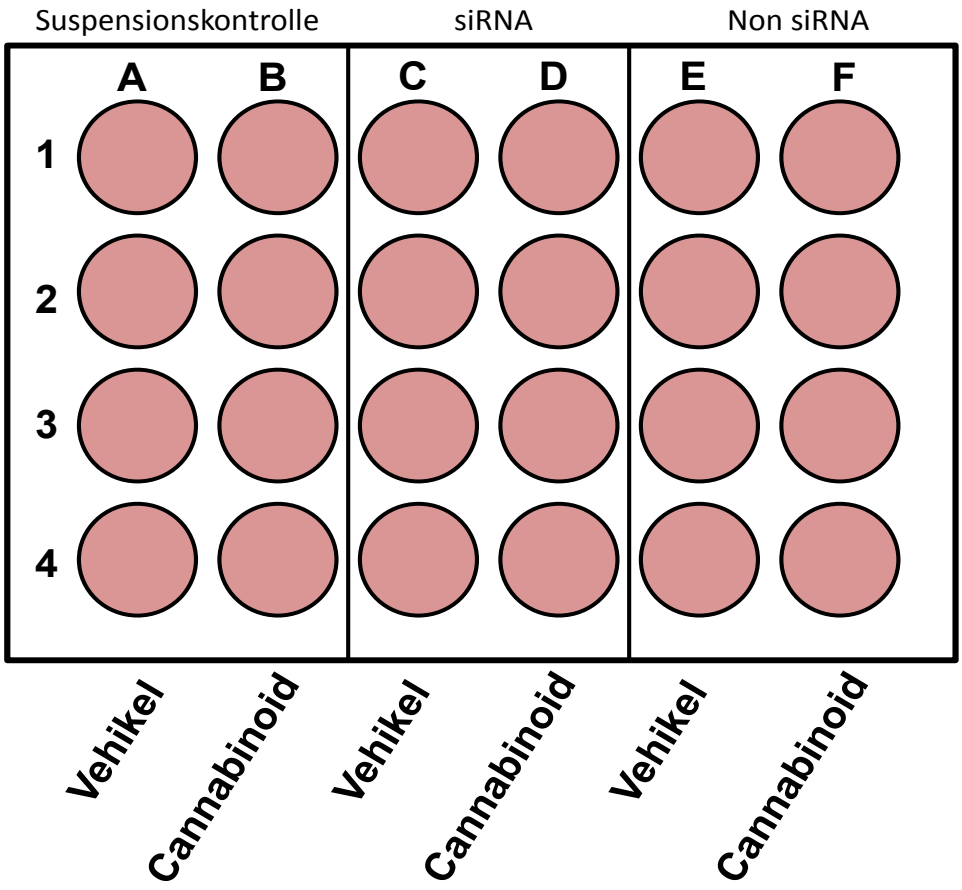

Abb. 4: Schematische Darstellung des Transfektionsversuches

24-Well Platte; 1 x 10^5 Zellen pro Well (A1 bis F4); Endvolumen 300 µl (240 µl serumfreies Komplettmedium + 30 µl Transfektionslösung + 30 µl Cannabinoid-Lösung); Suspensionskontrolle = RNA-freie Pufferlösung; siRNA = ICAM-1-siRNA (1,25 µg/ml) bzw. TIMP-1-siRNA (0,25 µg/ml); Non siRNA = negativ Kontrolle; Vehikel = 0,1% EtOH; Cannabinoid = CBD, THC, MA, oder JWH-133 jeweils 3 µM; n = 4 Experimente

2.2.4 Vorinkubation der A549-Zellen mit Rezeptorantagonisten

AM-251 und AM-630 sind spezifische Rezeptorantagonisten für den CB_1- bzw. CB_2-Rezeptor. Capsazepin antagonisiert TRPV1 (Ramer et al., 2010b; Ramer et al., 2012). Um die Beteiligung der Cannabinoidrezeptoren und des TRPV1 an den antiangiogenen Effekten der Cannabinoide zu belegen, wurden Versuche durchgeführt, bei denen die Tumorzellen vor der Stimulation mit Cannabinoiden mit den genannten Rezeptorantagonisten vorinkubiert wurden. Die Vorbehandlung und Aussaat der Tumorzellen erfolgte wie in Abschnitt 2.2.2 beschrieben in DMEM (0% FCS). Da die Antagonisten in DMSO gelöst waren, wurde stets auch eine entsprechende Vehikelkontrolle mitgeführt. Das Endvolumen betrug 300 µl pro

Well einer 24-Well Platte. Die Vorinkubation der Tumorzellen mit den Rezeptorantagonisten erfolgte in einer Konzentration von 1 µM für die Dauer von einer Stunde im Brutschrank. Die Verdünnungslösungen wurden mit PBS angesetzt. Im Anschluss erfolgte, wie unter Abschnitt 2.2.2 beschrieben, die Stimulation der Tumorzellen mit Cannabinoiden. Abb. 5 beschreibt den Versuchsaufbau schematisch.

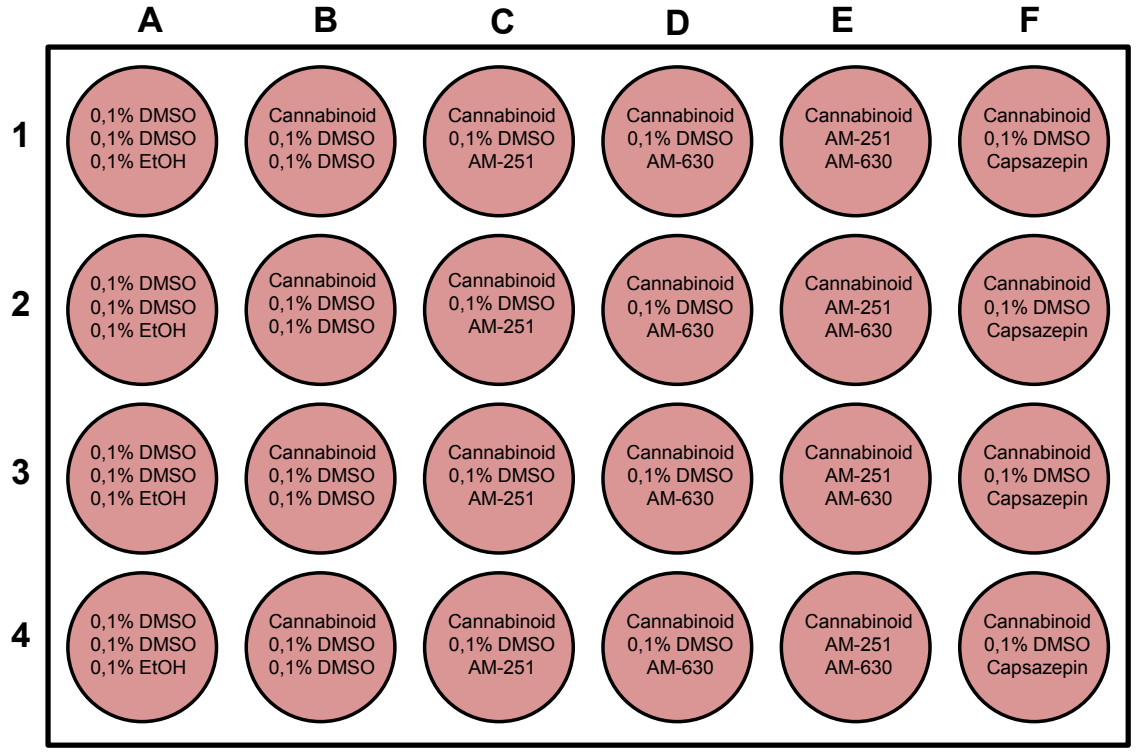

Abb. 5: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus

24-Well Platte; 1 x 10^5 Zellen pro Well (A1 bis F4); Endvolumen 300 µl; Cannabinoid = CBD; THC, MA oder JWH-133 je 3 µM; AM-251 = CB_1-Rezeptorantagonist, 1 µM; AM-630 = CB_2-Rezeptorantagonist, 1 µM; Capsazepin = TRPV1-Rezeptorantagonist; Inkubationszeit 1 h; n = 4 Experimente

2.2.5 Migrations-Assay mit konditionierten Medien (indirekte Stimulation)

Für das Migrations-Assay mit konditionierten Medien wurden die Überstände (konditionierte Medien) von zuvor stimulierten und 48 Stunden inkubierten Tumorzellen verwendet. Zur Untersuchung der Migration der HUVEC wurden Migrationsplatten (Transwell-Platten, *Boyden-Chambers*) in einem 24-Well-Format eingesetzt. Jedes Well enthält einen Einsatz (Insert) dessen Boden mit 8 µm großen Poren durchsetzt ist. Diese Poren ermöglichen es den HUVEC entlang eines chemotaktischen Gradienten in die untere Kammer eines Wells zu migrieren (Ramer et al., 2010a). Anschließend kann die Migration, nach Entfernung der nicht-migrierten Zellen von der Oberseite der *Inserts*, mittels eines kolorimetrischen Tests (WST-1-Test) quantifiziert werden. Zu jedem zu untersuchenden konditionierten Medium wurden 1 x 10^5 HUVEC in die Einsätze pipettiert. Unter sterilen Bedingungen wurden jeweils die Überstände aus einer Reagenz-Reihe vorsichtig abgenommen, in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und anschließend bei 4 °C und 1.300 x g fünf Minuten zentrifugiert, um einen zellfreien Überstand zu erhalten. Letzterer wurde nach dem Zentrifugieren abgenommen, in ein neues Reaktionsgefäß überführt und anschließend auf Eis gestellt. In der Zwischenzeit wurden kultivierte HUVEC mit vorgewärmten PBS gewaschen, mit Trypsin/EDTA vom Flaschenboden abgelöst, in 10 ml DMEM-Komplettmedium (10% FCS) resuspendiert, in ein 15 ml Röhrchen überführt und ausgezählt. Anschließend wurden die HUVEC bei 100 x g für fünf Minuten und bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und verworfen, das Zellpellet in 10 ml PBS resuspendiert. Jetzt wurde der Zellsuspension soviel Volumen abgenommen und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, dass sich in jedem Reaktionsgefäß 400.000 Zellen befanden (bei n = 4 Experimenten). Die Reaktionsgefäße wurden dann bei 100 x g und 4 °C für fünf Minuten zentrifugiert und anschließend auf Eis gestellt. Im nächsten Schritt wurde der Überstand vorsichtig abgesaugt und verworfen. Es erfolgte die Resuspension der HUVEC mit 1,2 ml des jeweiligen zu testenden konditionierten Mediums. Aus dieser Zellsuspension wurden anschließend jeweils 1 x 10^5 Zellen in die oberen Kammern einer Migrationsplatte überführt (Endvolumen 300 µl bei n = 4 Experimenten). In die untere Kammer eines jeden Wells wurden 750 µl DMEM-Komplettmedium (10% FCS) als Chemoattraktant pipettiert. Die Zellen wurden anschließend für 24 h im Brutschrank inkubiert. Um die Migration der Zellen mittels Viabilitätstest (WST-1-Test, siehe 2.2.11) quantifizieren zu können, wurde der Überstand aus den Inserts nach Ablauf der Inkubation abgesaugt und verworfen. Die Inserts wurden dann mit PBS ausgewaschen. Nicht migrierte Zellen auf der Oberseite des Inserts wurden vorsichtig mit einem Wattestäbchen entfernt und das PBS abgesaugt. Anschließend wurde jedes Insert in eine neue 24-Well Platte überführt. Jedes Well dieser Platte wurde zuvor mit 300 µl DMEM-serumfreies Medium und 50 µl WST-1-Lösung befüllt.

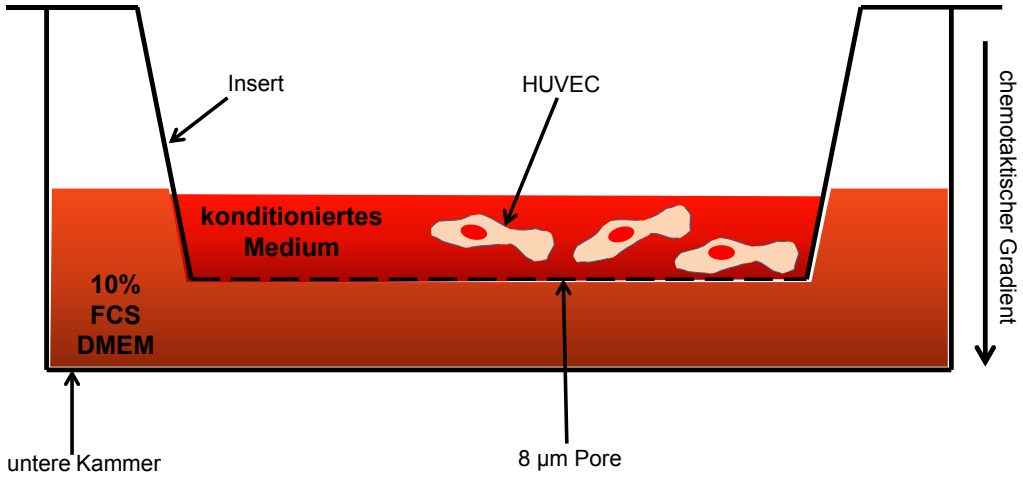

Abb. 6: Schematische Darstellung einer Transwell-Platte

Durch die 8 µm großen Poren des Inserts können die HUVEC entlang des chemotaktischen Gradienten migrieren. Obere Kammer (Insert) mit 300 µl konditioniertem Medium und 1 x 10^5 HUVEC. Untere Kammer mit 750 µl DMEM-Komplettmedium (10% FCS).

2.2.6 Migrations-Assay mit unkonditionierten Medien (direkte Stimulation)

Um einen direkten Effekt der Cannabinoide auf das Migrationsverhalten der HUVEC zu untersuchen, wurde ein Migrations-Assay mit unkonditionierten Medien, also bei direkter Stimulation der Zellen mit Cannabinoiden durchgeführt. Hierzu wurden zuvor kultivierte HUVEC mit vorgewärmten PBS gewaschen, mit Trypsin/EDTA vom Flaschenboden abgelöst, in 10 ml DMEM-Komplettmedium (10% FCS) resuspendiert, in ein 15 ml Röhrchen überführt und ausgezählt. Anschließend wurden die HUVEC bei 100 x g für fünf Minuten und bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und verworfen, das Zellpellet in serumfreiem DMEM-Medium resuspendiert. Aus dieser Zellsuspension wurden anschließend 1 x 10^5 Zellen in 270 µl Endvolumen in die obere Kammer einer Transwell-Platte (24-Well) ausgesät. Im Folgenden wurden 30 µl der zu testenden Substanzen in die Wells pipettiert. In die untere Kammer eines jeden Wells wurden 750 µl DMEM-Komplettmedium (10% FCS) als Chemoattraktant pipettiert. Die Zellen wurden anschließend für 24 h im Brutschrank inkubiert. Die Migration der HUVEC konnte nach der Inkubation mittels eines kolorimetrischen Tests (WST-1-Test) quantifiziert werden. Hierzu wurden die Zellen nach Ablauf der Inkubation, wie im vorigen Kapitel beschrieben, bearbeitet.

2.2.7 Viabilitäts-Assay mit konditionierten Medien (indirekte Stimulation)

Um auszuschließen, dass das antimigrative Verhalten der HUVEC durch zytotoxische Phänome hervorgerufen wird, wurde die Viabilität der Zellen unter dem Einfluss der konditionierten Medien gemessen. Hierzu wurden 1 x 10^5 Zellen pro Well in einer 48-Well Platte in jeweils 300 µl des zu testenden konditionierten Mediums ausgesät und 24 h im Brutschrank inkubiert. Im Anschluss daran wurde die Viabilität der Zellen mittels WST-1-Tests quantifiziert.

2.2.8 Viabilitäts-Assay mit unkonditionierten Medien (direkte Stimulation)

Ebenfalls musste ausgeschlossen werden, dass die Cannabinoide in den verwendeten Konzentrationen selbst zytotoxisch auf die HUVEC wirken und so einen antimigrativen Effekt auslösen. Hierfür wurden 1 x 10^5 Zellen pro Well in einer 48-Well Platte in 300 µl serumfreiem DMEM-Medium und einer Cannabinoid-Konzentration von jeweils 3 µM ausgesät und 24 h im Brutschrank inkubiert. Auch hierbei wurde anschließend die Viabilität der Zellen mittels WST-1-Tests quantifiziert.

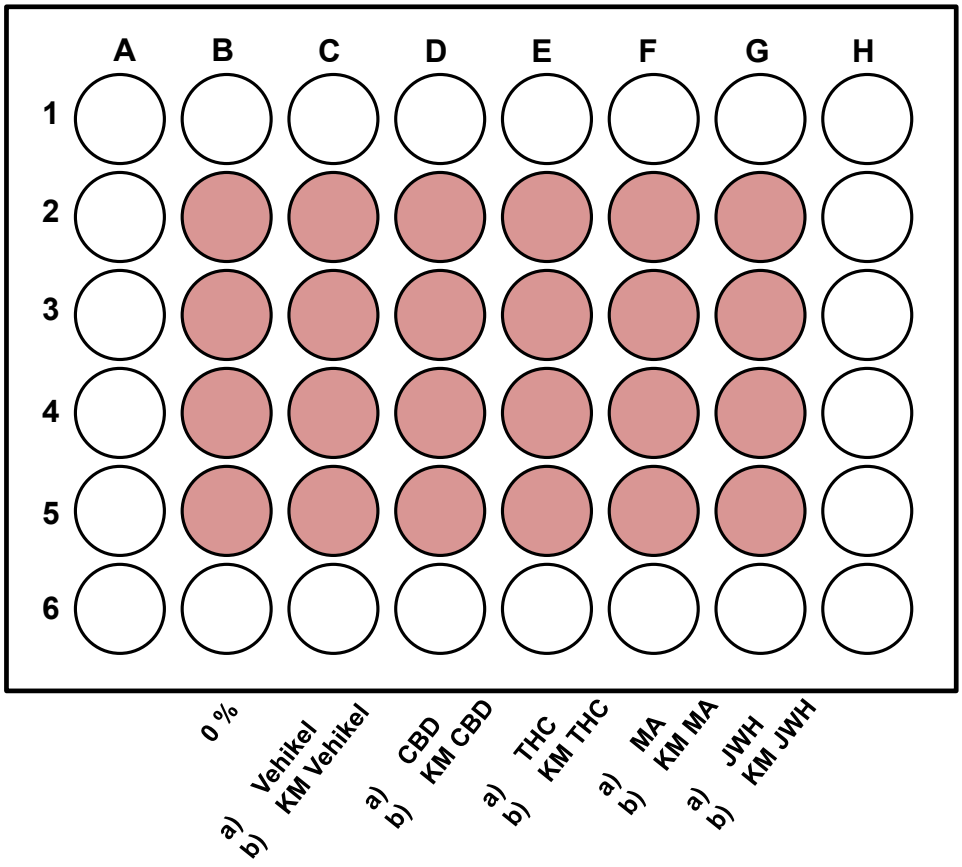

Abb. 7: Schematische Darstellung des Viabilitäts-Assays

48-Well Platte, 1 x 10^5 Zellen pro Well (B2 bis G5), a) direkte Stimulation, 300 µl Endvolumen (270 µl serumfreies DMEM-Medium + 30 µl Stimulations-Reagenz), 0% = serumfreies DMEM-Medium mit Vehikel, Vehikel = 0,1% EtOH, CBD 3 µM, THC 3 µM, MA 3 µM, JWH 3 µM, n = 4 Experimente, b) indirekte Stimulation (KM = konditioniertes Medium), 300 µl Endvolumen, n = 4 Experimente

2.2.9 Tube Formation Assay

Um die angiogenen Effekte der Cannabinoide bzw. der konditionierten Medien auf die HUVEC zu visualisieren und zu quantifizieren wurden Tubulogeneseversuche, sog. *Tube formation assays*, durchgeführt. Hierfür wurden, wie in anderen Arbeiten beschrieben (Pan et al., 2013), mit Matrigel beschichtete 48-Well Platten verwendet. Für das im Folgenden beschriebene Assay wurde das Setup allerdings leicht modifiziert. Der Versuch basiert auf der Erkenntnis, dass sich *in vitro* Endothelzellen auf Matrigeloberflächen in kapillarähnlichen Netzwerken (Intersektionen) organisieren, was dem Verhalten der Zellen während der Ausbildung von Gefäßstrukturen *in vivo* ähnelt (Grant et al., 1989). Es zeigte sich, dass eine verlässliche Anzahl an Intersektionen nur dann gebildet wurde, wenn HUVEC verwendet wurden, die nicht aus einer älteren als der zweiten Passage stammten. Aufgrund dieser

methodischen Schwierigkeit, wurden die Tubulogeneseversuche lediglich auf Schlüsselexperimente beschränkt. Der Boden eines Wells einer 48-Well Platte wurde unter sterilen Bedingungen mit 50 µl eisgekühltem Matrigel beschichtet. Anschließend erfolgte die Polymerisation des Matrigels bei 37 °C für zwei Stunden. Nach der Polymerisation wurden HUVEC-Zellsuspensionen mit 1 x 10^5 Zellen pro Well in die präparierten Wells ausgesät. Zuvor wurden die Endothelzellen nach folgendem Schema resuspendiert:

1. Vehikelkontrolle (serumfreies DMEM-Medium + 0,1% EtOH); konditionierte Medien Vehikel- oder Cannabinoid-behandelter A549-Zellen (siehe Abb. 12)

2. Vehikelkontrolle (serumfreies DMEM-Medium + 0,1% EtOH), serumfreies DMEM-Medium + Cannabinoid (CBD, THC, MA, JWH-133 jeweils 3 µM; siehe Abb. 10)

3. Vehikelkontrolle (serumfreies DMEM-Medium + PBS) oder serumfreies DMEM-Medium + rekombinantes TIMP-1 (0,1 ng/ml, 1 ng/ml, 10 ng/ml; siehe Abb. 14)

Das Endvolumen der jeweiligen Inkubation betrug 300 µl pro Well. Nach 24-stündiger Inkubation im Brutschrank wurden die Intersektionen fotografiert und durch Auszählen durch einen unabhängigen Untersucher im Blindversuch quantifiziert. Die Untersucher wurden angewiesen, alle geschlossenen ringförmigen Formationen innerhalb eines mikroskopischen Gesichtsfeldes zu zählen und zu dokumentieren.

2.2.10 Stimulation der HUVEC mit rekombinantem TIMP-1

Vor dem Hintergrund der Hypothese, dass TIMP-1 in kausalem Zusammenhang mit der Inhibierung der angiogenen Eigenschaften der HUVEC steht, wurde unter Verwendung von rekombinantem TIMP-1, dessen Cannabinoid-induzierte Freisetzung aus A549-Zellen simuliert. HUVEC wurden für Migrationsversuche in einer Dichte von 1 x 10^5 Zellen pro Well in die obere Kammer einer Migrationsplatte in serumfreiem DMEM ausgesät. Zusätzlich wurde in jedes Well rekombinantes TIMP-1, in PBS gelöst, pipettiert. Die Endkonzentrationen betrugen 0,1 ng/ml, 1 ng/ml und 10 ng/ml bei einem Volumen von 300 µl pro Well. Die untere Kammer der Migrationsplatte wurde mit 750 µl DMEM-Komplettmedium (10% FCS) als Chemoattraktant befüllt. Um auszuschließen, dass das PBS das Migrationsverhalten der HUVEC selbst beeinflusst, wurde zu jedem Versuch eine entsprechende Vehikelkontrolle mitgeführt. Für Viabilitätsversuche wurden HUVEC in einer Dichte von 1 x 10^5 Zellen pro Well in einer 48-Well Platte in serumfreien DMEM ausgesät und anschließend mit TIMP-1 in den genannten Endkonzentrationen bei einem Endvolumen

von 300 µl inkubiert. Für Tubulogeneseversuche wurden HUVEC in einer zuvor, wie unter Abschnitt 2.2.9 beschrieben, mit Matrigel beschichteten 48-Well Platte ebenfalls in einer Dichte von 1 x 10^5 Zellen pro Well in serumfreien DMEM ausgesät und mit rekombinanten TIMP-1 in den Endkonzentrationen 0,1, 1 und 10 ng/ml bei einem Endvolumen von 300 µl inkubiert. Die Inkubationsdauer betrug bei jedem der beschriebenen Versuche 24 Stunden. Nach Ablauf der Inkubation konnten Migration und Viabilität mittels WST-1-Test bzw. Tubulogenese mittels Auszählung der geschlossenen Intersektionen, die von HUVEC gebildet wurden, quantifiziert werden.

2.2.11 WST-1-Test

Der WST-1-Test stellt ein etabliertes, indirektes Verfahren zur Messung der Viabilität von Zellen dar. WST-1 (4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-Benzol-Disulfonat) ist ein Tetrazoliumsalz, das durch eine mitochondriale Dehydrogenase zu Formazan umgesetzt wird. Die Dehydrogenase ist ausschließlich in lebenden Zellen aktiv. Daher dient diese Reaktion als Viabilitätsnachweis. Bei der Bildung des Formazansalzes wird ein Farbumschlag von rot nach orange bis gelb verursacht. Durch diesen Farbumschlag wird wiederum eine photometrische Analyse der Proben ermöglicht.

Die Proben wurden jeweils bei einer Wellenlänge von 450 nm und einer Referenzwellenlänge von 690 nm vermessen. Die Eigenextinktion durch das im Medium enthaltene Phenolrot und unter zellfreien Bedingungen umgesetzte WST-1 wurde als Blankwert bei jeder Messung von den Rohwerten der Einzelmessungen subtrahiert. In der Durchführung wurden jeder Probe 50 µl WST-1 zugeführt und anschließend 30 – 60 min im Brutschrank inkubiert. Die Messung der Extinktion erfolgte bei einem mit bloßem Auge sichtbaren Farbumschlag.

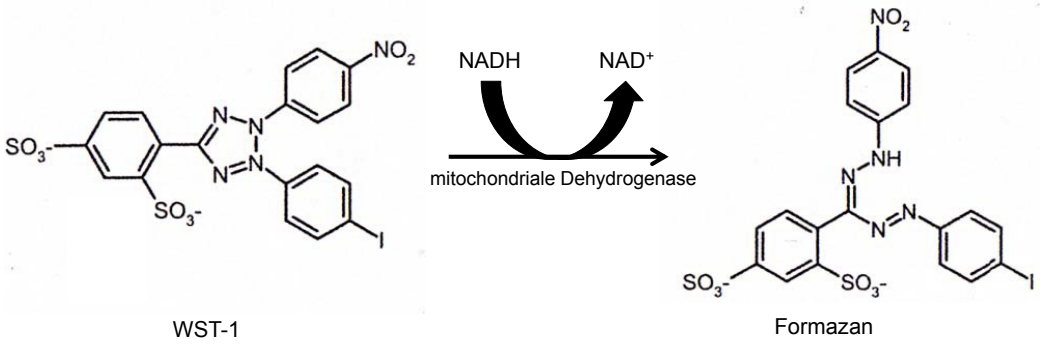

Abb. 8: Enzymatische Umsetzung von WST-1 zu Formazan
(modifiziert nach "Der Experimentator, Immunologie")

2.3 Proteinbiochemische Methoden

2.3.1 Lyse von Zellen

Zur quantitativen Ermittlung der ICAM-1- und β-Aktin-Proteinmengen wurden A549-Zellen in 6-Well Platten mit einer Dichte von 2 x 10^5 Zellen pro Well ausgesät, damit diese adhärieren und konfluent wachsen konnten. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und für 48 Stunden entweder mit einer Vehikelkontrolle oder mit einer entsprechenden Testsubstanz in serumfreien DMEM inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Lysate für weitere Untersuchungen verwendet. Hierfür wurden die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend kurz unter einem Abzug getrocknet. Für die darauf folgende Lyse der Zellen wurde ein Lysispuffer hergestellt, von dem in jedes Well 100 µl überführt wurden. Nach manueller Lösung der Zellen vom Boden der Wells wurden diese mit dem Lysispuffer in Reaktionsgefäße überführt. Zur Lyse wurden die Zellen jeweils 30 Minuten auf Eis gelagert und währenddessen mehrmals gevortext. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation für fünf Minuten bei 14.000 rpm. Die so gewonnenen Überstände wurden für die Proteinbestimmung und den anschließenden Western Blot verwendet.

2.3.2 Proteinbestimmung

Für die Analyse der ICAM-1- und β-Aktin-Proteinmengen wurden die Lysate wie unter Abschnitt 2.3.1 beschrieben verwendet. Zur Bestimmung der TIMP-1 Proteinlevel wurden A549-Zellen in 24-Well Platten mit einer Dichte von 1 x 10^5 Zellen pro Well ausgesät. Nach Erreichen einer Konfluenz wurden die Zellen, wie unter Abschnitt 2.2.2 beschrieben, behandelt. Nach 48-stündiger Inkubation wurden die Überstände abgenommen, bei 1.300 x g für fünf Minuten zentrifugiert und anschließend für Western Blot-Analysen von TIMP-1 verwendet.

Die Ermittlung des Gesamtproteins erfolgte mit dem BCA™ Protein Assay Kit. Die enthaltene BCA-Lösung (2 mg/ml) wurde mit Aqua dest. im Verhältnis 1:1 vermischt und zur Anfertigung einer Eichgeraden verwendet. Die Herstellung der Eichgeraden der Lysate erfolgte analog zu der der Überstände. Der einzige Unterschied bestand in der Verdünnung der Komponenten. Die Lysate wurden im Verhältnis 1:10, die Überstände im Verhältnis 1:5 jeweils mit Aqua dest. verdünnt. Je 10 µl dieser Lösungen wurden anschließend in die Wells einer 96-Well Platte pipettiert. Für die Eichgerade wurden die Lösungen als Doppelbestimmung, für die Proben als Dreifachbestimmung aufgetragen. Für das *Working Reagent* wurden aus dem BCA-Kit die Lösung A und B im Verhältnis 50:1 vermischt und von der fertigen Lösung je 200

µl in jedes Well überführt. Nach anschließender Inkubation von 30 Minuten bei 37 °C konnte die Extinktion am Photometer bei einer Wellenlänge von 570 nm gemessen werden. Anhand der sich daraus ergebenden Konzentrationen konnten unter Berücksichtigung der Verdünnungsgrade nun die Proteinmengen der einzelnen Proben in µg/µl ermittelt werden, die zur Durchführung der anschließenden SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese notwendig waren.

2.3.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) ist eine eindimensionale, vertikale Methode zur elektrophoretischen Auftrennung von Proteinen nach ihrer Molekülgröße. SDS (Sodiumdodecylsulfat) hat dabei die Funktion, als anionisches Detergenz die Eigenladung von Proteinen mit einer negativen Ladung zu maskieren. Legt man nun ein elektrisches Feld an, so wandern die in einem Trenngel befindlichen Proteine von der negativ geladenen Kathode zur positiv geladenen Anode. Je nach Ihrer Molekülgröße durchlaufen sie dabei das Gel entweder schneller oder langsamer. Hierbei gilt: je kleiner das Protein, desto schneller durchquert es das Gel.

Das Polyacrylamidgel besteht aus einem Sammel- und einem Trenngel. Das Sammelgel dient der Anhäufung der Proteine in kleinen Taschen, während im Trenngel die Auftrennung der Proteine erfolgt. Die Anfertigung der Gele erfolgte mit folgenden Komponenten (Die Angaben beziehen sich auf vier Gele mit einer Stärke von 1 mm):

Trenngel 10%		
	Aqua dest.	8,1 ml
	1,5 M Tris (pH 8,8)	5,0 ml
	10% (w/v) SDS	0,2 ml
	30%/0,8% (w/v) Polyacrylamid	6,6 ml
	TEMED	0,01 ml
	10% (w/v)APS	0,1 ml
Sammelgel 4%		
	Aqua dest.	6,1 ml
	1,5 M Tris (pH 8,8)	2,5 ml
	10% (w/v) SDS	0,1 ml
	30%/0,8% (w/v) Polyacrylamid	1,3 ml
	TEMED	0,01 ml
	10% (w/v)APS	0,05 ml

Nach dem Ausgießen der Gele wurden diese in eine mit elektrolythaltigem Laufpuffer gefüllte Gelelektrophoresekammer eingespannt. Vor der Beladung des Sammelgels wurden die Proteine mit fünffach konzentriertem Ladepuffer (Lämmli-Puffer) versetzt und für zehn Minuten auf 95 °C erhitzt. Die hohe Temperatur bewirkt eine Denaturierung der Proteine. Wasserstoffbrückenbindungen werden zerstört, sodass Tertiär- und Sekundärstrukturen aufgelöst werden. Zudem enthält der Ladepuffer β-Mercaptoethanol, wodurch zusätzlich eine Aufspaltung von Disulfidbrücken erreicht wird. Die Gelelektrophoresen liefen bei einer Stromstärke von 15 mA pro Gel. Die Stromstärke konnte auf 25 mA erhöht werden, sobald die Lauffront (Größenstandard = *Prestained Broad Range Marker*, Bio-Rad) das Trenngel erreichte. Nach Durchlaufen der Lauffrontmarker (Bromphenolblau) aus dem Gel, wurde die Elektrophorese gestoppt und die aufgetrennten Proteine konnten mittels Western Blot auf eine Nitrozellulosemembran überführt werden.

2.3.4 Western Blot

Der Western Blot ist ein Verfahren, bei dem durch Anlage eines elektrischen Feldes die aufgetrennten Proteine aus einem SDS-Polyacrylamidgel auf eine Nitrozellulosemembran übertragen werden. Aufgrund hydrophober Wechselwirkungen bleiben die Proteine an dieser Membran haften.

Mittels eines sog. Sandwich-Verfahrens wird eine luftleere Blot-Kammer aufgebaut, wobei die Nitrozellulosemembran zur positiv geladenen Anode und das Polyacrylamidgel zur negativ geladenen Kathode ausgerichtet werden. Die durch das SDS mit negativer Ladung maskierten Proteine wandern nach Anlegen des elektrischen Feldes in Richtung Anode. Weil es bei diesem Prozess zu nicht unbedeutender Wärmeentwicklung kommt, erfolgt der Proteintransfer in einem Eisbad unter Verwendung eines Methanol-Blotpuffers. Jedes Gel wurde für zwei Stunden bei 200 mA geblottet. Anschließend erfolgte die Färbung der Nitrozellulosemembran durch Ponceau-Färbung, um eine gleichmäßige Ladung der Proteine zu dokumentieren. Hierbei wurde auf der Membran eine Proteinbande bei 65 kDa sichtbar.

2.3.5 Immundetektion und Chemilumineszenz-Analyse

Für die Detektion von Proteinen ist es möglich, diese durch eine Antigen-Antikörper-Bindung zu visualisieren. Ein spezifischer Primärantikörper bindet dabei an ein Epitop des gesuchten Proteins, um dann wiederum von einem zweiten spezifischen Sekundärantikörper selbst an seinem f_c-Teil gebunden zu werden. Der Sekundärantikörper hat seinerseits am f_c-Teil eine Meerrettichperoxidase gebunden. Unter Verwendung eines Chemilumineszenz-Kits (ECL-

Kit) wird das darin enthaltene Luminol durch die Meerrettichperoxidase in einer chemischen Reaktion oxidiert. Das Produkt dieser Oxidationsreaktion ist chemilumineszierend und kann mit einer Geldokumentationsanlage (ChemiDoc®) sichtbar gemacht werden.

Die Nitrozellulosemembran wurde nach dem Blotvorgang für eine Stunde in einer 5%igen Milchpulverlösung bei Raumtemperatur inkubiert. Dieser Vorgang ist notwendig, um potenziell freie Proteinbindungsstellen an der Membran zu blockieren und falsch positive Antikörperbindungen zu verhindern. Nachfolgend fanden je zwei zehnminütige Waschgänge der Membran mit TBS-T statt, um im nächsten Schritt mit dem in 1%igen Milchpulver gelösten Primärantikörper über Nacht bei 4 °C inkubiert zu werden. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Primärantikörper-Lösung verworfen und die Membran abermals zweimal in TBS-T gewaschen. Jetzt wurde der ebenfalls in 1%igem Milchpulver gelöste Sekundärantikörper auf die Membran gegeben und mit dieser für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem zweimaligen Waschen mit TBS-T wurde die Membran kurz auf einem saugfähigen Papiertuch getrocknet. In der Zwischenzeit wurden die beiden Reaktionslösungen des ECL-Kits in einem bestimmten Verhältnis unter Lichtausschluss vermischt. Die Membranen wurden nun einzeln in die Geldokumentationsanlage (ChemiDoc™XRS, Bio-Rad) eingelegt und mit der fertigen Chemilumineszenz-Lösung benetzt. Während einer zehnminütigen Inkubationszeit wurden die Protein-Banden durch die Anlage detektiert und digital dokumentiert.

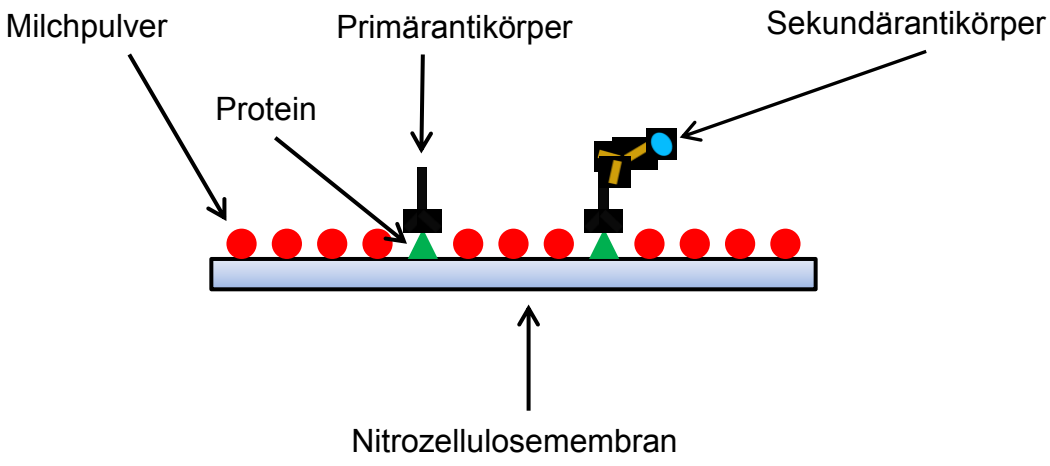

Abb. 9: Schematische Darstellung der Antigen-Antikörper-Bindung

2.3.6 Strippen von Membranen

Um gegebenenfalls auch andere Proteine auf der Nitrozellulosemembran nachweisen zu können, wurde die Membran für zweimal zwanzig Minuten mit einem Glycin-Strip-Puffer bei Raumtemperatur inkubiert. Durch dieses Verfahren (Stripping) werden die Antikörper von der Membran entfernt. Nach einmaligem Waschen mit TBS-T wurde noch einmal für eine Stunde eine Inkubation in 5%iger Milchpulverlösung durchgeführt, bevor die Membranen getrocknet und asserviert wurden.

2.3.7 Auswertung und Statistik

Statistische Analysen dieser Arbeit wurden ausschließlich mit der Software GraphPad Prism® durchgeführt. Die Quantifizierung der Proteinbanden erfolgte über eine videodensitometrische Analyse mit der Quantity One 1-D Analysis Software.

3 Ergebnisse

3.1 Direkter Effekt von Cannabinoiden auf das angiogene Verhalten von HUVEC

Um den direkten Einfluss verschiedener Cannabinoide auf die Endothelzell-Migration, -Viabilität und -Tubulogenese zu untersuchen, wurden HUVEC jeweils mit den Verbindungen CBD, THC, MA und JWH-133 in einer Endkonzentration von 3 µM für 24 Stunden inkubiert. Da zuvor publizierte Daten anhand eines A549-Xenograftmodells in athymischen Nacktmäusen eine Verringerung des Endothelzellmarkers CD31 und damit eine antiangiogene Wirkung von Cannabidiol belegen (28-tägige Behandlung der Mäuse mit jeweils 5mg/kg CBD alle 72 Stunden, i.p.) (Ramer et al., 2013), war zu erwarten, dass zumindest diese Testsubstanz eine Hemmung der angiogenen Fähigkeiten von HUVEC bewirkt. Allerdings zeigten sich bei den mit CBD inkubierten HUVEC, eine vermehrte Tubulogenese sowie ein signifikanter Anstieg der Migration im Vergleich zur Vehikel-Kontrolle. Eine signifikante Veränderung der Viabilität der Zellen nach Inkubation mit CBD konnte nicht nachgewiesen werden. In Anwesenheit der anderen Cannabinoide (THC, MA und JWH-133) veränderten sich sowohl die Tubulogenese als auch das Migrationsverhalten der HUVEC in vergleichbarer Weise im Sinne eines Anstiegs beider Parameter. Lediglich unter dem Einfluss von MA konnte hierbei ein signifikanter Anstieg der Tubulogenese im Vergleich zur Vehikel-Kontrolle gezeigt werden. Auch unter dem Einfluss von THC und JWH-133 konnte keine signifikante Abnahme der Viabilität nachgewiesen werden. Allerdings zeigte sich in Anwesenheit von MA eine, wenn auch nur geringfügige, Abnahme der Viabilität von 15,9% im Vergleich zur Vehikel-Kontrolle. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Abb. 10 zusammengefasst. Abb. 10C stellt einen repräsentativen lichtmikroskopischen Ausschnitt der Tubulogenese der HUVEC dar. Die Bilder zeigen jeweils einen Ausschnitt der in Abb. 10A und Abb. 10B quantitativ bestimmten Daten.

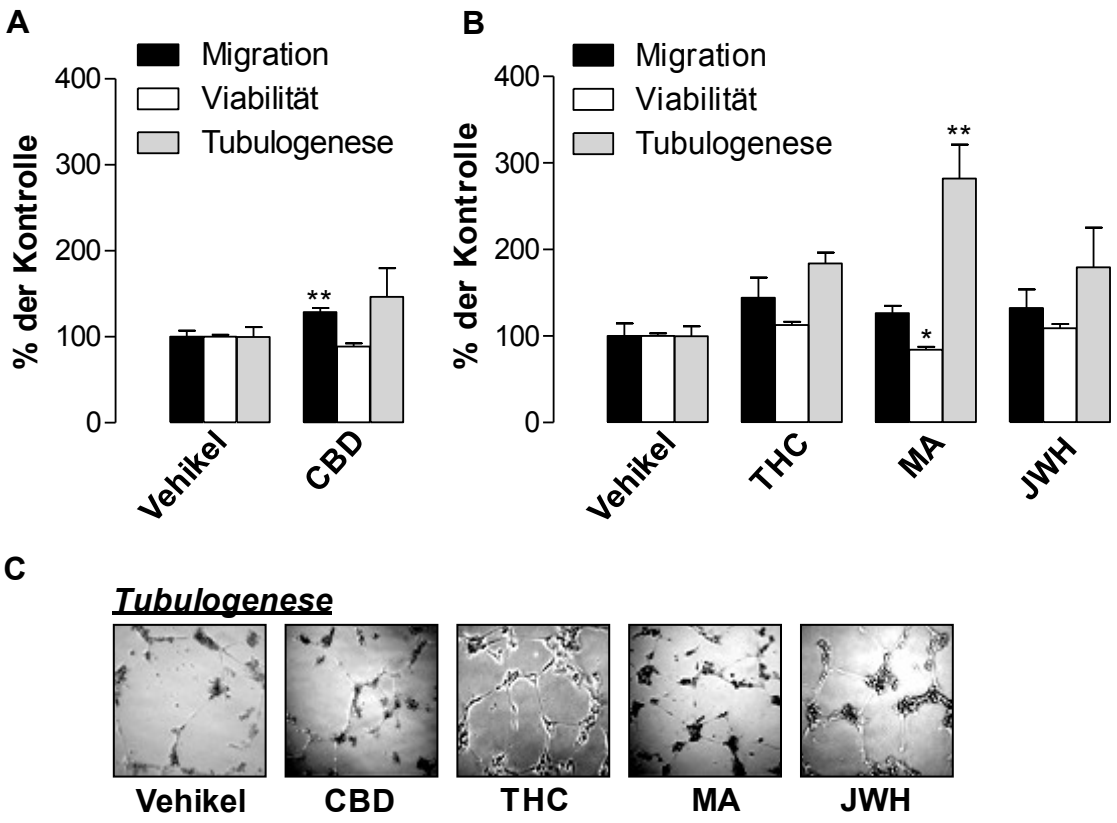

Abb. 10: Direkter Einfluss der Cannabinoide auf das Migrationsverhalten, die Viabilität und Tubulogenese von HUVEC

A und B: Migration (Boyden-Chamber-Assay, schwarze Balken), Viabilität (WST-1-Test, weiße Balken) und Tubulogenese (Tube formation Assay, graue Balken) der HUVEC nach 24-stündiger Inkubation mit CBD (A), THC, MA und JWH-133 (B) oder dem Vehikel in einer Konzentration von jeweils 3 µM der jeweiligen Testsubstanzen. *C:* Repräsentative lichtmikroskopische Aufnahmen der Tubulogenese der HUVEC auf einer Matrigel-Beschichtung nach 24-stündiger Inkubation mit CBD, THC, MA, JWH-133 oder dem Vehikel in einer Konzentration von jeweils 3 µM. Die Aufnahmen entsprechen den in den Histogrammen A und B gezeigten Daten. Die prozentualen Werte der Testsubstanzen beziehen sich auf die Werte der ausschließlich mit dem Vehikel behandelten Zellen (100%). Es handelt sich um Mittelwerte ± SEM aus n = 11 (Migration, A), n = 3 – 4 (Migration, B), n = 16 (Viabilität, A), n = 7 – 8 (Viabilität, B), bzw. n = 6 (Tubulogenese, A, B) Experimenten. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ vs. Vehikelkontrolle, erstellt mit Student's t-Test (A) bzw. ANOVA plus post hoc Dunnett Test (B).

3.2 Einfluss konditionierter Medien von Cannabinoid-stimulierten Tumorzellen auf das angiogene Verhalten von HUVEC

Da die Ergebnisse dieser ersten Untersuchungen der eigentlichen Annahme einer antiangiogenen Wirkung von Cannabinoiden widersprechen, sollte in weiteren Experimenten untersucht werden, inwieweit Cannabinoide möglicherweise die Mikroumgebung von Tumorzellen in Richtung eines antiangiogenen Mikromilieus verändern. Zu diesem Zweck wurden Tumorzellen mit Cannabinoiden inkubiert. Anschließend wurden die so konditionierten Medien von den Tumorzellen abgenommen und dazu verwendet, die funktionellen angiogenen Eigenschaften von HUVEC zu untersuchen. Die konditionierten Medien simulierten hierbei die Mikroumgebung von Tumoren, die mit den Gefäßen in deren Umgebung im Sinne einer Zell-Zell-Kommunikation zwischen Tumor und Gefäß in Kontakt treten.

A549-Zellen wurden hierzu für 48 h entweder mit einer Vehikelkontrolle (serumfreies konditioniertes DMEM mit Vehikel) oder einem Cannabinoid in einer Endkonzentration von jeweils 3 µM (ebenfalls in serumfreiem DMEM-Medium) inkubiert. Die so konditionierten Medien wurden nach der Inkubation von den Tumorzellen abgenommen, zentrifugiert und zur Resuspension von HUVEC verwendet. Die Zelldichte betrug jeweils 1 x 10^5 HUVEC pro Ansatz. Um das Migrationsverhalten der Endothelzellen in diesen durch Tumorzellen konditionierten Medien zu untersuchen, wurden die HUVEC in die obere Kammer einer Boyden-Chamber überführt und für 24 h inkubiert. Als Chemoattraktant wurde in die untere Kammer DMEM mit 10% FCS (v/v) gegeben (siehe Kapitel 2.2.5). Zur Quantifizierung der Viabilität und Untersuchung der Tubulogenese der HUVEC wurden die Zellen in 48-Well Platten bzw. in mit Matrigel beschichtete 48-Well Platten ausgesät und ebenfalls für 24 h inkubiert. Zu jedem Versuch wurde auch eine Vehikelkontrolle mit einer HUVEC-Zellsuspension aus serumfreiem unkonditionierten DMEM mitgeführt. Das Schema in Abb. 11 gibt einen Überblick über das beschriebene experimentelle Setup.

Abb. 12 zeigt das Ergebnis dieser Untersuchung: Die konditionierten Medien der A549-Zellen, die lediglich mit serumfreien DMEM (Vehikel KM) inkubiert wurden, führten, wie erwartet, im Vergleich zu denen, die mit serumfreiem unkonditionierten DMEM mit Vehikel (Vehikel) suspendiert wurden, zu einem signifikanten Anstieg der Migration, Viabilität und auch der Tubulogenese der HUVEC. Die HUVEC, welche den konditionierten Medien aus mit CBD behandelten A549-Zellen exponiert waren, zeigten nach 24-stündiger Inkubation eine signifikante Abnahme sowohl der Migration als auch der Tubulogenese im Vergleich zur Vehikelkontrolle (Vehikel KM). Im Gegensatz dazu wurde die Viabilität der HUVEC

verglichen mit den konditionierten Medien von A549-Zellen, die mit Vehikel behandelt wurden, nicht beeinflusst. Die HUVEC-Zellsuspensionen aus den Überständen der mit THC, MA und JWH-133 behandelten A549-Zellen führten nach 24-stündiger Inkubation zu vergleichbaren Ergebnissen. So konnte in allen drei Fällen im Vergleich zur Vehikelkontrolle (Vehikel KM) eine signifikante Abnahme der Migration der HUVEC ermittelt werden. Auch im Hinblick auf die Tubulogenese konnte ein ähnlich signifikanter Effekt, nämlich eine relative Abnahme der Tubulogenese, wie bei der Untersuchung mit CBD nachgewiesen werden. HUVEC-Zellsuspensionen, die mit konditionierten Medien von mit THC inkubierten A549-Zellen hergestellt wurden, zeigten keine signifikante Modulation der Zellviabilität im Vergleich zu den konditionierten Medien Vehikel-behandelter A549-Zellen. Lediglich in den Versuchen mit MA und JWH-133 wurde ein schwacher, aber dennoch signifikanter Abfall der Viabilität der HUVEC detektiert. Abb. 12C stellt einen repräsentativen lichtmikroskopischen Ausschnitt der Tubulogenese der Endothelzellen aus Abb. 12A und B dar.

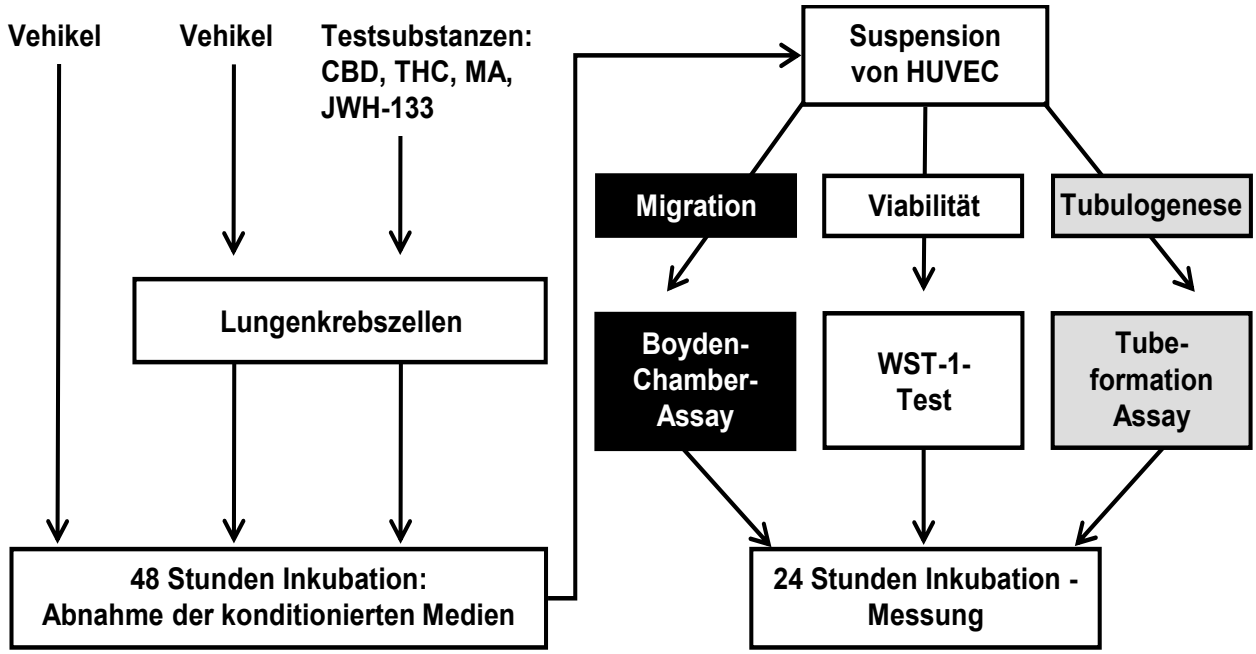

Abb. 11: Schematische Darstellung des Versuchsprotokolls zur Quantifizierung des Einflusses des Mikromillieus der Lungenkarzinomzellen auf das Verhalten von Endothelzellen

Durch 48-stündige Inkubation der NSCLC-Zelllinien A549, H460 und H358 mit einer Vehikelkontrolle, den Phytocannabinoiden CBD und THC, dem Endocannabinoid-Analogon MA bzw. dem spezifischen CB_2-Rezeptor-Agonisten JWH-133 in einer Konzentration von jeweils 3 µM wurden konditionierte Medien hergestellt. Im Anschluss wurden HUVEC entweder in einer serumfreien Vehikelkontrolle oder in den von den Lungenkarzinomzellen abgenommenen konditionierten Medien resuspendiert. Zur Evaluierung der Migration wurden die HUVEC-Suspensionen in Boyden-Chambers überführt. Als Chemoattraktant für die HUVEC diente DMEM-Komplettmedium (10% FCS), welches in die untere Kammer der Boyden-Chamber gefüllt wurde (siehe Abb. 6). Zur Quantifizierung der Viabilität diente der WST-1-Test. Die Bildung von kapillarähnlichen Gefäßstrukturen wurde durch Auszählung der geschlossenen ringförmigen Segmente, die von den HUVEC auf einer mit Matrigel beschichteten Oberfläche gebildet wurden, unter dem Lichtmikroskop quantifiziert. Die Messungen wurden in allen drei Versuchen jeweils nach 24-stündiger Inkubation der HUVEC mit den konditionierten Medien durchgeführt.

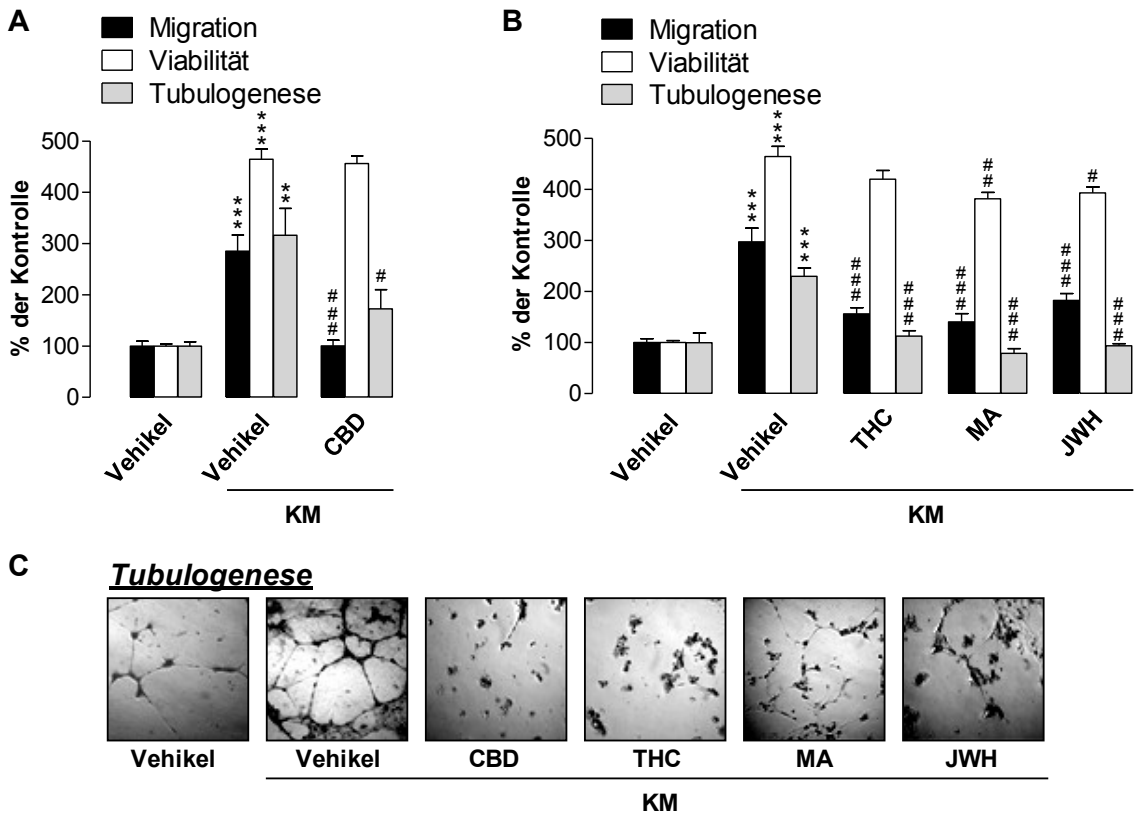

Abb. 12: Einfluss der von A549-Zellen gewonnenen konditionierten Medien auf das Migrationsverhalten, die Viabilität und die Tubulogenese der HUVEC

A und B: Migration (Boyden-Chamber-Assay, schwarze Balken), Viabilität (WST-1-Test, weiße Balken) und Tubulogenese (Tube formation Assay, graue Balken) der HUVEC nach Resuspension und 24-stündiger Inkubation entweder in einer serumfreien DMEM-Lösung (jeweils das Vehikel auf der linken Seite der Abbildungen, 100%) oder in den zuvor von A549-Zellen gewonnenen konditionierten Medien (KM). Die A549-Zellen wurden für 48 Stunden mit einer Vehikelkontrolle (Vehikel KM, A, B) oder einem der Cannabinoide CBD (A), THC, MA bzw. JWH-133 (B) in einer Konzentration von 3 µM inkubiert. *C:* Repräsentative lichtmikroskopische Aufnahmen der Tubulogenese (Tube formation) der HUVEC auf einer Matrigel-Beschichtung nach 24-stündiger Inkubation mit den entsprechenden Versuchslösungen. Die Aufnahmen entsprechen den Histogrammen aus Abb. 12A und B. Die prozentualen Werte der Testsubstanzen (KM) beziehen sich auf die Werte der ausschließlich mit dem Vehikel behandelten Endothelzellen (Kontrolle, 100%). Es handelt sich um Mittelwerte ± SEM aus n = 7 – 8 (Migration, A), n = 8 (Migration, B), n = 4 (Viabilität, A, B), n = 8 (Tubulogenese, A), bzw. n = 3 (Tubulogenese, B) Experimenten. ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ vs. 0% Vehikelkontrolle (serumfrei); # $P < 0,05$, ## $P < 0,01$, ### $P < 0,001$ vs. Vehikelkontrolle KM, erstellt mit ANOVA plus post-hoc Bonferroni Test.

3.3 Involvierung von Cannabinoid-Rezeptoren und TRPV1 in den antimigratorischen Effekt von Cannabinoiden

Neuere Publikationen weisen darauf hin, dass sowohl CB_1- und CB_2-Rezeptoren als auch TRPV1 in den Membranen von A549-Zellen nachweisbar sind (Ramer et al., 2012). Um die Rolle dieser Rezeptoren im Hinblick auf antimigratorische Effekte zu untersuchen, wurden in folgend dargestellten Experimenten entsprechende Rezeptorantagonisten eingesetzt. Es handelte sich hierbei um AM-251 als Antagonist für den CB_1-Rezeptor, um AM-630 als Antagonist am CB_2-Rezeptor sowie um Capsazepin, einem Antagonisten des TRPV1. Die Rezeptorantagonisten wurden jeweils in Konzentrationen von 1 µM verwendet. Frühere Untersuchungen haben diesbezüglich ergeben, dass eine Endkonzentration von 1 µM ausreichend ist, um jeweils sowohl den CB_1- und CB_2-Rezeptor als auch den TRPV1 zu antagonisieren (Mukherjee, 2004; Ramer et al., 2010b; Ramer et al., 2012). Durch Vorinkubation der A549-Zellen mit AM-251, AM-630 oder der Kombination beider Rezeptorantagonisten für die Dauer von einer Stunde und anschließender Behandlung mit den Cannabinoiden CBD, THC und MA (jeweils 3 µM) konnte der inhibitorische Einfluss der Cannabinoide auf das Migrationsverhalten der HUVEC im Vergleich zur Vehikelkontrolle signifikant vermindert bzw. aufgehoben werden. Die Verwendung des TRPV1-Antagonisten Capsazepin führte in den Versuchsreihen mit CBD und MA zu ähnlichen Werten. Abb. 13 fasst die Ergebnisse dieser Untersuchung in Form von Histogrammen zusammen. Wie in Abb. 13D dargestellt, führten die konditionierten Medien von A549-Zellen, die mit den Rezeptorantagonisten in Abwesenheit der Cannabinoide inkubiert wurden, zu einem leichten Anstieg der HUVEC-Migration.

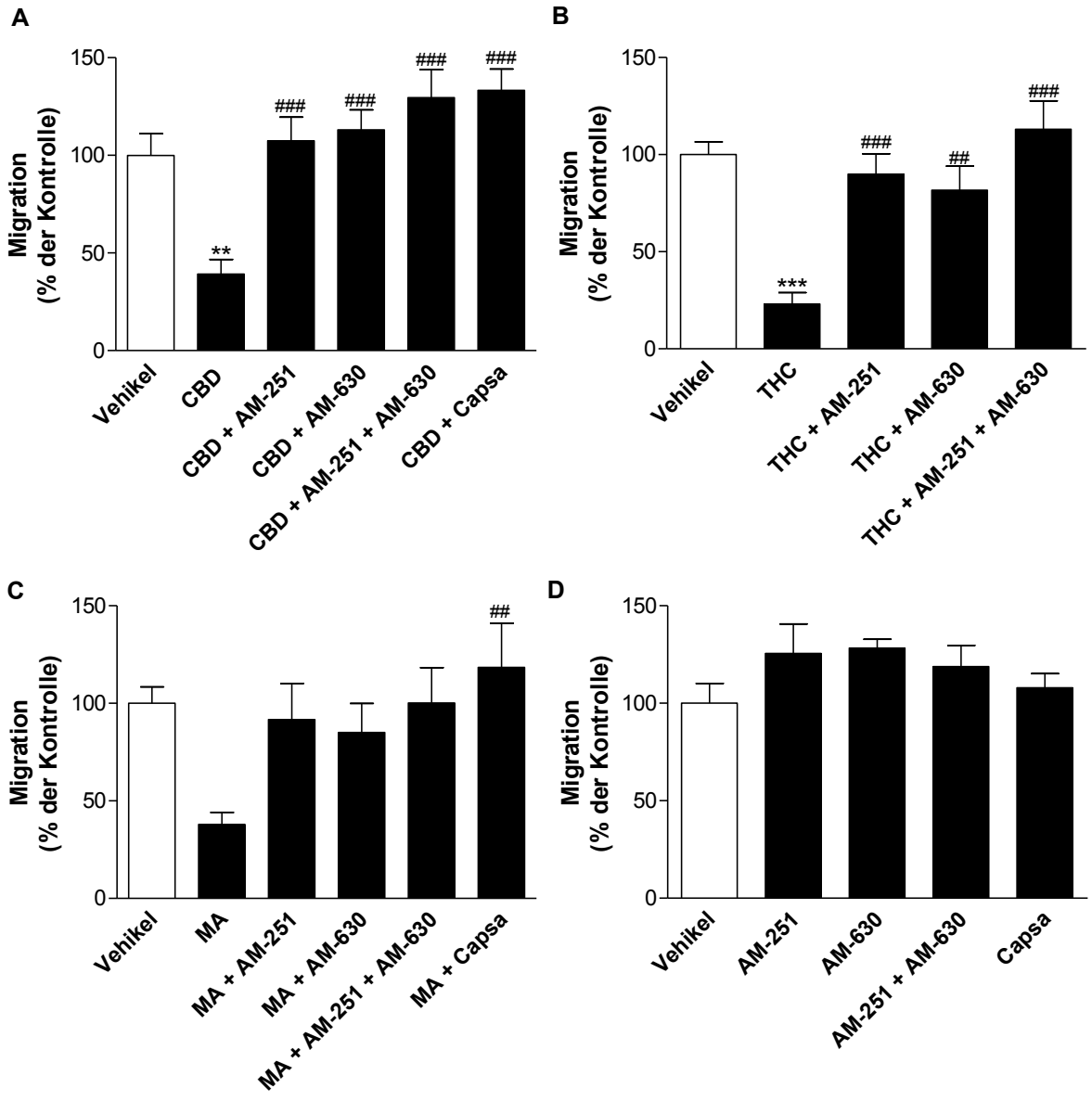

Abb. 13: Beteiligung der Cannabinoid-Rezeptoren (CB_1, CB_2) und des TRPV1 am antimigratorischen Einfluss konditionierter Medien Cannabinoid-behandelter A549-Zellen auf HUVEC

A, B und C: Einfluss von AM-251 (CB_1-Antagonist, A – C), AM-630 (CB_2-Antagonist, A – C) und Capsazepin (Capsa, TRPV1-Antagonist, A, C) auf die Hemmung der HUVEC-Migration durch konditionierte Medien, die von A549-Zellen gewonnen wurden. Die Lungenkarzinomzellen wurden mit dem entsprechenden Rezeptorantagonisten in einer Konzentration von jeweils 1 µM für 60 Minuten vorbehandelt. Anschließend erfolgte die Stimulation der Zellen mit den Cannabinoiden CBD (A), THC (B) und MA (C) jeweils in einer Konzentration von 3 µM. Die Zellen inkubierten nun für die Dauer von 48 Stunden bevor die Überstände abgenommen wurden. In diesen Überständen wurden HUVEC resuspendiert und

jeweils in die obere Kammer einer Boyden-Chamber überführt. Die daraufhin folgende Inkubationszeit betrug 24 Stunden. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Migration nach Entfernung der nicht-migrierten HUVEC aus der oberen Kammer des Boyden-Chamber-Systems quantifiziert. D: Einfluss von AM-251, AM-630 und Capsazepin auf die HUVEC-Migration in Abwesenheit der Cannabinoide nach einer Inkubationszeit von 49 Stunden. Die prozentualen Werte beziehen sich auf die Gruppe der HUVEC, die mit konditionierten Medien Vehikel-behandelter A549-Zellen resuspendiert wurden (Kontrolle, 100%). Es handelt sich um Mittelwerte ± SEM aus n = 11 – 12 (A) bzw. n = 7 – 8 (B, C, D) Experimenten. ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ vs. entsprechender Vehikelkontrolle; ## $P < 0,01$, ### $P < 0,001$ vs. der mit dem entsprechenden Cannabinoid behandelten Gruppe; erstellt mit ANOVA plus post-hoc Bonferroni Test.

3.4 Untersuchung des angiogenen Verhaltens von HUVEC unter dem Einfluss von rekombinantem TIMP-1

Frühere Arbeiten verschiedener Forschungsgruppen konnten die Beteiligung von TIMP-1 an der Hemmung der Angiogenese belegen (Moses et al., 1990; Johnson et al., 1994; Seandel et al., 2001). Darüber hinaus identifizierten vergangene Studien Cannabinoide als potenzielle Induktoren für die Synthese und Freisetzung von TIMP-1. Maßgeblich beteiligt am TIMP-1-induktorischen Mechanismus sind die Cannabinoid-Rezeptoren CB_1 und CB_2 sowie der TRPV1 in Lungenkarzinom-Zellen (Ramer und Hinz, 2008; Ramer et al., 2010a; Ramer et al., 2012). Ziel der folgenden Versuchsreihe war es, einen möglichen Zusammenhang zwischen der Freisetzung von TIMP-1 aus A549-Zellen in konditionierte Medien und dem beobachteten antimigrativen Effekt auf HUVEC zu untersuchen. Um die Cannabinoid-induzierte Freisetzung von TIMP-1 aus Tumorzellen zu simulieren, wurde im Folgenden rekombinantes TIMP-1 zu einer direkten Stimulation von HUVEC in serumfreien Medien verwendet. Wie in Abb. 14 dargestellt, verursachte das exogen zugeführte rekombinante TIMP-1 eine konzentrationsabhängige Hemmung der HUVEC-Migration und der Tubulogenese ohne dabei die Zellviabilität signifikant zu beeinflussen.

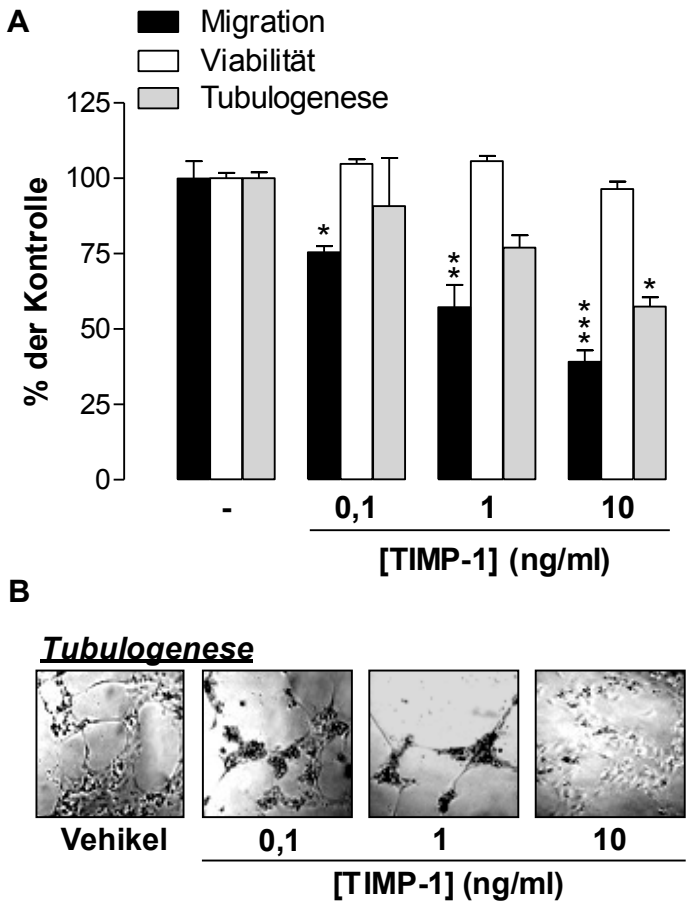

Abb. 14: Einfluss von rekombinantem TIMP-1 auf die Migration, Viabilität und Tubulogenese von HUVEC

A: Migration (Boyden-Chamber-Assay, schwarze Balken), Viabilität (WST-1-Test, weiße Balken), Tubulogenese (Tube formation Assay, graue Balken) der HUVEC nach 24-stündiger Inkubation entweder mit einer Vehikelkontrolle (-) oder mit rekombinantem TIMP-1 in den abgebildeten Konzentrationen von rekombinatem TIMP-1 [TIMP-1]. *B:* Repräsentative lichtmikroskopische Aufnahmen der Tubulogenese (Tube formation) der HUVEC auf einer Matrigel-Beschichtung nach 24-stündiger Inkubation mit den angegebenen Stimulationen. Die Aufnahmen sind den Experimenten der Histogramme aus Abb. 14A entnommen. Die prozentualen Werte beziehen sich auf die Werte der ausschließlich mit dem Vehikel behandelten Endothelzellen (100%). Es handelt sich um Mittelwerte ± SEM aus n = 3 (Migration), n = 4 (Viabilität), bzw. n = 3 (Tubulogenese) Experimenten. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ vs. entsprechender Vehikelkontrolle; erstellt mit ANOVA plus post-hoc Dunnett Test.

3.5 Knockdown von TIMP-1 in Cannabinoid-behandelten A549-Zellen

In Ergebnissen einer bereits publizierten Studie konnte gezeigt werden, dass durch eine Transfektion von A549-, H460- und H358-Zellen mit einer TIMP-1 siRNA in einer Konzentration von 0,25 µg/ml und einer Inkubationsdauer von 72 h die Cannabinoid-induzierte Expression von TIMP-1 signifikant gehemmt wird (Ramer et al., 2012). Unter Anwendung des gleichen Versuchsprotokolls, wobei jedoch die Inkubationszeit auf 48 Stunden verkürzt wurde, wurde die Cannabinoid-induzierte TIMP-1-Expression und die Hemmung der Migration von Endothelzellen in entsprechend konditionierten Medien auf einen möglichen kausalen Zusammenhang hin untersucht. Die Ergebnisse, welche in den Abb. 15A bis D grafisch dargestellt sind, zeigen zunächst eine Hemmung der Migration durch die jeweiligen Cannabinoide, wenn HUVEC in konditionierten Medien von A549-Zellen resuspendiert wurden, die zusätzlich zum Cannabinoid und dem Vehikel des Cannabinoids (0,1% Ethanol) noch mit den Lösungsmitteln der siRNA und den entsprechenden Transfektionsreagenzien behandelt wurden (Abb. 15A bis D, jeweils die zwei linken Balken der Histogramme). Die gleichzeitige Inkubation eines Cannabinoids mit einer *non-interfering* siRNA-Kontrolle, also einer siRNA-Sequenz, die an keiner RNA komplementär binden kann, diente bei jedem Ansatz als zusätzliche Negativkontrolle. So konnte ein möglicher Effekt eines Kontaktes der Zellen mit RNA ausgeschlossen werden. Auch diese Kontrollen (Abb. 15A bis D, die jeweils beiden rechten Balken in den Histogrammen) zeigten eine antimigrative Wirkung bei allen getesteten Cannabinoiden. Der jeweilige durch siRNA-Transfektion erzielte Knockdown von TIMP-1 (Abb. 15A bis D, jeweils die beiden mittleren Balken der Histogramme) bewirkte eine Aufhebung des antimigrativen Effekts, den konditionierte Medien von Cannabinoid-behandelten A549-Zellen auf HUVEC in den Kontrollgruppen ausüben.

Die Western Blot-Analysen, welche ebenfalls in Abb. 15A bis D dargestellt sind, belegen, dass die Transfektion der A549-Zellen mit der TIMP-1 siRNA ausreichend war, um eine Verminderung der Cannabinoid-induzierten TIMP-1-Expression ohne Beeinflussung der basalen Freisetzung zu erreichen.

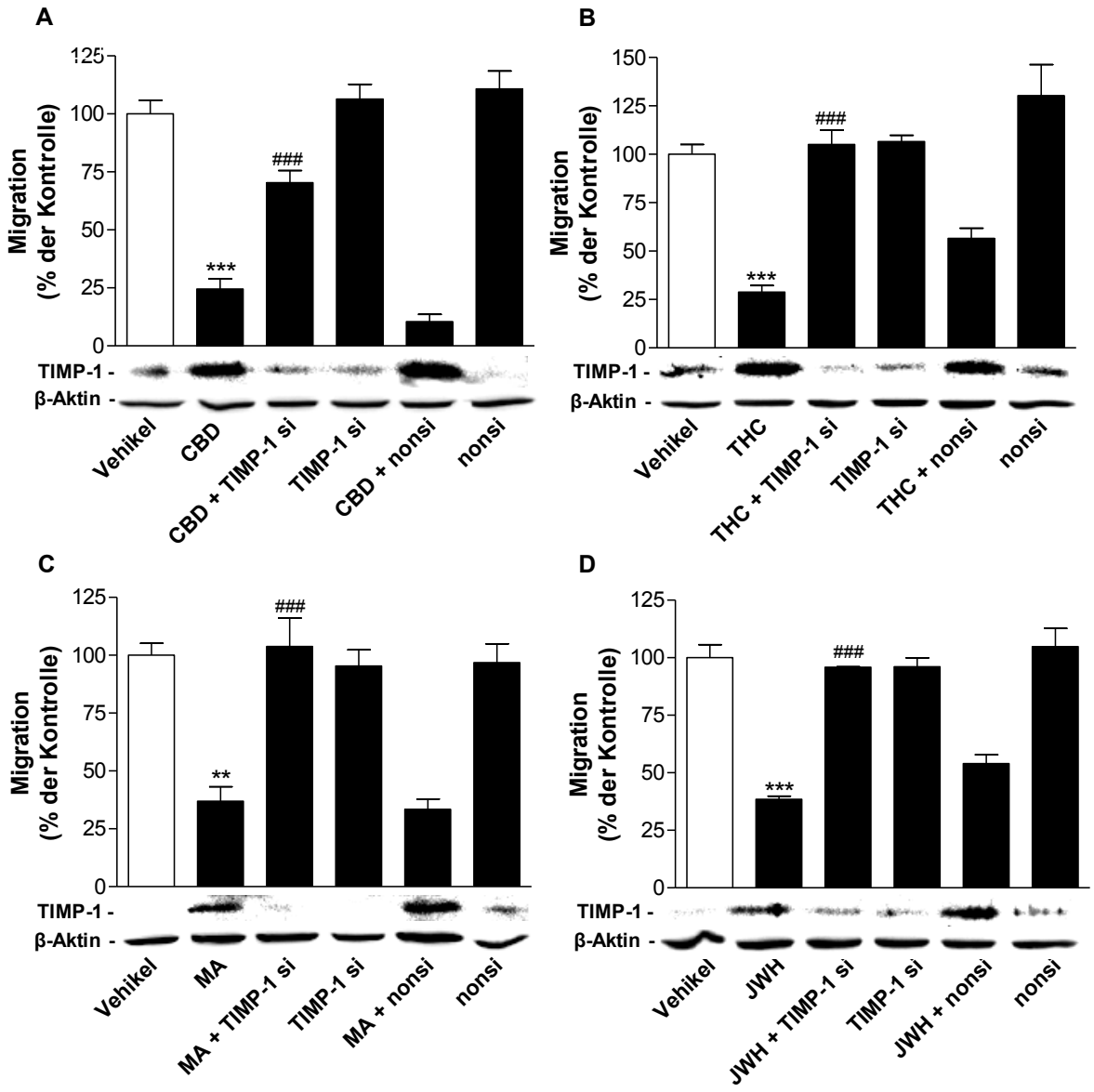

Abb. 15: Einfluss der TIMP-1 siRNA-Transfektion von A549-Zellen auf die Migration von HUVEC

A – D: A549-Zellen wurden mit 0,25 µg/ml TIMP-1 siRNA (TIMP-1 si) bzw. non-silencing siRNA (nonsi) für die Dauer von 21 Stunden in DMEM-Komplettmedium (10% FCS) transfiziert. Anschließend erfolgte die erneute Transfektion in gleicher Konzentration diesmal jedoch in serumfreiem DMEM. Zusätzlich wurden die Zellen mit CBD (A), THC (B), MA (C) bzw. JWH-133 (D) jeweils in einer Konzentration von 3 µM stimuliert und im Folgenden für 48 Stunden inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Überstände abgenommen und zur Resuspension mit den HUVEC verwendet. Die HUVEC-Suspensionen wurden nun jeweils in die obere Kammer einer Boyden-Chamber überführt, um nach 24-stündiger Inkubation die Migration der Endothelzellen quantifizieren zu können. In gleichzeitig durchgeführten Experimenten, die unter den gleichen Bedingungen stattfanden, konnte der

Knockdown von TIMP-1 kontrolliert werden. Hierzu wurden Analysen der Zellkultur-Überstände der A549-Zellen nach 48-stündiger Inkubation in 24-Well Platten mittels Western Blot durchgeführt. Die prozentualen Werte der Testsubstanzen beziehen sich auf die Werte der Gruppe der mit den konditionierten Medien Vehikel-behandelter A549-Zellen exponierten Endothelzellen (100%). Es handelt sich um Mittelwerte ± SEM aus n = 4 (A, B, C) bzw. n = 3 – 4 (D) Experimenten. ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ vs. zugehöriger Vehikelkontrolle; ### $P < 0,001$ vs. der entsprechenden Cannabinoid-behandelten Gruppe ohne siRNA; erstellt mit ANOVA plus post-hoc Bonferroni Test. Die Abbildungen zu den Western Blot-Analysen stellen jeweils repräsentative Experimente dar. Als Ladekontrolle wurde Aktin aus den jeweiligen Zelllysaten bestimmt.

3.6 Knockdown von ICAM-1 in Cannabinoid-behandelten A549-Zellen

Da in einer früheren Publikation ICAM-1 als vorgeschalteter Mediator der Cannabinoid-induzierten TIMP-1-Expression belegt werden konnte (Ramer et al., 2012), sollte mittels der angewendeten funktionellen Methoden untersucht werden, ob auch ein Knockdown des TIMP-1-Induktor ICAM-1 zu einer Aufhebung des antimigrativen Potenzials konditionierter Medien Cannabinoid-behandelter A549-Zellen führt.

Hinsichtlich dieses Aspektes wurden im Folgenden Experimente mit dem Ziel durchgeführt, eine mögliche Beteiligung der Cannabinoid-induzierten ICAM-1-Expression auf die antimigrativen Effekte der Cannabinoide auf HUVEC zu untersuchen. Im Einklang mit den Untersuchungsergebnissen bezüglich der Rolle von ICAM-1 als Trigger der Cannabinoid-induzierten Expression von TIMP-1 konnten in den durchgeführten Experimenten durch Transfektion der A549-Zellen mit ICAM-1 siRNA ähnliche Ergebnisse wie in den Versuchen des vorhergehenden Kapitels erreicht werden. In Abb. 16A bis D ist die signifikante Aufhebung des antimigrativen Effektes der konditionierten Medien auf die HUVEC unter Verwendung von ICAM-1 siRNA im Vergleich zur ausschließlichen Behandlung der A549-Zellen mit Cannabinoiden grafisch dargestellt. Um den Knockdown von ICAM-1 durch Transfektion der A549-Zellen mit der ICAM-1 siRNA quantifizieren zu können, wurden auch zu diesem Experiment entsprechende Western Blot-Analysen durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Analysen stehen im Einklang mit den oben geschilderten Ergebnissen hinsichtlich des Migrationsverhaltens der HUVEC und werden ebenfalls in den Abb. 16A bis D gezeigt.

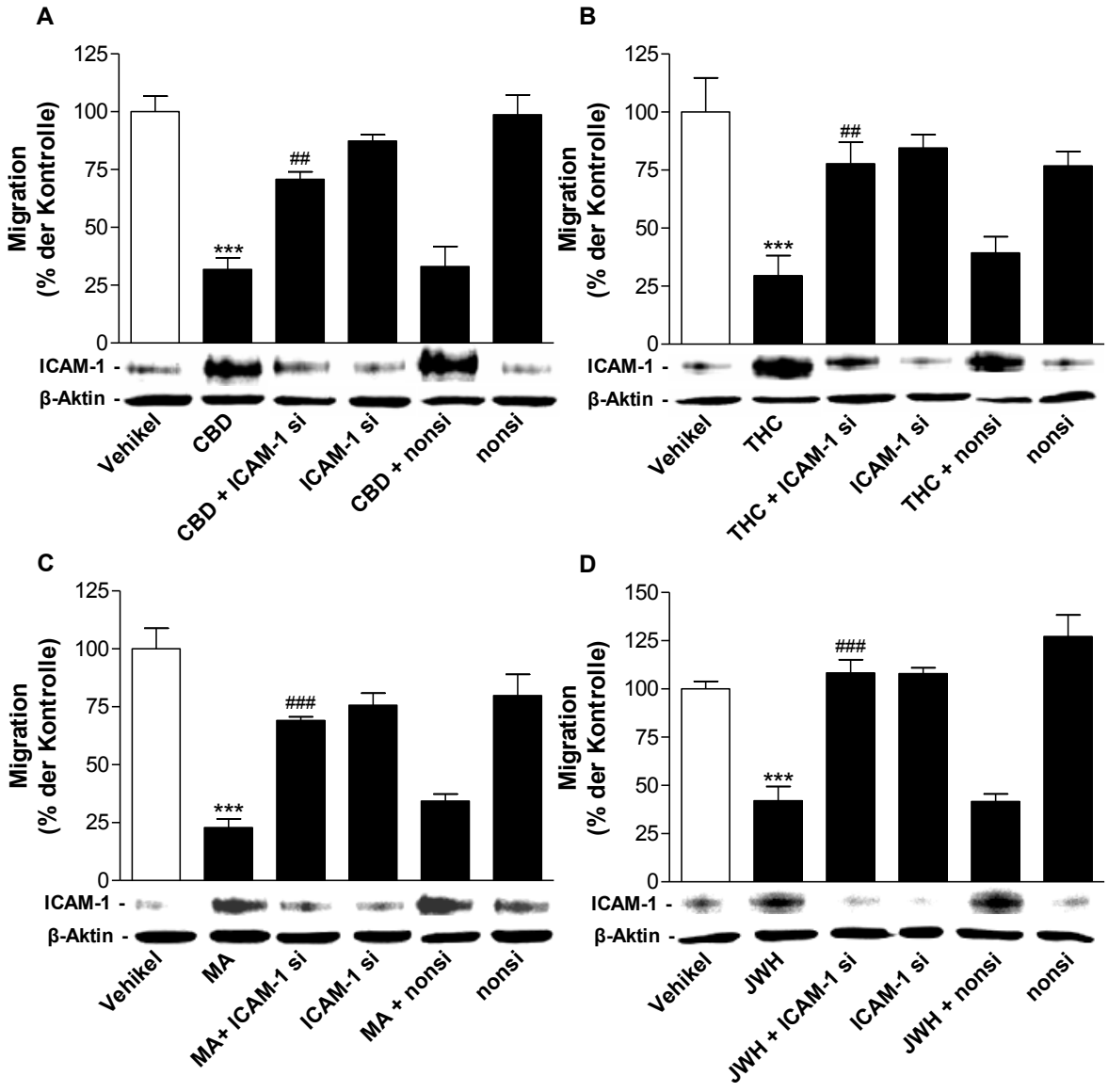

Abb. 16: Einfluss der ICAM-1 siRNA-Transfektion von A549-Zellen auf die Migration von HUVEC

A – D: Die A549-Zellen wurden mit 1,25 µg/ml ICAM-1 siRNA (ICAM-1 si) bzw. non-silencing siRNA (nonsi) für die Dauer von 21 Stunden in DMEM-Komplettmedium (10% FCS) transfiziert. Anschließend erfolgte die erneute Transfektion in gleicher Konzentration, diesmal jedoch in serumfreiem DMEM. Zusätzlich wurden die Zellen mit CBD (A), THC (B), MA (C) bzw. JWH-133 (D) jeweils in einer Konzentration von 3 µM stimuliert und im Folgenden für 48 Stunden inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Überstände abgenommen und zur Resuspension mit den HUVEC verwendet. Die so hergestellten HUVEC-Suspensionen wurden nun jeweils in die obere Kammer einer Boyden-Chamber überführt, um nach 24-stündiger Inkubation die Migration der Endothelzellen quantifizieren zu können. In gleichzeitig durchgeführten Experimenten, die unter ähnlichen Bedingungen stattfanden, konnte

der Knockdown von ICAM-1 kontrolliert werden. Hierzu wurden Analysen der Zellkultur-Überstände der A549-Zellen nach 48-stündiger Inkubation in 6-Well Platten mittels Western Blot durchgeführt. Die prozentualen Daten-Werte der Testsubstanzen beziehen sich jeweils auf die Werte der HUVEC-Migration, die mit konditionierten Medien Vehikel-behandelter A549-Zellen erhoben wurden (100%). Es handelt sich um Mittelwerte ± SEM aus n = 3 (A,B) bzw. n = 4 (C,D) Experimenten. *** $P < 0,001$ vs. zugehöriger Vehikelkontrolle; ## $P < 0,01$, ### $P < 0,001$ vs. der entsprechenden Cannabinoid behandelten Gruppe ohne siRNA; erstellt mit ANOVA plus post-hoc Bonferroni Test. Die Abbildungen zu den Western Blot-Analysen stellen jeweils repräsentative Experimente dar. Als Ladekontrolle wurde Aktin aus den jeweiligen Zelllysaten bestimmt.

3.7 Untersuchung des angiogenen Verhaltens von HUVEC unter Verwendung konditionierter Medien anderer Lungentumor-Zelllinien

Um auszuschließen, dass sich der nachgewiesene indirekte, Cannabinoid-induzierte, antimigratorische Effekt auf die HUVEC auf A549-Zellen beschränkt, wurden zusätzliche Schlüssel-Experimente mit anderen NSCLC-Zelllinien (H460, H358) durchgeführt. Analog zum experimentellen Protokoll im Umgang mit den A549-Zellen wurden diese Zelllinien ebenfalls für 48 Stunden entweder mit einer Vehikelkontrolle oder einem Cannabinoid in einer Konzentration von 3 µM stimuliert, bevor die Zellüberstände abgenommen und zur Resuspension mit den HUVEC verwendet wurden. Anschließend wurden mit diesen Zellsuspensionen Migrationsversuche (Migrations-Assay) und Viabilitätsuntersuchungen (Viabilitäts-Assay) durchgeführt.

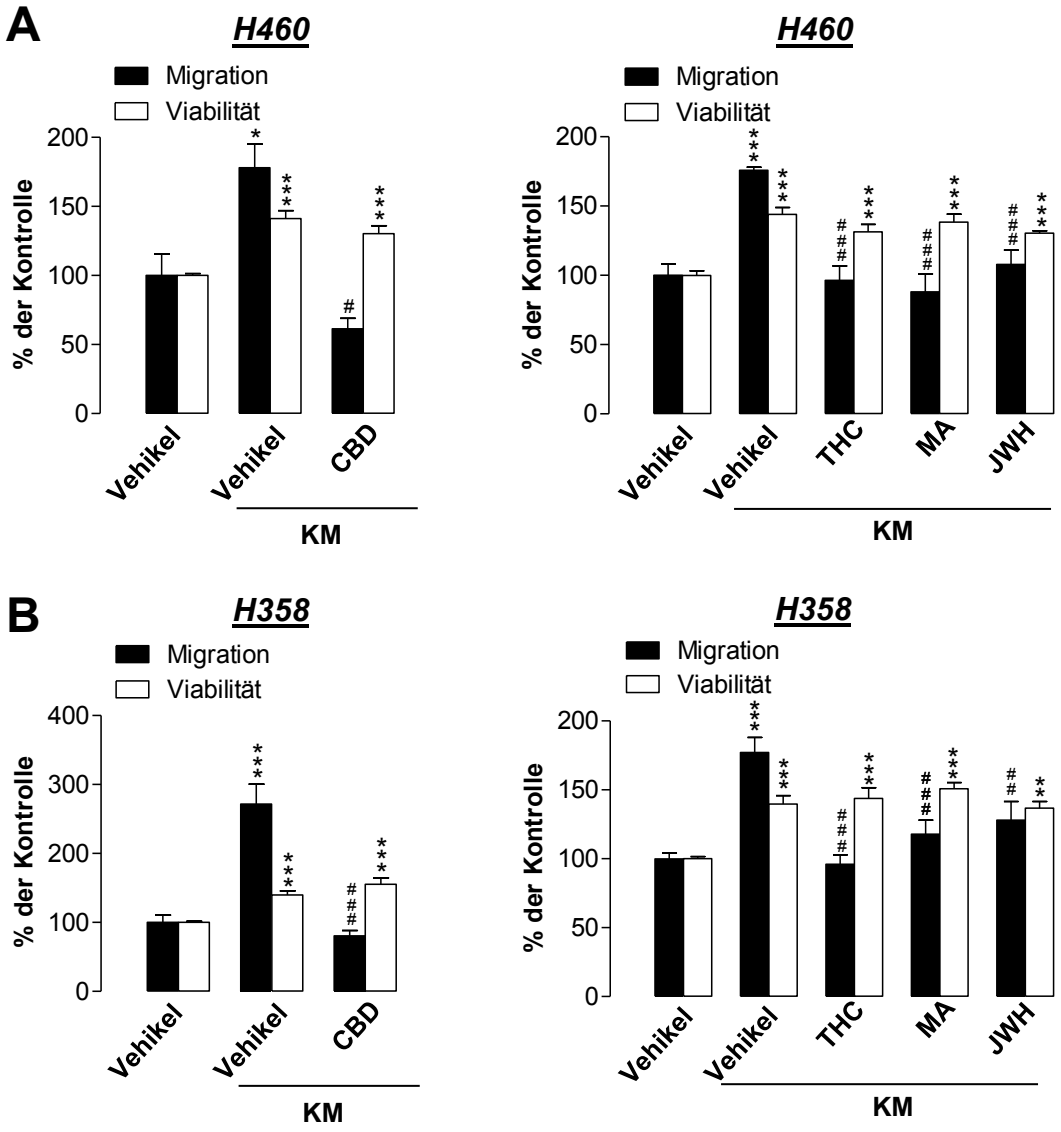

Abb. 17: Einfluss konditionierter Medien, der Zelllinien H460 und H358 auf das Migrationsverhalten und die Viabilität der HUVEC

Die HUVEC wurden entweder in serumfreien Medium (Vehikel, = 100%) oder in den konditionierten Medien (KM) von mit einem Vehikel (Vehikel KM) bzw. Cannabinoiden behandelten Lungenkarzinomzellen resuspendiert und in die obere Kammer einer Boyden-Chamber (Migrations-Assay) bzw. in eine 48-Well Platte (Viabilitäts-Assay) überführt. Nach 24-stündiger Inkubation erfolgte die Messung der Migration und Viabilität der Endothelzellen mittels WST-1-Test. Zur Gewinnung der konditionierten Medien wurden zuvor H460- und H358-Zellen für die Dauer von 48 Stunden entweder mit dem Vehikel (DMEM, 0% FCS) oder einer finalen Konzentration von 3 µM des jeweiligen Cannabinoids (CBD, THC, MA oder JWH) inkubiert. Die Histogramme repräsentieren Mittelwerte ± SEM aus n = 8 Experimenten mit Ausnahme der Migrationsversuche in A (n = 4 Experimente). * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ vs.

serumfreie Vehikelkontrolle (Vehikel); # $P < 0,05$, ## $P < 0,01$, ### $P < 0,001$ vs. zugehörigem Vehikel KM; erstellt mit ANOVA plus post-hoc Bonferroni Test.

3.8 Untersuchung des angiogenen Verhaltens von HUVEC unter Verwendung konditionierter Medien von Nicht-Tumor-Bronchialepithelzellen

Im Folgenden sollte untersucht werden, ob die Migration von HUVEC in vergleichbarer Weise beeinflusst werden kann, wenn diese mit konditionierten Medien (KM) behandelt werden, die zuvor von Nicht-Tumor-Lungenepithelzellen gewonnen wurden. Für diese Versuche wurden BEAS-2B-Zellen verwendet. Hierbei handelt es sich um eine Zelllinie, die aus Lungenepithel gesunder Individuen gewonnen (Reddel et al., 1988) und als *in vitro*-Modell zur Untersuchung des physiologischen Lungengewebes verwendet wird (Amstad et al., 1988; Wan et al., 2012). Abb. 18 zeigt die Ergebnisse dieser Untersuchung. Verglichen mit HUVEC, die in serumfreiem Medium resuspendiert wurden, zeigte sich, dass KM, die von zuvor mit einem Vehikel behandelten BEAS-2B-Zellen gewonnen wurden, zu einem signifikanten Anstieg der Migration von HUVEC führten. Im Gegensatz zu KM, die von den mit Cannabinoiden behandelten Zelllinien A549, H460 und H358 abgenommen wurden, führte die 48-stündige Inkubation der BEAS-2B-Zellen mit 3 µM CBD, THC, MA bzw. JWH-133 zu keiner Modulation der KM, mit dem Resultat einer signifikanten Veränderung des Migrationsverhaltens der HUVEC im Vergleich mit der Vehikelgruppe.

Im Einklang mit der vermuteten Rolle von TIMP-1 als Cannabinoid-induzierter Inhibitor der HUVEC-Migration konnte gezeigt werden, dass kein Cannabinoid zu einer erhöhten Freisetzung von TIMP-1 führte.

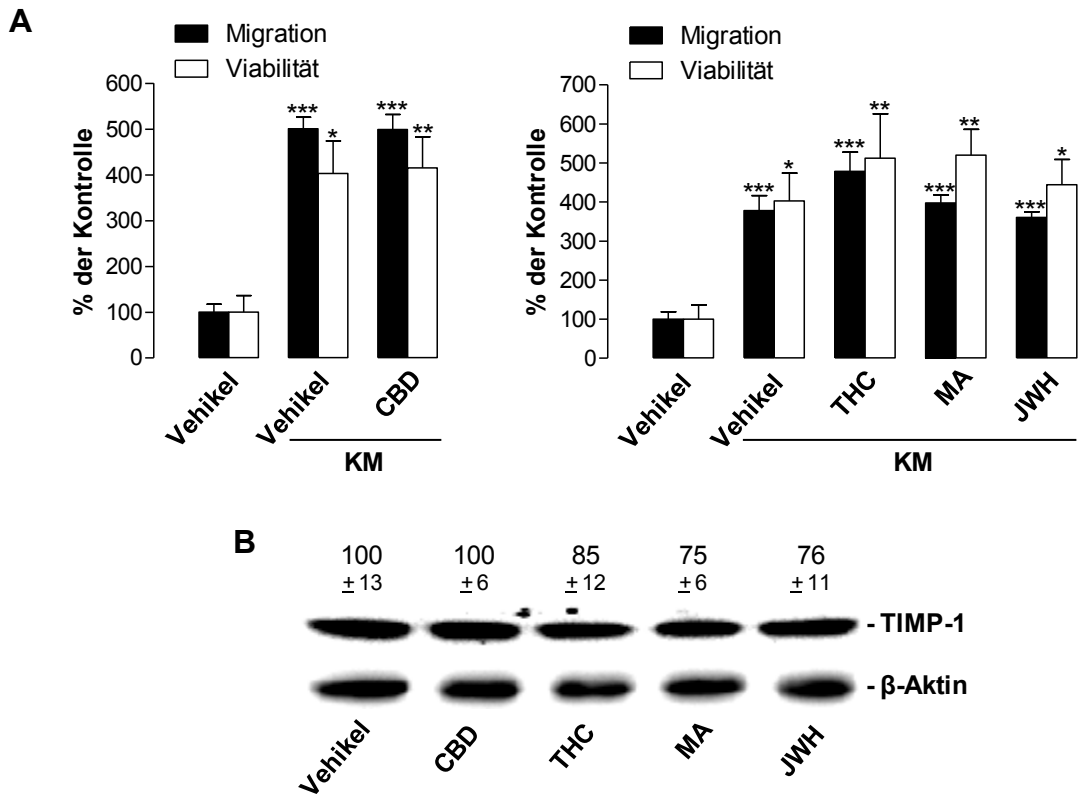

Abb. 18: Analyse der Cannabinoid-modulierten TIMP-1-Freisetzung aus BEAS-2B-Zellen sowie der Einfluss konditionierter Medien aus BEAS-2B-Zellen auf die Migration und Viabilität von HUVEC

A: Inkubation der BEAS-2B-Zellen für 48 Stunden mit einem Vehikel oder 3 µM CBD (linkes Diagramm) bzw. THC, MA oder JWH-133 (rechtes Diagramm). Die so gewonnenen konditionierten Medien wurden anschließend zur Resuspension mit den HUVEC verwendet und schließlich zur Untersuchung der Migration (Boyden-Chamber-Assay, schwarze Balken) bzw. Viabilität (WST-1-Test, weiße Balken) genutzt. Die Inkubationszeit der HUVEC betrug 24 Stunden. B: Western Blot-Analyse der TIMP-1-Freisetzung in konditionierte Medien nach 48-stündiger Inkubation der BEAS-2B-Zellen mit einem Vehikel oder Cannabinoid mit einer Konzentration von 3 µM. Es handelt sich um Mittelwerte ± SEM aus n = 4 Experimenten. Die Werte über den Blots repräsentieren Mittelwerte ± SEM aus densitometrischen Untersuchungen im Vergleich mit Vehikel-behandelten Zellen (100%) ohne Testsubstanzen aus n = 4 Experimenten. Als Ladekontrolle wurde Aktin aus den jeweiligen Zelllysaten bestimmt. * $P < 0{,}05$, ** $P < 0{,}01$, *** $P < 0{,}001$ vs. entsprechender Vehikel-Kontrolle, erstellt mit ANOVA plus post-hoc Dunnett test.

4 Diskussion

In den letzten Jahren konnte durch zahlreiche tierexperimentelle Untersuchungen belegt werden, dass Cannabinoide fähig sind, die Neovaskularisierung von Tumoren zu hemmen. Allerdings gibt es nur wenige Studien, die sich mit den ursächlichen antiangiogenen Mechanismen dieses Effekts beschäftigen. Bislang konnten Ergebnisse aus Studien, die sich mit dieser Fragestellung auseinandersetzten, lediglich aus solchen Experimenten gewonnen werden, die sich auf die direkten Effekte von Cannabinoiden auf Endothelzellen oder der Modulation angiogener Faktoren in Krebszellen konzentrierten. Untersuchungen bezüglich möglicher Tumor-Endothelzell-Interaktionen wurden bis dato weitestgehend vernachlässigt. Die vorliegende Arbeit bietet erstmals einen auf Basis von Inhibition beruhenden Nachweis für die Cannabinoid-induzierte TIMP-1-Freisetzung aus Lungenkarzinomzellen als eine entscheidende Schlüsselrolle hinsichtlich der antiangiogenen Effekte der Cannabinoide auf Endothelzellen.

Eine Reihe von Ergebnissen dieser Arbeit unterstützt diese Theorie. Erstens: Alle konditionierten Medien (KM), die von mit Cannabinoiden behandelten Lungenkarzinomzellen gewonnen wurden, führten zu einer deutlichen Hemmung der Endothelzell-Migration und Tubulogenese. Minimale Abnahmen der Viabilität der HUVEC konnten nur dann festgestellt werden, wenn Endothelzellen in KM resuspendiert wurden, die von zuvor mit MA oder JWH-133 inkubierten A549-Zellen stammten.

Zweitens: Wie unlängst in Untersuchungen gezeigt wurde, fördert ICAM-1 im Sinne eines vorgeschalteten Triggerfaktors die Cannabinoid-induzierte TIMP-1-Freisetzung aus A549-Zellen (Ramer et al., 2012). Durch posttranskriptionellen Knockdown von ICAM-1 mittels siRNA konnte der beobachtete Effekt, also die Hemmung der HUVEC-Migration, aufgehoben werden.

Drittens: Spezifische Rezeptorantagonisten führten durch Blockade der Cannabinoidrezeptoren (CB_1, CB_2) bzw. des TRPV1 zu einer Aufhebung der antimigratorischen Wirkung der KM. Diese Beobachtung steht im Einklang mit ebenfalls erst kürzlich veröffentlichten Ergebnissen, welche die Hochregulation sowohl von ICAM-1 als auch von TIMP-1 im Zusammenhang mit der Aktivierung von Cannabinoidrezeptoren sowie des TRPV1 belegen (Ramer et al., 2012).

Viertens: Werden A549-Zellen mit TIMP-1 siRNA transfiziert, um die TIMP-1-Expression zu unterdrücken, führt dies ebenfalls zu einer Hemmung des antimigratorischen Effekts der KM auf Endothelzellen. Experimente mit exogen zugegebenem rekombinantem TIMP-1, die eine

vergleichbare Hemmung der proangiogenen Eigenschaften Migration und Tubulogenese von HUVEC zeigten, bestätigen die funktionelle Rolle der Cannabinoid-induzierten TIMP-1-Freisetzung aus Endothelzellen als entscheidende Regulation der Antiangiogenese.

Letzten Endes konnte außerdem gezeigt werden, dass sich die beobachteten Effekte nicht nur auf Lungenkarzinomzellen der Zelllinie A549 beschränken. Hierzu wurden die NSCLC-Zelllinien H358 und H460 mit Cannabinoiden unter Einhaltung des gleichen Versuchsprotokolls wie bei der A549-Zelllinie stimuliert. Die so gewonnenen KM wurden dann zur Anfertigung einer HUVEC-Suspension verwendet, um anschließend mit dieser Migrations- und Viabilitätsversuche durchzuführen. Diese Versuche führten zu vergleichbaren antimigratorischen Effekten wie sie auch bei den Experimenten mit KM von A549-Zellen beobachtet werden konnten. Bereits im Jahr 2012 publizierten Ramer *et al.* Ergebnisse, die belegen, dass die Zelllinien H358 und H460 nach Stimulation mit Cannabinoiden in ähnlicher Weise ICAM-1-abhängig TIMP-1 hochregulieren (Ramer et al., 2012).

Die in der vorliegenden Arbeit präsentierten Daten belegen einen Cannabinoid-induzierten indirekten Effekt auf gefäßbildende Zellen. Für die Vermittlung dieses Effektes ist ein weiterer Zelltyp notwendig, der einerseits selbst Teil des pathologischen Prozesses, wie in diesem Fall einer Neoplasie, ist, andererseits aber auch als Mediator zwischen Cannabinoiden und Endothelzellen vermittelt. Ergebnisse einer Untersuchung aus dem Jahr 2011 stehen mit diesem Befund im Einklang: bei dieser Studie konnte demonstriert werden, dass die Endocannabinoid-ähnliche Substanz Palmitoyl-Ethanolamid KM aktivierter Mastozyten so modifiziert, dass die Proliferation von HUVEC inhibiert wird. Die Studie befasste sich mit der Hypothese, dass die antiangiogenen Eigenschaften von Palmitoyl-Ethanolamid eine probate Option in der Behandlung von entzündlichen Erkrankungen durch Hemmung der angiogenen Komponente bieten (Cantarella et al., 2011).

Interessanterweise zeigten die Ergebnisse der ersten hier vorgestellten Experimente, in denen HUVEC direkt mit Cannabinoiden inkubiert wurden, eher pro- als antiangiogene Effekte. Dies steht teilweise im Kontrast zu einigen Studien, in denen es Hinweise auf eine direkte Beeinflussung von Endothelzellen im Sinne von Migrationshemmung durch Cannabinoide gibt. So konnten Blázquez *et al.* zeigen, dass geringe Konzentrationen von JWH-133 die Migration von HUVEC in Boyden-Chamber-Versuchen unter Verwendung von Lysophosphatidsäure als chemoattraktiver Substanz hemmen können. Hierfür wurden HUVEC für 18 Stunden mit JWH-133 inkubiert, anschließend trypsiniert und für weitere drei Stunden in Boyden-Chambers überführt (Blázquez et al., 2003). Dieser Versuchsaufbau unterscheidet sich also deutlich von den in dieser Arbeit verwendeten Protokollen. In einer anderen Studie, in der Boyden-Chamber-Versuche mit kollagenbedeckten Kammern und

abweichenden Nährmedien durchgeführt wurden, führte CBD zu einer Hemmung der Migration von HUVEC. Außerdem zeigte die Studie, dass CBD die HUVEC-Proliferation bei einem IC_{50} von ungefähr 10 µM und die HUVEC-Migration bei Konzentrationen ≥ 9 µM hemmt. Letzteres wurde anhand sog. Wundheilungs-Assays demonstriert (Solinas et al., 2012). In einer weiteren Arbeit führte die Verwendung von CBD und THC in Konzentrationen von ≥ 4,7 µM zu einer Hemmung der Proliferation boviner Endothelzellen (Kogan et al., 2006). Des Weiteren präsentierte die letztgenannte Arbeit auch Ergebnisse, die darauf hindeuten, dass CBD und THC konzentrationsabhängig das angiogene Verhalten von Endothelzellen aus Ratten-Aortenringen zu beeinflussen scheinen. So führten einerseits sehr geringe Konzentrationen (50 nM) zur Induktion von Gefäßformationen, Konzentrationen von 2,3 µM zeigten gar keinen Effekt und höhere Konzentrationen führten zu antiangiogenem Verhalten. Pisanti *et al.* fanden heraus, dass Met-F-Anandamid, ein Endocannabinoid-Analogon, die Proliferation und Tubulogenese von Endothelzellen aus Schweineaorten inhibieren kann. Dieser Effekt konnte jedoch nur in Anwesenheit des *basic fibroblast growth factors* (bFGF) beobachtet werden. Fehlte dieser Faktor und wurden die Endothelzellen mit bis zu 10 µM Met-F-Anandamid behandelt, konnte kein antiproliferativer Effekt dokumentiert werden (Pisanti et al., 2007). Diese Daten weisen darauf hin, dass Cannabinoide unter Umständen das Endothelzellverhalten in Abhängigkeit von deren Aktivierung beeinflussen.

Die teilweise Diskrepanz zwischen den Ergebnissen dieser Arbeit und den oben genannten Studien mag am ehesten den unterschiedlichen experimentellen Settings geschuldet sein. Außerdem wurden in der vorliegenden Arbeit Cannabinoide in wesentlich geringeren Konzentrationen als in den zuvor beschriebenen Arbeiten verwendet.

Verschiedene andere Studien belegen promigrative Effekte von Cannabinoiden auf unterschiedliche Zelltypen und stehen somit im Einklang mit dem hier dargestellten CBD-mediierten Anstieg der HUVEC-Migration. So wurden für HU-212, Anandamid und WIN55,212-2 promigratorische Einflüsse auf humane Nierenzellen aus Embryonen (Song et al., 2000), für WIN55,212-2 auf humane Epithelzellen der Kornea (Yang et al., 2010) und für 2-AG, Anandamid und andere Fettsäure-Ethanolamide auf Zellen der Mikroglia (Franklin et al., 2003; Walter et al., 2003) belegt. Darüber hinaus wurden für CBD und JWH-133 ähnliche Effekte auf humane mesenchymale Stammzellen beschrieben (Schmuhl et al., 2014). Andere Arbeiten zeigen, dass die Aktivierung von Cannabinoid-Rezeptoren ein Trigger für die Migration von Neuroblasten zu sein scheint (Oudin et al., 2011). Zhang *et al.* belegten in ihrer Arbeit für die Endocannabinoid-ähnliche Substanz N-Arachidonyl-L-Serin die Induktion von Migration und Tubulogenese humaner Endothelzellen aus dermalen Kapillaren (Zhang et al., 2010).

Auch die Beeinflussung der Neovaskularisierung von Tumoren durch TIMP-1 konnte bereits in anderen Untersuchungen belegt werden (Johnson et al., 1994; Martin et al., 1999). Hier wurde die Inhibierung der Tumorprogression durch antiangiogene Eigenschaften von TIMP-1 demonstriert. Im Einklang mit dieser Entdeckung zeigten weitere Arbeiten eine signifikante Hemmung der Tumorangiogenese durch ektope Überexpression von TIMP-1 (Guedez et al., 2001; Ikenaka et al., 2003). Guedez *et al.* konnten in ihrer Arbeit zeigen, dass sowohl rekombinantes TIMP-1 als auch die Zellkulturüberstände von TIMP-1-exprimierenden Tumorzellen zu einer Hemmung der Migration von Endothelzellen führt (Guedez et al., 2001).

Interessanterweise konnte in Experimenten zur Rolle der Cannabinoid-aktivierten Rezeptoren bei der antimigrativen Wirkung der Cannabinoide gezeigt werden, dass alle Rezeptorantagonisten den Effekt von CBD und MA komplett umkehren. Die vollständige Umkehr der antimigrativen Wirkung bei Behandlung der A549-Zellen mit jeweils 1 µM der einzelnen Rezeptorantagonisten lässt die Frage nach einer mechanistischen Ursache offen. In der Tat sollte jeder einzelne Rezeptorantagonist eigentlich nur eine partielle Hemmung der antimigrativen Wirkung erzielen, da bei Blockade eines Rezeptors immer noch die anderen Rezeptoren ihre antimigrative Wirkung entfalten sollten. Untersuchungen zur Wirkung der Rezeptorantagonisten in Abwesenheit der Cannabinoide zeigten jedoch einen leichten Eigeneffekt der Cannabinoid-Rezeptor-Antagonisten. Dieser Eigeneffekt der Rezeptorantagonisten könnte auch der Grund dafür sein, dass in einzelnen Experimenten (vor allem bei der antimigrativen Wirkung von CBD und MA) die Rezeptorantagonisten bei Kombination mit Cannabinoiden zu einer vollständigen Umkehr der Migrationshemmung führen, die zum Teil sogar über der Vehikel-Kontrolle lag.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit demonstrieren auch, dass die KM von drei verschiedenen Lungenkarzinomzelllinien keinen signifikanten Einfluss auf die Viabilität der HUVEC ausüben. Davon ausgenommen sind KM von A549-Zellen, die mit MA oder JWH-133 behandelt wurden. Hier zeigten sich zwar signifikante, aber dennoch nur partielle Effekte. Die konkreten intrazellulären Mechanismen der Migrationshemmung und Inhibierung der Tubulogenese von HUVEC durch freigesetztes TIMP-1 aus Tumorzellen, müssen allerdings noch genauer untersucht werden. Als wesentlicher Bestandteil dieser Interaktion wurde in diesem Kontext bereits die Hemmung der Matrix-Metalloproteinase vom Typ 2 diskutiert (Montiel et al., 2009). Inwieweit die hier beschriebene antiangiogene Wirkung der Cannabinoid-induzierten TIMP-1-Freisetzung über die Hemmung von MMPs vermittelt wird oder MMP-unabhängig verläuft, müssen weiterführende Experimente zeigen.

Im Jahre 2012 beschrieben Ramer *et al.* einen Mechanismus für die Cannabinoid-induzierte Freisetzung von TIMP-1 aus Lungenkarzinomzellen. Eine erhöhte ICAM-1-Expression,

induziert durch Aktivierung der CB_1- und CB_2-Rezeptoren sowie des TRPV1 und die anschließende Aktivierung der p42/44 MAP-Kinase (*Mitogen-activated protein kinase*), spielt dabei eine Schlüsselrolle. Dieser intrazelluläre Mechanismus führt in der Folge zu einer erhöhten Freisetzung von TIMP-1 und damit, im Sinne einer autokrinen Regulation, zur Hemmung der Invasion von Lungentumorzellen (Ramer et al., 2012). Offen blieb hierbei jedoch die Frage, wie ICAM-1 zu einer erhöhten TIMP-1-Expression führt. Ein möglicher Mechanismus könnte hierbei eine ICAM-1-vermittelte Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1 darstellen (Koyama et al., 1996), da eine Bindestelle für AP-1 auch innerhalb der TIMP-1-Promotorregion identifiziert werden konnte (Edwards et al., 1992). Weitere Experimente diesbezüglich müssen diese Hypothese allerdings erst untersuchen. Die zuvor nachgewiesene TIMP-1-Expression als mechanistische Grundlage der antiinvasiven Wirkung legt, zusammen mit den hier dargestellten Daten, nahe, dass die Cannabinoid-induzierte TIMP-1-Freisetzung essenzieller Bestandteil eines bimodalen antikanzerogenen Mechanismus in humanen Lungetumorzellen darstellt, über den sowohl die Ausbreitung von Tumorzellen als auch deren Neovaskularisierung inhibiert wird. Eine kürzlich publizierte Arbeit konnte darüber hinaus belegen, dass die Cannabinoid-induzierte ICAM-1-Expression in humanen Lungentumorzellen eine erhöhte Tumorzelllyse durch Lymphokin-aktivierte Killer-(LAK)-Zellen des Immunsystems bewirkt (Haustein et al., 2014). Hierbei wurden Lungentumorzellen für 48 Stunden mit den Cannabinoiden CBD, THC und MA behandelt. Eine anschließende Kokultur der so behandelten Tumorzellen mit LAK-Zellen, die zuvor aus Blut gesunder Spender isoliert und aktiviert wurden, führte entsprechend zu einer Freisetzung eines Farbstoffs aus den Tumorzellen, mit dem die Tumorzelllyse quantitativ analysiert werden konnte. Diese Daten legen somit nahe, dass die hier dargestellte Regulation einen möglichen multimodalen Antitumormechanismus von Cannabinoiden darstellen könnte.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Durch Cannabinoid-induzierte Freisetzung von TIMP-1 wird das Mikromillieu von Tumorzellen so moduliert, dass es im Ergebnis zu einer indirekten Hemmung der angiogenen Eigenschaften von Endothelzellen kommt. Dieser indirekte antiangiogene Effekt setzt also die Anwesenheit von Tumorzellen voraus und stellt einen neuen spezifischen Mechanismus dar. Vor diesem Hintergrund könnten Cannabinoide zukünftig das therapeutische Arsenal im Kampf gegen Tumorerkrankungen der Lunge und anderer Organe bereichern. Abb. 19 fasst die hier gezeigten Ergebnisse zusammen.

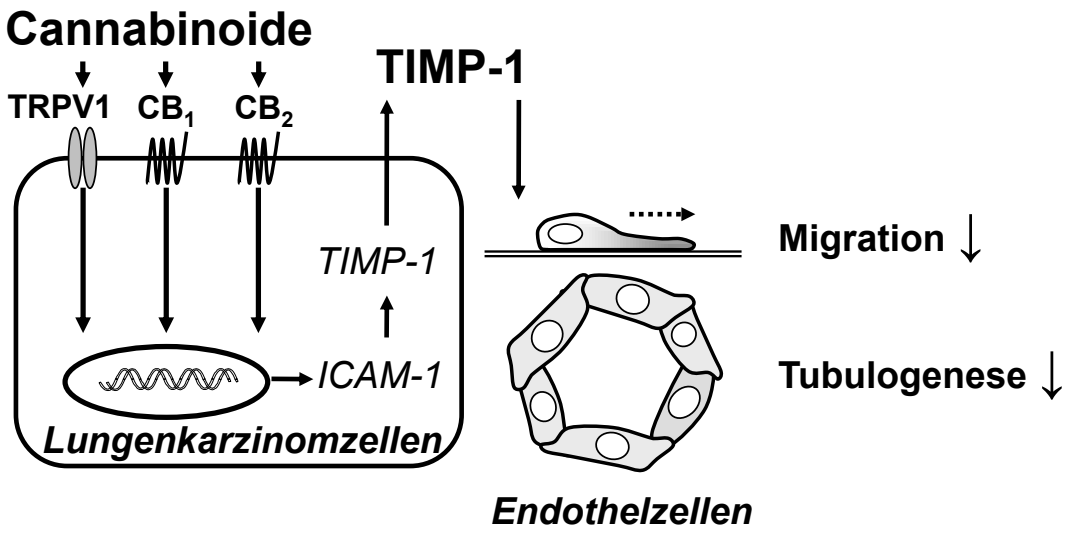

Abb. 19: Zusammenfassende Darstellung der Wirkung von Cannabinoiden auf das Migrationsverhalten und die Tubulogenese von HUVEC

Die Aktivierung der Cannabinoid-Rezeptoren und des TRPV1 durch Cannabinoide führt zu einem Anstieg der TIMP-1-Freisetzung aus Lungenkarzinomzellen (Ramer und Hinz, 2008; Ramer et al., 2010a; Ramer et al., 2012). Das Bindeglied zwischen Rezeptoraktivierung und vermehrter TIMP-1-Freisetzung ist ICAM-1. Durch Stimulation der Tumorzellen mit Cannabinoiden wird die Expression von ICAM-1 induziert. Dies wiederum führt zu erhöhten TIMP-1-Konzentrationen im Tumorzell-umgebenden Medium (Ramer et al., 2012). Letztlich vermittelt TIMP-1 auf parakrinem Wege eine Inhibition der Migration und Tubulogenese von Endothelzellen in Richtung Tumorgewebe.

6 Literaturverzeichnis

Adams, R.; Hunt, M.; Clark JH. (1940) Structure of cannabidiol, a product isolated from the marihuana extract of Minnesota wild hemp. *Am Chem Soc;* 62, 196-200

Amstad, P.; Reddel, R. R.; Pfeifer, A.; Malan-Shibley, L.; Mark, G. E.; Harris, C. C. (1988) Neoplastic transformation of a human bronchial epithelial cell line by a recombinant retrovirus encoding viral Harvey ras. *Mol Carcinog;* 1, 151-160.

Bab, I.; Zimmer, A.; Melamed, E. (2009) Cannabinoids and the skeleton: from marijuana to reversal of bone loss. *Ann Med;* 41, 560-567

Barutta, F.; Piscitelli, F.; Pinach, S.; Bruno, G.; Gambino, R.; Rastaldi, M. et al. (2011) Protective role of cannabinoid receptor type 2 in a mouse model of diabetic nephropathy. *Diabetes;* 60, 2386-2396

Basu, S.; Dittel, B. (2011) Unraveling the complexities of cannabinoid receptor 2 (CB2) immune regulation in health and disease. *Immunol Res*; 51, 26-38

Bayewitch, M.; Rhee, M. H.; Avidor-Reiss, T.; Breuer, A.; Mechoulam, R.; Vogel, Z. (1996) (-)-Delta9-tetrahydrocannabinol antagonizes the peripheral cannabinoid receptor-mediated inhibition of adenylyl cyclase. *J Biol Chem;* 271, 9902-9905

Bergers, G.; Benjamin, L. (2003) Angiogenesis: Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer;* 3, 401-410

Bifulco, M.; Laezza, C.; Portella, G.; Vitale, M.; Orlando, P.; Petrocellis, L. de; Di Marzo, V. (2001) Control by the endogenous cannabinoid system of ras oncogene-dependent tumor growth. *FASEB J;* 15, 2745-2747

Bisogno, T.; Hanus, L.; Petrocellis, L. de; Tchilibon, S.; Ponde, D. E.; Brandi, I. et al. (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, 845-852

Blázquez, C.; Casanova, M. L.; Planas, A.; Gómez Del Pulgar, T.; Villanueva, C.; Fernández-Aceñero, M. J. et al. (2003) Inhibition of tumor angiogenesis by cannabinoids. *FASEB J;* 17, 529-531

Blázquez, C.; González-Feria, L.; Alvarez, L.; Haro, A.; Casanova, M. L.; Guzmán, M. (2004) Cannabinoids inhibit the vascular endothelial growth factor pathway in gliomas. *Cancer Res;* 64, 5617-5623

Blázquez, C.; Salazar, M.; Carracedo, A.; Lorente, M.; Egia, A.; Gonzales-Feria, L.; Haro, A.; Velasco, G.; Guzman, M. (2008) Cannabinoids inhibit glioma cell invasion by downregulating matrix metalloproteinases-2 expression. *Cancer Res*; 68, 1945-1952

Bouaboula, M.; Poinot-Chazel, C.; Bourrie, B.; Canat, X.; Calandra, B.; Rinaldi-Carmona, M. et al. (1995) Activation of mitogen-activated protein kinases by stimulation of the central cannabinoid receptor CB1. *Biochem J;* 312, 637-641

Bouaboula, M.; Poinot-Chazel, C.; Marchand, J.; Canat, X.; Bourrie, B.; Rinaldi-Carmona, M. et al. (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, 704-711

Buckley, N. E.; McCoy, K. L.; Mezey, E.; Bonner, T.; Zimmer, A.; Felder, C. C.; Glass, M. (2000) Immunomodulation by cannabinoids is absent in mice deficient for the cannabinoid CB(2) receptor. *Eur J Pharmacol;* 396, 141-149

Caffarel, M. M.; Andradas, C.; Mira, E.; Perez-Gomez, E.; Cerutti, C.; Moreno-Bueno, G.; Flores, J. M.; Garcia-Real, I.; Palacios, J.; Manes, S.; Guzman, M.; Sanchez, C. (2010) Cannabinoids reduce ErbB2-driven breast cancer progression through Akt inhibition. *Mol Cancer*; 9, 196

Cantarella, G.; Scollo, M.; Lempereur, L.; Saccani-Jotti, G.; Basile, F.; Bernardini, R. (2011) Endocannabinoids inhibit release of nerve growth factor by inflammation-activated mast cells. *Biochem Pharmacol;* 82, 380-388

Carmeliet, P.; Jain, R. K. (2000) Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature;* 407, 249-257

Carmeliet, P. (2003) Angiogenesis in health and disease. *Nat Med;* 9, 653-660

Casanova, M. L.; Blázquez, C.; Martínez-Palacio, J.; Villanueva, C.; Fernández-Aceñero, M. J.; Huffman, J. W. et al. (2003) Inhibition of skin tumor growth and angiogenesis in vivo by activation of cannabinoid receptors. *J Clin Invest;* 111, 43-50

Chang, Y. S.; Di Tomaso, E.; McDonald, D. M.; Jones, R.; Jain, R. K.; Munn, L. L. (2000) Mosaic blood vessels in tumors: frequency of cancer cells in contact with flowing blood. *Proc Natl Acad Sci U S A;* 97, 14608-14613

Costa, B.; Giagnoni, G.; Franke, C.; Trovato, A. E.; 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, 247-250

Curran, S.; Murray, G. I. (1999) Matrix metalloproteinases in tumour invasion and metastasis. *J Pathol;* 189, 300-308

Curran, S.; Murray, G. I. (2000) Matrix metalloproteinases: molecular aspects of their roles in tumour invasion and metastasis. *Eur J Cancer;* 36, 1621-1630

Devane, W. A.; Hanus, L.; Breuer, A.; Pertwee, R. G.; Stevenson, L. A.; Griffin, G. et al. (1992) Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science;* 258, 1946-1949

Dvorak, H. F.; Detmar, M.; Claffey, K. P.; Nagy, J. A.; van de Water, L; Senger, D. R. (1995) Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: an important mediator of angiogenesis in malignancy and inflammation. *Int Arch Allergy Immunol;* 107, 233-235

Edwards, D. R.; Rocheleau, H.; Sharma, R. R.; Wills, A. J.; Cowie, A.; Hassell, J. A.; Heath, J. K. (1992) Involvement of AP1 and PEA3 binding sites in the regulation of murine tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) transcription. *Biochim Biophys Acta;* 1171, 41-55

Fakhrejahani, E.; Toi, M. (2014) Antiangiogenesis therapy for breast cancer: an update and perspectives from clinical trials. *Jpn J Clin Oncol;* 44, 197-207

Felder, C. C.; Joyce, K. E.; Briley, E. M.; Mansouri, J.; Mackie, K.; Blond, O. et al. (1995) Comparison of the pharmacology and signal transduction of the human cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Mol Pharmacol;* 48, 443-450

Fernández-Ruiz, J.; Moreno-Martet, M.; Rodríguez-Cueto, C.; Palomo-Garo, C.; Gómez-Cañas, M.; Valdeolivas, S. et al. (2011) Prospects for cannabinoid therapies in basal ganglia disorders. *Br J Pharmacol;* 163, 1365-1378

Ferrara, N.; Gerber, H.; LeCouter, J. (2003) The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med;* 9, 669-676

Filippis, D. de; D'Amico, A.; Cipriano, M.; Petrosino, S.; Orlando, P.; Di Marzo, V.; Iuvone, T. (2010) Levels of endocannabinoids and palmitoylethanolamide and their pharmacological manipulation in chronic granulomatous inflammation in rats. *Pharmacol Res;* 61, 321-328

Folkman, J. (1971) Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med*; 285, 1182-1186

Franklin, A.; Stella, N. (2003) Arachidonylcyclopropylamide increases microglial cell migration through cannabinoid CB2 and abnormal-cannabidiol-sensitive receptors. *Eur J Pharmacol;* 474, 195-198

Freimuth, N.; Ramer, R.; Hinz, B. (2010) Antitumorigenic effects of cannabinoids beyond apoptosis. *J Pharmacol Exp Ther;* 332, 336-344

Fujihara, T.; Yashiro, M.; Inoue, T.; Sawada, T.; Kato, Y.; Ohira, M. et al. (1999) Decrease in ICAM-1 expression on gastric cancer cells is correlated with lymph node metastasis. *Gastric Cancer;* 2, 221-225

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

Galve-Roperh, I.; Sánchez, C.; Cortés, M. L.; 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, 313-319

Gaoni Y.; Mechoulam R. (1964) Isolation, structure and partial synthesis of an active constituent of hashish. *J Am Chem Soc;* 86

Gijsen, H.; De Cleyn, M.; Surkyn, M.; Van Lommen, G.; Verbist, B.; Nijsen, M. et al. (2012) 5-sulfonyl-benzimidazoles as selective CB2 agonists-part 2. *Bioorg Med Chem Lett;* 22, 547-552

Gomez, D. E.; Alonso, D. F.; Yoshiji, H.; Thorgeirsson, U. P. (1997) Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Eur J Cell Biol;* 74, 111-122

Grant, D. S.; Tashiro, K.; Segui-Real, B.; Yamada, Y.; Martin, G. R.; Kleinman, H. K. (1989) Two different laminin domains mediate the differentiation of human endothelial cells into capillary-like structures in vitro. *Cell;* 58, 933-943

Guedez, L.; McMarlin, A. J.; Kingma, D. W.; Bennett, T. A.; Stetler-Stevenson, M.; Stetler-Stevenson, W. G. (2001) Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 alters the tumorigenicity of Burkitt's lymphoma via divergent effects on tumor growth and angiogenesis. *Am J Pathol;* 158, 1207-1215

Haustein, M.; Ramer, R.; Linnebacher, M.; Manda, K.; Hinz, B. (2014) Cannabinoids increase lung cancer cell lysis by lymphokine-activated killer cells via upregulation of ICAM-1. *Biochem Pharmacol;* 92, 312-325

Hernan Perez de la Ossa, D.; Lorente, M.; Gil-Alegre, M. E.; Torres, S.; Garcia-Taboada, E.; Aberturas Mdel, R.; Molpeceres, J.; Velasco, G.; Torres-Suarez, A. I. (2013) Local delivery of cannabinoid-loaded microparticles inhibits tumor growth in a murine xenograft model of glioblastoma multiforme. *PLoS One*; 8, e54795

Hopkins, A. M.; Baird, A. W.; Nusrat, A. (2004) ICAM-1: targeted docking for exogenous as well as endogenous ligands. *Adv Drug Deliv Rev;* 56, 763-778

Hosch, S. B.; Meyer, A. J.; Schneider, C.; Stoecklein, N.; Prenzel, K. L.; Pantel, K. et al. (1997) Expression and prognostic significance of HLA class I, ICAM-1, and tumor-infiltrating lymphocytes in esophageal cancer. *J Gastrointest Surg;* 1, 316-323

Howlett, A. C.; Barth, F.; Bonner, T. I.; Cabral, G.; Casellas, P.; Devane, W. A. et al. (2002) International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacol Rev;* 54, 161-202

Huang, H.; Wang, S.; Hsin, I.; Chang, C.; Lee, F.; Lin, H. et al. (2012) Cannabinoid receptor 2 agonist ameliorates mesenteric angiogenesis and portosystemic collaterals in cirrhotic rats. *Hepatology;* 56, 248-258

Huffman, J. W.; Liddle, J.; Yu, S.; Aung, M. M.; Abood, M. E.; Wiley, J. L.; Martin, B. R. (1999) 3-(1',1'-Dimethylbutyl)-1-deoxy-delta8-THC and related compounds: synthesis of selective ligands for the CB2 receptor. *Bioorg Med Chem;* 7, 2905-2914

Hurwitz, H.; Fehrenbacher, L.; Novotny, W.; Cartwright, T.; Hainsworth, J.; Heim, W. et al. (2004) Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med;* 350, 2335-2342

Iacovelli, R.; Alesini, D.; Palazzo, A.; Trenta, P.; Santoni, M.; Marchis, L. et al. (2014) Targeted therapies and complete responses in first line treatment of metastatic renal cell carcinoma. A meta-analysis of published trials. *Cancer Treat Rev;* 40, 271-275

Ikenaka, Y.; Yoshiji, H.; Kuriyama, S.; Yoshii, J.; Noguchi, R.; Tsujinoue, H. et al. (2003) Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) inhibits tumor growth and angiogenesis in the TIMP-1 transgenic mouse model. *Int J Cancer;* 105, 340-346

Jiang, S.; Fu, Y.; Williams, J.; Wood, J.; Pandarinathan, L.; Avraham, S. et al. (2007) Expression and function of cannabinoid receptors CB1 and CB2 and their cognate cannabinoid ligands in murine embryonic stem cells. *PLoS One;* 2, e641

Johnson, M. D.; Kim, H. R.; Chesler, L.; Tsao-Wu, G.; Bouck, N.; Polverini, P. J. (1994) Inhibition of angiogenesis by tissue inhibitor of metalloproteinase. *J Cell Physiol;* 160, 194-202

Jung, K.; Liu, X.; Chirco, R.; Fridman, R.; Kim, H.C. (2006) Identification of CD63 as a tissue inhibitor of metalloproteinase-1 interacting cell surface protein. *EMBO J;* 25, 3934-3942

Kartner N, Riordan JR, Ling V. (1983) Cell surface P-glycoprotein associated with multidrug resistance in mammalian cell lines. *Science*; 221, 1285-1288

Kim, K.; Moore, D. H.; Makriyannis, A.; Abood, M. E. (2006) AM1241, a cannabinoid CB2 receptor selective compound, delays disease progression in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Eur J Pharmacol;* 542, 100-105

Kogan, N. M.; Blázquez, C.; Alvarez, L.; Gallily, R.; Schlesinger, M.; Guzmán, M.; Mechoulam, R. (2006) A cannabinoid quinone inhibits angiogenesis by targeting vascular endothelial cells. *Mol Pharmacol;* 70, 51-59

Koyama, Y.; Tanaka, Y.; Saito, K.; Abe, M.; Nakatsuka, K.; Morimoto, I. et al. (1996) Cross-linking of intercellular adhesion molecule 1 (CD54) induces AP-1 activation and IL-1beta transcription. *J Immunol* 157, 5097-5103

Lage, H.; Kellner, U. (2013) Resistenzen gegenüber medikamentöser Tumortherapie. Aktueller Status. *Pathologe;* 34, 398-402

Leelawat, S.; Leelawat, K.; Narong, S.; Matangkasombut, O. (2010) The dual effects of delta(9)-tetrahydrocannabinol on cholangiocarcinoma cells: anti-invasion activity at low concentration and apoptosis induction at high concentration. *Cancer Invest;* 28, 357-363

Ligresti, A.; Moriello, A. S.; Starowicz, K.; Matias, I.; Pisanti, S.; Petrocellis, L. et al. (2006) Antitumor activity of plant cannabinoids with emphasis on the effect of cannabidiol on human breast carcinoma. *J Pharmacol Exp Ther;* 318, 1375-1387

Lin, S.; Khanolkar, A. D.; 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, 5353-5361

Liotta, L. A.; Kleinerman, J.; Catanzaro, P.; Rynbrandt, D. (1977) Degradation of basement membrane by murine tumor cells. *J Natl Cancer Inst;* 58, 1427-1431

Liotta, L. A.; Tryggvason, K.; Garbisa, S.; Hart, I.; Foltz, C. M.; Shafie, S. (1980) Metastatic potential correlates with enzymatic degradation of basement membrane collagen. *Nature;* 284, 67-68

Little, J. P.; Villanueva, E. B.; Klegeris, A. (2011) Therapeutic potential of cannabinoids in the treatment of neuroinflammation associated with Parkinson's disease. *Mini Rev Med Chem;* 11, 582-590

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, 6552–6561

Mackie, K. (2005) Distribution of cannabinoid receptors in the central and peripheral nervous system. *Handb Exp Pharmacol*; 299-325

Maeda, K.; Kang, S.; Sawada, T.; Nishiguchi, Y.; Yashiro, M.; Ogawa, Y. et al. (2002) Expression of intercellular adhesion molecule-1 and prognosis in colorectal cancer. *Oncol Rep;* 9, 511-514

Martin, D. C.; Sanchez-Sweatman, O. H.; Ho, A. T.; Inderdeo, D. S.; Tsao, M. S.; Khokha, R. (1999) Transgenic TIMP-1 inhibits simian virus 40 T antigen-induced hepatocarcinogenesis by impairment of hepatocellular proliferation and tumor angiogenesis. *Lab Invest;* 79, 225-234

Matsuda, L. A.; Lolait, S. J.; Brownstein, M. J.; Young, A. C.; Bonner, T. I. (1990) Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature;* 346, 561-564

McAllister, S. D.; Christian, R. T.; Horowitz, M. P.; Garcia, A.; Desprez, P. (2007) Cannabidiol as a novel inhibitor of Id-1 gene expression in aggressive breast cancer cells. *Mol Cancer Ther;* 6, 2921-2927

McKallip, R. J.; Lombard, C.; Fisher, M.; Martin, B. R.; Ryu, S.; Grant, S. et al. (2002) Targeting CB2 cannabinoid receptors as a novel therapy to treat malignant lymphoblastic disease. *Blood;* 100, 627-634

McKallip, R. J.; Jia, W.; Schlomer, J.; Warren, J. W.; Nagarkatti, P. S.; Nagarkatti, M. (2006) Cannabidiol-induced apoptosis in human leukemia cells: A novel role of cannabidiol in the regulation of p22phox and Nox4 expression. *Mol Pharamacol;* 70, 897-908

Mechoulam, R.; Ben-Shabat, S.; Hanus, L.; Ligumsky, M.; Kaminski, N. E.; Schatz, A. R. et al. (1995) Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol;* 50, 83-90.

Mo, F. M.; Offertáler, L.; Kunos, G. (2004) Atypical cannabinoid stimulates endothelial cell migration via a Gi/Go-coupled receptor distinct from CB1, CB2 or EDG-1. *Eur J Pharmacol;* 489, 21-27

Montiel, M.; Urso, L.; de la Blanca, E. P.; Marsigliante, S.; Jiménez, E. (2009) Cisplatin reduces endothelial cell migration via regulation of type 2-matrix metalloproteinase activity. *Cell Physiol Biochem;* 23, 441-448

Moses, M. A.; Sudhalter, J.; Langer, R. (1990) Identification of an inhibitor of neovascularization from cartilage. *Science;* 248, 1408-1410

Mukherjee, S.; Adams, M.; Whiteaker, K.; Daza, A.; Kage, K.; Cassar, S. et al. (2004) Species comparison and pharmacological characterization of rat and human CB2 cannabinoid receptors. *Eur J Pharmacol;* 505, 1-9

Munro, S.; Thomas, K. L.; Abu-Shaar, M. (1993) Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature;* 365, 61-65

Munson, A. E.; Harris, L. S.; Friedman, M. A.; Dewey, W. L.; Carchman, R. A. (1975) Antineoplastic activity of cannabinoids. *J Natl Cancer Inst;* 55, 597-602

Murphy, G.; Houbrechts, A.; Cockett, M. I.; Williamson, R. A.; O'Shea, M.; Docherty, A. J. (1991) The N-terminal domain of tissue inhibitor of metalloproteinases retains metalloproteinase inhibitory activity. *Biochemistry;* 30, 8097-8102

Murphy, G.; Gavrilovic, J. (1999) Proteolysis and cell migration: creating a path? *Curr Opin Cell Biol;* 11, 614-621

Nagase, H.; Woessner, J. F. (1999) Matrix metalloproteinases. *J Biolog Chem;* 274, 21491-21494

Nagase, H.; Visse, R.; Murphy, G. (2006) Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res;* 69, 562-573

Natali, P.; Nicotra, M. R.; 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, 1271-1278

Niesink, R. J. M.; van Laar, M. W. (2013) Does Cannabidiol Protect Against Adverse Psychological Effects of THC? *Front Psychiatry;* 4, 130

Nithipatikom, K.; Endsley, M. P.; Isbell, M. A.; Falck, J. R.; Iwamoto, Y.; Hillard, C. J.; Campbell, W. B. (2004) 2-arachidonoylglycerol: a novel inhibitor of androgen-independent prostate cancer cell invasion. *Cancer Res;* 64, 8826-8830

Oesch, S.; Walter, D.; Wachtel, M.; Pretre, K.; Salazar, M.; Guzmán, M. et al. (2009) Cannabinoid receptor 1 is a potential drug target for treatment of translocation-positive rhabdomyosarcoma. *Mol Cancer Ther;* 8, 1838-1845

Oudin, M. J.; Gajendra, S.; Williams, G.; Hobbs, C.; Lalli, G.; Doherty, P. (2011) Endocannabinoids regulate the migration of subventricular zone-derived neuroblasts in the postnatal brain. *J Neurosci;* 31, 4000-4011

Pan, Q.; Pan, H.; Lou, H.; Xu, Y.; Tian, L. (2013) Inhibition of the angiogenesis and growth of Aloin in human colorectal cancer in vitro and in vivo. *Cancer Cell Int* 13, 69

Perren, T. J.; Swart, A. M.; Pfisterer, J.; Ledermann, J. A.; Pujade-Lauraine, E.; Kristensen, G. et al. (2011) A phase 3 trial of bevacizumab in ovarian cancer. *N Engl J Med;* 365, 2484-2496

Pertwee, R. G. (1997) Pharmacology of cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Pharmacol Ther;* 74, 129-180

Pertwee, R. G. (1999) Cannabis and cannabinoids: pharmacology and rationale for clinical use. *Forschende Komplementärmedizin*; 12-15

Pertwee, R. G.; Ross, R. A. (2002) Cannabinoid receptors and their ligands. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids;* 66, 101-121

Pertwee, R. G.; Ross, R. A.; Craib, S. J.; Thomas, A. (2002) (-)-Cannabidiol antagonizes cannabinoid receptor agonists and noradrenaline in the mouse vas deferens. *Eur J Pharmacol;* 456, 99-106

Pertwee, R. G. (2006) Cannabinoid pharmacology: the first 66 years. *Br J Pharmacol*; 163-171

Pertwee, R. G. (2007) Cannabinoids and multiple sclerosis. *Mol Neurobiol;* 36, 45-59

Pertwee, R. G.; Howlett, A. C.; Abood, M. E.; Alexander, S P H; Di Marzo, V.; Elphick, M. R. et al. (2010) International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXIX. Cannabinoid receptors and their ligands: beyond CB_1 and CB_2. *Pharmacol Rev;* 62, 588-631

Piomelli, D. (2003) The molecular logic of endocannabinoid signalling. *Nat Rev Neurosci;* 4, 873-884

Pisanti, S.; Borselli, C.; Oliviero, O.; Laezza, C.; Gazzerro, P.; Bifulco, M. (2007) Antiangiogenic activity of the endocannabinoid anandamide: correlation to its tumor-suppressor efficacy. *J Cell Physiol;* 211, 495-503

Portella, G.; Laezza, C.; Laccetti, P.; 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, 1771-1773

Pourkhalili, N.; Ghahremani, M. H.; Farsandaj, N.; Tavajohi, S.; Majdzadeh, M.; Parsa, M. et al. (2013) Evaluation of anti-invasion effect of cannabinoids on human hepatocarcinoma cells. *Toxicol Mech Methods;* 23, 120-126

Preet, A.; Ganju, R. K.; Groopman, J. E. (2008) Delta9-Tetrahydrocannabinol inhibits epithelial growth factor-induced lung cancer cell migration in vitro as well as its growth and metastasis in vivo. *Oncogene;* 27, 339-346

Qamri, Z.; Preet, A.; Nasser, M. W.; Bass, C. E.; Leone, G.; Barsky, S. H.; Ganju, R. K. (2009) Synthetic cannabinoid receptor agonists inhibit tumor growth and metastasis of breast cancer. *Mol Cancer Ther;* 8, 3117-3129

Quesada, A. R.; Muñoz-Chápuli, R.; Medina, M. A. (2006) Anti-angiogenic drugs: from bench to clinical trials. *Med Res Rev;* 26, 483-530

Rajesh, M.; Mukhopadhyay, P.; Haskó, G.; Liaudet, L.; Mackie, K.; Pacher, P. (2010) Cannabinoid-1 receptor activation induces reactive oxygen species-dependent and -independent mitogen-activated protein kinase activation and cell death in human coronary artery endothelial cells. *Br J Pharmacol;* 160, 688-700

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, 955-966

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, 2162-2174

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, 1535-1548

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

Reddel, R. R.; Ke, Y.; Gerwin, B. I.; McMenamin, M. G.; Lechner, J. F.; Su, R. T.; Brash, D.E.; Park, J.B.; Rhim, J.S.; Harris, C.C. (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, 1904-1909

Reichenbach, V.; Ros, J.; Fernández-Varo, G.; Casals, G.; Melgar-Lesmes, P.; Campos, T. et al. (2012) Prevention of fibrosis progression in CCl4-treated rats: role of the hepatic endocannabinoid and apelin systems. J Pharmacol Exp Ther; 340, 629-637

Risau, W. (1997) Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 386, 671–674

Roebuck, K. A.; Finnegan, A. (1999) Regulation of intercellular adhesion molecule-1 (CD54) gene expression. *J Leukoc Biol;* 66, 876-888

Sánchez, C.; de Ceballos, M. L.; Gomez del Pulgar, T.; Rueda, D.; Corbacho, C.; Velasco, G. et al. (2001): Inhibition of glioma growth in vivo by selective activation of the CB(2) cannabinoid receptor. *Cancer Res;* 61, 5784-5789

Sandler, A.; Gray, R.; Perry, M. C.; Brahmer, J.; Schiller, J. H.; Dowlati, A. et al. (2006) Paclitaxel-carboplatin alone or with bevacizumab for non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*; 355, 2542-2550

Sarker, K. P.; Obara, S.; Nakata, M.; Kitajima, I.; Maruyama, I. (2000) Anandamide induces apoptosis of PC-12 cells: involvement of superoxide and caspase-3. *FEBS Lett;* 472, 39-44

Schmitz, S.. (2011) Der Experimentator: Zellkultur. *Der Experimentator: Zellkultur*.

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

Seandel, M.; Noack-Kunnmann, K.; Zhu, D.; Aimes, R. T.; Quigley, J. P. (2001) Growth factor-induced angiogenesis in vivo requires specific cleavage of fibrillar type I collagen. *Blood;* 97, 2323-2332

Shoemaker, J. L.; Seely, K. A.; Reed, R. L.; Crow, J. P.; Prather, P. L. (2007) The CB2 cannabinoid agonist AM-1241 prolongs survival in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis when initiated at symptom onset. *J Neurochem;* 101, 87-98

Shweiki, D.; Neeman, M.; Itin, A.; Keshet, E. (1995) Induction of vascular endothelial growth factor expression by hypoxia and by glucose deficiency in multicell spheroids: implications for tumor angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A;* 92, 768-772

Solinas, M.; Massi, P.; Cantelmo, A. R.; Cattaneo, M. G.; Cammarota, R.; Bartolini, D. et al. (2012) Cannabidiol inhibits angiogenesis by multiple mechanisms. *Br J Pharmacol;* 167, 1218-1231

Song, Z. H.; Zhong, M. (2000) CB1 cannabinoid receptor-mediated cell migration. *J Pharmacol Exp Ther;* 294, 204-209

Sophocleous, A.; Landao-Bassonga, E.; Van't Hof, R. J.; Idris, A. I.; Ralston, S. H. (2011) The type 2 cannabinoid receptor regulates bone mass and ovariectomy-induced bone loss by affecting osteoblast differentiation and bone formation. *Endocrinology;* 152, 2141-2149

Stetler-Stevenson, W. G. (1999) Matrix metalloproteinases in angiogenesis: a moving target for therapeutic intervention. *J Clin Invest;* 103, 1237-1241

Stetler-Stevenson, W. G. (2008) Tissue inhibitors of metalloproteinases in cell signaling: metalloproteinase-independent biological activities. *Sci Signal;* 1, re6

Thapa, D.; Lee, J. S.; Heo, S.; Lee, Y. R.; Kang, K. W.; Kwak, M. et al. (2011) Novel hexahydrocannabinol analogs as potential anti-cancer agents inhibit cell proliferation and tumor angiogenesis. *Eur J Pharmacol;* 650, 64-71

Tominaga, M.; Caterina, M. J.; Malmberg, A. B.; Rosen, T. A.; Gilbert, H.; Skinner, K. et al. (1998) The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. *Neuron;* 21, 531-543

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

van de Stolpe, A; van der Saag, P T (1996) Intercellular adhesion molecule-1. *J Mol Med;* 74, 13-33

van der Stelt, M.; Cals, J.; Broeders-Josten, S.; Cottney, J.; van der Doelen, A. A.; Hermkens, M. et al. (2011) Discovery and optimization of 1-(4-(pyridin-2-yl)benzyl)imidazolidine-2,4-dione derivatives as a novel class of selective cannabinoid CB2 receptor agonists. *J Med Chem;* 54, 7350-7362

Velasco, G.; Sanchez, C.; Guzman, M. (2012) Towards the use of cannabinoids as antitumour agents. *Nat Rev Cancer;* 12, 436-444

Vidinský, B.; Gál, P.; Pilátová, M.; Vidová, Z.; Solár, P.; Varinská, L. et al. (2012) Anti-proliferative and anti-angiogenic effects of CB2R agonist (JWH-133) in non-small lung cancer cells (A549) and human umbilical vein endothelial cells: an in vitro investigation. *Folia biologica;* 58, 75-80

Walter, L.; Franklin, A.; Witting, A.; Wade, C.; Xie, Y.; Kunos, G. et al. (2003) Nonpsychotropic cannabinoid receptors regulate microglial cell migration. *J Neurosci;* 23, 1398-1405

Wan, Y.; Raese, R. A.; Fortney, J. E.; Xiao, C.; Luo, D.; Cavendish, J. et al. (2012) A smoking-associated 7-gene signature for lung cancer diagnosis and prognosis. *Int J Oncol;* 41, 1387-1396

Wright, K.; Rooney, N.; Feeney, M.; Tate, J.; Robertson, D.; Welham, M.; Ward, S. (2005) Differential expression of cannabinoid receptors in the human colon: cannabinoids promote epithelial wound healing. *Gastroenterology;* 129, 437-453

Wright, K. L.; Duncan, M.; Sharkey, K. A. (2008) Cannabinoid CB2 receptors in the gastrointestinal tract: a regulatory system in states of inflammation. *Br J Pharmacol;* 153, 263-270

Yang, J. C.; Haworth, L.; Sherry, R. M.; Hwu, P.; Schwartzentruber, D. J.; Topalian, S. L. et al. (2003) A randomized trial of bevacizumab, an anti-vascular endothelial growth factor antibody, for metastatic renal cancer. *N Engl J Med;* 349, 427-434

Yang, H.; Wang, Z.; Capó-Aponte, J. E.; Zhang, F.; Pan, Z.; Reinach, P. S. (2010) Epidermal growth factor receptor transactivation by the cannabinoid receptor (CB1) and transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) induces differential responses in corneal epithelial cells. *Exp Eye Res;* 91, 462-471

Zetter, B. R. (1998) Angiogenesis and tumor metastasis. *Annu Rev Med;* 49, 407-424

Zhang, X.; Maor, Y.; Wang, J. F.; Kunos, G.; Groopman, J. E. (2010) Endocannabinoid-like N-arachidonoyl serine is a novel pro-angiogenic mediator. *Br J Pharmacol;* 160, 1583-1594

Zhou, B.; Poon, M-C; Pu, W. T.; Han, Z. C. (2007) Therapeutic neovascularization for peripheral arterial diseases: advances and perspectives. *Histol Histopathol;* 22, 677-686

Zuardi, A. W. (2008) Cannabidiol: from an inactive cannabinoid to a drug with wide spectrum of action. *Rev Bras Psiquiatr;* 30, 271-280

Zygmunt, P. M.; Petersson, J.; Andersson, D. A.; Chuang, H.; Sørgård, M.; Di Marzo, V. et al. (1999) Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. *Nature;* 400, 452-457

7 Abbildungsverzeichnis

ABB. 1: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES ANGIOGENIC SWITCH 7
ABB. 2: NEUBAUER ZÄHLKAMMER 32
ABB. 3: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG EINES STIMULATIONSANSATZES 33
ABB. 4: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES TRANSFEKTIONSVERSUCHES 35
ABB. 5: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES VERSUCHSAUFBAUS MIT REZEPTORANTAGONISTEN 36
ABB. 6: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG EINER TRANSWELL-PLATTE 38
ABB. 7: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES VIABILITÄTS-ASSAYS 40
ABB. 8: ENZYMATISCHE UMSETZUNG VON WST-1 ZU FORMAZAN 42
ABB. 9: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER ANTIGEN-ANTIKÖRPER-BINDUNG 46
ABB. 10: DIREKTER EINFLUSS DER CANNABINOIDE 49
ABB. 11: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES VERSUCHSPROTOKOLLS 52
ABB. 12: EINFLUSS DER VON A549-ZELLEN GEWONNENEN KONDITIONIERTEN MEDIEN 53
ABB. 13: BETEILIGUNG DER CANNABINOID-REZEPTOREN (CB_1, CB_2) UND DES TRPV1 55
ABB. 14: EINFLUSS VON REKOMBINANTEM TIMP-1 57
ABB. 15: EINFLUSS DER TIMP-1 SIRNA-TRANSFEKTION VON A549-ZELLEN 59
ABB. 16: EINFLUSS DER ICAM-1 SIRNA-TRANSFEKTION VON A549-ZELLEN 61
ABB. 17: EINFLUSS KONDITIONIERTER MEDIEN, DER ZELLLINIEN H460 UND H358 63
ABB. 18: ANALYSE DER CANNABINOID-MODULIERTEN TIMP-1-FREISETZUNG AUS BEAS-2B 65
ABB. 19: ZUSAMMENFASSENDE DARSTELLUNG DER WIRKUNG VON CANNABINOIDEN 71

8 Tabellenverzeichnis

TAB. 1: AUSWAHL PRO- UND ANTIANGIOGENER MODULATOREN 5
TAB. 2: ÜBERBLICK ÜBER VERWENDETE CANNABINOIDE 8
TAB. 3: BEISPIELE POTENZIELLER THERAPEUTISCHER EINSATZMÖGLICHKEITEN SELEKTIVER CB_2-REZEPTOR-AGONISTEN 11
TAB. 4: AUFLISTUNG DER VERWENDETEN PRIMÄREN ANTIKÖRPER 22
TAB. 5: AUFLISTUNG DER VERWENDETEN SEKUNDÄREN ANTIKÖRPER 22

9 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celisius
Abb.	Abbildung
AM-251	[N-(Piperidin-1-yl)-5-(4-iodophenyl)-1-(2,4-dichlorophenyl)-4-methyl-1H-pyrazol-3-carboxamid], selektiver CB_1-Rezeptor-antagonist
AM-630	[(6-Iodo-2-methyl-1-[2-(4-morpholinyl)ethyl]-1H-indol-3-yl) (4-methoxyphenyl)methanon], selektiver CB_2-Rezeptorantagonist
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua dest.	Aqua destillata
BCA	Bicinchoninic acid (Bicinchoninsäure)
BEAS-2B	humane Bronchialepithelzellen aus gesundem Gewebe
Capsa	Capsazepin
CB_1	Cannabinoidrezeptor Typ 1
CB_2	Cannabinoidrezeptor Typ 2
CBD	(-)-Cannabidiol
cm^2	Quadratzentimeter
CO_2	Kohlenstoffdioxid
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FCS	Fetal Calf Serum (Fetales Kälberserum)
g	Erdbeschleunigung (9,81 m/sec^2)
g	Gramm
h	Stunden
H_2O_2	Wasserstoffperoxid
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HUVEC	human umbilical vein endothelial cells (humane Umbilikalvenen Endothelzellen)
IC_{50}	half maximum inhibitory concentration (halbmaximale Hemmkonzentration)

ICAM-1	Intercellular adhesion molecule-1
IgG	Immunglobulin G
JWH-133	(6aR,10aR)-3-(1,1-Dimethylbutyl)-6a-,7,10,10a-tetrahydro-6,6,9-trimethyl-6H-dibenzo[b,-d]pyran, selektiver CB_2 Agonist
KCl	Kaliumchlorid
kDa	kilo Dalton
KH_2PO_4	Kaliumdihydrogenphosphat
l	Liter
lat.	latein
M	Molarität
mA	Milliampère
MA	R(+)-Methanandamid, (R)-N-(2-Hydroxy-1-methylethyl)-5Z,8Z,11Z,14Z-eicosatetraenamid
MDR1	Multidrug-resitance protein 1
ml	Milliliter
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromol
mM	Millimol
mm	Millimeter
MMP	Matrix-Metalloproteinase
n	Endsumme
NaCl	Natriumchlorid
Na_2HPO_4	Natriumhydrogenphosphat
ng	Nanogramm
nM	Nanomol
nm	Nanometer
NSCLC	non-small cell lung cancer
PBS	Phosphate-buffered saline
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RNA	Ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)

rpm	Umdrehungen pro Minute
SDS	Sodiumdodecylsulfat
siRNA	small-interfering RNA
Tab.	Tabelle
TBS	Tris-buffered saline
TBS/T	Tris-buffered saline mit Tween®20
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine
THC	Δ^9-Tetrahydrocannabinol
TIMP-1	Tissue inhibitor of matrix metalloproteinases-1
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethane
TRPV1	Transient receptor potential vanilloid 1
Tween®20	Polyethylen Sorbitan Monolaurat
U	Unit (Einheit)
VEGF	Vascular endothelial growth factor
WST-1	(4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1.6-Benzol-Disulfonat)

10 Danksagung

Zuerst bedanke ich mich herzlichst bei Herrn Prof. Dr. Burkhard Hinz, Direktor des Instituts für Toxikologie und Pharmakologie der Universitätsmedizin Rostock, für die freundliche Überlassung des spannenden Promotionsthemas und die Unterstützung als Doktorvater.

Mein weiterer und großer Dank gilt Dr. Robert Ramer, der mir während meiner Zeit als Doktorand als direkter Ansprechpartner jederzeit zur Verfügung stand, mich motivierte, fachlich beriet und wissenschaftlich betreute. Damit und nicht zuletzt auch durch seinen großartigen Humor ermöglichte er mir das Gelingen dieser Arbeit.

Bei Philipp Borchert bedanke ich mich für seine geduldige Einführung in die Laborwelt und die praktische Unterstützung bei den einzelnen Versuchsreihen. Außerdem danke ich allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Toxikologie und Pharmakologie der Universitätsmedizin Rostock für die freundliche Aufnahme in das Team sowie die zahlreichen fachlichen Hilfestellungen.

Ich danke ganz besonders und von ganzem Herzen meinen Eltern, die mich nicht nur während meines Studiums, sondern schon mein gesamtes Leben lang immer unterstützten, mir zur Seite standen, Freiräume ließen und mich in schwierigen Zeiten auffingen. Dafür und auch einfach nur so liebe ich euch.

Danke auch an meine beiden geliebten Schwestern, ohne die ich heute sicher nicht da stehen würde, wo ich stehe.

Zu guter Letzt, aber nicht weniger von Bedeutung gilt mein besonderer Dank meinen lieben Freunden, die mir während der letzten Jahre immer den Rücken stärkten, mich motivierten und für mich da waren. Danke Ellen! Ohne dich hätte ich diesen Schritt wahrscheinlich nie gewagt. Danke Steffen! Du weißt wofür! Danke Ulf, André, Martin, Patrick, Anne, Manuel! Ohne euch wäre alles nicht einmal halb so schön. Danke Laura für die großartige Zeit in Rostock!

11 Selbstständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Rostock, den 30.03.2015

Sascha Fischer