Aus der Universitätsklinik für Neurologie

der Universität Ulm

Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. med. Albert C. Ludolph

Expression von Rezeptoren und Abbauenzymen des Endocannabinoidsystems in primären Zellen des ZNS als mögliche pharmakologische Zielproteine zur Behandlung neurodegenerativer Erkrankungen

DISSERTATION

zur

Erlangung des Doktorgrades der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der Universität Ulm

Vorgelegt 2018

von Michael Engelskirchen

geboren in Köln

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Thomas Wirth

1. Berichterstatter: PD Dr. Anke Witting

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Boris Ferger

Tag der Promotion: 07. Juni 2019

Die Inhalte dieser Seite wurden aus Gründen des Datenschutzes entfernt.

Teile dieser Dissertation sind erschienen in folgender Publikation:

Pasquarelli N, **Engelskirchen M**, Hanselmann J, Endres S, Porazik C, Bayer H, Buck E, Karsak M, Weydt P, Ferger B, Witting A: Evaluation of monoacylglycerol lipase as a therapeutic target in a transgenic mouse model of ALS. *Neuropharmacology 124*: 157-169 (2017)

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis III

1 Einleitung 1

1.1 Motivation 1

1.2 Neurodegenerative Erkrankungen 1

1.2.1 Allgemeines 1

1.2.2 Neuroinflammation 3

1.2.3 Exzitotoxizität 6

1.2.4 Pharmakologische Therapiemöglichkeiten bei neurodegenerativen Erkrankungen 8

1.3 Endocannabinoid System 9

1.3.1 Allgemeines 9

1.3.2 Historisches 9

1.3.3 Cannabinoid-Rezeptoren 10

1.3.4 Endocannabinoide 11

1.3.5 Endocannbinoid Biosynthese 13

1.3.6 Endocannabinoid Degradation 14

1.3.7 ECS in neurodegenerativen Erkrankungen 15

1.3.8 ECS als pharmakologisches Target bei Neurodegeneration 17

1.4 Fragestellung und Zielsetzung 18

2 Material und Methoden 19

2.1 Material 19

2.1.1 Laborgerät 19

2.1.2 Plastikwaren 19

2.1.3 Zellkultur 19

2.1.4 qPCR 21

2.1.5 Westernblot 22

2.1.6 Immunzytochemie 25

2.1.7 Endocannabinoid-Extraktionen 27

2.2 Methoden 28

2.2.1 Zellkultur 28

2.2.2 qPCR 33

2.2.3 Westernblot 35

2.2.4 Immunzytochemie 39

2.2.5 Endocannabinoid-Extraktionen 41

2.2.6 Statistische Auswertung 42

3 Ergebnisse 43

3.1 CB_1 Expression in primären Zellen des ZNS 43

3.2 CB2 Expression in primären Zellen des ZNS 47

3.3 MAGL Expression in primären Zellen des ZNS 50

3.4 FAAH Expression in primären Zellen des ZNS 53

3.5 2-AG, AEA und AA in Astrozyten mit und ohne KML-29-Behandlung 56

4 Diskussion 58

4.1 Allgemeines 58

4.2 Verteilung des ECS in primären Zellen des ZNS 58

4.2.1 Expression von CB_1 in primären Neuronen und Gliazellen 58

4.2.2 Expression von CB_2 in primären Neuronen und Gliazellen 62

4.2.3 Expression der MAGL in primären Neuronen und Gliazellen 65

4.2.4 Expression der FAAH in primären Neuronen und Gliazellen 66

4.2.5 2-AG und AEA Expression im ZNS 68

4.2.6 Bedeutung der Ergebnisse 70

4.3 Das ECS als pharmakologisches Target bei neurodegenerativen Erkrankungen 72

4.3.1 Allgemeines 72

4.3.2 Cannabinoide als Behandlungsoption bei neurodegenerativen Erkrankungen 73

4.4 Ausblick 76

5 Zusammenfassung 79

6 Literaturverzeichnis 80

Danksagung 97

Lebenslauf 98

Abkürzungsverzeichnis

2-AG	2-Arachidonylglycerol
ABHD	α-β-hydrolase domain
AEA	Arachidonylethanolamid, Anandamid
ALS	Amyotrophe Lateralsklerose
AMPA	Aminomethylphosphonsäure
AMT	AEA membrane transporter
ANOVA	Analysis of variance
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor
bFGF	Basic fibroblast growth factor
BSA	Rinderserumalbumin
CB_1	Cannabinoid-Rezeptor 1
CB_2	Cannabinoid-Rezeptor 2
CBD	Cannabidiol
CBN	Cannabinol
CD	Cluster of differentiation
cDNA	complementary DNA
COX-2	Cyclooxygenase 2
D-MEM	Dulbecco’s Modified Eagle Medium
D-PBS	Dulbecco’s Phosphate Buffered Saline
DAGL	Diacylglycerol Lipase
DAMPs	Damage-associated molecular patterns
DAPI	4’,6-Diamidin-2-phenylindol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNase I	Desoxyribonuklease I
dNTP	Nukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EAE	Autoimmune Enzephalomyelitis
ECS	Endocannabinoid System
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FAAH	Fettsäureamid Hydrolase
FBS	Fetales Rinderserum

GPR55	G-protein-coupled receptor 55
IGF-1	Insulinlike growth factor-1
IL	Interleukin
LPA	Lysophosphatsäure
LPS	Lipopolysaccharide
LTD	Long-term depression
Lyso-PI	Lyso-Phosphatidylinositol
MAGL	Monoacylglycerol Lipase
Memstain	MemCode™ Reversible Protein Stain Kit
mPTP	Mitochondrial permeability transition pore
MPTP	1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MS	Multiple Sklerose
MSI/ MSE	Metabotropic-induced supression of inhibition/ excitation
NAPE	*N*-Arachidonoyl-Phosphatidylethanolamin
NAPE-PLD	NAPE- Phospholipase D
NAT	*N*-Acetyltransferase
NMDA	*N*-Methyl-D-Aspartat
NO	Stickstoffmonooxid
PAMPs	Pathogen-associated molecular patterns
PBS	Phosphate buffered saline
PE	Phosphatidylethanolamin
PFA	Paraformaldehyd
PGK1	Phosphoglyceratkinase 1
PLA2	Phospolipase A2
PLC	Phospholipase C
Pol2	RNA Polymerase 2
PON	Poly-L-Ornithin Hydrobromid
PPAR	Peroxisome proliferator activated receptors
PPIA	Peptidylprolyl Isomerase A
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qPCR	Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction
RIPA	Radioimmunoprecipitation assay
RNase	Ribonuklease

ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RT-PCR	Reverse Transcriptase – Polymerasekettenreaktion
SDS PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid Gelelektrophorese
SEM	Standard error of the mean
SOD1	Superoxide dismutase 1
SSI	Slow-self inhibiton
TBP	Tata-Box Binding Protein
THC	Delta-9-Tetrahydrocannabinol
TLR	Toll-like receptors
TNF-α	Tumor necrosis factor-α
TRP	Transient Receptor Potential
TRPV1	Transient Receptor Potential Vanilloid 1

1 Einleitung

1.1 Motivation

Neurodegenerative Erkrankungen gewinnen in der heutigen Gesellschaft zunehmend an Bedeutung. Dies ist zum einen durch den demographischen Wandel zu erklären; durch die immer älter werdenden Menschen treten die Symptome von neurodegenerativen Erkrankungen verstärkt auf und werden bewusster wahrgenommen. Zum anderen werden diese durch das hohe Ausmaß an Forschung immer besser verstanden. Dennoch fehlt in den meisten Fällen eine kausale Therapie und die einzige Behandlungsmöglichkeit, das Krankheitsleiden zu lindern, besteht in der Verbesserung der Symptomatik. Deshalb gilt es als Ziel der modernen Medizin, die gewonnenen Erkenntnisse auszubauen, um letztlich ein besseres Krankheitsverständnis zu gewinnen und Therapien - sei es präventiv, pharmakologisch oder chirurgisch - zu entwickeln, welche gezielt in den Krankheitsprozess eingreifen.
Das Endocannabinoid System (ECS) wird in dieser Hinsicht in den letzten Jahren zunehmend erforscht, da ihm neuroprotektive und antiinflammatorische Eigenschaften zugeschrieben werden und es somit zwei entscheidende Schlüsselmechanismen der Pathologie von neurodegenerativen Erkrankungen verbessern kann.

1.2 Neurodegenerative Erkrankungen

1.2.1 Allgemeines

Neurodegenerative Erkrankungen gehen, wie der Name schon sagt, mit einem Untergang an neuronalem Gewebe einher. Klassischerweise werden Erkrankungen wie Morbus Alzheimer, Morbus Parkinson, Chorea Huntington, Amyotrophe Lateralsklerose (ALS) und Multiple Sklerose (MS) dazugezählt, entfernter zeigen jedoch auch Erkrankungen wie zerebrale Ischämien oder HIV-induzierte Demenz die gleichen pathologischen zellulären Vorkommnisse auf (Centonze et al. 2007b, Orgado et al. 2009). Die verschiedenen Erkrankungen divergieren in den betroffenen Gebieten des zentralen Nervensystems und daher

ist die Symptomatik sehr unterschiedlich ausgeprägt. Es kann das gesamte zentrale Nervensystem oder auch nur einzelne Neuronenpopulationen betroffen sein. Bei Chorea Huntington ist beispielsweise im besonderen Maße der neuronale Verlust im Striatum feststellbar (Vonsattel 2008). Somit kommt es hier zu unwillkürlichen Bewegungen vor allem der Extremitäten, da die Impulsunterdrückung der Motorik gestört ist (Roos 2010). Bei der ALS kommt es ebenfalls zu motorischen Defiziten, jedoch äußern sich diese in Form von Muskelschwäche und Lähmungen, da es vornehmlich zum Untergang der Motoneurone im zerebralen Kortex, Hirnstamm und Rückenmark kommt (Kiernan et al. 2011). Der Verlauf aller neurodegenerativen Erkrankungen ist typischerweise progressiv, die Symptomatik nimmt also entsprechend zu. Kognitive Defizite können je nach Ausprägung und Krankheitsverlauf bei allen neurodegenerativen Erkrankungen auftreten und stellen für den Betroffenen und seine Angehörigen eine besondere Belastung dar.

Insgesamt ist die Prävalenz neurodegenerativer Erkrankungen zunehmend. Dies ist einerseits, wie bereits erwähnt, auf die immer älter werdende Bevölkerung zurückzuführen, da sie vornehmlich Erkrankungen des höheren Alters sind. Im europäischen Raum wird bis 2030 eine Zunahme der 60-80jährigen um 50% und der über 80jährigen um 200% erwartet (Jellinger 2005). An Morbus Alzheimer, der am meisten verbreiteten neurodegenerativen Erkrankung, leiden beispielsweise weltweit momentan etwa 35 Millionen Menschen (Marchalant et al. 2012). Etwa 10% der über 80jährigen sind betroffen und die Anzahl an Demenzkranken wird sich schätzungsweise von 2005 bis 2025 vervierfachen (Ferri et al. 2005). Dies stellt die Gesellschaft und das Gesundheitssystem vor erhebliche soziale und ökonomische Probleme, auf die man sich in der nächsten Zeit einstellen muss.
Andererseits verbessern sich die diagnostischen Mittel immer mehr, sodass eine frühere Diagnose möglich wird. Leider hat dies jedoch häufig keine therapeutische Konsequenz, da Interventionsmöglichkeiten fehlen, den Erkrankungsprozess zu stoppen oder zu verlangsamen. Es steht in den meisten Fällen lediglich die Behandlung der Symptomatik als möglicher therapeutischer Ansatz zur Verfügung.

Früher teilte man neurologische Erkrankungen grob in zwei Typen ein: neurodegenerative, wie Alzheimer, Parkinson oder ALS, und inflammatorische, wie MS. Heute weiß man, dass diese beiden pathologischen Prozesse in allen neurologischen Erkrankungen koexistieren. Das bedeutet, dass Morbus Alzheimer auch eine inflammatorische und MS auch eine neurodegenerative Komponente aufweist (Centonze et al. 2007b). Insgesamt gibt es zentrale Dysfunktionen, welche in allen neurodegenerativen Erkrankungen auftreten können. Dazu zählen unter anderem Neuroinflammation, Exzitotoxizität, Akkumulation von fehlgefalteten Proteinen, oxidativer Stress oder mitochondriale Dyfunktion (Ranieri et al. 2016).

1.2.2 Neuroinflammation

Neuroinflammation ist ein wesentlicher Aspekt bei neurodegenerativen Erkrankungen. Sie ist ein wichtiger Bestandteil des Abwehrsystems des Gehirns und regelt das Gleichgewicht zwischen Neuroprotektion und Neurotoxizität (Hooten et al. 2015).

Man ging früher davon aus, dass Neuroinflammation durch tote Zellpartikel getriggert wird und somit erst als Konsequenz der neuronalen Schädigung auftritt (Hooten et al. 2015). Aus heutiger Sicht resultiert, dass diese schon viel eher direkt in den Prozess der Neurodegeneration eingreift und diesen verstärken und beschleunigen kann (Heneka et al. 2015).

Neuroinflammation wird im Wesentlichen von den beteiligten Zelltypen beeinflusst. Hervorzuheben sind vor allem die lokalen Gliazellen des ZNS wie Mikroglia, Astrozyten und Oligodendrozyten. Aber auch eingewanderte T-Lympozyten können den Prozess maßgeblich beeinflussen, indem sie je nach Zelltyp antiinflammatorische oder proinflammatorische Substanzen ausschütten (Hooten et al. 2015).

Sowohl Mikroglia als auch Astrozyten spielen eine bedeutende Rolle, indem sie einerseits frühe pathologische Prozesse versuchen einzudämmen, im späteren Verlauf jedoch durch sezernierte proinflammatorische Signale den Progress der Erkrankung sogar antreiben. Diese Komplexität und Diversität der Zellen ist erstens durch das Fortschreiten der Erkrankung, welcher die Zellen nicht mehr gewachsen zu sein scheinen, zu erklären und zweitens durch deren verschiedene Aktivitätszustände.

Mikroglia werden als eines der ersten und wichtigsten Bestandteile der Schutzmechanismen des Gehirns vor Infektion und Trauma betrachtet (Hooten et al. 2015). Sie werden als Makrophagen des Gehirns bezeichnet und ihre mesodermale Herkunft unterstreicht die enge Verwandtschaft der beiden Zelltypen. Sie sind hoch motile und anpassungsfähige Zellen, welche in ihren jeweiligen Gehirnarealen für die Erhaltung und Plastizität der neuronalen Verschaltungen zuständig sind. Bei Kontakt mit pathologischen Reizen wie neuronalem Zelltod oder Proteinaggregaten migrieren sie zum Ort des Geschehens und wirken mit ihrer Immunantwort dagegen (Heneka et al. 2015). Mit Hilfe von Danger-associated molecular patterns (DAMPs) oder Pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) wie CD14, CD36 und Toll-like Rezeptoren (TLRs) können sie pathologische Prozesse aufspüren und durch Phagozytose und Ausschüttung von Cytokinen, Chemokinen und sonstigen Immunantworten unschädlich machen. Demnach können Mikroglia in Ruhe oder aktiviert vorliegen. Ruhende Mikroglia stellen sich mikroskopisch durch einen kleineren Zellkörper und viele verästelte Ausläufer dar. Aktivierte Mirkoglia hingegen zeigen einen größeren, gleichmäßigeren Zellkörper und können weiterhin in fünf verschiedene Aktivitätszustände unterteilt werden. Dazu zählen die angeborene/ erworbene Deaktivierung, die angeborene Aktivierung, die klassische Aktivierung (M1), die alternative Aktivierung (M2) und schließlich die humorale Aktivierung (Gordon 2003). Um die Rolle von Mikroglia bei Neuroinflammation zu verstehen, sind vor allem M1 und M2 wichtig, welche ebenso bei Makrophagen beschrieben werden. M1 begünstigt vornehmlich eine proinflammatorische Zellantwort durch Rekrutierung von neurotoxischen T-Zellen, Ausschüttung von Reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und proinflammatorischen Zytokinen wie Interleukin 1 (IL-1), Interleukin 6 (IL-6) und Tumor necrosis factor-α (TNF-α) und die Reduktion von neurotrophen Faktoren (Hooten et al. 2015). M2 hingegen unterstützt eher eine antiinflammatorische Immunantwort, indem neurotrophe Faktoren wie Insulin-like growth factor 1 (IGF-1) und antiinflammatorische Zytokine wie IL-4 und IL-10 ausgeschüttet werden.

Astrozyten sind die Stützzellen des ZNS. Sie wirken entscheidend an der Bluthirnschranke mit. Neben diesen Funktionen und weiteren Tätigkeiten als Regulatoren extrazellulärer Neurotransmitter-Konzentrationen und der

Homöostase von Ionen und metabolischen Substanzen sind Astrozyten auch ein wichtiger Teil des Immunsystems im Gehirn (Hooten et al. 2015). Ebenso wie Mikroglia können sie mit Hilfe von PAMPs pathologische Prozesse erkennen und durch Ausschüttung von Zytokinen, Chemokinen, Interleukinen, Stickstoffmonooxid (NO) und anderen zytotoxischen Molekülen diesen entgegenwirken. Das so entstehende Milieu kann bei chronischer Aktivierung jedoch auch zur Schädigung des gesunden neuronalen Gewebes führen und so die Pathogenese vorantreiben.

Oligodendrozyten haben zwei Hauptfunktionen im zentralen Nervensystem. Zum einen sind sie für die Bildung der Myelinscheide der neuronalen Axone verantwortlich und haben somit Einfluss auf die saltatorische Signaltransduktion und den metabolischen Transport (Locatelli et al. 2015).
Zum anderen sind sie maßgeblich an der Regulierung der Glutamatspiegel in der weißen Substanz des ZNS beteiligt (DeSilva et al. 2009). Somit kann es bei Funktionslosigkeit der Oligodendrozyten zu erhöhten Glutamat-Spiegeln kommen und folglich zu exzitotoxischen Schäden der umliegenden Zellen. Auf diese Weise können Oligodendrozyten entscheidend an neurodegenerativen Prozessen beteiligt sein (Sekiyama et al. 2012). Ein Untergang von umliegendem neuronalem Gewebe bei Dysfunktion von Oligodendrozyten konnte in zahlreichen Tiermodellen nachgewiesen werden (Locatelli et al. 2012, McTigue et Tripathi 2008, Nave 2010). Ebensolche Effekte können bei MS und heriditären Leukodystrophien an Menschen beobachtet werden, wo Oligodendrozyten und folglich die Myelinscheiden vermehrt zugrunde gehen und somit die schwerwiegende Symptomatik verursacht wird (Nave 2010).

Wie überall im Körper spielt das adaptive Immunsystem auch im Gehirn eine wichtige Rolle beim Schutz gegen Trauma oder Infektion und ist somit ebenfalls ein entscheidender Mediator der Neuroinflammation. Bei neurodegenerativen Erkrankungen infiltrieren verschiedene Typen von T-Zellen ins ZNS, darunter vor allem CD4+-T-Helferzellen (Th), im späteren Verlauf auch CD8+-Lymphozyten. Sie werden durch die Antigen-Präsentation der Mikroglia angelockt (Hooten et al. 2015). Auch bei CD4+-T-Zellen kann man zwischen neurotoxischen und neuroprotektiven Zellen unterscheiden. Th1 und Th17 werden

proinflammatorische Eigenschaften zugeschrieben, wohingegen Th2 und regulatorische T-Zellen (Tregs) durch antiinflammatorische Effekte neuroprotektiv wirken.

1.2.3 Exzitotoxizität

Der Begriff Exzitotoxizität beschreibt ein Phänomen der Neurophysiologie, bei dem es durch unphysiologisch vermehrte extrazelluläre Spiegel von exzitatorischen Substanzen im Gehirn zu einem Untergang von neuronalem Gewebe kommt. Es ist bekannt, dass dieser Prozess in großem Maße an der Pathologie von vielen neurologischen Erkrankungen wie Schlaganfällen, Rückenmarksverletzungen, Hirntraumata, aber auch neurodegenerativen Erkrankungen beteiligt ist (Mehta et al. 2013).
Eine wesentliche Funktion spielt dabei Glutamat, der häufigste exzitatorische Neurotransmitter, welcher entscheidend an Funktionen wie neuronaler Plastizität, Gedächtnis und Lernen beteiligt ist (Chen Q. Y. et al. 2009).
In physiologischer Situation ist Glutamat intrazellulär etwa 10.000 Mal höher konzentriert als extrazellulär und weißt dort nahezu keine Aktivität auf (Ma et al. 2012). Somit kann gewährleistet werden, dass es nur von außen durch die Bindung an Rezeptoren seine Wirkungen entfalten kann. Die Rezeptoren sind zudem ausschlaggebend in wieweit die Zelle auf einen Glutamat-Reiz reagiert (Yu et al. 2008). Sie werden in metabotrope und ionotrope Rezeptoren unterteilt, wobei für die schnelle neuronale Übertragung vor allem die ionotropen Rezeptoren entscheidend sind. Dazu zählen *N*-Methyl-D-Aspartat (NMDA), der im allgemeinen koexpressierte AMPA und Kainat (Mehta et al. 2013).
Bei der Reizübertragung wird das in Vesikeln gespeicherte Glutamat nach Depolarisation der Präsynapse ausgeschüttet und kann somit an postsynaptische Glutamat-Rezeptoren binden. Durch die Bindung von Glutamat wird ein Magnesium-Ion aus dem Kanal freigegeben und macht diesen so für Kalzium-Ionen durchgängig (Spandou et al. 2007). Das Kalzium strömt entlang seines Konzentrationsgefälles in die Zelle und induziert so Kalzium-abhängige Signalkaskaden, welche unter anderem AMPA modifizieren und somit die synaptische Stärke und Plastizität beeinflussen (Maragakis et Rothstein 2006). Auf diese Weise können nicht nur Signale von einem Neuron aufs andere übertragen werden, sondern auch durch die enge Verknüpfung der Synapsen auf zusätzliche

Neurone übergreifen und das Signal somit potenziert werden (Okubo et al. 2010). Beim Abbau von Glutamat aus dem synaptischen Spalt sind entscheidend Astrozyten beteiligt. Diese wandeln mit Hilfe der Glutamin Synthetase das Glutamat in das inaktive Glutamin um, in welcher Form es gespeichert bzw. wiederum in Glutamat überführt werden kann (Mehta et al. 2013). Außerdem können akut erhöhte Glutamat-Spiegel durch Aktivierung von mehreren Transport-Mechanismen wieder normalisiert werden (Gottlieb et al. 2003), solange sie sich im physiologischen Rahmen befinden (Zlotnik et al. 2007).

Die Exitotoxizitätshypothese besagt, dass bei verstärkter und verlängerter Stimulierung der Neurone mit Glutamat die Zelle die normalerweise strengregulierte Kalziumhomöostease nicht mehr aufrechterhalten kann und es somit durch verschiedene toxische Prozesse zu einem Untergang der Zelle kommt. Unter anderem werden Kalzium-abhängige Enzyme wie beispielsweise die Phospholipase A2, die Stickstoffoxid Synthetase und die Xanthinoxidase aktiviert (Mehta et al. 2013) und so die Bildung von Sauerstoffradikalen und Stickstoffmonooxid (NO) verstärkt, was wiederum Membranen, Proteine und Nukleinsäuren schädigen kann. Zudem wird dieser Prozess durch die Störung des Mitochondrien-Stoffwechsels verschlechtert, welcher maßgeblich an der Bildung von Sauerstoffspezies beteiligt ist (Miller et al. 2010). In Folge dessen werden große, unselektive Poren in den Mitochondrien, mitochondrial permeability transition pores (mPTP), geöffnet, was wiederum zu einer Verschlechterung des Kalziumspiegels und der toxischen Metaboliten führt (Lee H. G. et al. 2009). Das Öffnen von mPTP spielt vermutlich eine Schlüsselrolle bei der Exzitotoxizität (Molochnikov et al. 2012, Swamy et al. 2009). Letztlich wird durch proapoptotische Faktoren wie Cytochrom C aus den Mitochondrien der programmierte Zelltod eingeleitet (Nicholls 2004). Es kommt zu einem Untergang des Neurons und das somit freiwerdende Glutamat kann die Exzitotoxizität weiter verstärken.

Es kommt aufgrund dieser beiden Mechanismen, Neuroinflammation und Exzitotoxizität, zu einer Zunahme der Neurodegeneration, da sie sich gegenseitig bedingen und verstärken.

1.2.4 Pharmakologische Therapiemöglichkeiten bei neurodegenerativen Erkrankungen

Eine gute pharmakologische Therapie sollte demnach möglichst kausal in die pathologischen Prozesse eingreifen, um ein Fortschreiten zu verhindern und im besten Fall einen Rückgang der neuronalen Schädigung zu bewirken.
Neuroinflammation und Exzitotoxizität stellen diesbezüglich besondere Ansätze bei neurodegenerativen Erkrankungen dar. Bereits in der Klinik verwendete Substanzen wie Memantin bei Morbus Alzheimer oder Riluzol bei ALS greifen entscheidend in die Schlüsselmechanismen ein. Memantin beispielsweise ist ein NMDA-Antagonist und reduziert so die Exzitotoxizitäts-vermittelten neuronalen Schäden. Riluzol ist das einzige zugelassene Medikament zur Behandlung von ALS und wirkt ebenfalls über die Blockade eines Glutamatkanals.
Auf der Suche nach neuen pharmakologischen Ansätzen zur Behandlung von neurodegenerativen Erkrankungen ist man auf das Endocannabinoid System aufmerksam geworden, welches in hohem Maße im zentralen Nervensystem vorkommt. Dieses stellt ein besonders interessantes Target dar, da es an beiden pathologischen Prozessen, Neuroinflammation und Exzitotoxizität, maßgeblich beteiligt ist und seinen Metaboliten neuroprotektive und antiinflammatorische Eigenschaften im ZNS zugewiesen werden.

1.3 Endocannabinoidsystem

1.3.1 Allgemeines

Das Endocannabinoidsystem (ECS) ist nach der *Cannabis sativa* Pflanze benannt. Es besteht aus den Endocannabinoiden (eCBs), den zugehörigen Rezeptoren und den Enzymen die für Auf- und Abbau der eCBs zuständig sind. Es ist nahezu in allen Geweben des Körpers exprimiert und spielt in zahlreichen Prozessen eine Rolle. Dazu zählen Nozizeption, Appetit, Angst, Reproduktion, Bewegung, Neuroprotektion, Neuroplastizität, Neurogenese und Gedächtnis (Skaper et Di Marzo 2012).

1.3.2 Historisches

Cannabis sativa wird bekannterweise schon seit tausenden von Jahren in seinen verschiedenen Zubereitungsformen wie Marihuana oder Haschisch vom Menschen diverser Kulturen zu spirituellen, aber auch medizinischen Zwecken verwendet. Zudem wurden die Blätter der Pflanze, auch Hanf genannt, wegen ihrer robusten Fasern als Nutzpflanze gebraucht (Mechoulam et al. 2014).
Die ersten gut beschriebenen wissenschaftlichen Arbeiten über die Wirkung von Cannabis sativa begannen Mitte des neunzehnten Jahrhunderts als O'Shaugnessy et al. die Verhaltensweise von Menschen und verschiedenen Tieren unter Cannabis-Einfluss untersuchte (O'Shaughnessy 1842). Da man schon aus anderen Pflanzen die aktiven Substanzen extrahieren konnte, wie zum Beispiel Morphin aus dem Schlafmohn (*Papaver somniferum*), versuchte man dies auch mit der Cannabis-Pflanze. Ein erster Erfolg gelang allerdings erst Ende des 19. Jahrhunderts mit der Isolierung von Cannabinol (CBN). Darauf folgte in den 30er Jahren die Isolierung von Cannabidiol (CBD), einer weiteren aktiven Substanz der Cannabis-Pflanze. Allerdings konnte aufgrund von mangelnden technischen Voraussetzungen die Struktur der Moleküle noch nicht eruiert werden. Dies war erst möglich als in den 1960er Jahren die Methode der Chromatographie und der Spektrometrie eingeführt wurde. Mit deren Hilfe gelang es Gaoni und Mechoulam 1964 das Δ^9-Tetrahydrocannbinol (THC) zu isolieren und die chemische Struktur zu bestimmen (Gaoni et Mechoulam 1964). THC gilt bis heute

als psychoaktivste Komponente der Cannabis-Pflanze. Darüber hinaus wurden jedoch über 100 weitere verschiedene Substanzen aus *Cannabis sativa* isoliert.
Durch die Erforschung der Wirkungsweise von THC ist man in den 90er Jahren auf zwei Proteine gestoßen, welche als Rezeptoren für das Molekül fungierten. Passenderweise wurden diese Cannabinoid-Rezeptoren CB_1 (Matsuda et al. 1990) und CB_2 (Munro et al. 1993) benannt. Die Existenz dieser beiden Rezeptoren legte nahe, dass nicht nur exogene Substanzen daran binden können, sondern auch vom Körper selbst produzierte, endogene Stoffe. So entstand die Bezeichnung des Endocannabinoidsystems.

1.3.3 Cannabinoid-Rezeptoren

Bei diesen beiden Proteinen handelt es sich um G-Protein-gekoppelte transmembranäre Rezeptoren, welche überall im menschlichen Körper gefunden werden können. CB_1 wird allerdings vor allem im Gehirn exprimiert, wo er mit der häufigste G-Protein-gekoppelte Rezeptor überhaupt ist (Herkenham et al. 1990, Moldrich et Wenger 2000). Aber auch in Gefäßen, Immunzellen oder Fortpflanzungsorganen kann er in geringeren Mengen nachgewiesen werden (Borner et al. 2009, Habayeb et al. 2008, Hillard 2000, Parolaro 1999). CB_2 wird hingegen hauptsächlich in Immunzellen, wie Makrophagen, B- und T-Zellen und Mikroglia exprimiert und ist in gesundem neuronalem Gewebe kaum nachzuweisen (Borner et al. 2009, Cabral et Marciano-Cabral 2005, Lee S. F. et al. 2001, Parolaro 1999). Durch pathologische Prozesse kann die Expression aber stark hochreguliert werden. Dies kommt vermutlich durch die Hochregulierung des Rezeptors in Mikroglia zustande und eine zusätzliche Einwanderung von Lymphozyten ins Gehirn (Maresz et al. 2005).
Darüber hinaus existieren neben CB_1 und CB_2 noch andere Rezeptoren, die bekanntlich mit Cannabinoiden interagieren können. Dazu zählen Rezeptoren aus der Transient receptor potential (TRP) – Familie, wie der Transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1), vor allem bekannt wegen seiner Interaktion mit Capsaicin, dem Schärfe-vermittelnden Alkaloid aus verschiedenen Paprikagewächsen (De Petrocellis et al. 2008, Toth et al. 2009). Daneben können Cannabinoide an Peroxisome- proliferator- activated receptors wie PPARα oder PPARγ wirken oder an GPR55, welcher zu den non-CB_1/CB_2 G-protein-gekoppelten Rezeptoren gezählt wird (Ryberg et al. 2007, Sun et al. 2006).

Inwieweit diese Rezeptoren allerdings zum ECS gezählt werden können, ist umstritten.

Die durch CB_1 und CB_2 vermittelten Effekte sind sehr unterschiedlich ausgeprägt. Die klassische dem THC zugeschriebene psychoaktive Wirkung wird voraussichtlich hauptsächlich durch Aktivierung von CB_1 vermittelt. Dazu zählen die klassischen tetraiden Effekte wie Hypomotilität, Analgesie, Hypothermie und Katalepsie. Dies konnte durch CB_1 -/- knockout Mäuse gezeigt werden, bei denen diese Symptome kaum auftraten (Ledent et al. 1999, Zimmer et al. 1999). Zusätzlich konnten neuroprotektive Effekte festgestellt werden wie die Hemmung der Glutamatausschüttung, die Senkung der intrazellulären Kalzium-Konzentration oder Vasodilatation (van der Stelt et Di Marzo 2005).

Die überwiegende Expression von CB_2 auf immunologischen Zellen lässt vermuten, dass dieser Rezeptor im Gehirn eher immunmodulatorische Effekte vermittelt. *In vitro* Experimente konnten zeigen, dass eine Aktivierung von CB_2 die Ausschüttung von proinflammatorischen Substanzen in Mikroglia und Astrozyten von Mensch und Maus inhibiert und somit entscheidenden Einfluss auf das ansässige Immunsystem ausübt (Benito et al. 2008).

Nach der Entdeckung der Cannabinoid-Rezeptoren galt es, die natürlichen Agonisten der Rezeptoren, die sogenannten Endocannabinoide, zu identifizieren. Eine Isolierung gelang bereits kurze Zeit später. Die zwei am besten charakterisierten Endocannabinoide sind 2-Arachidonoylglycerol (2-AG) und N-Arachidonoylethanolamin (AEA, Anandamid). Neben AEA und 2-AG existieren allerdings noch zahlreiche andere Substanzen, die als Endocannabinoide bezeichnet werden können.

1.3.4 Endocannabinoide

Endocannabinoide sind lipide Signalmoleküle, welche Amide und Ester in langen Ketten ungesättigter Fettsäuren enthalten. Sie werden typischerweise bei Depolarisation oder Aktivierung bestimmter G-Protein-gekoppelter Rezeptoren auf Bedarf synthetisiert und ausgeschüttet (Lu H. C. et Mackie 2016). Auch die Signalübertragung unterscheidet sich deutlich von der von klassischen Neurotransmittersystemen. Bei Letzteren werden durch die Depolarisierung der Präsynapse, die in Vesikel-gespeicherten Neurotransmitter wie Glutamat oder GABA, in den synaptischen Spalt freigelassen und wirken nachfolgend auf dem

postsynaptischen Neuron. Im Gegensatz dazu wirken Endocannabinoide auf eine retrograde Art und Weise. Das bedeutet, dass bei Depolarisierung der Postsynapse Endocannabinoide dort auf Bedarf synthetisiert und freigelassen werden, um auf der präsynaptischen Membran des vorigen Neurons an CB_1-Rezeptoren zu binden. Über die Gi/o-Proteine werden Kalzium- und Kalium-Kanäle reguliert und so die weitere Ausschüttung von Neurotransmittern gehemmt. Dieser Mechanismus kommt sowohl bei exzitatorischen, wie auch bei inhibitorischen Neuronen vor und dementsprechend können Endocannabinoide inhibitorisch, durch Hemmung der Exzitation, oder exzitatorisch (dysinhibitorisch), durch Hemmung der inhibitorischen Neurone, wirken. Diese Wirkungsweise wird auch als Depolarisation-induced supression of inhibiton (DSI) oder Depolarisation-induced supression of excitation (DSE) bezeichnet (Kano et al. 2009). Es konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass Endocannabinoide durch weitere Übertragungsmechanismen wirken können. Dazu zählen *metabotropic-induced supression of inhibition/ excitation* (MSI bzw. MSE), long-term depression (LTD) und slow-self inhibition (SSI) (Lu H. C. et Mackie 2016), welche im Folgenden aber nicht näher erläutert werden sollen.

Alles in Allem lässt die Signalübertragung der Endocannabinoide darauf schließen, dass diese eine entscheidende Rolle in der Feinregulierung synaptischer Signale spielen (Blankman et Cravatt 2013). Die Mechanismen der Ausschüttung und des Transports der Endocannabinoide sind leider bisher nur wenig erforscht. Es wird jedoch angenommen, dass Transportmoleküle wie AMT existieren, um die eCBs über Zellmembranen zu transportieren. Darüber hinaus wird vermutet, dass sie ebenfalls aufgrund ihrer lipophilen Eigenschaften selbstständig die Membranen überwinden können (Centonze et al. 2007b).

Wie bereits erwähnt sind 2-AG und Anandamid die zwei Hauptendocannabinoide. Sie wurden als erstes entdeckt und stellen nach heutigem Kenntnisstand die am weitest verbreiteten und wirksamsten Endocannabinoide dar. Sie weisen Unterschiede hinsichtlich ihres Vorkommens und ihrer pharmakologischen Eigenschaften auf. Anandamid ist ein partieller Agonist an CB_1- und CB_2-Rezeptoren, weist aber gegenüber letzterem eine deutlich geringere Affinität auf. 2-AG wirkt hingegen als voller Agonist an beiden Rezeptoren und zeigt an diesen eine deutlich größere Potenz als Anandamid (Pertwee et al. 2010). Basale 2-AG-Spiegel werden als dreimal höher eingeschätzt als Anandamid, obwohl die Gründe

dafür nicht ausreichend verstanden sind. Es wird jedoch angenommen, dass nicht das gesamte 2-AG als Endocannabinoid wirkt, sondern teilweise lediglich als Zwischenprodukt im Fettstoffwechsel vorliegt (Murataeva et al. 2014). Aufgrund seiner starken Bindung und Wirksamkeit an beiden Rezeptoren und vermehrten Vorkommen wird 2-AG auch als das zentrale Endocannabinoid im ECS gesehen.

1.3.5 Endocannbinoid-Biosynthese

Im Gegensatz zu klassischen Neurotransmittern und Neuropeptiden werden Endocannabinoide nicht in Vesikeln gespeichert, sondern bei Bedarf von einer Reihe intrazellulärer Enzyme aus Membranphospholipiden synthetisiert und direkt in den synaptischen Spalt freigelassen (Ueda et al. 2011). Obwohl beide Hauptendocannabinoide AEA und 2-AG in Struktur und Wirkung viele Gemeinsamkeiten aufweisen, ist ihre Synthese und ihr Abbau nahezu gänzlich unterschiedlich (Ueda et al. 2011).

Der Haupt-Synthese-Weg von Anandamid wird bekanntlich durch einen zweischrittigen Prozess durchgeführt. Für die Synthese dient Phosphatidylethanolamin (PE) als Ausgangssubstrat. Dieses wird durch die N-Acetyltransferase (NAT) in N-Arachidonoyl-PE (NAPE) umgewandelt. Dieser Schritt gilt als geschwindigkeitsbestimmend im Syntheseprozess. NAT ist ein membrangebundenes Enzym und wird durch einen Anstieg an Ca^{2+} in der Zelle aktiviert. Es werden jedoch auch andere Möglichkeiten der Aktivierung diskutiert. Des Weiteren wird das N-Arachidonoyl-PE durch die NAPE-Phospholipase D (NAPE-PLD) unter Abspaltung von Phosphatsäure in Anandamid umgewandelt. NAPE-PLD ist ein Membran-assoziiertes Enzym, welches vorrausichtlich durch Bestandteile der Membran wie PE aktiviert wird. Andere Synthesewege wurden beschrieben, in welchen verschiedene Enzyme wie PLC, Abh4, sPLA2 usw. beteiligt sind, gelten jedoch nicht als hauptverantwortlich für die Bereitstellung von Anandamid (Wang et Ueda 2009).

Auch bei der Biosynthese von 2-AG wurden mehrere Wege beschrieben; der zweischrittige Prozess über die Phospholipase Cβ (PLC) und Diacylglycerollipase (DAGL) gilt jedoch als wichtigster Bereitsteller von 2-AG. Die PLC wandelt vorzugsweise PI in Diacylglycerol um, welches wiederum durch DAGL in 2-AG umgewandelt wird. DAGL ist ein bei Zellen an der Basalmembran lokalisiertes Enzym, welches in zwei Isoformen auftritt: DAGLα und DAGLβ. Beide Isoformen

sind an der Synthese von 2-AG beteiligt, wenn auch in verschiedenem Ausmaß in verschiedenen Geweben. Demnach ist DAGLα vermutlich hauptverantwortlich für die Bereitstellung von 2-AG im Gehirn, da DAGLα-defiziente Mäuse eine erhebliche Reduktion aufwiesen, welche bei DAGLβ-defizienten Mäusen so nicht gezeigt werden konnte (Ueda et al. 2011). DAGLβ ist in dieser Hinsicht entscheidender für die Synthese in der Leber. Auch Phosphatidsäure oder Phosphorylcholin können als Substrat für die Synthese herangezogen werden. Alternative Wege involvieren die Bildung von Lyso-Phosphatidylinositol (Lyso-PI) aus Phosophatidylinositol durch die Phospholipase A1 und die weitere Umwandlung in 2-AG durch die Lyso-PI-PLC. Zudem kann 2-AG auch durch Phosphatierung von Lysophosphatsäure gewonnen werden. Dies stellt einen möglichen dritten Syntheseweg dar (Murataeva et al. 2014).

1.3.6 Endocannabinoid-Degradation

Die Degradation der Endocannabinoide wird vornehmlich durch Hydrolyse gewährleistet. Dabei unterscheiden sich auch hier die Abbauwege zwischen 2-AG und Anandamid, es existieren jedoch auch einige Überschneidungen.
2-AG wird hauptsächlich durch die Monoaclyglycerol-Lipase (MAGL) abgebaut, welche das Molekül in Arachidonsäure (AA) und Glycerol spaltet. Die entstehende AA kann so der Prostaglandin- und Leukotriensynthese zugeführt werden. MAGL ist sogar der Hauptbereitsteller von AA im Gehirn, im Gegensatz zu anderen Geweben, wie der Leber oder dem Gastrointestinaltrakt, wo dies vornehmlich durch die Phospolipase A2 (PLA2) gewährleistet wird (Nomura et al. 2011). Zu den anderen Enzymen, welche 2-AG hydrolisieren zählen zudem auch die Serin Hydrolasen α-β-hydrolase domain 6 und 12 (ABHD6, ABHD12). Diese sind für etwa 5 bzw. 9% des 2-AG-Abbaus verantwortlich (Savinainen et al. 2012). Allerdings konnte durch MAGL -/- Knockout Mäuse gezeigt werden, dass die beiden Enzyme erst bei hochregulierten 2-AG-Spiegeln eine wesentliche Rolle spielen. Zudem wird die Fettsäureamid Hydrolase (FAAH) öfter mit der 2-AG-Degradation in Zusammenhang gebracht, da *in vitro* gezeigt werden konnte, dass sie 2-AG hydrolisieren kann. Es ist jedoch anzunehmen, dass sie im Gehirn bei regulären 2-AG-Spiegeln *in vivo* keine bedeutende Rolle spielt und nur bei sehr hohen Spiegeln in die Degradation eingreifen könnte (Murataeva et al. 2014).

Eine weitere Abbaumöglichkeit von 2-AG ist die Umwandlung in weitere biologisch aktive Substanzen, welche möglicherweise auch gegenteilige Effekte haben können. Ein Schlüsselenzym dabei ist die Cyclooxygenase 2 (COX 2) welche 2-AG in Prostaglandin Glycerolester umwandeln kann, die proinflammatorische Eigenschaften aufweisen. Lysophospatsäure (LPA), welches in multiple Signalwege eingreift, kann zudem durch die Phosphorylierung von 2-AG mit Hilfe von Glycerolkinasen entstehen. Aber auch die Lipoxygenase ist imstande 2-AG zu oxidieren und so entstehende Hydroxyperoxy Derivate herzustellen.
Anandamide wird ebenfalls hauptsächlich durch Hydrolyse degradiert. Dafür ist die fatty acid amide hydrolase (FAAH) hauptverantwortlich, welche es in Arachidonsäure und Ethanolamin spaltet. Zusätzlich kann AEA, ähnlich wie 2-AG, durch bestimmte Enzyme, wie COX-2, verschiedene Lipoxygenasen oder Cytochrom p450 Monooxygenasen, oxidiert werden und so in teilweise wirksame Metaboliten umgewandelt werden (Maccarrone 2017).

1.3.7 ECS in neurodegenerativen Erkrankungen

Da das ECS entscheidende neuromodulatorische Eigenschaften aufweist, ist es besonders interessant, die Expression der beteiligten Proteine und Metaboliten in verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen und verschiedenen Krankheitsstadien zu beurteilen, um damit Rückschlüsse auf deren eventuelle Beteiligung an pathologischen Prozessen oder deren mögliche Kompensationstrategie zu schließen. Dies kann wiederum die Möglichkeit einer pharmakologischen Intervention verbessern, da die verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen trotz der vielen Parallelen möglicherweise eine modifizierte Herangehensweise erfordern.
Diesbezüglich haben viele Studien die verschiedenen Bestandteile des ECS in verschiedenen Erkrankungen und Erkrankungsstadien untersucht und dabei sehr komplexe Veränderungen feststellen können.
Bei Morbus Alzheimer zum Beispiel konnte gezeigt werden, dass die CB_1 Expression im präfrontalen Kortex zu Beginn der Erkrankung ansteigt und im weiteren Verlauf stark abnimmt (Farkas et al. 2012). Außerdem ist die CB_1 Funktionalität eingeschränkt (Ramirez et al. 2005). Der CB_2 Rezeptor konnte in postmortalen Gehirnen von Alzheimer Patienten besonders dicht in Regionen nachgewiesen werden, wo eine vermehrte Anzahl von Mikroglia im

Zusammenhang mit neuritischen Plaques aufgefunden wurde (Benito et al. 2003, Solas et al. 2013). Zudem konnte Jung et al. erhöhte Werte von AEA im mittleren frontalen und temporalen Kortex nachweisen (Jung K. M. et al. 2012). Letztlich waren die Level von DAGLα, DAGLβ, FAAH und MAGL in Alzheimer Patienten erhöht, obwohl die 2-AG-Hydrolyse erniedrigt war (Benito et al. 2003, Mulder et al. 2011).

Bei Patienten mit Morbus Parkinson wurde eine verminderte Expression von CB_1 in der Substantia nigra, aber dafür erhöhte Expression in dopaminergen Projektionsarealen, festgestellt (Van Laere et al. 2012). Die 2-AG-Spiegel waren im Globus pallidus um das 7-fache erhöht (Di Marzo et al. 2000) und Pisani et al. konnten erhöhte Werte von AEA im Liquor nachweisen, welche sich nach Dopaminersatztherapie normalisierten (Pisani et al. 2010). Zudem waren die Spiegel von FAAH erniedrigt (Gubellini et al. 2002).

Bei Huntington konnte ein Zusammenhang zwischen CB_1-Rezeptordichte und Krankheitsprogression festgestellt werden. In den Basalganglien sind diese deutlich vermindert (Glass et al. 2000) und CB_2 in striatalen Mikroglia erhöht (Palazuelos et al. 2009). Im Striatum waren AEA und 2-AG vermindert und im Kortex 2-AG vermindert und AEA erhöht. Dazu kohärent waren die Spiegel von FAAH und MAGL im Kortex erhöht bzw. erniedrigt (Bari et al. 2013).

Bei ALS konnte in G93A SOD1 Mäusen, dem gängigsten Krankheitsmodell von ALS, eine Hochregulierung von CB_1 in Motorneuronen gezeigt werden (Zhao et al. 2008), welche zudem hypersensitiv gegenüber Agonisten waren (Rossi et al. 2009). CB_2 war in Mikroglia, welche aus humanen postmortalem Rückenmarksgewebe von ALS Patienten isoliert worden, erhöht (Yiangou et al. 2006). Außerdem konnte eine Erhöhung von 2-AG und AEA im Rückenmark von SOD-1 Knockout Mäusen festgestellt werden (Witting et al. 2004b), welche bei Progression der Erkrankung noch weiter anstiegen (Bilsland et al. 2006).

Bei Patienten mit MS oder Mäusen mit experimenteller autoimmuner Enzephalomyelitis (EAE), einem Mausmodell von MS, konnten viele verschiedene Veränderungen des ECS festgestellt werden. Zum einen eine Erhöhung von AEA in akuten inflammatorischen Herden (Eljaschewitsch et al. 2006) und im Liquor der Patienten (Centonze et al. 2007a). 2-AG-Level waren nicht beeinträchtigt. Zum anderen wurden hingegen von Di Filippo et al. (Di Filippo et al. 2008) erniedrigte Spiegel von AEA und 2-AG im Liquor von MS Patienten beschrieben und

Cabranes et al. (Cabranes et al. 2005) fand mit der Runterregulierung von AEA und 2-AG in Gehirnen von EAE Mäusen ähnliche Ergebnisse.

1.3.8 ECS als pharmakologisches Target bei Neurodegeneration

Die Veränderungen der Bestandteile des ECS in oben beschriebenen Erkrankungen deutet darauf hin, dass dieses wesentlich am Krankheitsprozess beteiligt ist. Inwieweit genau ist zum jetzigen Zeitpunkt noch schwer zu sagen und bleibt Gegenstand der Forschung. Anhand der Wirkungsweise der Endocannabinoide lassen sich jedoch Hypothesen aufstellen, auf welche Art und Weise diese protektiv wirken könnten, oder sogar bezogen auf die Erkrankung oder das Erkrankungsstadium, negative Effekte vermitteln. Im Folgenden werden die Wirkungen der Endo- oder auch Phytocannabinoide in Bezug auf Neurodegeneration und den beteiligten Prozessen genauer dargestellt.

In Hinsicht auf neurologische Erkrankungen weisen Endocannabinoide einige positive Effekte auf. Zum einen wird durch präsynaptische CB_1-Rezeptoren die Ausschüttung von Glutamat an glutanergen Neuronen gehemmt und somit die Neuroexzitotoxizität-vermittelten Schäden vermindert (Rossi et al. 2010). Zum anderen wird CB_1 im Zusammenhang mit Bildung von neurotrophen Substanzen wie Brain derived neurotrophic factor (BDNF) oder basic fibroblast growth factor (bFGF) gestellt (Aguado et al. 2007, Khaspekov et al. 2004, Marsicano et al. 2003). Außerdem kann CB_1 die Exzitoxizität durch Bildung von NO, Inhibition von NFκB und inflammatorischen Zytokinen wie TNFα und die Abschwächung von Cyclooxygenase-2 einschränken (Kim S. H. et al. 2006b, Panikashvili et al. 2005, Zhang et Chen 2008).

Da CB_2 überwiegend auf Immunzellen exprimiert wird, werden auch dort die Effekte vermittelt. Zum einen vermindert eine Aktivierung von CB_2 die Produktion und Ausschüttung von Zytokinen aus Makrophagen und Mikroglia und somit die inflammatorische Ausbreitung. Zum anderen kann es die T-Zell-Aktivierung reduzieren und vermindert die Bildung von freien Radikalen, welche wiederum das Gewebe schädigen können.

1.4 Fragestellung und Zielsetzung

Neurodegenerative Erkrankungen stellen die moderne Medizin trotz der intensiven Forschung und des zunehmenden Verständnisses immer noch vor große Probleme in der Behandlung der Patienten. In vielen Fällen stehen lediglich symptomatische Therapien zur Verfügung und Pharmaka, welche in einzelne pathologische Prozesse eingreifen, besitzen nur begrenzte Wirksamkeit.

Aufgrund des regulierenden Effekts des ECS auf das Gehirn besteht die Möglichkeit, dieses als Ansatzpunkt für pharmakologische Interventionen zur Behandlung von neurodegenerativen Erkrankungen zu verwenden. Um die Wirkung und Wirkungsweise genauer zu verstehen, ist es essentiell, das ECS mit seinen zellulären Bestandteilen in den verschiedenen primären ZNS-Zellen zu analysieren. Die vorliegende Arbeit konzentriert sich auf die vier Proteine CB_1, CB_2, MAGL und FAAH, welche sich nach jetzigem Forschungsstand als besonders vielversprechende pharmakologische Ziele darstellen.

Im Hinblick darauf war es das Ziel der vorliegenden Dissertation herauszufinden, in welchem Zelltyp des ZNS diese Proteine besonders exprimiert werden und wo diese auf zellulärer Ebene lokalisiert sind.

Bei der Untersuchung galt es die RNA- und Proteinspiegel der Proteine mittels quantitativer PCR und Westernblot in Neuronen, Astrozyten, Oligodendrozyten und Mikroglia zu bestimmen und einen direkten Vergleich der Mengen zwischen den verschiedenen Zelltypen herzustellen. Zusätzlich sollte die zelluläre Lokalisation besagter Proteine in den verschiedenen Zelltypen mittels Immunzytochemie untersucht werden.

Darüber hinaus sollten die wichtigsten Endocannabinoide wie 2-AG und Anandamid und deren Abbauprodukte Arachidonsäure in den Zelltypen untersucht und der Effekt des bereits in unserem Labor im Tierversuch verwendeten MAGL-Inibitor KML-29 an primären Zellen getestet werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Laborgerät

Zentrifugen:

(Biofuge fresco, Rotor #3325B; Biofuge pico, Rotor #3324; Biofuge pico, Rotor #3325B; Varifuge 3.2S)	Heraeus
Magnetischer Mixer (KMO2 basic; RET basic)	IKA
Pipetboy accu	Integra Biosciences
Pipetten (Eppendorf research; Eppendorf reference)	Eppendorf
pH-Meter, pH 523	WTW
Vortexer, VM-3000	VWR

2.1.2 Plastikwaren

BD Falkon Primaria 6-Well-Platte	Artikel-Nr. 353846, Falcon
BD Falkon Primaria 12-Well-Platte	Artikel-Nr. 353853, Falcon
Zellkulturschale	Artikel-Nr. 633171, greiner bio-one
Mikrotestplatte 96-Well	Artikel-Nr. 821.581, Sarstedt
Mikroröhrchen 1,5 ml safe-seal	Artikel-Nr. 72.706.400, Sarstedt
Pipettenspitzen 200-1000 µl	Artikel-Nr. 70.762, Sarstedt
Pipettenspitzen 20-200 µl	Artikel-Nr. 70.760, Sarstedt
Pipettenspitzen 1-10 µl	Artikel-Nr. 70.1130, Sarstedt
PP-Röhrchen steril 50 ml	Artikel-Nr. 227261, greiner bio-one
PP-Röhrchen steril 15 ml	Artikel-Nr. 188271, greiner bio-one
Gewebekulturflasche, PE mit belüftetem Verschluss 75 cm^2	Artikel-Nr. 83.1813.002, Sarstedt

2.1.3 Zellkultur

B27- Zusatz 50x	Artikel-Nr. 17504-044, Invitrogen
Cytosin-β-D-arabinofuranosidhydrochlorid	Artikel-Nr. C6645-100MG, Sigma

Dulbecco's Modified Eagle Medium (D-MEM$^-$) 1x (ohne Phenolrot)	Artikel-Nr. 31053-028, Invitrogen
D-MEM$^+$ GlutaMAX^{TM} -I 1x (mit Phenolrot)	Artikel-Nr. 61965-026, Invitrogen
Desoxyribonuklease I (DNase I)	Artikel-Nr. LS-002139, Worthington
D-PBS$^-$ 1x (ohne Kalzium, Magnesium)	Artikel-Nr. 14190-169, Invitrogen
D-PBS$^+$ 1x (mit Kalzium, Magnesium)	Artikel-Nr. 14040-174, Invitrogen
FBS Fetales Rinder Serum „Gold"	Artikel-Nr. A15-151, PAA
GlutaMAX^{TM} –I Zusatz (200 mM)	Artikel-Nr. 35050-038, Invitrogen
Neubauer Hämocytometer	Artikel-Nr. 1310000, Laboroptik
Neurobasal^{TM} Medium	Artikel-Nr. 21103, Invitrogen
Pen/Strep (Penicillin-Streptomycin)	Artikel-Nr. 15140-122, Invitrogen
PON (Poly-L-Ornithin Hydrobromid, 1 mg/ml)	Artikel-Nr. P3655, Sigma
Steriles Wasser (Ampuwa Spüllösung Plastipur)	Artikel-Nr. 7151, Fresenius Kabi
Trypanblau 0,4%	Artikel-Nr. T8157, Sigma
Trypsin 2,5%	Artikel-Nr. 15090-046, Invitrogen

Verwendete Lösungen:

DNase I	10 mg/ml in D-PBS$^-$
D-MEM$^+$	500 ml D-MEM+GlutaMAX^{TM} -I 1x 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 10% Fetales Rinder Serum (FBS)
D-MEM$^-$	500 ml D-MEM 1x (high glucose) 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2 mM GlutaMAX^{TM}-I Zusatz
Neurobasalmedium	Neurobasal^{TM}Medium 0.002% B27- Zusatz 0.025% Glutamin 10 U/ml Penicillin 10 µg/ml Streptomycin

	10 µM Glutamat
Oligodendrozytenmedium	D-MEM (4,5 g/l Glukose, L-Glutamin, Natriumpyruvat) 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 10% FBS 1% GlutaMAX™
PON Lösung	100 µg/ml PON in H_2O

2.1.4 qPCR

BD Plastipak™ 100x 1 ml, steril	Artikel-Nr. 300013, BD Bioscience
Hardshell PCR Platten 96-Well WHT/CLR	Artikel-Nr. HSP9601, BioRad
iScript™cDNA Synthese Kit	Artikel-Nr. 170-8891, BioRad
iQ™SYBR Green Supermix	Artikel-Nr. 170-8885, BioRad
Microseal´B´Film	Artikel-Nr. MSB1001, BioRad
Nadel 0.6x 30 mm	Artikel-Nr. NN-2332R, Terumo Europe
RNeasy Mini Kit (250)	Artikel-Nr. 74106, Qiagen

Verwendete Primer:

Gen	Vorwärtsprimersequenz	Rückwärtsprimersequenz
Cnr1	5'-GGGCAAATTTCCTTATAGCA -3'	5'-GGCTCAACGTGACTGAGAAA -3'
Cnr2	5'-CTGCAGCTCTTGGGACCTAC-3'	5'-TGTCCCAGAAGACTGGGTGT-3'
Mgll-1	5'-TTTCTGGCATGGTCCTGATT-3'	5'-ATTGAGCAGTTTGGCAGCA-3'
Faah-1	5'-TCTGTGGCCTCAAGCCTACT-3'	5'-GAAAGCTGCACTGCTGTCTG-3'
TBP	5'-CGGTCGCGTCATTTTCTC-3'	5'- GGGTTATCTTCACACACCATGA-3'
Pol-2	5'-GCTGGGAGACATAGCACCA-3'	5'-TTACTCCCCTGCATGGTCTC-3'
PGK1	5'-CAAGCTACTGTGGCCTCTGG-3'	5'-TCTGCTTAGCTCGACCCACA-3'
Ppia	5'-CTGTAGCTCAGGAGAGCGTC -3'	5'-CCAGCTAGACTTGAAGGGGA -3'

Verwendete Lösungen:

Mastermix (pro Well)	7 µl SYBR Green Supermix 0,5 µl Primermix 1,5 µl Wasser
Primermix	10% Vorwärtsprimer (100 µM) 10% Rückwärtsprimer (100 µM) in Wasser

Geräte:

NanoDrop 1000, Spektrophotometer	Thermo Scientific
T3 Thermoschüttler	Artikel-Nr. 3909118, Biometra
CFX96^{TM} Echtzeit-System, C1000	BioRad
Touch^{TM} Thermoschüttler	VWR
Software: CFX-Manager	BioRad

2.1.5 Westernblot

Aceton	AppliChem
Acrylamid 30%	Artikel-Nr. 161-0158, BioRad
2-amino-2-hydroxymethyl- propan-1,3-diol (Tris)	Artikel-Nr. 75825, USB Corporation
Ammoniumpersulfat (APS)	Artikel-Nr. A9164, Sigma Aldrich
Rinderserumalbumin (BSA)	Artikel-Nr. 11930, Serva
Bromphenolblau	Artikel-Nr. B8026, Sigma Aldrich
Complete Mini, EDTA-frei (Protease-Inhibitor Cocktail)	Artikel-Nr. 04693159001, Roche
DC Protein Assay Kit	Artikel-Nr. 500-0113/ -0114/ -0115, BioRad
Dithiothreitol (DTT)	Artikel-Nr. D9779-1G, Sigma Aldrich
Ethylendiaminetetraacetic acid (EDTA) Lösung pH 8,0 (0,5 M)	Artikel-Nr. A4892,0100, AppliChem
4-Iodophenol	Artikel-Nr. I10201-10G, Sigma Aldrich
Glycerol	Artikel-Nr. A1123,1000, AppliChem
Glycin	Artikel-Nr. A1377,1000, AppliChem

H_2O_2 (30%)	Artikel-Nr. 55760, Otto Fischer GmbH
KCl	Artikel-Nr. 529552-1KG, Calbiochem
KH_2PO_4	Artikel-Nr. 1048730250, Merck
MemCode™ Reversible Protein Färbe Kit für PVDF Membranen	Artikel-Nr. 24585, Thermo Scientific
Methanol	Artikel-Nr. 32213-2.5L, Sigma Aldrich
Milchpulver Na_2HPO_4* $2H_2O$	Artikel-Nr. A3567,1000, AppliChem
Natriumchlorid	Artikel-Nr. 27810.295, VWR
Natriumdesoxycholat	Artikel-Nr. A1531,0100, AppliChem
Natriumdodecylsulfat (SDS) - Lösung 20%	Artikel-Nr. A0675,0250, AppliChem
Natriumsäure	Artikel-Nr. 1066880100, Merck
Page Ruler™ plus vorgefärbter Proteinmaßstab	Artikel-Nr. 26619, Thermo Scientific
2-Propanol	Artikel-Nr. 34965-2.5L, Sigma Aldrich
Tetramethylethylenediamin (TEMED)	Artikel-Nr. 87687, Sigma Aldrich
Trichloressigsäure	Artikel-Nr. 6353-500ML, SigmaDiagnostics
Tris HCl	Artikel-Nr. 9090.3, Carl Roth
Triton X-100	Artikel-Nr. A4975,0100, AppliChem
Tween 20	Artikel-Nr. P9416-100ML, Sigma Aldrich

Zubehör:

Mikroplatten Extinktionsleser + 750 nm Filter	Artikel-Nr. 7334750, BioTek
Blotting Papier, 3 mm	Artikel-Nr. 3030-917, Whatman
ImageQuant LAS 4000	Artikel-Nr. 28-9558-10, GE Healthcare
Immobilon-P Transfermembran, PVDF	Artikel-Nr. IPVH00010, Millipore
Prot/ Elec Spitzen	Artikel-Nr. 223-9915, BioRad
Mini-PROTEAN® 3 Electrophoresis-Cell-Set	Artikel-Nr. 165-3301, BioRad
Mini-PROTEAN® Casting frame	Artikel-Nr. 165-3304, BioRad

Mini-PROTEAN® Comb, 10-Well, 1,0 mm	Artikel-Nr. 165-3359, BioRad
Mini-PROTEAN® Comb, 15-Well, 1,5 mm	Artikel-Nr. 165-3366, BioRad
Mini-PROTEAN® Short Plates	Artikel-Nr. 165-3308, BioRad
Mini-PROTEAN® Spacer Plates	Artikel-Nr. 165-3312, BioRad
Mini Trans-Blot Modul	Artikel-Nr. 170-3935, BioRad
Thermoschüttler	Artikel-Nr. 022670000, Eppendorf
E835 Powersupply	Artikel-Nr. 4100-217-01, Consort

Verwendete Puffer:

Blocking Puffer pH 7,4	10% PBS (10x) 5% Milchpulver 0,05% Tween 20
Blotting Puffer pH 8,4	192 mM Glycin 15% Methanol 25 mM Tris
Phosphate Buffered Saline (PBS) 10x, pH 7,2–7,4	27 mM KCl 15 mM KH_2PO_4 81 mM $Na_2HPO_4*H_2O$ 1,37 M NaCl
PBST	10% PBS 10x 0.05% Tween 20
RadioImmunoPrecipitation Assay (RIPA) Puffer pH 7,4	5 mM EDTA 150 mM NaCl 1,0% Natriumdesoxycholat 0,1% SDS 10 mM Tris 1,0% Triton X-100
SDS-PAGE Laufpuffer pH 8,4	192 mM Glycin 0,1% SDS 25 mM Tris
SDS-PAGE Trenngelpuffer pH 8,8	0,4% SDS 0,5 M Tris
SDS-PAGE Sammelgelpuffer pH 6,8	0,4% SDS 1,5 M Tris

SDS Probenpuffer 6x pH 6,8	0,01% Bromophenolblau 0,002% β-Mercaptoethanol 25% Glycerol 2% SDS 62,5 mM Tris-HCl

Zusammensetzung der SDS-PAGE:

SDS-PAGE Trenngel (8%)	27% Acrylamid (30%) 0,5% APS (10%) 25% Trenngelpuffer 0,5% SDS (20%) 0,06% TEMED
SDS-PAGE Sammelgel (4%)	14,5% Acrylamid (30%) 0,5% APS (10%) 0,5% SDS (20%) 25% Sammelgelpuffer 0,1% TEMED

Primäre Antikörper (verdünnt in PBST mit 1% BSA und 0.005% Natriumsäure):

MAGL	Goat	1:333-1:1000	Abcam	ab77398
FAAH	Rabbit	1:1000	Abcam	ab128917
CB1	Rabbit	1:333-1:1000	Cayman	10006590
CB2	Rabbit	1:1000	Abcam	ab45942

Sekundäre Antikörper (verdünnt in Blockingpuffer):

Goat	Anti-Rabbit	1:200	Artikel-Nr.: 172 1019, BioRad
Rabbit	Anti-Goat	1:750	Artikel-Nr.: R21459, life technologies

2.1.6 Immunzytochemie

PBS (pH 7,2-7,4):	37 mM NaCl, 8,1 mM Na_2HPO_4 1,5 mM KH_2PO_4 2,5 mM KCL
4% PFA:	30 ml 1x PBS 10 ml 16% PFA

0,1% Triton:	10 ml PBS 100 µl 10% Triton
2% BSA:	10 ml 1x PBS 200 mg BSA
PBS-T 0,1%:	10 ml 1x PBS 10 µl Tween 20
PBS-T 0,05%:	10 ml 1x PBS 5 µl Tween 20
Mounting-Medium:	DAPI, Artikel-Nr.: H-1200, Vectashield
4% Paraformaldehyd (PFA)	Artikel-Nr.: A3813,0250, AppliChem
Triton	Artikel-Nr.: 101371896, Sigma Aldrich
Albumin	Artikel-Nr.: A2058, Sigma Aldrich
Tween 20	Artikel-Nr.: A7564 0500, AppliChem

Verwendete Antikörper:

Primärer Antikörper	**Typ**	**Hersteller**	**Artikel-Nr.**	**Verdünnung**
MAGL	Goat	Abcam	ab77398	1:300
FAAH	Rabbit	Abcam	ab128917	1:300-1:400
CB1	Rabbit	Cayman	10006590	1:50-1:100
CB2	Rabbit	Abcam	ab45942	1:300

Sekundärer Antikörper	**Typ**	**Hersteller**	**Artikel-Nr.**	**Verdünnung**
Alexa Fluor 488	Goat Anti-Rabbit	Life technologies	A 11055	1:200
Alexa Fluor 488	Donkey Anti-Goat	Life technologies	A 11034	1:750

2.1.6.1 Verwendete Geräte:

Axiovert 200	Carl Zeiss Microscopy
AxioVision	Carl Zeiss Microscopy

2.1.7 Endocannabinoid-Extraktionen

Petrischalen 100 mm	Artikel-Nr.: 83.3902, Sarstedt
Dichlormethan	Artikel-Nr.: 32222, Sigma Aldrich
Glasvials	Artikel-Nr.: 7-0880, neo Lab
MS-Grade Methanol	Artikel-Nr.: 34966, Sigma Aldrich
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Artikel-Nr.: D2650, Sigma
KML-29	1,1,1,3,3,3-hexafluoropropan-2-yl-4-(bis(benzo[d][1,3]dioxol-5-yl)(hydroxy) methylpiperidine-1-carboxylate, Boehringer Ingelheim

Deuterierte Standards:

d_4-Anandamid	Artikel-Nr.: 10011178, Cayman
d_5-2-AG	Artikel-Nr.: 362162, Cayman
d_8-Arachindonsäure	Artikel-Nr.: 390010, Cayman
d_4-Prostaglandin D_2	Artikel-Nr.: 312010, Cayman
d_4-Prostaglandin E_2	Artikel-Nr.: 314010, Cayman
d_4-Thromboxan A_2	Artikel-Nr.: 319030, Cayman

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

2.2.1.1 Präparation

Die Experimente wurden ausschließlich mit primären Zellen des ZNS durchgeführt, welche aus dem Gehirn von neugeborenen Mäusen isoliert wurden. Die Versuche wurden nach geltendem Recht (TierSchG §4 Abs. 3: Tötung von Wirbeltieren ohne Vorbehandlung) beim Tierforschungszentrum der Universität Ulm unter Reg. O.151 angezeigt.
Die Präparation der Mäusehirne wurde für alle vier Zelltypen gleich durchgeführt, die anschließende Weiterbehandlung unterschied sich jedoch je nach Zelltyp.
Für die Präparation wurden C57BL/6 Mäusen, spätestens vier Tage nach ihrer Geburt, der Kopf abgetrennt, die Haut entfernt und das Gehirn durch drei feine Schnitte am Schädelknochen freigelegt. Anschließend wurde das Gehirn in eine mit eiskalter D-BPS$^-$ gefüllte Petrischale überführt, um dort unter dem Okular von Zerebellum, Bulbi und Meningen befreit zu werden. Dieser Schritt wurde möglichst gründlich und atraumatisch durchgeführt, da somit gewährleistet werden konnte, dass das Gehirn frei von Fibroblasten und Endothelzellen war. Das freipräparierte Gehirn wurde schließlich in ein mit D-BPS$^-$ gefülltes Zentrifugenröhrchen überführt und darin auf Eis gelagert bis die Präparation der übrigen Mäuse beendet war. Alle Schritte wurden unter möglichst sauberen Konditionen durchgeführt, um eventuelle Kontaminationen zu vermeiden.

2.2.1.2 Mikroglia

Die Isolierung von Mikroglia war identisch mit der von Astrozyten, da erstere einen dichten Astrozytenrasen als Grundlage zum Wachsen benötigen und daher beide Zelltypen co-kultiviert wurden.
Die präparierten Mäusegehirne wurden dafür unter der Sterilwerkbank dreimal mit D-PBS$^+$ gewaschen und danach mit 1,25 ml Trypsin (2,5%) und 50 µl DNase für 4-5 min inkubiert. Trypsin diente als Serin-Protease dazu, die einzelnen Zellen aus größeren Zellverbänden zu lösen. Die DNAse wurde hinzugefügt, um freie DNA zu spalten, welche durch die Trypsinbehandlung oder die mechanische Einwirkung

während der Präparation entstehen konnte. Im Anschluss wurden die Gehirne wiederrum einem dreimaligen Waschvorgang mit D-PBS$^+$ unterzogen, der Überstand entfernt und weitere 50 µl DNAse hinzugefügt, um die Bildung von gallertartiger freier DNA zu verhindern, welche die weitere Behandlung erschwert hätte. Mit Hilfe einer Pasteurpipette wurden die Gehirne homogenisiert und 5 ml D-MEM$^+$ hinzugefügt. Das diente unter anderem dazu die Aktivität von Trypsin zu unterbrechen. Die Zellen wurden für 10 min bei 500 *g* zentrifugiert und der Überstand anschließend verworfen. Nach erneuter Homogenisierung des Pellet mit D-MEM$^+$ konnten bereits im Vorfeld präparierte Zellkulturflaschen mit 1 ml der Zellsuspension befüllt werden. Somit fasste jede Flasche etwa zwei Gehirne. Weitere 9 ml D-MEM$^+$-Medium wurden hinzugefügt, um gutes Nährmedium für die anwachsenden Zellen zu bilden. Die Zellkulturflaschen (75 cm^2) wurden zuvor mit Poly-L-Ornithin Hydrobromid (PON) (PONsolution) für mindestens 30 min bei 37 °C inkubiert und anschließend mit sterilem Wasser und zuletzt mit D-PBS$^+$ gewaschen. Dieser Schritt war wichtig, um eine gute Anhaftung der Zellen an die Zellkulturflasche gewährleisten zu können. Die befüllten Zellkulturflaschen wurden nun bei einer Temperatur von 37 °C und einer CO_2 Konzentration von 5% in den Inkubator gestellt, um die Situation in vivo möglichst genau zu simulieren. Dort wurden sie für drei bis vier Tage belassen, um das Absetzen und Anhaften der Zellen zu ermöglichen. Daraufhin wurden sie erneut dreimal mit D-PBS$^+$ gewaschen und 10 ml neues D-MEM$^+$ pro Flasche hinzugefügt. Dieser Schritt wurde möglichst konstant und schnell durchgeführt, um vergleichbare Voraussetzungen für die Zellen zu schaffen.

Das Medium D-MEM$^+$ ist für das Wachstum von Mikroglia und Astrozyten essentiell. Inhaltsstoffe wie Glukose (4,5 g/l) und L-Alanyl-L-Glutamin (GlutaMAX™, 2 mM) sind wichtige Nährstoffe der Zellen. FBS unterstützt die Zellproliferation. Die Antibiotika Streptomycin und Penicillin sollen einer bakteriellen Kontamination vorbeugen. Außerdem sezernieren die Astrozyten, welche erst im späteren Verlauf von den Mikroglia getrennt werden, wichtige Wachstumsfaktoren für die Mikrogliazellen. Für andere ZNS Zellen wie Neurone und Oligodendrozyten fehlen wichtige Faktoren, sodass ein Wachstum ausgeschlossen werden kann.

Nach 10 bis 14 Tagen im Brutschrank wiesen die Flaschen einen dichten Astrozyten-Zellrasen mit leicht angehafteten Mikroglia auf. Dies ermöglichte durch

leichtes Beklopfen der Flaschen das Loslösen der Mikroglia vom Astrozyten-Rasen. Die Astrozyten lösten sich bei leichtem Klopfen nicht von der Zellkulturflasche. Die nun im Medium enthaltenen Mikroglia wurden zusammen mit diesem entnommen und für 10 min bei 500 *g* zentrifugiert. Der Überstand wurde wiederrum verworfen und das zurückbleibende Pellet mit 1 ml serumfreiem D-MEM$^-$ homogenisiert. 10 µl dieser Zellsuspension wurden mit weiteren 10 µl Tryptanblau vermischt und in eine Neubauer-Zählkammer injiziert, um dort gezählt zu werden. Da Tryptanblau lediglich beschädigte Zellmembranen überwinden kann, diente es dazu, lebende von toten Zellen zu unterscheiden. Lebende Zellen erschienen demnach farblos im Gegensatz zu toten blauen Zellen. Die Zahl der lebenden Zellen wurde nun auf das Gesamtvolumen der Zellsuspension hochgerechnet. Nach erneutem Zentrifugieren und der Abnahme des Überstands, wurde das Pellet-enthaltende Zentrifugationsröhrchen mit Datum und Zellzahl beschriftet und im Gefrierschrank bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.2.1.3 Astrozyten

Die Mikroglia konnten bis zu drei Mal vom Astrozytenrasen abgeklopft werden. Dafür wurden die Flaschen nach dem Abklopfvorgang wieder für weitere 3-7 Tage im Brutschrank inkubiert um sich zu regenerieren. Nach dem dritten Abklopfen war die Menge an Mikroglia jedoch zu gering, sodass diese nicht mehr einzeln isoliert werden konnten und möglichst von den Astrozyten zu trennen waren. Dafür wurden die Zellkulturfalschen wiederum leicht beklopft. Danach wurden sie zweimal mit D-PBS$^+$ gewaschen und anschließend mit 1 ml Trypsin/EDTA benässt, um die Astrozyten vom Flaschenboden zu lösen. Dieser Schritt wurde durch die Bedingungen im Inkubator begünstigt. Nach 5 min im Brutschrank wurden den Flaschen 5 ml D-MEM$^+$ zugefügt, um die Trypsin-Wirkung zu beenden. Die Zellsuspension aus den Flaschen wurde in eine vorgewärmte Petrischale überführt und für 15 min im Brutschrank gelagert. Nach 15 min wurden diese entnommen und bewegt, um nicht adhärente Zellen zu verwirbeln. Anschließend wurden diese erneut für 15 min im Brutschrank inkubiert. Dieser Schritt diente dazu die restlichen Mikroglia von den Astrozyten zu entfernen. Da sich Mikroglia deutlich schneller absetzten, war somit die Zellsuspension nach

30 min nahezu frei von Mikroglia. Die Zellsuspension wurde nun in ein Zentrifugenröhrchen überführt und für 10 min bei 500 *g* zentrifugiert. Nach Homogenisierung mit 2-3 ml D-MEM$^+$ wurden die Zellen wie oben beschrieben mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer gezählt, erneut zentrifugiert und das Pellet, nach anschließender Entnahme des Überstands, bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C eingefroren.

2.2.1.4 Neurone

Wie erwähnt ist die Präparation bei der Isolierung aller vier Zelltypen identisch. Bei der Präparation von Neuronen wurde jedoch darauf geachtet, möglichst junge Tiere zu verwenden (höchstens zwei Tage postnatal), damit eine ausreichende Anzahl an extrahierten Zellen gewährleistet werden konnte.
Ähnlich wie bei der Isolierung von Mikroglia wurden die Gehirne dreimal mit D-BPS$^+$ unter der sterilen Werkbank gewaschen. Allerdings wurden nach dem letzten Waschschritt 4,75 ml D-PBS$^+$-Medium im Röhrchen belassen und 250 µl Trypsin und 50 µl DNase hinzugefügt. Die Röhrchen wurden 8-15 min im Brutschrank inkubiert und alle 5 min invertiert. Danach wurden den Gehirnen 5 ml DMEM+ hinzugefügt, um die Trypsin-Reaktion zu stoppen. Nach zweimaligem Waschen wurde der Überstand entfernt und weitere 50 µl DNase dazugegeben. Nach Homogenisierung der Gehirne wurden zusätzliche 5 ml D-MEM$^+$ addiert um die DNase-Reaktion zu beenden. Das Gemisch wurde durch ein Zellsieb (100 µm) gefiltert, welches danach mit 1 ml D-MEM$^+$ durchgespült wurde. Nun wurden die Zellen wiederum zentrifugiert, der Überstand entfernt, mit D-MEM$^+$ homogenisiert und in der Neubauer-Zählkammer gezählt. Jeweils 300x10^4 Zellen wurden in einer Zellkulturflasche ausgesät und für 1 h im Brutschrank gelagert. Die Zellkulturflaschen wurden vorher mit 1 mg/ml Poly-L-Lysin, welches 1:10 in H_2O verdünnt wurde, für 2 h oder über Nacht bei 37 °C inkubiert, mit sterilem Wasser und D-PBS$^+$ gewaschen und schließlich mit D-MEM$^+$ befüllt. Nach einer Stunde Inkubationszeit der Zellen im Brutschrank wurde das Medium entfernt, durch Neurobasal /B27 ersetzt und die Flasche erneut bei 37 °C und 5% CO_2 inkubiert. Nach einem sowie nach vier Tagen wurde die Hälfte des Mediums ausgetauscht und 10 µM Cytosin Arabinofuranosid hinzugefügt. Am siebten Tag nach Präparation wurde das Medium entnommen und zentrifugiert. Das Pellet wurde

homogenisiert und die Zellzahl mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer ermittelt. Nach erneuter Zentrifugierung wurde das Pellet bei -80 °C bis zur Verwendung weggefroren.

2.2.1.5 Oligodendrozyten

Wie bereits für die Neurone mussten auch für die Präparation von Oligodendrozyten möglichst junge Tiere verwendet werden. Die isolierten Gehirne wurden dann mit einer Schere in fünf Teile geteilt, in ein Zentrifugenröhrchen überführt, mit 350 µl D-MEM$^+$ benässt und anschließend für 3 min in ein 37 °C warmes Wasserbad gestellt. Danach wurde die Suspension unter der sterilen Werkbank mit Hilfe einer 1 ml Pipette homogenisiert und pro Gehirn 75 µl vorgewärmte OPC Papainlösung hinzugefügt. Nun wurden die Röhrchen wiederum für 20 min ins Wasserbad gestellt, wobei sie alle 2 min kurz invertiert wurden. Nach dem Wasserbad wurde der Suspension 2 ml D-MEM$^+$ zugefügt und nach weiteren 10 min Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurde sie durch eine Pasteurpipette erneut homogenisiert. Weitere 4 ml D-MEM$^+$ wurden addiert und das Röhrchen für 5 min bei 300 *g* in die Zentrifuge gestellt. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet mit D-MEM$^+$ gelöst. Das Zellmaterial von zwei Gehirnen wurde einer Zellkulturflasche hinzugefügt. Wie bei Neuronen wurden diese Flaschen ebenfalls für 2 h oder über Nacht mit Poly-L-Lysin vorbehandelt und nach dreimaligem Waschen mit sterilem H_2O mit D-MEM$^+$-Medium befüllt. Nachdem das Zelllysat für 3-4 h im Brutschrank inkubiert worden war, wurde das Medium gewechselt. Jeweils $2/3$ des Mediums wurde an Tag 3, 6 und 9 nach Präparation durch neues Medium ersetzt und zudem 5 µl/ml Insulin pro Arbeitsschritt hinzugefügt.

Um reine Oligodendrozytenkulturen zu erhalten, mussten noch restliche Mikrogliazellen entfernt werden. Dies wurde durch leichtes Beklopfen der Flaschen und anschließender Entnahme des Mediums erreicht. Durch Zugabe von D-PBS und starkem Beklopfen der Flaschen lösten sich die Oligodendrozyten und die Zellsuspension konnte anschließend in eine vorgewärmte Petrischale überführt werden. Diese wurde für 15 min bei 37 °C inkubiert, leicht geschüttelt, um nicht adhärente Zellen zu verwirbeln, und für weitere 15 min im Brutschrank gelagert. Dieser Schritt war notwendig, um die restlichen Mikroglia in der Zellsuspension

herauszufiltern, da sich diese deutlich schneller absetzen. Die Suspension mit den freien Zellen wurde der Petrischale entnommen, in ein Zentrifugenröhrchen überführt und für 5 min bei 300 *g* zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen gezählt und das Pellet schließlich bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.2.2 qPCR

Die quantitative Echtzeit-PCR (qPCR) dient dazu, ein bestimmtes DNA Stück zu amplifizieren und gleichzeitig quantitativ zu messen. Dazu wird während des Amplifaktionsprozesses der DNA-Fragmente ein Fluorophon (SYBR Green 1) in die neu gebildeteten DNA-Komplexe eingelagert. Anhand der Stärke der Fluoreszenz kann, nach Normalisierung auf mindestens zwei Housekeeping Gene, auf die Menge der ursprünglichen DNA geschlossen werden. Als Housekeeping-Gene wurden TBP, Pol-2, PPIA und PGK1 verwendet.
Da in diesen Experimenten die mRNA Level von CB1, CB2, MAGL und FAAH analysiert wurden, musste die mRNA durch eine Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR) zuvor in cDNA umgewandelt werden.

2.2.2.1 RNA Isolation

Für die Isolation der RNA wurden die Röhrchen mit den Zellpellets dem auf -80 °C temperierten Gefrierschrank entnommen, und bei Raumtemperatur aufgetaut. Möglicher Restüberstand wurde vorsichtig mit Hilfe einer Pipette entnommen. Jeweils 10 ml RLT Puffer wurden 200 µl DTT hinzugefügt, sodass insgesamt der Puffer eine 2 M Konzentration hatte. Von diesem Puffer wurden dem Röhrchen 350 µl hinzugefügt und anschließend ausreichend gevortext. Der Guanidin-Thiocyanat-enthaltende RLT Puffer diente dazu die Proteine zu denaturieren und die Aktivität der RNase zu hemmen. Dieser Effekt wurde durch das DTT unterstützt, welches die Disulfidbrücken der RNase aufhebte und sie damit funktionslos werden ließ. Die Suspension wurde nun gänzlich in eine QIAshredder (Qiagen) Säule, welche einem 2 ml Röhrchen aufsaß, transferiert und in dieser für 2 min bei maximaler Geschwindigkeit 16 060 *g* zentrifugiert, um die Probe zu homogenisieren. Danach wurden 350 µl 70%iges Ethanol hinzugefügt und mit Hilfe einer Pipette gut vermischt. Die 700 µl wurden in ein RNeasy mini spin column (Qiagen), welches einem weiteren 2 ml Auffangröhrchen aufsaß, überführt

und anschließend bei 9503 *g* für 15 s zentrifugiert. Das RNeasy mini spin column wurde dazu verwendet die RNA auf einer Membran festzuhalten. Somit konnte die Flüssigkeit, welche in einem 2 ml Röhrchen aufgefangen wurde, verworfen werden. Das Röhrchen wurde wiederverwendet. Im Anschluss folgten drei Waschschritte der membrangebundenen RNA mit einmal 700 µl RW1 Puffer und zweimal 500 µl RPE Puffer mit anschließender Zentrifugierung für 15 s bei 9503 *g*. Beim letzten Waschschritt wurde für 2 min bei 16 060 *g* zentrifugiert. Um die Membran vollständig zu trocknen und eine Übertragung von restlichem Alkohol zu vermeiden, wurde die Membran erneut für 1 min bei 16 060 *g* zentrifugiert. Die nun trockene Membran wurde im letzten Schritt der Isolation mit 20-30 µl RNase-freiem Wasser benässt, um die dort gebundene RNA zu lösen. Nach erneuter Zentrifugierung bei 9503 *g* für 1 min wurde das RNA-enthaltende Wasser in einem 1,5 ml Röhrchen aufgefangen. Um für die RT-PCR exakte RNA-Mengen gewährleisten zu können, wurde die RNA-Konzentration der Lösung mittels NanoDrop ND-1000 Spektrometer (Thermofischer) gemessen. Da RNA sein Absorptionsmaximum bei 260 nm hat, kann der Wert mit dem Vergleichswert von RNA-freiem Wasser verglichen und somit die enthaltende RNA-Konzentration bestimmt werden.

2.2.2.2 RT-PCR

Wie oben bereits erläutert, muss zur Durchführung der qPCR DNA vorliegen. Dies wird durch die RT-PCR möglich, welche RNA in cDNA umwandelt.
Dafür wurde 1 µg RNA in insgesamt 15 µl RNAse-freiem Wasser verdünnt und mit 4 µl iScript™ Reaktion Mix und 1 µl iScript™ Reverse Transcriptase vermischt, um ein Gesamtvolumen von 20 µl zu erhalten. Dieser Reaktionsmix enthielt die verschiedenen Oligonukleotide, polyA Primer und zufällige Hexamer-Primer, welche zur Replikation von DNA von Nöten sind. Die verwendete Reverse Transkriptase stammte aus einem murinen Leukämievirus (MMLV) und war eine RNA-abhängige DNA Polymerase. Die RT-PCR wurde dann mittels eines Biometra T3 Thermocyclers unter folgenden Bedingungen durchgeführt: 5 min bei 25 °C zur Anheftung und Stabilisierung der Primer und Oligonukleotide, 30 min bei 42 °C zur Polimerisierung der DNA und 5 min bei 85 °C zur Denaturierung der RT.

Schließlich wurde das Gerät auf 4 °C runtergekühlt, um die cDNA-Proben zu schützen. Die Proben konnten so direkt für die qPCR verwendet werden.

2.2.2.3 qPCR

Der erste Schritt der qPCR war die Herstellung des cDNA-Mixes, welcher die cDNA aller zu testenden Proben enthielt. Aus diesem wurde eine Verdünnungsreihe hergestellt, um eine Standardkurve zu generieren, aus welcher man später von der Fluoreszenzstärke auf die relative cDNA Menge schließen konnte.

Jeweils 5 µl der Standards oder der Probe wurden in zweifacher Ausführung auf eine 96-Well-Platte aufgetragen. Anschließend wurden 9 µl eines Master Mixes in jedes Well pipettiert. Dieser enthielt neben Wasser, einer hot-start iTaq™ DNA Polymerase, dNTPs, 6 mM $MgCl_2$, SYBR Green 1 und Fluoreszein auch das spezifische Primerpaar, welches untersucht werden sollte. Nach dem Pipettieren wurde die Platte mit einer Folie luftdicht verschlossen und kurz zentrifugiert, um sicher zu gehen, dass sich die gesamte Flüssigkeit auf dem Grund des Wells befand. Die qPCR wurde mittels der Bio-Rad CFX-Manager Software am CFX96™ Real-Time System, C1000 Touch™ Thermal Cycler durchgeführt. Insgesamt wurden 40 Zyklen durchgeführt. Ein Zyklus bestehend aus 15 s bei 95 °C zur Denaturierung, 15 s bei 60 °C oder 64,4 °C (je nach zu untersuchendem Primerpaar) zur Anlagerung der Primer und Aufbau des komplementären DNA-Stranges und letztlich einer Schmelzkurve, welche für 10 s bei 95 °C belassen wurde, dann von 65 °C auf 95 °C in 5-Sekundenschritten erhöht wurde, um sicher zu gehen, dass nur spezifische DNA-Stücke gebildet wurden. Nach jedem Zyklus wurde die Fluoreszenz des angelagerten SYBR Green 1 gemessen und somit die qPCR Kurve erstellt.

2.2.3 Westernblot

Um die Proteinexpression der verschiedenen Zellen zu messen, wurde ein Westernblot verwendet. Diese Methode wird in drei Teilschritte gegliedert. Anfangs werden die Proteine durch eine Gelelektrophorese nach Größe und Gewicht aufgetrennt. Im Anschluss kommt das sogenannte Blotting, bei dem die

aufgetrennten Proteine auf eine PVDF-Membran transferiert werden. Letztlich wird die Membran mit primären und sekundärem Antikörper inkubiert, um eine für das gesuchte Protein spezifische Bande zu identifizieren. Die Stärken der Banden werden dann mittels ImageQuantTM LAS 4000 (GE Healthcare) detektiert und so der Proteinanteil quantifiziert.
Bevor der Westernblot durchgeführt werden kann, müssen die Proteine jedoch vorerst aus den Zellen extrahiert und in ihre Bestandteile zerlegt werden. Dieser Vorgang wird als Proteolyse bezeichnet.

2.2.3.1 Proteolyse

Die Zellpellets wurden dem Gefrierschrank entnommen und bei Raumtemperatur aufgetaut. 900 µl RIPA-Puffer wurden im Verhältnis 7:1 mit 7-fachem Proteinaseinhibitor vermischt und 100 µl der Lösung auf das Pellet pipettiert. Das Röhrchen wurde gevortext, um eine gute Auflösung des Pellet im Lyse-Puffer zu gewährleisten und anschließend für 20 min zur weiteren Lyse auf Eis inkubiert. Danach wurde die Suspension in ein 1,5 ml Eppendorf überführt und anschließend für 30 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Protein-enthaltende Überstand wurde mit Hilfe einer Pipette entnommen und in ein neues 1,5 ml Eppendorf transferiert. Mit diesem konnte nun ein Proteinassay durchgeführt werden. Das überbleibende Pellet wurde verworfen.

2.2.3.2 Proteinassay

Der Proteinassay diente dazu den Proteingehalt der Probe zu messen, damit im Verlauf die Geltaschen mit jeweils der gleichen Proteinmenge beladen werden konnten, um so die Vergleichbarkeit der Resultate zu gewährleisten.
Der Assay wurde mit Hilfe des Bio-Rad DC Protein Assay Kits durchgeführt. Dieses beruht auf der Farbintensitätsmessung der Proben mittels Lowry Assay. Die zugegebenen Reagenzien Alkalin Copper Tartrat Lösung (Reagent A) gemischt mit Tensid (Reagent S) im Verhältnis 50:1 (Solution A) und Folin Reagent, einem Natriumsulfonat (Reagent B), bildeten Komplexe mit den Proteinen der Probe. Dies beruhte vornehmlich auf der Reaktion mit den Aminosäuren Tyrosin und Tryptophan, aber auch Cystein, Cystin und Histidin.

Durch die in alkalischer Lösungen entstehenden Kupfer-Protein-Komplexe wurde des Folin Reagent reduziert und somit entstand die blaue Farbe, welche je nach Proteinkonzentration intensiver erschien. Diese Färbung wurde dann mittels einer Standardkurve verglichen und somit die Proteinkonzentration bestimmt. Für die Standardkurve wurden die Konzentrationen 0,0 mg/ml, 0,1 mg/ml, 0,2 mg/ml, 0,5 mg/ml, 1,0 mg/ml und 1,5 mg/ml BSA in RIPA-Puffer-Gemisch verwendet. Wenn die Probe eine Konzentration über 1,5 mg/ml aufwies und somit nicht mehr innerhalb der Standardkurve lag, musste diese verdünnt und der Protein Assay wiederholt werden, um eine exakte Konzentrationsmessung zu gewährleisten.
Anfangs wurden 5 µl der Proben bzw. der Standards in Duplikaten oder Triplikaten auf eine 96-Well-Platte aufgetragen. Anschließend wurde jedes Well mit 25 µl Solution A befüllt und nach einer Minute Inkubationszeit wurden weitere 200 µl Reagent B hinzugegeben. Nach weiteren 15 min Inkubationszeit konnte nun mittels des Absorbance Microplate Readers Elx800UV (Biotek) die Absorption der Proben bei 750 nm bestimmt werden.
Schließlich konnte 50 µg Protein in einem Volumen von 83,4 µl RIPA-Puffer aufgelöste werden. Dieses Medium wurde dann nach Zugabe von 16.6 µl 6x SDS-Ladepuffer für 5 min bei 95 °C in den Thermoschüttler gestellt, um die Proteine zu denaturieren. Der SDS-Ladepuffer verhinderte eine erneute Zusammenlagerung der Peptidketten der denaturierten Proteine und sorgte weiterhin für eine insgesamt negative Ladung der Proteinoberflächen. Damit konnte gewährleistet werden, dass bei der Gelelektrophorese die Proteine nicht nach Ladung, sondern ausschließlich nach Größe aufgetrennt wurden.

2.2.3.3 Gelherstellung

Um die SDS-Polyacrilamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) durchzuführen, musste vorerst das Gel gegossen werden. Dies bestand aus zwei verschiedenen Teilen. Einem Sammelgel (4% Acrylamid), in das die Proben in Taschen eingespritzt wurden und das dafür sorgt, dass die Proben während der Elektrophorese gleichzeitig das Trenngel erreichen. Letzteres dient, wie der Name andeutet, der Auftrennung der verschiedenen Proteine nach ihrer Größe. Dies wird durch einen höheren Anteil an Acrylamid (8%) und einen niedrigeren pH-Wert gewährleistet.

Um die Gele zu gießen, wurden die Glasplatten, welche als Form dienten, zusammengebaut und in die Halterung eingesetzt. Die Komponenten des Trenngels wurden vermischt, in die Form mit Hilfe eines Pipetboys eingegossen und mit Isopropanol bedeckt, um eine Austrocknung des Gels zu verhindern. In der Zwischenzeit wurde das Sammelgel zubereitet und nach 10-15 min konnte es wiederum auf das Trenngel gegossen werden. Schließlich wurde ein Kamm auf der Glasplatte eingesetzt, welcher die Taschen für die Proben bildete. Nach erneutem Trocknen der Gele für 20 min konnten die Glasplatten, die das Gel enthielten, in nasse Tücher eingewickelt und bei 4 °C in einer Plastiktüte bis zum Gebrauch gelagert werden.

2.2.3.4 Gelelektrophorese und Blotting

Die Gele wurden in die Apparatur eingesetzt und diese mit Laufpuffer befüllt. Für die Gelelektrophorese wurden jeweils 15 µl der vorbereiteten Proben in die Taschen des 8%igen SDS-Polyacrylamid-Gels injiziert. Die Randtasche wurde mit 7 µl Proteinmarker als Größenstandard befüllt. Die Elektrophorese lief nun bei 130 V, 100 W und 25 mA / Gel im Laufpuffer für circa 1 h, bis der Bromphenolblau-Marker den unteren Gelrand erreicht hatte. Anschließend wurde das Gel von den Glasplatten genommen und die aufgetrennten Proteine wurden mittels feuchtem Blotting bei 130 V, 100 W und 150 mA in Blotting Puffer auf eine Polyvinylidindifluorid (PVDF) Membran übertragen. Diese wurde zuvor in Methanol aktiviert.

2.2.3.5 Proteinfärbung (Memstain)

Die PVDF Membran wurde nun mit Hilfe des MemCode™ Reversible Protein Stain Kits gefärbt, um das Blotting zu überprüfen und die Menge an übertragenem Protein zu messen.
Dafür wurde die Membran vorerst mit PBST gewaschen und danach für 2 min mit dem MemCode™ Sensitizer inkubiert. Anschließend konnte sie mit MemCode™ Stain für 1 min gefärbt werden. Dieser ist hochaffin zu Proteinen und nur minimal zu PVDF und Transferpuffer-Komponenten. Um unspezifische Banden zu entfernen, wurde die Membran drei- bis fünfmal mit destilliertem Wasser

gewaschen. Anschließend wurde sie getrocknet und mit dem ImageQuantTM LAS 4000 fotografiert. Das Memstain wurde als Referenzwert für die Westernblotanalyse verwendet, da im Labor etablierte Housekeepinggene wie Aktin und HPRT sehr unterschiedlich von den verschiedenen Zelltypen exprimiert wurden und somit ungeeignet für die Analyse waren.
Um die Färbung wieder rückgängig zu machen, wurde die Membran mit Methanol reaktiviert, für 5 min mit dem MemCode™ Eraser inkubiert und letztlich erneut dreimal mit PBST gewaschen.

2.2.3.6 Detektion der spezifischen Proteine

Bevor die Membran mit dem primären Antikörper inkubiert werden konnte, musste sie für mindestens eine Stunde mit 5% BSA in PBST geblockt werden, damit unspezifische Bindungsstellen für den Antikörper abgedeckt wurden. Nach anschließendem dreimaligem Waschen mit PBST konnte sie nun mit dem spezifischen Erstantikörper bei 4 °C über Nacht inkubiert werden. Am nächsten Tag wurde sie erneut dreimal mit PBST gewaschen, um ungebundene und unspezifisch gebundene Antikörper zu entfernen. Danach konnte der sekundäre Antikörper, an den eine Peroxidase gebunden ist, hinzugefügt werden und die Membran wurde so für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Zuletzt wurde sie wiederum dreimalig mit PBST gewaschen und mit Hilfe der ECL-Lösung A und B konnten die Proteine in der CCD Kamera, ImageQuantTM LAS 4000 detektiert werden. Das in der ECL Lösung enthaltene Luminol generiert bei Verstoffwechselung durch die an dem Zweitantikörper gebundene Peroxidase Luminiszenz.

2.2.4 Immunzytochemie

Die Immunzytochemie wurde verwendet, um bestimmte Antigene in den verschiedenen fixierten Zellen nachzuweisen und deren zelluläre Lokalisation und Verteilung zu bestimmen. Das Grundprinzip beruht, ähnlich wie beim Westernblot, auf der Interaktion von Antigen, Erstantikörper und Zweitantikörper. Der Erstantikörper bindet an das spezifische Antigen der Zellen. Der Zweitantikörper, welcher an ein Alexa-Fluorophore gekoppelt ist, bindet wiederum spezifisch an

das kristalline Fragment des Erstantikörpers. Somit kann der Antigen-/ Antikörper-Komplex unter einem Fluoreszenzmikroskop detektiert werden.

2.2.4.1 Färbungen

Die Zellen wurden auf 13 mm Deckgläsern in einer 24-Well-Platte gezüchtet. Darin wurden sie vorsichtig mit 1x PBS gewaschen und danach mit 500 µl 4% Paraformaldehyd für 10 min fixiert. Formaldehyd dient dazu, die zellulären Strukturen zu stabilisieren und zu verhindern, dass diese abgebaut werden.
Danach wurden die Zellen erneut dreimalig mit PBS gewaschen und anschließend mit 0,1% Triton für 5 min behandelt. Dieser Schritt war notwendig, um die Zellmembranen zu permeabilisieren, damit die Antikörper im weiteren Verlauf zu ihrem spezifischen intrazellulären Antigen gelangen konnten. Nach weiterem dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Deckgläser aus den Wells entnommen und auf einen mit Parafilm ausgelegten Objektträgerhalter transferiert. Die Deckgläser wurden nun mit 60 µl 2% BSA in PBS für 15 min bedeckt, um unspezifische Bindungsstellen der Antikörper zu blockieren. Im nächsten Schritt wurden die Deckgläser mit den primären Antikörpern beschichtet und diese wurden über Nacht bei 4 °C inkubiert. Um ihr Austrocknen zu verhindern, wurde um die Deckgläser eine feuchte Kammer erstellt.
Am nächsten Tag wurden die Deckgläser wiederum dreimal mit 0,05% PBS-T gewaschen und anschließend 1 h bei Raumtemperatur mit den entsprechenden sekundären Antikörpern, welche in 0,1% PBS-T verdünnt wurden, inkubiert. Alle Lösungen inklusive der Zweitantikörper wurden möglichst vom Licht ferngehalten, um ein Ausbleichen der Fluoreszenzwirkung zu vermeiden. Nach wiederholtem dreimaligen Waschen mit 0,05% PBS-T wurden die Deckgläser mit Hilfe von 2 µl 4’,6-diamidino-2-phenylindol (DAPI) mit der zellbeschichteten Seite nach unten auf einen Objektträger übertragen. Die Bildung von Lufteinschlüssen wurde möglichst vermieden. DAPI bindet an Stellen der doppelsträngigen DNA, die reich an Adenosin und Thymin sind. Die Eindecklösung besitzt zudem fluoreszierende Eigenschaften mit einem Absorptionsmaximum bei 385 nm und einem Emissionsmaximum bei 461 nm Wellenlänge. Diese Eigenschaften machen es möglich, die Nuclei im Fluoreszenzmikroskop zu sehen. Zudem verhindert DAPI

das Ausbleichen der Proben und stabilisiert diese, um eine bessere Lagerung zu gewährleisten.
In einem letzten Schritt wurden mit Hilfe des Axio Imager Z2 repräsentative Bilder der gefärbten Zellen in 40facher Vergrößerung gemacht.

2.2.5 Endocannabinoid-Extraktionen

Für die Messungen der Endocannabinoid-Konzentrationen der verschiedenen Zelltypen, mit und ohne KML29 Behandlung, mussten diese extrahiert und mit Hilfe der Gaschromatographie und der Massenspektrometrie gemessen werden. Die Messungen wurden in diesem Fall von Christoph Porazik bei Boehringer Ingelheim in Biberach durchgeführt.
Aufgrund des hohen zellulären Aufwands wurden in dieser Arbeit nur Astrozyten untersucht, sodass sich die folgende Methodik ausschließlich auf die Arbeit mit diesem Zelltyp bezieht.
Die Astrozyten wurden nach ausreichender Reifung abgeschüttelt und gezählt. Anschließend wurden $50x10^4$ Zellen in 100 mm Petrischalen ausplattiert, um weitere 5-7 Tage bei 37 °C im Brutschrank zu kultivieren, bis sich erneut ein dichter Astrozytenrasen gebildet hatte. Hiernach wurde der Überstand entnommen und die Zellen mit D-PBS$^-$ gewaschen und wiederum abgesaugt. Unter Zugabe von 1 ml D-PBS$^-$ wurden die Zellen mittels eines Zellscrapers abgekratzt und das zellenthaltende D-PBS$^-$ in ein 2 ml Eppendorf-Tube überführt. Dort wurde es mit Hilfe eines Eppendorf-Pistills zermörsert und wiederum einer mit 3 ml D-PBS$^-$ vorgelegten Petrischale zugeführt. Dieser zusätzliche Schritt diente dem Aufbrechen der Zellmembranen, um so eine bessere Wirksamkeit von KML29 zu gewährleisten.
KML29 wurde zuvor abgewogen und eine 10 mM Lösung in DMSO á 30 µl alliqoutiert und bei -20 °C gelagert. Um die gewünschte Endkonzentration von 1 µM für die Stimulierung der Astrozyten zu erreichen, mussten diese zuerst in 720 µl D-PBS$^-$ vorverdünnt werden. Zudem wurden 750 µl einer DMSO-Lösung mit gleicher Konzentration angelegt, um später als DMSO-Kontrolle angewendet zu werden. Anschließend wurden die KML29-Lösung, die DMSO-Lösung und 750 µl D-PBS$^-$ (als Negativkontrolle) bei 30 °C im Ultraschallbad für mindestens 30 min sonifiziert. Dieser Schritt war notwendig, um das schlecht lösliche KML29

mit dem Wasser zu homogenisieren. Es wurde darauf geachtet die Endkonzentration unter 0,01% DMSO zu halten, damit ein toxischer Effekt von DMSO auf die Zellen ausgeschlossen werden konnte.

Für die Stimulierung wurden die Petrischalen mit 10 µl KML29-Lösung, DMSO-Lösung oder D-PBS$^-$-Lösung behandelt und danach für 30 min im Brutschrank inkubiert.

In der Zwischenzeit wurden 24 ml Glasröhrchen mit 8 ml Dichlormethan und Internen-Standards befüllt und auf Eis gelagert. Aus den deuterierten Internen-Standards wurde zuvor ein Master Mix zusammengestellt. Dafür wurde 0,1 µl d_4-AEA, 1 µl d_5-2-AG, 1 µl d_8-AA, 0,1 µl d_4-PGD_2, 0,1 µl d_4-PGE_2, 0,1 µl d_4-TXB_2 verwendet und jeweils 2,4 µl pro Probe hinzugefügt.

Nach der Inkubation wurden die Petrischalen auf Eis gestellt und die Zellen nach Zugabe von 4 ml eiskaltem MS-Grade Methanol erneut mit Hilfe eines Zellscrapers gelöst sowie der Überstand in die vorbereiteten Glasröhrchen überführt. Anschließend wurden die Proben 1-2 min gevortext und bei 4 °C bei 380 *g* für 10 min zentrifugiert. Danach wurde die untere, organische Phase mit Hilfe eines Pipetboys und einer Pasteurpipette vorsichtig entnommmen und in einem 8 ml Glasröhrchen bei -80 °C bis zum Transport nach Biberach gelagert.

2.2.6 Statistische Auswertung

Die Daten wurden mit Microsoft Excel bearbeitet, und als Mittelwert +/- Standardfehler des Mittelwerts (SEM) angegeben. Die statistische Auswertung der Daten wurde mit dem Statistikprogramm GraphPad Prism v5.01 durchgeführt. Dafür wurden die Unterschiede zwischen den verschiedenen Zelltypen mittels One-way ANOVA untersucht und anschließend mit dem Dunnetts multiplen Vergleichstest zu einem Referenzzelltyp getestet. Dieser Test wurde verwendet, um möglichst anschaulich den Vergleich der RNA- bzw. Proteinmenge in den verschiedenen Zelltypen herzustellen. Die Sternchen symbolisieren Signifikanzen im Vergleich zum Referenzzelltyp: *p<0.05, **p<0,01, ***p<0,001.

Die Westernblots wurden mit Hilfe des LAS ImageQuant quantifiziert. Zur Hintergrundkorrektur wurde die Rolling-Ball-Methode herangezogen. Die Gesamtmenge an Protein wurde mittels MemStain ermittelt und die Menge des gesuchten Proteins in Relation zur Gesamtproteinmenge bestimmt.

3 Ergebnisse

Um Aufschluss über die Expression der Cannabinoid-Rezeptoren CB_1 und CB_2 und der wichtigsten Abbauenzyme von Endocannabinoiden MAGL und FAAH im ZNS zu erhalten, habe ich deren Expression auf mRNA- und Protein-Ebene gemessen und sie per Immunzytochemie (ICC) lokalisiert. Hierfür wurden murine Primärkulturen von Neuronen, Astrozyten, Oligodendrozyten und Mikroglia hergestellt.

Des Weiteren habe ich eine Methode zur Messung der Endocannabinoid-Spiegel in primären Astrozyten etabliert und den Effekt des MAGL-Inhibitors KML29 an diesen getestet.

3.1 CB_1-Expression in primären Zellen des ZNS

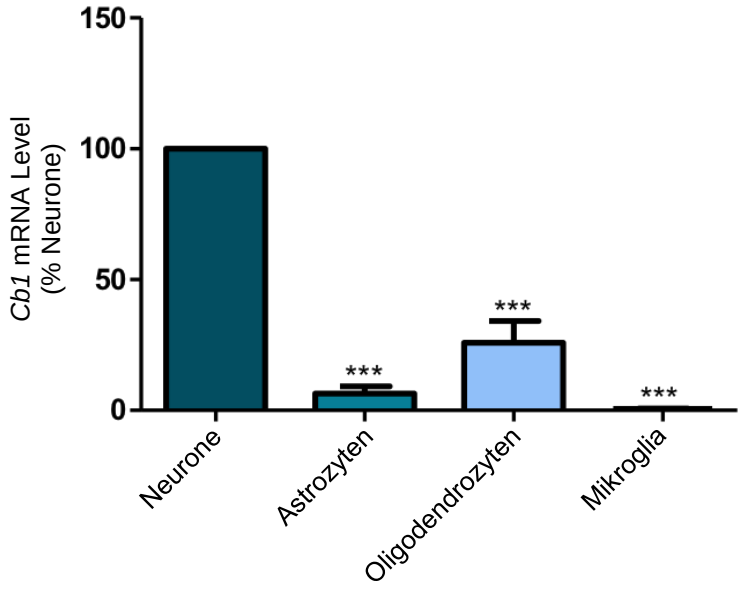


Abbildung 1: Die primären Zellen (Neurone, Astrozyten, Oligodendrozyten und Mikroglia) wurden aus der C57BL/6 Maus isoliert und die Expression von *Cb1* mittels qPCR quantifiziert und relativ zu mindestens zwei Housekeepinggenen (TBP, pol2, PKK1, PPIA) bestimmt. Daten präsentiert in Mittelwert ± SEM von n= 4-6 unabhängigen Experimenten. Statistische Analyse mittels One-way ANOVA mit anschließendem Dunnetts multiplem Vergleichstest. Sternchen symbolisieren Signifikanzen zur Kontrollgruppe: *p<0.05, **p<0,01, ***p<0,001. Vergleich der Menge in % von Astrozyten, Oligodendrozyten und Mikroglia jeweils mit der in Neuronen (100%).

Um den CB_1-Spiegel in murinen Primärkulturen des ZNS zu bestimmen, wurden zunächst jeweils Neuronen, Astrozyten, Oligodendrozyten und Mikroglia aus dem

Enzephalon neonataler C57BL/6-Mäuse isoliert und kultiviert. Anschließend wurde die mRNA-Expresison von *Cb1* per qPCR bestimmt.

Dabei konnte gezeigt werden, dass *Cb1* auf mRNA-Ebene in Neuronen stärker exprimiert wird als in den Gliazellen. Beim prozentualen Vergleich der Menge an *Cb1* in verschiedenen Gliazellen mit der in Neuronen ergibt sich, dass Oligodendrozyten etwa 25% der Menge exprimieren, Astrozyten etwa 6% und Mikroglia weniger als 1% (Abb. 1).

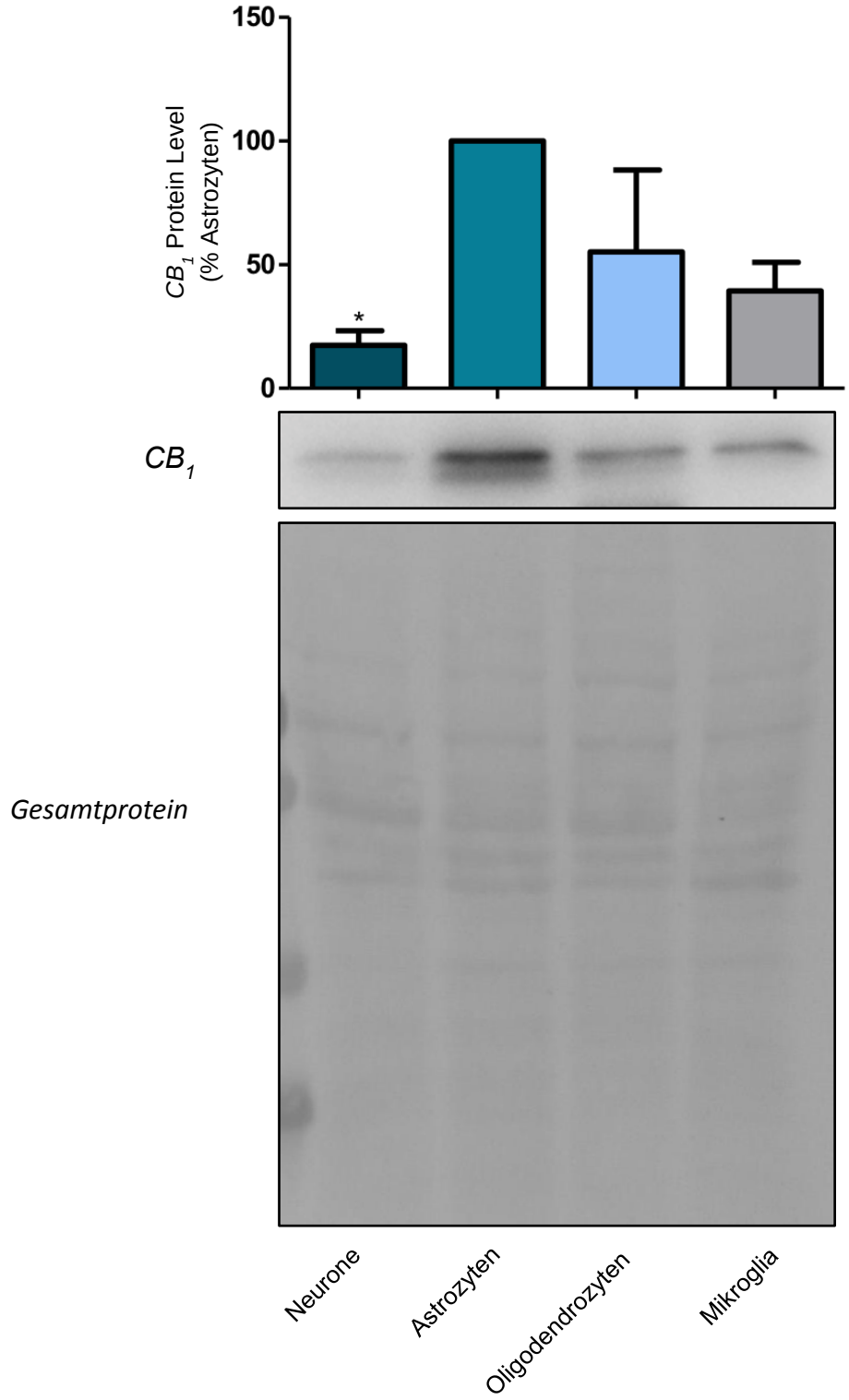


Abbildung 2: Expression vom *CB1* in Neuronen, Astrozyten, Oligodendrozyten und Mikroglia. Daten präsentiert in Mittelwert ± SEM. Statistische Analyse mittels One-way ANOVA mit anschließendem Dunnetts multiplem Vergleichstest. Sternchen symbolisieren Signifikanzen zur Kontrollgruppe: *p<0.05, **p<0,01, ***p<0,001. *CB1* wurde mit einem geeigneten Erstantikörper (Cayman 10006590) detektiert. MemStain wurde verwendet um die Effektivität des Proteintransfers zu überprüfen und die Gesamtmenge an Protein zu bestimmen. Die Menge an *CB1* wurde in Relation zur Gesamtmenge an Protein bestimmt und die Menge von Neuronen, Oligodendrozyten und Mikroglia in % direkt mit der in Astrozyten (100%) verglichen. n = 4.

Die Proteinmenge von *CB1* wurde mittels Westernblot bestimmt. Dabei konnten die zuvor ermittelten Ergebnisse auf mRNA-Ebene nicht bestätigt werden. Es zeigte sich die geringste Menge an *CB1* in Neuronen und die stärkste Expression in Astrozyten. Mikroglia wiesen dort etwa 40% der Menge an *CB1* im Vergleich zu der in Astrozyten auf. Bei den Oligodendrozyten waren es etwa 55%, jedoch mit starken Schwankungen innerhalb der einzelnen Versuche, sodass diesbezüglich keine eindeutige Aussage getroffen werden kann (Abb. 2).

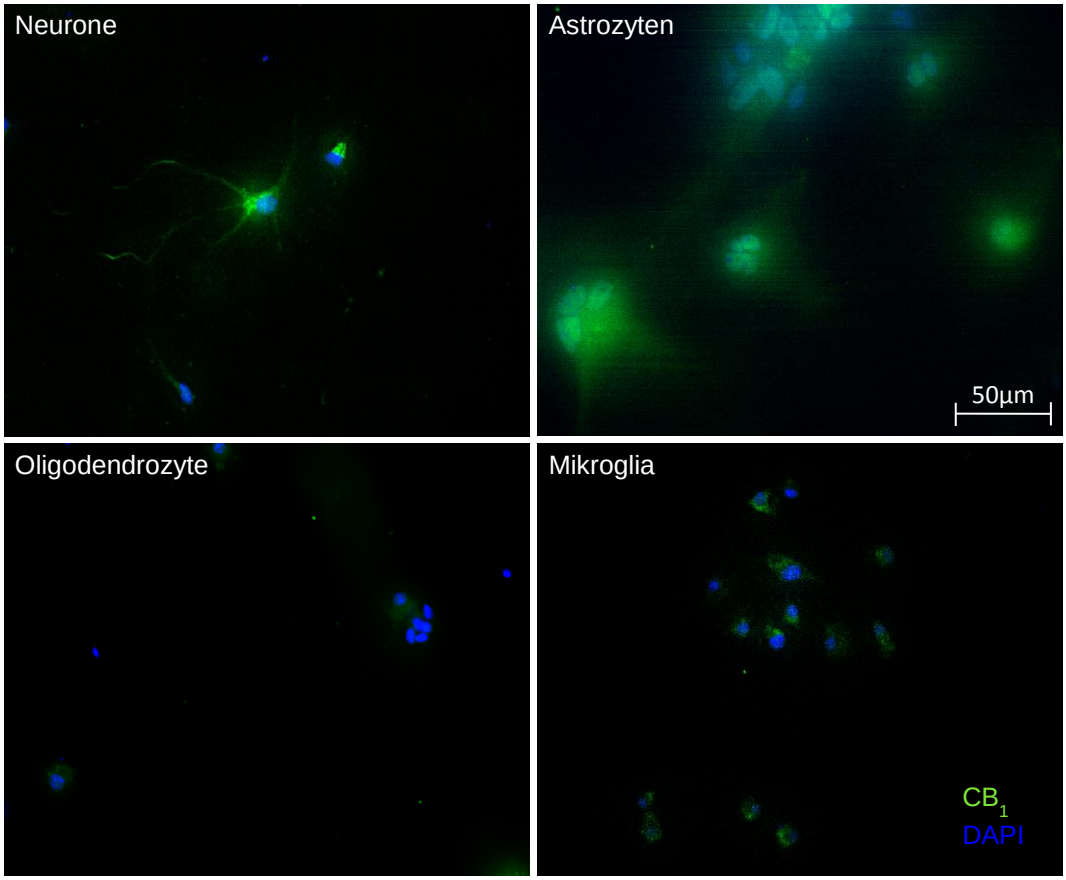


Abbildung 3: ICC von *CB1*. Detektion mittels geeignetem Antikörper (Cayman 10006590) an primären Neuronen, Astrozyten, Olidodendrozyten und Mikroglia. Zweitantikörper Fluor Alexa 488 gekoppelt. Darstellung der Zellkerne mittels DAPI.

Die ICC wurde ebenfalls an primären murinen Zellen durchgeführt. Dazu wurden diese in einer 24-Well-Platte auf Deckgläsern angezüchtet und nach Behandlung mit 1. und 2. Antikörper mittels Fluoreszenzmikroskop untersucht.

Dabei konnte in Oligodendrozyten und Mikroglia nur ein sehr geringes, zellkernnahes Signal für *CB1* nachgewiesen werden. In Neuronen war das Signal deutlicher im Soma der Zelle, reichte jedoch bei einzelnen Zellen bis in die

Dendriten. Astrozyten zeigten ein großflächiges Signal über dem ganzen Zellkörper (Abb. 3).

3.2 CB_2-Expression in primären Zellen des ZNS

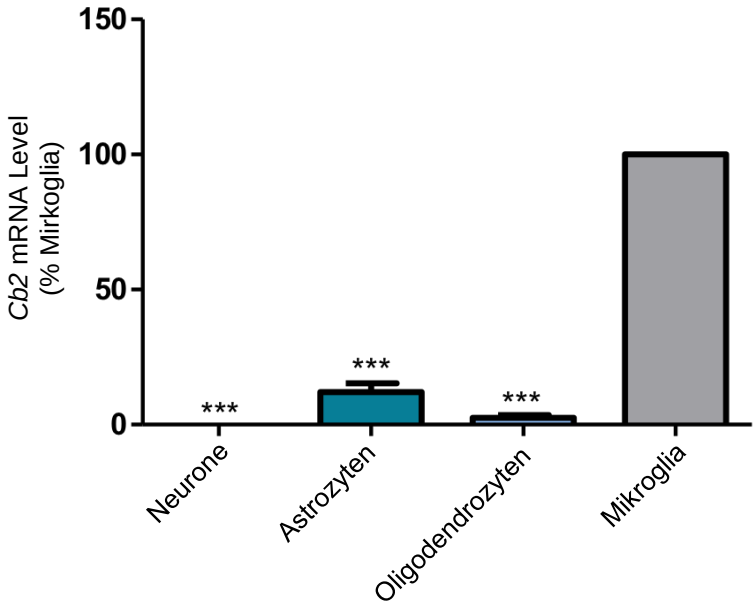


Abbildung 4: Die primären Zellen (Neurone, Astrozyten, Oligodendrozyten und Mikroglia) wurden aus der C57BL/6 Maus isoliert und die Expression von *Cb2* mittels qPCR quantifiziert und relativ zu mindestens zwei Housekeepinggenen (TBP, pol2, PKK1, PPIA) bestimmt. Daten präsentiert in Mittelwert ± SEM von n= 4-6 unabhängigen Experimenten. Statistische Analyse mittels One-way ANOVA mit anschließendem Dunnetts multiplem Vergleichstest. Sternchen symbolisieren Signifikanzen zur Kontrollgruppe: *p<0.05, **p<0,01, ***p<0,001. Vergleich der Menge in % von Neuronen, Astrozyten und Oligodendrozyten jeweils mit der in Mikroglia (100%).

Die Menge an *Cb2* wurde analog zu *Cb1* aus murinen primären Zellkulturen von Neuronen, Astrozyten, Oligodendrozyten und MIkroglia mittels qPCR ermittelt, um einen Vergleich der vier verschiedenen Zelltypen herzustellen. Daraus ergab sich, dass die mRNA des *Cb2*-Rezeptors deutlich stärker in primären Mikroglia exprimiert wird als den anderen drei Zelltypen. Prozentual gesehen weisen dabei Astrozyten etwa 12% der Menge an *Cb2*-mRNA im Vergleich zu Mikroglia auf, Oligodendrozyten etwa 2,5% und Neurone unter 1%.

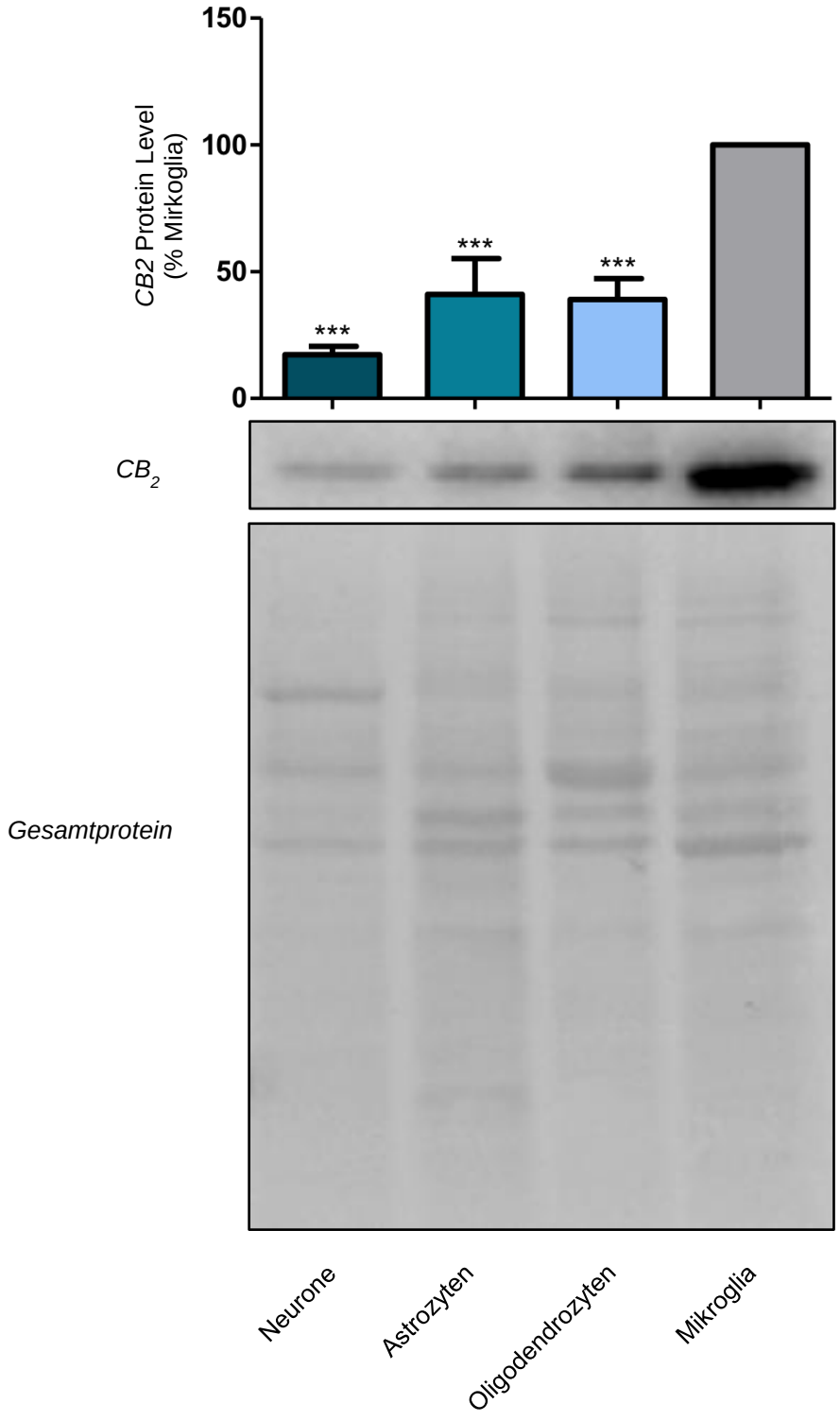


Abbildung 5: Expression vom *CB2* in primären Neuronen, Astrozyten, Oligodendrozyten und Mikroglia. Daten präsentiert in Mittelwert ± SEM. Statistische Analyse mittels One-way ANOVA mit anschließendem Dunnetts multiplem Vergleichstest. Sternchen symbolisieren Signifikanzen zur Kontrollgruppe: *p<0.05, **p<0,01, ***p<0,001. *CB2* wurde mittels geeignetem Erstantikörper (Abcam ab45942) detektiert. MemStain wurde verwendet um die Effektivität des Proteintransfers zu überprüfen und die Gesamtmenge an Protein zu bestimmen. Die Menge an *CB2* wurde in Relation zur Gesamtmenge an Protein bestimmt und die Menge von Neuronen, Astrozyten und Oligodendrozyten in % direkt mit der in Mikroglia (100%) verglichen. n = 5.

Bei der Untersuchung von *CB2* auf Proteinebene mittels Westernblot, konnte das Ergebnis aus den qPCR-Versuchen bestätigt werden. Es zeigte sich ebenfalls eine maßgebliche Expression in Mikroglia. Im Vergleich zu Astrozyten und Oligodendrozyten konnten dort etwa 2,5x mehr *CB2* gefunden werden. Verglichen mit Neuronen etwa das Sechsfache.

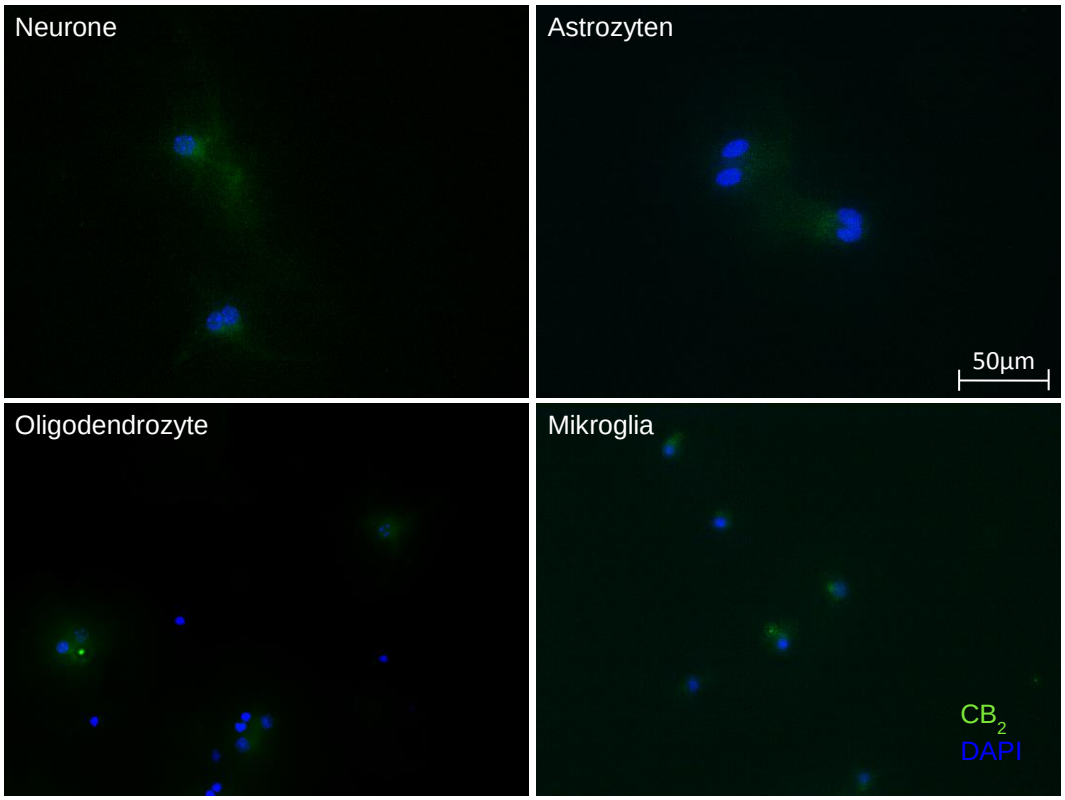


Abbildung 6: ICC von *CB2*. Detektion mittels geeignetem Antikörper (Abcam ab45942) an primären Neuronen, Astrozyten, Oligodendrozyten und Mikroglia. Zweitantikörper Fluor Alexa 488 gekoppelt. Darstellung der Zellkerne mittels DAPI.

Mit der ICC konnte ich bei der Detektion von *CB2* in allen vier Zelltypen nur sehr geringe Signale feststellen, was eine Aussage zur Lokalisation dieses Proteins nicht sicher möglich macht. Vereinzelt vorhandene leichte Signale fanden sich im Bereich der Zellkerne.

3.3 MAGL-Expression in primären Zellen des ZNS

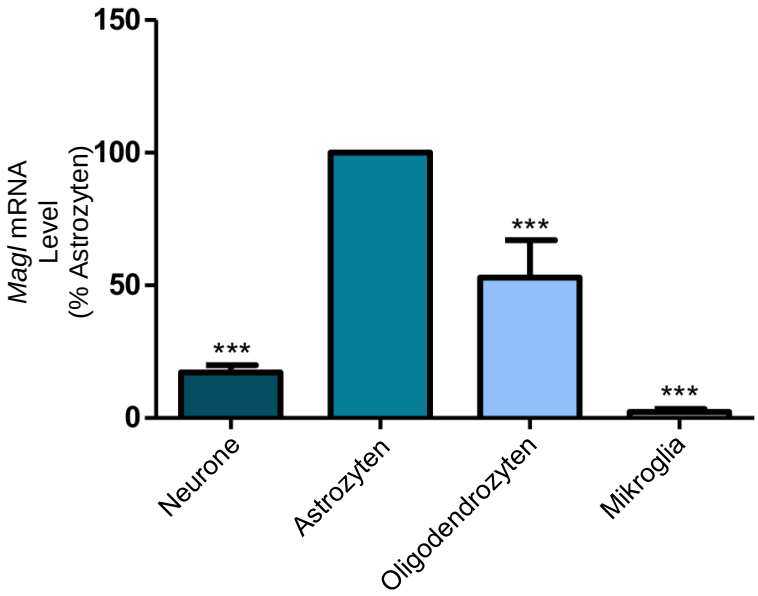


Abbildung 7: Die primären Zellen (Neurone, Astrozyten, Oligodendrozyten und Mikroglia) wurden aus der C57BL/6 Maus isoliert und die Expression von *Magl* mittels qPCR quantifiziert und relativ zu mindestens zwei Housekeepinggenen (TBP, pol2, PKK1, PPIA) bestimmt. Daten präsentiert in Mittelwert ± SEM von n = 4-5 unabhängigen Experimenten. Statistische Analyse mittels One-way ANOVA mit anschließendem Dunnetts multiplem Vergleichstest. Sternchen symbolisieren Signifikanzen zur Kontrollgruppe: *p<0.05, **p<0,01, ***p<0,001. Vergleich der Menge in % von Neuronen, Oligodendrozyten und Mikroglia jeweils mit der in Astrozyten (100%).

Die Expression von MAGL wurde, ebenso wie CB1 und CB2, an murinen primären Neuronen, Astrozyten, Oligodendrozyten und Mikroglia untersucht, welche aus C57BL/6-Mäusen gewonnen und kultiviert wurden.

Die Untersuchung mittels qPCR zeigte, dass kultivierte Astrozyten im Vergleich zu den anderen Zelltypen signifikant mehr *Magl*-mRNA synthetisieren. In Oligodendrozyten konnte im Schnitt etwa 50% dieses Spiegels nachgewiesen werden. In Neuronen war es etwa 15%. Kultivierte Mikroglia zeigten im Vergleich keine großen Mengen an *Magl*-mRNA.

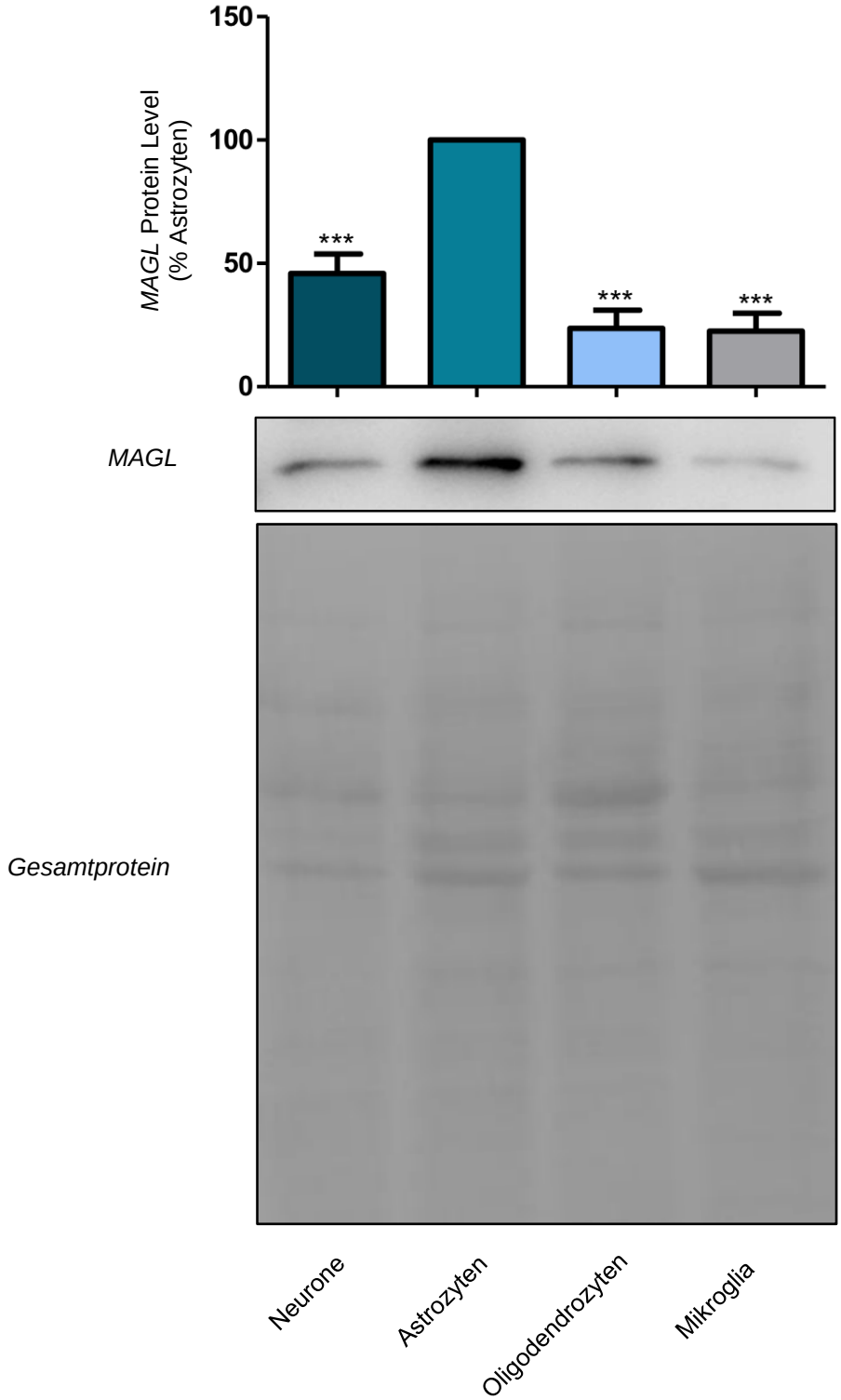


Abbildung 8: Expression vom *MAGL* in primären Neuronen, Astrozyten, Oligodendrozyten und Mikroglia. Daten präsentiert in Mittelwert ± SEM. Statistische Analyse mittels One-way ANOVA mit anschließendem Dunnetts multiplem Vergleichstest. Sternchen symbolisieren Signifikanzen zur Kontrollgruppe: *p<0.05, **p<0,01, ***p<0,001. *MAGL* wurde mittels geeigneten Erstantikörper (Abcam ab77398) detektiert. MemStain wurde verwendet um die Effektivität des Proteintransfers zu überprüfen und die Gesamtmenge an Protein zu bestimmen. Die Menge an *MAGL* wurde in Relation zur Gesamtmenge an Protein bestimmt und die Menge von Neuronen, Oligodendrozyten und Mikrooglia in % direkt mit der in Astrozyten (100%) verglichen. n = 5.

Auf Proteinebene konnte die verhältnismäßig starke Expression in Astrozyten ebenfalls festgestellt werden. Allerdings zeigten sich dort im Vergleich zu den mRNA-Ergebnissen höhere Spiegel an *MAGL* in Neuronen (etwa 50%) und geringere in Oligodendrozyten (etwa 20%). Mikroglia wiesen, ebenso wie auf mRNA-Ebene die geringste Menge an *MAGL* auf.

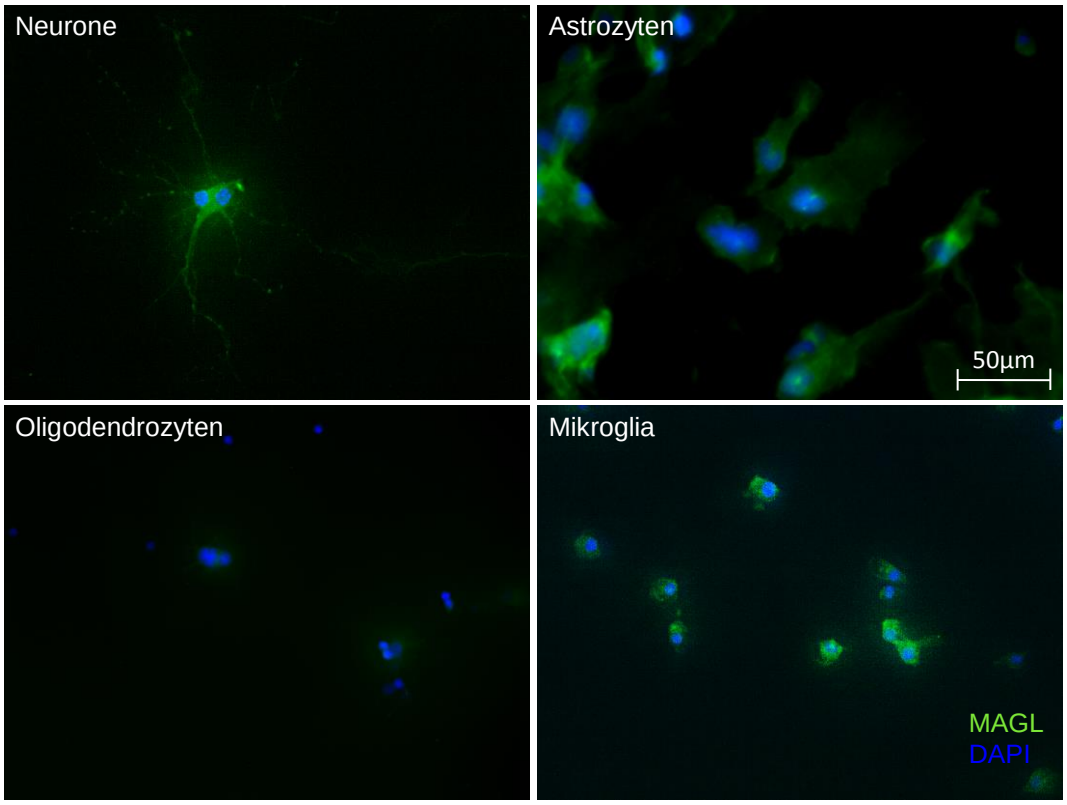


Abbildung 9: ICC von *MAGL*. Detektion mittels geeignetem Erstantikörper (Abcam ab77398) an primären Neuronen, Astrozyten, Oligodendrozyten und Mikroglia. Zweitantikörper Fluor Alexa 488 gekoppelt. Darstellung der Zellkerne mittels DAPI.

Die Immunfluoreszenz von *MAGL* ergab in Neuronen eine ubiquitäre Verteilung im Soma und in Dendriten. Auch in Astrozyten zeigt sich eine breite Verteilung des Proteins. In Oligodendrozyten konnte keine wesentliche Expression durch die Immunfluoreszenz gezeigt werden. Bei Mikroglia fand sich ein zellkernnahes verstärktes Signal.

3.4 FAAH-Expression in primären Zellen des ZNS

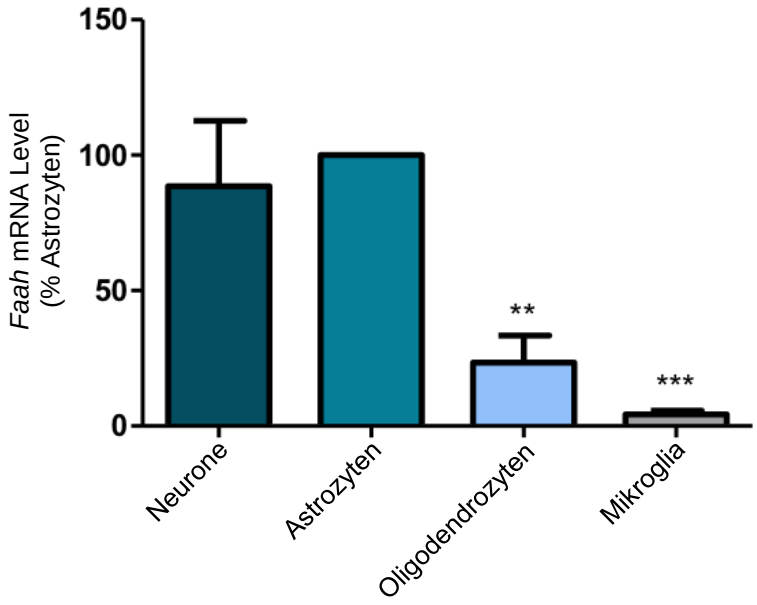


Abbildung 10: Die primären Zellen (Neurone, Astrozyten, Oligodendrozyten und Mikroglia) wurden aus der C57BL/6 Maus isoliert und die Expression von *Faah* mittels qPCR quantifiziert und relativ zu mindestens zwei Housekeepinggenen (TBP, pol2, PKK1, PPIA) bestimmt. Daten präsentiert in Mittelwert ± SEM von n = 5-6 unabhängigen Experimenten. Statistische Analyse mittels One-way ANOVA mit anschließendem Dunnetts multiplem Vergleichstest. Sternchen symbolisieren Signifikanzen zur Kontrollgruppe: *p<0.05, **p<0,01, ***p<0,001. Vergleich der Menge in % von Neuronen, Oligodendrozyten und Mikroglia jeweils mit der in Astrozyten (100%).

Die FAAH-Expression wurde mittels qPCR und Westernblot bestimmt. Außerdem wurde eine ICC durchgeführt, um die Lokalisation des Proteins zu eruieren. Dafür wurden die primären Neurone, Astrozyten, Oligodendrozyten und Mikroglia aus dem Gehirn der C57BL/6 Maus gewonnen und kultiviert.

Aus den Versuchen ergab sich, dass *Faah* auf mRNA-Ebene vor allem in Neuronen und Astrozyten exprimiert wird. Oligodendrozyten weisen etwa ein Viertel der Menge auf (23%). Kultivierte Mikroglia im Vergleich keine wesentliche Expression (4%).

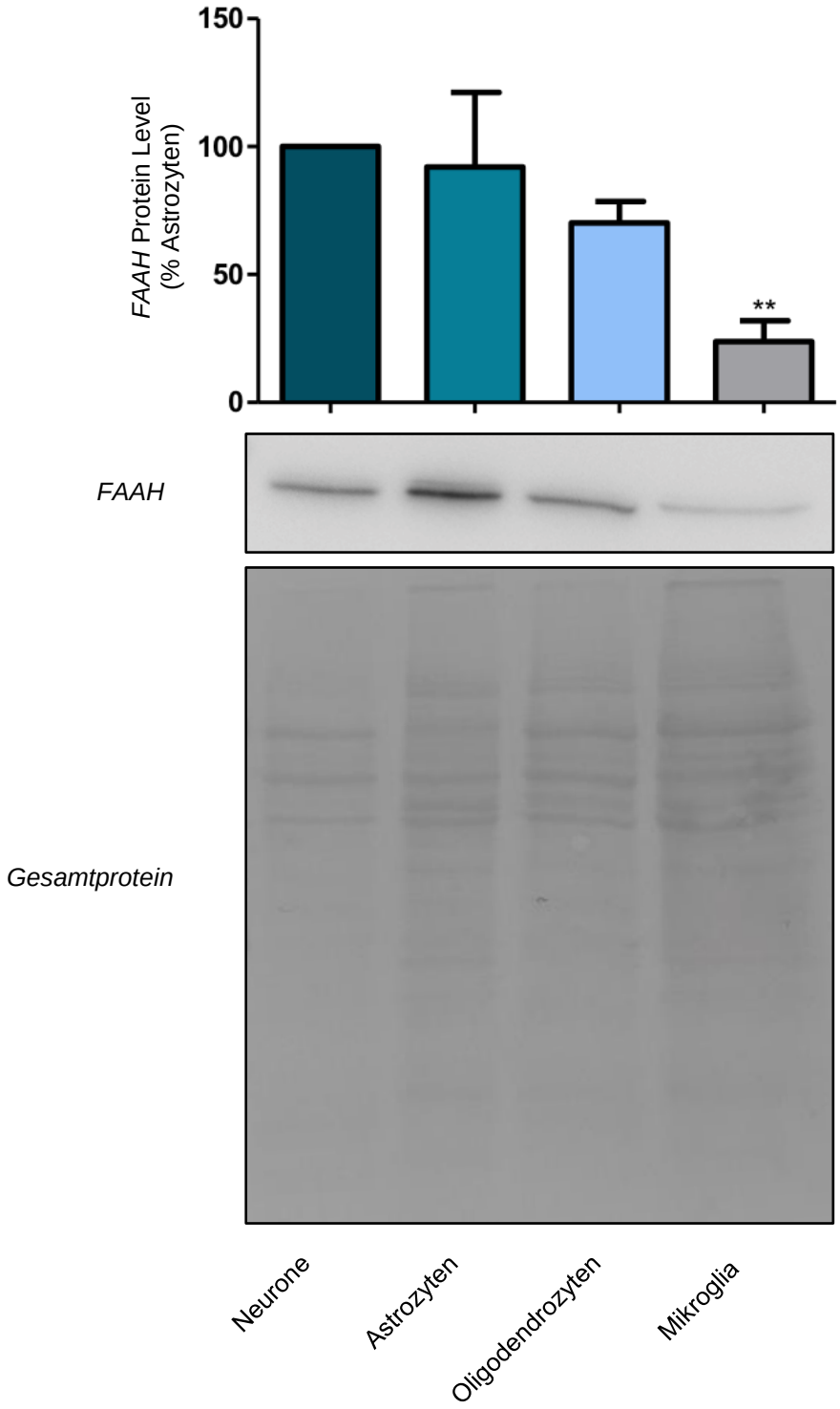


Abbildung 11: Expression von *FAAH* in primären Neuronen, Astrozyten, Oligodendrozyten und Mikroglia. Daten präsentiert in Mittelwert ± SEM. Statistische Analyse mittels One-way ANOVA mit anschließendem Dunnetts multiplem Vergleichstest. Sternchen symbolisieren Signifikanzen zur Kontrollgruppe: *p<0.05, **p<0,01, ***p<0,001. Proteinmenge wurde mittels geeignetem Antikörper (Abcam ab128917) mittels Westernblot gemessen. MemStain wurde verwendet, um die Effektivität des Proteintransfers zu überprüfen und die Gesamtmenge an Protein zu bestimmen. Die Menge an FAAH wurde in Relation zur Gesamtmenge an Protein bestimmt und die Menge von Neuronen, Oligodendrozyten und Mikroglia in % direkt mit der in Astrozyten (100%) verglichen. n = 5.

Die Analyse mittels Westernblot zeigt kohärente Befunde zu den qPCR-Ergebnissen. Es zeigt sich ebenfalls eine überwiegende Expression in Neuronen und Astrozyten. In Mikroglia können wiederum nur geringe Mengen an *FAAH* festgestellt werden. Oligodendrozyten weisen auf Proteinebene allerdings etwa 70% der Menge an *FAAH* im Vergleich zu der in Neuronen auf.

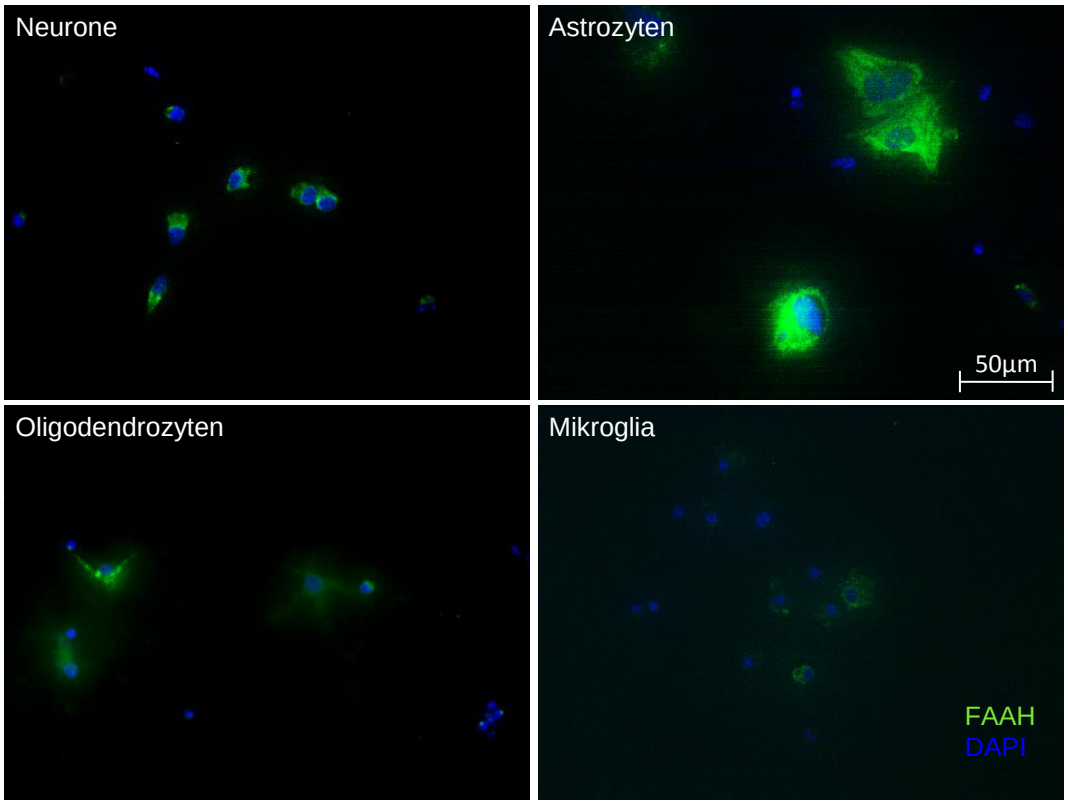


Abbildung 12: ICC von *FAAH*. Detektion mittels geeignetem Antikörper (Abcam ab128917) an primären Neuronen, Astrozyten, Oligodendrozyten und Mikroglia. Zweitantikörper Fluor Alexa 488 gekoppelt. Darstellung der Zellkerne mittels DAPI.

Das *FAAH*-Enzym stellt sich in der Immunfluoreszenz in Oligodendrozyten und Mikroglia mit einem sehr schwachen, eher Zellkernnah gelegenen Signal dar. In Neuronen ist dieses ebenso lokalisiert, jedoch etwas stärker ausgeprägt. Astrozyten hingegen zeigen ein deutliches Signal über das ganze Soma verteilt.

3.5 2-AG, AEA und AA in Astrozyten mit und ohne KML-29-Behandlung

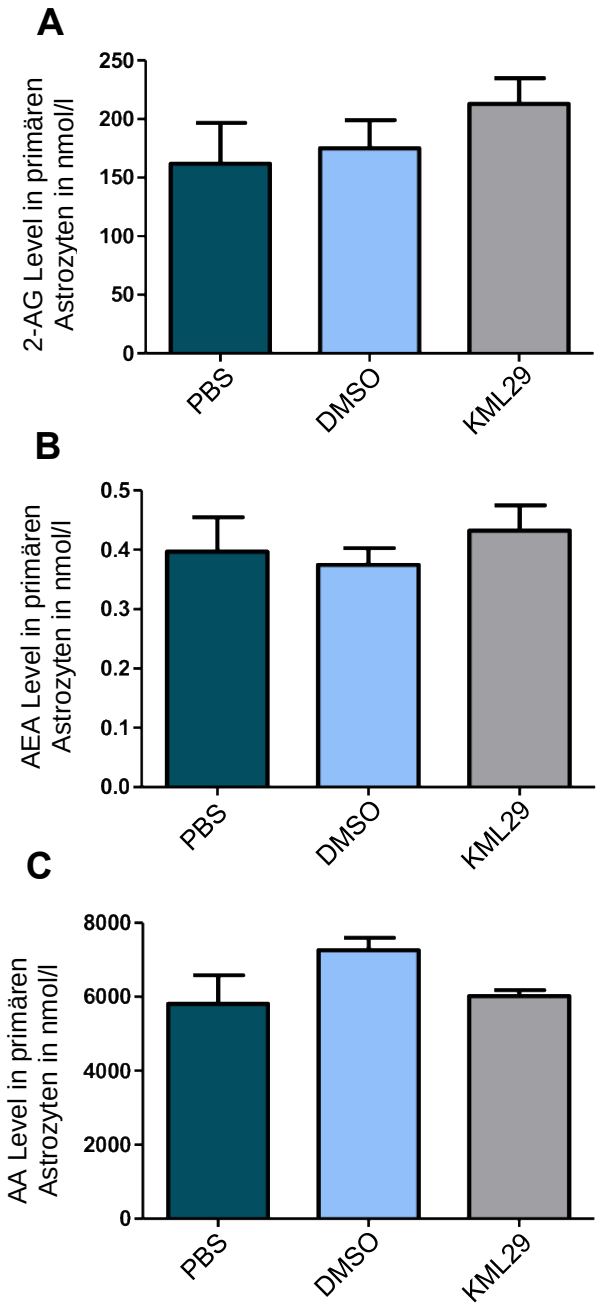


Abbildung 13: Extraktionen von *2-AG (A)*, *AEA* (B) und *AA* (C) aus primären Astrozyten (jeweils $50x10^4$ in einer 100 mm Petrischale) der *C57BL/6* Maus ohne und mit Behandlung des MAGL-Inhibitors KML29. Die Messungen wurden bei Boehringer Ingelheim in Biberach durchgeführt. Daten präsentiert in Mittelwert ± SEM. Die statistische Analyse mittels One-way ANOVA und anschließendem Dunnetts multiplen Vergleichstest mit Vergleich der DMSO- und KML29-Gruppe zur PBS-Kontrollgruppe ergab bei einer Versuchsanzahl von n = 3 keine signifikanten Unterschiede.

Um die Rolle der verschiedenen primären Zellen des ZNS für das ECS besser zu verstehen, ist es nicht nur wichtig, die Expression der Rezeptoren und beteiligter Enzyme zu beleuchten, sondern auch die Endocannabinoide selbst zu untersuchen. Daher war das Ziel, eine Methode zu finden, um die Endocannabinoide aus den Zellen zu extrahieren und quantitativ zu bestimmen. Außerdem konnte so der Effekt des MAGL-Inhibitors KML29, der schon im Tierversuch in unserem Labor zum Einsatz kam, direkt an den Zellen getestet werden. Da in den Ergebnissen aus qPCR und Westernblot gezeigt werden konnte, dass MAGL vor allem in Astrozyten exprimiert wird, war es für mich von besonderem Interesse an diesem Zelltyp den Effekt zu testen. Dazu wurden unabhängige murine Astrozytenkulturen angelegt und diese kurz vor den Extraktionen von 2-AG, AEA und AA für 30 min mit KML29 behandelt. Als Negativkontrolle wurden die Zellen zum einen nur mit PBS inkubiert und zum anderen mit DMSO, um Effekte durch das Lösungsmittel selbst auszuschließen.

In den Versuchen konnte 2-AG in Konzentrationen um ca. 160 nmol/l gefunden werden. Die Menge an AEA war etwa 400x geringer mit Konzentrationen bei 0,4 nmol/l. AA wurde in Konzentrationen von 6000 nmol/l nachgewiesen.
Bezüglich der Behandlung mit KML29 der primären Astrozyten zeigten sich nach drei Extraktionen keine signifikanten Unterschiede der mit KML29 behandelten Zellen zur PBS-Kontrollgruppe. Es zeigte sich jedoch eine Tendenz, dass bei Behandlung mit dem MAGL-Inhibitor KML29 die Spiegel von 2-AG in den Astrozyten ansteigen. Auch Anandamid stellt sich ebenfalls unter KML29-Behandlung leicht erhöht im Vergleich zur PBS-Kontrolle dar. Die Arachidonsäure-Spiegel sind ebenfalls leicht erhöht im Vergleich zur PBS-Kontrolle. Es weist dort jedoch die DMSO-Kontrolle deutlich höhere Spiegel als die PBS-Kontrolle auf, was eigentlich nicht der Fall sein sollte.

4 Diskussion

4.1 Allgemeines

In der vorliegenden experimentellen Arbeit sollte die Expression von möglichen pharmakologischen Target-Proteinen des Endocannabinoid-Systems in primären Neuronen und Gliazellen untersucht werden, um so Rückschlüsse auf die protektiven Wirkungen der Pharmaka ziehen zu können. Zudem wurde eine Methode zur Extraktion und Messung der Endocannabinoide in primären Zellen etabliert und der selektive MAGL-Inhibitor KML29 an kultivierten Astrozyten getestet.

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass CB_2 hauptsächlich von Mikroglia exprimiert wird. CB_1 hingegen wies in den Versuchen eine unterschiedliche Expression auf mRNA- und Protein-Ebene auf. *Cb1*-mRNA wurde vor allem in Neuronen gefunden, wohingegen die Analyse mittels Westernblot hauptsächlich eine Expression in Gliazellen, vornehmlich in Astrozyten, zeigte. Die Abbau-Enzyme der Endocannbinoide, MAGL und FAAH, konnte ich maßgeblich in Astrozyten nachweisen, FAAH jedoch auch in großen Mengen in Neuronen.

Die Behandlung der Astrozyten mit dem MAGL-Inhibitor KML29 ergab die Tendenz, dass die 2-AG- und AEA-Spiegel leicht erhöht im Vergleich mit der Behandlung mit DMSO und PBS waren.

Es gilt nun diese Ergebnisse in den momentanen Stand der Forschung am ECS einzuordnen und Rückschlüsse zu ziehen, in wieweit diese Relevanz für mögliche pharmakologische Intervention haben.

4.2 Verteilung des ECS in primären Zellen des ZNS

4.2.1 Expression von CB_1 in primären Neuronen und Gliazellen

Bei der Analyse des CB_1-Rezeptors in den verschiedenen Zelltypen gab es interessanterweise deutliche Unterschiede von mRNA- zur Proteinebene. Es konnte mittels qPCR festgestellt werden, dass sich *Cb1*-mRNA überwiegend in primären Neuronen befindet. Auf Proteinebene hingegen zeigte sich in Neuronen

im Vergleich zu den Gliazellen die geringste Menge an *CB1*. Dort war das Protein vor allem in Astrozyten exprimiert.

In der Literatur besteht der allgemeine Konsens, dass CB_1 im gesamten Gehirn in hohen Mengen in Neuronen gefunden werden kann und in niedrigeren Mengen ebenso in Gliazellen und in peripheren Zelltypen (Howlett et al. 2002, Matsuda et al. 1990, Tsou et al. 1998a). Es gibt jedoch starke Unterschiede der Rezeptordichte in verschiedenen Hirnarealen. Eine hohe Rezeptordichte von CB_1 gibt es beispielsweise in hippokampalen Strukturen, dem entorhinalen Kortex, olfaktorischen Regionen, großen Teilen der Basalganglien, der Substantia nigra, sowie der Amygdala. So können auch die Effekte von Marihuana auf das Verhalten, das Gedächtnis und die Kognition erklärt werden und das Vorkommen in den Basalganglien deutet auf ihre wichtige Rolle in der Abstimmung der Motorik hin (Glass et al. 1997, Herkenham et al. 1991, Herkenham et al. 1990, Svizenska et al. 2008, Tsou et al. 1998a). Ebenso sind CB1-Rezeptoren vermehrt in Regionen in Zusammenhang mit Schmerzwahrnehmung und –verarbeitung vorhanden, wie beispielsweise im Periaquäduktalen Grau und im Hinterhorn des Rückenmarks (Farquhar-Smith et al. 2000, Tsou et al. 1998a). Im Thalamus, Hypothalamus, Hirnstamm (außer im Nucleus dorsalis nervi vagi) oder Rückenmark sind die Spiegel jedoch wesentlich niedriger (Breivogel et Sim-Selley 2009). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass CB_1 insbesondere in GABAnergen Interneuronen exprimiert wird, welche jedoch nicht maßgeblich an der Vermittlung der psychoaktiven Effekte von Cannabis beteiligt sind. Eher spielen diese in der Übertragung von Informationen ins Langzeitgedächtnis eine Rolle (Puighermanal et al. 2009) Die psychoaktiven Wirkungen von THC sind vielmehr den CB_1 Rezeptoren auf glutaminergen Neuronen zuzuschreiben, welche jedoch weniger häufig sind (Monory et al. 2007, Tsou et al. 1998a).
Die Expression von CB_1 in Gliazellen ist in geringerem Umfang adressiert worden, aber auch hierzu gibt es einige aufschlussreiche Studien. Allerdings werden erhebliche Unterschiede zwischen den Zellen in verschiedenen Aktivitätszuständen und den verschiedenen Spezies festgestellt (Stella 2010). Mehrere Labors konnten eine *in situ* Expression von CB_1 in Astrozyten zeigen, dort besonders in den perivaskulären Zellen (Guzman 2003, Moldrich et Wenger 2000, Rodriguez et al. 2001, Salio et al. 2002). Die *in vitro* Expression von CB_1 in

kultivierten Astrozyten zeigte je nach Tiermodell, aus dem die Zellen extrahiert wurden, sehr unterschiedliche Ergebnisse. Beispielsweise zeigten kultivierte Astrozyten von Sprague-Dawley Ratten eine CB_1 Expression (Bouaboula et al. 1995, Sanchez et al. 1998a), Astrozyten von OFA Ratten jedoch nicht (Jung M. et al. 1997). Bei Mäusen verhält es sich ähnlich verwirrend. Molina-Holgado et al. konnten in Astrozyten von CD1 Mäusen CB_1 nachweisen, wohingegen Walter et Stella dies in Astrozytenkulturen von C57BL/6-Mäusen nicht konnten (Molina-Holgado F. et al. 2002b, Walter et Stella 2003). Ich konnte demgegenüber in Astrozyten der in meinem Labor ebenfalls genutzten C57BL/6-Mäuse CB_1 nachweisen. Diese unterschiedlichen und zum Teil widersprüchlichen Ergebnisse könnten aber möglicherweise weniger mit den verschiedenen Tierspezies und -familien zusammenhängen, sondern vielmehr mit Abweichungen von der Methodik zur Gewinnung der Proben und den Zellkulturkonditionen und dementsprechend variierenden Zellzuständen (Stella 2009). Daher gibt es immer noch einige Unklarheiten bezüglich der Rolle von CB_1 in Astrozyten. Es wird diesbezüglich jedoch angenommen, dass Astrozyten durch die Stimulierung von CB_1 eine wichtige Funktion im metabolischen Stoffwechsel spielen via Energiebereitstellung und dem Auf- und Abbau von Stoffwechselprodukten (Blazquez et al. 1999, Sanchez et al. 1998b). Dafür würde auch die hauptsächliche Expression in den perivaskulären Ausläufern der Zellen sprechen, da diese an der Blut-Hirn-Schranke maßgeblich beteiligt sind. Es gilt allerdings noch weitere Kenntnisse über die Funktion von CB_1 auf Astrozyten zu gewinnen, um definitive Rückschlüsse ziehen zu können und bestehende Ungereimtheiten auszuräumen.

Über die Expression von CB1 in Oligodendrozyten gibt es insgesamt nur wenig Informationen. Molina-Holgado et al. konnten CB_1 in Oligodendrozyten aus Zellkulturen und *in situ* nachweisen und zeigen, dass diese eine bedeutende Rolle für das Überleben der Zellen spielen und die Reifung der oligodendrozytären Vorläuferzellen positiv beeinflussen (Gomez et al. 2011, Molina-Holgado E. et al. 2002a). Es gibt aber noch große Wissenslücken bezüglich der Involvierung des ECS in Oligodendrozyten, die es zu füllen gilt.

Die Expression von CB_1 in kultivierten Mikroglia und Mikroglia-Zelllinien wurde von mehreren Studien beschrieben (Carlisle et al. 2002, Carrier et al. 2004, Facchinetti et al. 2003, Molina-Holgado E. et al. 2002a, Sinha et al. 1998, Stefano et al. 1996, Waksman et al. 1999). Die genaue Beurteilung ihrer Funktion ist allerdings bisher

unklar, da nur sehr geringe Mengen des Proteins exprimiert werden und dies vornehmlich in intrazellulären Bestandteilen (Walter et al. 2003). CB_1 wird jedoch in engem Zusammenhang mit der NO-Produktion von Mikroglia gebracht, obwohl diesbezüglich auch unterschiedliche Ansichten bestehen (Stella 2009, Wyss-Coray et Mucke 2002).

Da ich als erstes die CB_1-Expression mittels qPCR untersucht habe und dort das vornehmliche Vorkommen in Neuronen feststellen konnte, waren die Ergebnisse sehr gut mit den in der Literatur beschriebenen Informationen vereinbar. Auf Proteinebene zeigte die Analyse mittels Westernblot hingegen widersprüchliche Ergebnisse mit der geringsten Expression in Neuronen und starker Expression in Astrozyten. Folglich wurden zwei Hypothesen aufgestellt, um diese deutliche Divergenz erklären zu können und die Möglichkeit einer fehlerhaften Methodik zu untersuchen. Zum einen wurde vermutet, dass die primären Neurone, welche ungefähr 7 Tage kultiviert wurden und somit im Schnitt deutlich kürzer als die Zellkulturen der Gliazellen, noch nicht den vollen Umfang an CB_1 exprimierten. Dementsprechend haben wir mehrere Versuche mit Neuronen, welche 14 Tage, anstatt der üblichen 7, kultiviert wurden, durchgeführt, um zu sehen, ob sich hierbei Veränderungen in der Proteinexpression von CB_1 zeigen. Dies konnte ich jedoch nicht feststellen.
Zum anderen könnte der Unterschied der Unspezifität des Erstantikörpers verschuldet sein, da ähnliches öfters in der Literatur beschrieben wurde. Daher habe ich die bereits geblotteten PVDF Membranen mit einem weiteren CB_1-Antikörper inkubiert und wie gewohnt analysiert. Es zeigten sich jedoch identische Expressionsmuster wie beim ursprünglichen Erstantikörper, sodass auch dieser Fehler ausgeschlossen werden konnte.
Dementsprechend gehe ich von einer unterschiedlichen Expression von CB_1 auf mRNA- und Proteinebene in dieser Zellkultur aus. Wie oben bereits beschrieben, könnten die Ergebnisse auf die Umstände der Zellkultur und der damit verbundenen verschiedenen Aktivitätszustände der Zellen zurückzuführen sein.

Die zelluläre Lokalisation von CB_1 in zentralen und peripheren Neuronen befindet sich hauptsächlich in der Präsynapse, wo es auch durch Inhibition der Ausschüttung regulierend auf das Neurotransmittersystem wirkt (Mechoulam et

Parker 2013). Dies konnte durch einige elektronenmikroskopische Untersuchungen gezeigt werden (Katona et al. 1999, Marsicano et Lutz 1999, Tsou et al. 1999). CB_1 konnte jedoch auch postsynaptisch und in perivaskulären Astrozyten und anderen Gliazellen gefunden werden (Rodriguez et al. 2001).
In meinen Untersuchungen konnte ich ebenfalls positive Signale von CB_1 in den Dendriten der Neurone feststellen, was auf die präsynaptische Lokalisation des Proteins hinweist. Weiterhin konnte die deutliche Expression des Proteins in kultivierten Astrozyten gezeigt werden, was sich wiederum mit den Ergebnissen von Rodriguez et al. deckt. Demgegenüber konnte ich keine deutlichen Signale von CB_1 in Oligodendrozyten und Mikroglia nachweisen. Die Expression von CB_1 in diesen Zellen ist zwar beschrieben, jedoch nur in sehr geringen Mengen. Es ist dementsprechend gut möglich, dass unsere Fluoreszenzbilder zu ungenau und unzureichend sind, eine aussagekräftige Beurteilung der zellulären Lokalisation von CB_1 in Oligodendrozyten und Mikroglia zu treffen.

4.2.2 Expression von CB_2 in primären Neuronen und Gliazellen

In dieser Studie konnten gezeigt werden, dass im Vergleich der vier zentralen Zelltypen des zentralen Nervensystems in Primärkultur, CB_2 Rezeptoren auf mRNA- und Proteinebene maßgeblich von Mikroglia exprimiert werden, in deutlich geringeren Mengen von Astrozyten und Oligodendrozyten und kaum von Neuronen.
Diese Ergebnisse sind in Einklang mit anderen Forschungsgruppen, welche gleichermaßen zeigen konnten, dass CB_2 von Mikroglia in Zellkultur exprimiert wird (Carlisle et al. 2002, Facchinetti et al. 2003, Klegeris et al. 2003, Walter et al. 2003). Zudem konnte CB_2 in BV-2 Zellen, einer Mikroglia-Zelllinie, nachgewiesen werden (Carrier et al. 2004, Walter et al. 2003).
Generell geht man jedoch davon aus, dass CB_2 kaum oder nur in sehr geringen Mengen von gesundem ZNS Zellen exprimiert wird (Malfitano et al. 2014). Diese These wird durch das nur sehr geringe Vorkommen von CB_2 mRNA in gesundem Hirngewebe der Ratte unterstützt (Brown et al. 2002, Griffin et al. 1999). Es wird hingegen beobachtet, dass bei Vorliegen von pathologischen Prozessen die Menge an CB_2 im ZNS drastisch zunimmt (Mechoulam et Parker 2013). Dies ist zum einen durch die Einwanderung von Immunzellen zu erklären, welche bekanntermaßen CB_2 exprimieren (Stella 2004). Zum anderen werden durch

verschiedene neuropathologische Prozesse unterschiedliche Aktivierungszustände von Mikroglia hervorgerufen und folglich die Expression von CB_2 beeinflusst (Stella 2010). Dies konnte zum Beispiel in einer in vivo Studie von Maresz et al. gezeigt werden, bei der CB_2 in Mikroglia bei neuroinflammatorischen Prozessen hochreguliert wurde (Maresz et al. 2005). Benito et al. konnte dies ebenso bei postmortalen Proben von Patienten mit Alzheimer feststellen. Dort zeigte sich eine starke CB_2 Expression besonders in Zusammenhang mit senilen Plaques (Benito et al. 2003). Gleichermaßen verhielt es sich bei MS- und ALS-Patienten, bei denen ebenfalls eine erhöhte CB_2 Expression im Gehirn festgestellt werden konnte. (Yiangou et al. 2006).

Es ist wenig bekannt über die Expression von CB_2 in Astrozyten und Oligodendrozyten. Walter und Stella konnten keine Expression von CB_2 in Astrozyten nachweisen (Walter et Stella 2003). Die Gruppe um Molina-Holgado konnte in einer Studie das Vorkommen von CB_2 in ausgereiften Oligodendrozyten und ihren Vorläuferzellen in Zellkultur nachweisen (Molina-Holgado E. et al. 2002a). Da CB_2 jedoch kaum in gesundem Hirngewebe nachzuweisen ist, stellt sich auch hier die Frage, ob die Expression in diesen Zellen ebenso wie in Mikroglia durch die Bedingungen der Zellkultur beeinflusst wird.

Besonders die Expression von CB_2 in Neuronen ist umstritten. Wie erwähnt konnte in vielen Fällen CB_2 nur in Gehirnen mit vorliegenden pathologischen Prozessen nachgewiesen werden (Garcia-Gutierrez et Manzanares 2011). Einige Studien hingegen beschreiben das Vorhandensein von CB_2 im Gehirn. Diese Studien beziehen sich vor allem auf die verschiedenen Hirnareale und beabsichtigen auf diese Weise Erkenntnisse über die Funktion von CB_2 an diesen Stellen zu erlangen. Zusammenfassend konnte eine dichte Expression von CB_2 in den Laminae III und V der orbitofrontalen, visuellen, auditiven, motorischen und olfaktorischen Cortexes, sowie in pyramidalen Neuronen des Hippocampus, im Striatum, der Amygdala, in Teilen des Hirnstamms (Nucleus nervi facialis, Nucleus cochlearis posterior) und im Cerebellum, dort vor allem in der Purkinje-Zellschicht, festgestellt werden (Gong et al. 2006, Lu Q. et al. 2000, Onaivi et al. 2006, Ross et al. 2001). Eine geringe Densität von CB_2 zeigte sich im Dienzephalon (Gong et al. 2006). Weitere Studien konnten ähnliche Ergebnisse zeigen und diese etwas weiter präzisieren (Baek et al. 2008, Brusco et al. 2008a, Brusco et al. 2008b,

Lanciego et al. 2011, Suarez et al. 2008, Suarez et al. 2009, Van Sickle et al. 2005).

In einer neueren Publikation von 2012 haben sich Onaivi et al. aufgrund der vergleichsweise geringen Datenlage gegenüber CB_1 genauer mit der CB_2-Rezeptor Expression im Gehirn auseinandergesetzt (Onaivi et al. 2012). Dabei untersuchten sie dessen genomische Struktur von Maus und Mensch und fanden heraus, dass dieser in zwei Isoformen, CB_2A und CB_2B, vorkommt, welche ein bestimmtes gewebespezifisches Auftreten aufwiesen. CB_2A mRNA konnte neben der Peripherie in verschiedenen Hirnregionen wie dem Nucleus caudatus, Amygdala, Hippocampus, Zerebellum, Nucleus accumbens, Putamen und dem Kortex nachgewiesen werden, wohingegen CB_2B mRNA im Gehirn nicht in signifikanten Mengen gefunden werden konnte (Liu et al. 2009).

Unsere Ergebnisse bezüglich der CB_2 Expression sind gut zu erklären, da primäre Mikroglia durch den Prozess der Kultivierung in einen aktivierten Zustand versetzt werden und somit die CB_2 Expression hochreguliert wird (Becher et Antel 1996). Zudem sind Mikroglia die Immunzellen des ZNS und über CB_2 werden, wie auch in anderen Geweben wie beispielsweise der Milz, immunmodulatorische Effekte vermittelt.

Die zelluläre Lokalisation von CB_2 ist durch unsere Immunzytochemie schwierig zu beurteilen. Das Fluoreszenzsignal befindet sich vornehmlich um den Zellkern, ist jedoch bei allen vier Zelltypen nur sehr schwach ausgeprägt, sodass die Auswertbarkeit der Bilder unzureichend erscheint. Onaivi et al. beschreiben in ihrer Studie über die subzelluläre Lokalisation von CB_2 in immunhistologischen Schnitten des Rattengehirns eine Expression in Neuronen und Gliazellen vor allem auf der Plasmamembran an synaptischen Kontaktstellen. Dies deutet auf eine postsynaptische Expression hin, im Gegensatz zur der oben beschriebenen präsynaptischen Expression von CB_1 (Gong et al. 2006, Onaivi et al. 2006). Zudem zeigten sich in Neuronen Signale im Soma, genauer im rauen endoplasmatischen Retikulum und im Golgi Apparat, was auf die Synthese des Proteins schließen lässt (Onaivi et al. 2012).

4.2.3 Expression der MAGL in primären Neuronen und Gliazellen

Die Abbauenzyme der Endocannabinoide wurden in den letzten Jahren besonders ausgiebig untersucht, da sie einen interessanten Ansatz für pharmakologische Interventionen darstellen. Gerade bei MAGL gab es lange Zeit Probleme mit unspezifischen Antikörpern, was mittlerweile jedoch deutlich gebessert werden konnte. Pasquarelli et al. konnten in meinem Labor die Spezifität des hier verwendeteten MAGL-Antikörpers bereits zeigen (Pasquarelli et al. 2015).
In meinen Versuchen zur zellulären Expression von MAGL konnte ich zeigen, dass diese hauptsächlich sowohl als mRNA, als auch als Protein in Astrozyten vorliegt und vergleichsweise wenig in Mikroglia.
Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit neueren Studien, welche ebenfalls die Expression von MAGL in Astrozyten feststellen konnten (Docs et al. 2015, Tanimura et al. 2012, Uchigashima et al. 2011).
Ebenso geben ältere Studien aufschlussreiche Informationen über die Expression von MAGL im ZNS. Dinh et al. konnten 2002 im Gehirn der Ratte mittels *In-situ-Hybridisierung* hohe Spiegel an MAGL-mRNA im Kortex, dort besonders in Laminae 4,5 und 6, im CA3 Feld des Hippokampus, im Kleinhirn und im anterioren Thalamus, vor allem im anterodorsalen Nucleus, nachweisen (Dinh et al. 2002).
Die Ergebnisse konnten durch Gulyas et al. bestätigt und erweitert werden. Sie zeigten zusätzlich eine starke Expression von MAGL in CA3 Pyramidenzellen, Körnerzellen und einigen Interneuronen des Hippokampus (Gulyas et al. 2004). Zudem konnten sie MAGL lediglich im Stratum moleculare des Kleinhirns nachweisen und nicht in den FAAH-positiven Purkinje-Zellen (Gulyas et al. 2004). Tanimura et al. zeigten ebenfalls mittels Immunhistochemie eine starke Expression im Stratum moleculare und in den synaptischen Enden der Parallelfasern (Tanimura et al. 2012). Eine weitere Studie zeigte eine Expression von MAGL in glutanergen Neuronen im Hippokampus von Menschen (Ludanyi et al. 2011).
Auch die Expression von MAGL in Gliazellen wurde beschrieben. Zum einen konnte die Expression von MAGL in Astrozyten des Gyrus dentatus (Uchigashima et al. 2011), des Hippokampus (Di et al. 2013) und des Hinterhorns des Rückenmarks (Docs et al. 2015) gezeigt werden. Zum anderen konnte MAGL ebenso in Bergmann-Glia (Ludanyi et al. 2011, Tanimura et al. 2012) des Kleinhirns und in kultivierten Astrozyten nachgewiesen werden (Walter et al.

2004). MAGL konnte zudem in kultivierten Mikroglia nachgewiesen werden (Witting et al. 2004a), Dócs et al. konnten in ihrer Studie im Hinterhorn des Rückenmarks jedoch keine Expression von MAGL in Mikroglia feststellen (Docs et al. 2015).

Unsere Untersuchung der subzellulären Lokalisation von MAGL in den primären ZNS Zellen durch Immunzytochemie ergab in Neuronen und Astrozyten eine ubiquitäre Verteilung im Zellkörper, wohingegen in Mikroglia nur zellkernnah ein Signal festgestellt werden konnte. Oligodendrozyten zeigen dagegen kein Fluoreszenz-Signal.
Gulyas et al. konnten in ihrer Studie von 2004, in der sie die Verteilung von MAGL und FAAH im Gehirn der Ratte verglichen, zeigen, dass MAGL in den präsynaptischen Enden im Axon der Neurone exprimiert wird, im Gegensatz zum postsynaptisch exprimierten FAAH. Eine Lokalisation im Zytoplasma der präsynaptischen Enden zeigten ebenfalls Dinh et al. (Dinh et al.)

Es scheint daher in der Gesamtschau der Ergebnisse dieser und anderer Studien, dass Mikroglia eine geringe Rolle in der Degradation von 2-AG spielen. Vielmehr wird diese von Astrozyten und einzelnen Neuronenpopulationen übernommen. Es ist jedoch nicht zu vernachlässigen, dass auch andere Enzyme wie COX-2 oder ABHD6 und ABHD12 im Stande sind, 2-AG zu hydrolisieren und dafür möglicherweise lokalisationsspezifisch verantwortlich sind.

4.2.4 Expression der FAAH in primären Neuronen und Gliazellen

Bei der Analyse der Expression von FAAH in den primären ZNS Zellen konnten wir feststellen, dass diese, ähnlich wie MAGL, auf beiden Ebenen vor allem durch Astrozyten erfolgt, aber zusätzlich auch in gleichen Mengen von Neuronen. Wiederum konnte im Vergleich keine wesentliche Expression in Mikroglia gezeigt werden.
Im Gegensatz zu MAGL sind die molekularen Eigenschaften und das Verteilungsmuster von FAAH besser beschrieben (Pazos et al. 2005). In Gehirnen von Menschen und Ratten konnte eine ähnliche Verteilung von FAAH festgestellt werden, welche sich teilweise auf ganz bestimmte Zellpopulationen beschränkt. Hohe Konzentrationen in neuralen Zellen konnten in kortikalen Pyramidenzellen,

striatalen und striatoefferenten Projektionsneuronen, Purkinjezellen, sowie in der molekularen und granulären Zellschicht des Kleinhirns, dem Nucleus olivaris inferius und Kernen des Hypothalamus, des Mittelhirns und des Kleinhirns gefunden werden (Egertova et al. 2003, Romero et al. 2002, Suarez et al. 2008, Tsou et al. 1998b). Bereits in diesen Studien konnte eine große Konvergenz der Verteilung von FAAH mit CB_1 festgestellt werden. Egertova et al. haben sich detailiert mit dieser These auseinandergesetzt und konnten sie weiter präzisieren. Dabei haben sie die Verteilung von FAAH und CB_1 in Gehirnen von Mäusen untersucht und verglichen und konnten zeigen, dass der Hauptteil an FAAH mit Neuronen assoziiert ist, was nach ihrer Ansicht auch die größte Relevanz für das Endocannabinoidsystem darstelle (Egertova et al. 2003). In Kernen des Thalamus und des Kleinhirns und im Nucleus mesencephalicus nervi trigemini konnten sie eine starke Expression von FAAH ohne eine Coexpression mit CB_1 feststellen. Dies könnte, so spekulieren sie, durch das Vorhandensein von einem weiteren, noch unbekannten Anandamid-Rezeptor zu erklären sein oder durch ähnliche Signalmoleküle, welche ihre Effekte nicht durch Cannabinoid-Rezeptoren vermitteln (Egertova et al. 2003). Eine deutliche Coexpression der beiden Proteine konnten sie hingegen im zerebellärem Kortex, im Hippokampus, im Neokortex, im olfaktorischen Kortex, in der Amygdala und im Gyrus dentatus ermitteln (Egertova et al. 2003).

Neben der neuronalen Expression von FAAH konnte in dieser Studie auch gezeigt werden, dass FAAH von Oligodendrozyten im Nucleus caudatus, im Mittelhirn, in Umgebung der Kleinhirnkerne und im Nucleus mesencephalicus nervi trigemini exprimiert wird. Außerdem konnte ein positives Signal von FAAH in Ependymzellen der Ventrikel nachgewiesen werden (Egertova et al. 2003) Inwieweit diese aber in das Endocannbinoidsystem involviert sind, bleibt offen. Darüber hinaus konnte FAAH in humanen Astrozyten des Kortex und der Basalganglien gefunden werden, jedoch in wesentlich geringeren Mengen als in Neuronen (Romero et al. 2002). In Gliazellen von Ratten konnte FAAH nicht in wesentlichen Mengen nachgewiesen werden (Egertova et al. 1998, Tsou et al. 1998b). Benito et al. konnten 2003 in Proben von postmortalen Alzheimer-Patienten eine Erhöhung von FAAH und dessen Aktivität in Astrozyten feststellen, welche um die beta-amyloiden Plaques gelagert waren. Dies galt jedoch nicht für andere Gliazelltypen wie Mikroglia (Benito et al. 2003). In kultivierten Mikroglia

konnte jedoch die Expression von FAAH nachgewiesen werden (Witting et al. 2004a).

Mittels der Immunzytochemie konnten wir zeigen, dass FAAH in Neuronen und Astrozyten großflächig exprimiert wird. Die Signale sind deutlich über das ganze Soma verteilt und reichen bei Neuronen bis in die Dendriten. In Mikroglia befindet sich das FAAH-spezifische Signal zellkernnah, wohingegen sich in Oligodendrozyten wiederum nur ein geringes Signal nachweisen lässt.

Gulyas et al. zeigten in ihrer Studie zur zellulären Lokalisation von FAAH im zentralen Nervensystem eine postsynaptische Expression im somatodendritischen Kompartment der Kernneurone des Hippokampus, im Gegensatz zu MAGL, die vornehmlich präsynaptisch lokalisiert war (Gulyas et al. 2004). Zudem konnten sie eine starke Assoziation von FAAH in Kleinhirn und Hippokampus mit der zytoplasmatischen Seite des Glatten Endoplasmatischen Retikulums und der Mitochondrien feststellen (Gulyas et al. 2004).

4.2.5 2-AG- und AEA-Expression im ZNS

Die Expression der Endocannabinoide im zentralen Nervensystem ist weitaus geringer untersucht als die der zugehörigen Rezeptoren. Dies ist mit Sicherheit auch auf die damit verbundene kompliziertere Methodik zurückzuführen. Dennoch sind in der Literatur einige Studien vorhanden, welche die Expression der Endocannabinoide, vornehmlich von AEA und 2-AG, im ZNS und in den verschiedenen Zelltypen untersuchen.

Es konnten hohe Spiegel an AEA im Hippocampus, Thalamus, Striatum und Hirnstamm nachgewiesen werden. In etwas geringerem Umfang auch im Kleinhirn und Kortex (Bisogno et al. 1999, Felder et al. 1996). Demgegenüber konnte 2-AG in ungefähr 150 Mal höheren Mengen als AEA im Gehirn der Ratte nachgewiesen werden, insbesondere im Hirnstamm, Hippocampus, Striatum und Medulla oblongata (Bisogno et al. 1999).

In der Zellkultur konnte die Endocannabinoid-Produktion in primären Neuronen, Mikroglia, Astrozyten und isolierten Makrophagen nachgewiesen werden (Di Marzo et al. 1999, Di Marzo et al. 1994, Wagner et al. 1997, Walter et al. 2002, Walter et al. 2003). Dabei konnten Walter et al. zeigen, dass kultivierte Mikroglia etwa 20 Mal mehr Endocannabinoide als kultivierte Neurone oder Astrozyten

produzieren (Walter et al. 2002, Walter et al. 2003). Die Menge und die Art des Endocannbinoids waren jedoch abhängig vom verwendeten Stimulus (Stella 2004). Mikroglia könnten demnach im aktivierten Zustand der Hauptbereitsteller von Endocannabinoiden im ZNS sein (Stella 2009).

In unseren Versuchen konnten wir die Produktion von 2-AG und AEA in primären Astrozyten nachweisen. Dabei zeigte sich, dass 2-AG von Astrozyten etwa 400x mehr exprimiert wurde als AEA. Die Konzentration von AA war mit 6000 nmol/l am größten. Das war zu erwarten, da AA ein Abbauprodukt beider Endocannabinoide ist und einen wichtigen Metaboliten zur Synthese verschiedenster Substanzen darstellt.

Bei dreißigminütiger Inkubation der Zellen mit dem MAGL-Inhibitor KML29 zeigte sich eine angedeutete Erhöhung der 2-AG- und AEA-Spiegel ohne signifikante Relevanz. Die AA-Spiegel waren ebenfalls leicht erhöht, jedoch zeigte dort auch die DMSO-Kontrolle deutlich höhere Spiegel im Vergleich zur PBS-Kontrolle, was eigentlich nicht der Fall sein sollte.

Die Erhöhung von 2-AG war zu erwarten und ist gut zu erklären, da es hauptsächlich durch MAGL hydrolisiert wird. Ebenso kann MAGL, allerdings in einem deutlich geringeren Umfang, AEA hydrolisieren, sodass KML29 möglicherweise auch so die AEA-Level beeinflusst. Die erhöhten AA-Spiegel sind hingegen eher widersprüchlich zum erwarteten KML29-Effekt. Da durch MAGL-Inhibition weniger 2-AG hydrolisiert wird, müsste weniger AA anfallen. Allerdings bestehen in diesen Versuchen große Schwankungen der PBS- und DMSO-Kontrollgruppen, was die Aussagekraft der Ergebnisse deutlich einschränkt. Diese Versuche geben erste Hinweise auf die Wirkung von KML29, es ist aber zweifelsohne notwendig die Versuche auszubauen und zu erweitern, um eindeutigere Aussagen über den Effekt von KML29 auf Astrozyten zu treffen. Es wäre zudem von besonderem Interesse, die Endocannabinoid-Produktion der verschiedenen primären Zelltypen des ZNS zu untersuchen und miteinander zu vergleichen. Zudem wäre es interessant zu sehen, wie unterschiedlich der Effekt von KML29 auf die verschiedenen Zellen ist und welcher Zelltyp maßgeblich an der protektiven Wirkung dieser Substanz beteiligt ist.

4.2.6 Bedeutung der Ergebnisse

Wie bereits erwähnt bezieht sich der Großteil der Studien zur Verteilung von Bestandteilen des ECS im zentralen Nervensystem vorrangig auf die verschiedenen Hirnregionen, um auf diese Weise eventuelle Funktionen des ECS beurteilen zu können. Außerdem werden Neurone in den Vordergrund gestellt, da die klassischen tetraiden Effekte von Cannabinoiden maßgeblich durch CB_1-Rezeptoren auf Neuronen hervorgerufen werden.

Diese Studie hat besonderes Augenmerk auf den Vergleich der Bestandteile des ECS zwischen Neuronen und Gliazellen herstellt, um auf diese Weise Hinweise zu erhalten inwieweit letztere für die Funktion des ECS essentiell sind. Dabei ist wichtig zu erwähnen, dass zur Herstellung der Zellkulturen, mit denen ich gearbeitet habe, das gesamte Großhirn verwendet wurde und keine Aussage bezüglich einzelner Zellpopulationen getroffen werden kann. Zudem ist zu bedenken, dass lediglich die Situation *in vitro* untersucht wurde und das komplexe Zusammenspiel der Zelltypen *in vivo* nicht berücksichtigt werden konnte. Dennoch können so wichtige Hinweise auf die Funktionen und Interaktionen der Zellen gegeben werden und Anreize für nachfolgende Studien gesetzt werden.

Ich konnte mit meinen Versuchen bestätigen, dass CB_2 maßgeblich von Mikroglia exprimiert wird und somit eventuelle CB_2-Agonisten primär immunmodulatorische Funktionen im ZNS hätten. Dazu zählt die vermehrte Rekrutierung und Proliferation von Mikroglia in betroffene Hirnregionen (Carrier et al. 2004), welche weniger inflammatorische Substanzen wie TNFα oder freie Radikale ausschütten (Eljaschewitsch et al. 2006, Ramirez et al. 2005). Ebenso könnte durch die Stimulation von CB_2 auf Mirkoglia deren Fähigkeit zur Phagozytose von unerwünschten Zellpartikeln, beispielsweise dem Aβ-Protein, erhöht und die Ausschüttung von trophischen Faktoren wie BDNF gefördert werden (Stella 2009). CB_2-Agonisten wären dementsprechend vielversprechende Substanzen zur Behandlung von neurodegenerativen Erkrankungen, insbesondere von Morbus Alzheimer oder Multipler Sklerose.

CB_1-Rezeptoren zeigten hingegen eine deutliche Divergenz zwischen Expression auf mRNA- und Proteinebene. Dies ist möglicherweise durch die große Anpassungsfähigkeit von Astrozyten zu erklären. Da sie in Zellkultur in verschieden Aktivitätszuständen aufgefunden werden können, könnten sich auch die Expressionsmuster bestimmter Proteine unterscheiden (Lange et al. 2012).

Die Expression von CB_1 wird in vielen Fällen von Neuronen zumindest anfänglich bei pathologischen Veränderungen hochreguliert, um dem Krankheitsprozess so entgegenzusteuern (Laprairie et al. 2012). Dies kann womöglich auch für Astrozyten gelten, was es allerdings noch genauer zu untersuchen gilt. Es ist jedoch anzunehmen, wenn man alle Informationen zu CB_1 in Betracht zieht, dass dieser vor allem *in vivo* von Neuronen exprimiert wird und für diese eine zentrale Rolle spielt. Nichtsdestotrotz ist die Funktion dieses Rezeptors auf Gliazellen nicht zu vernachlässigen und sollte ausführlicher untersucht werden.

Des Weiteren zeigten interessanterweise Astrozyten die stärkste Expression der zwei wichtigsten Abbauenzyme der Endocannabinoide, MAGL und FAAH. Dies lässt auf eine entscheidende Rolle in der Regulierung der Endocannabinoid-Spiegel im Gehirn schließen. Astrozyten könnten demnach eine ganz zentrale Position im ECS des zentralen Nervensystems spielen und am stärksten durch Pharmaka wie KML29 in ihrer Funktion beeinflusst werden. Auch hier sind noch weitere detaillierte Studien erforderlich, um die genaue Funktion dieses Zelltyps im Hinblick auf Endocannabinoide zu beleuchten. Wie oben bereits beschrieben sind Astrozyten sehr anpassungsfähige Zellen, welche im Gehirn eine wichtige Rolle in der Energiebereitstellung und der Immunabwehr spielen. Diese Funktion kann auch auf das ECS übertragen werden, da sie durch die starke Expression der Abbauenzyme für die Regulation der Endocannabinoid-Spiegel maßgeblich verantwortlich sind und diese demnach an verschiedene physiologische oder pathologische Umstände anpassen können.

Unsere eigenen Versuche, kultivierte Astrozyten mit KML29 zu stimulieren, zeigten zwar eine leichte Tendenz die 2-AG und AEA Spiegel zu erhöhen, waren aber noch zu ungenau und experimentell, um genaue Aussagen darüber zu treffen.

Andere Studien weisen allerdings darauf hin, dass MAGL-Inhibitoren durch die Erhöhung der 2-AG-Spiegel eine vielversprechende pharmakologische Behandlungsmöglichkeit darstellen würden. Einerseits führen erhöhte 2-AG-Spiegel zu einer Hochregulierung von CB1 und BDNF, wie in KML29-behandelten Tieren und primären Neuronen gezeigt werden konnte, wodurch neuroprotektive Effekte erzielt werden (Pasquarelli et al. 2017). Andererseits ist 2-AG der natürliche Agonist der CB_2-Rezeptoren und da diese vornehmlich auf Mikroglia exprimiert werden, insbesondere bei neuropathologischen Veränderungen, wirken

MAGL-Inhibitoren zusätzlich antiinflammatorisch. Dies wird noch dadurch verstärkt, dass die Bereitstellung von Arachidonsäure für die Prostaglandinsynthese reduziert wird (Nomura et al. 2011).

4.3 Das ECS als pharmakologisches Target bei neurodegenerativen Erkrankungen

4.3.1 Allgemeines

Aufgrund des weitverbreiteten Vorkommens des ECS im zentralen Nervensystem und den ihm zugeschriebenen neuroprotektiven, antiinflammatorischen und antioxidativen Eigenschaften, wurde schnell die Verbindung zu neurodegenerativen Erkrankungen hergestellt. Zum einen wurden die Bestandteile des ECS in den verschiedenen Erkrankungen und deren Verlauf untersucht, um einen möglichen Zusammenhang herzustellen. Zum anderen wurde die Hypothese aufgestellt, dass dieses als eine vielversprechende pharmakologische Zielstruktur in der Behandlung von Krankheiten dienen könnte, die mit einer neuronalen Schädigung einhergehen. Dementsprechend ist seit Entdeckung der Komponenten des ECS eine rege Forschung in Gang gekommen, um die bereits bekannten pflanzlichen Wirkstoffe wie THC oder CBD auf ihre mögliche Wirkung bei neurodegenerativen Erkrankungen zu untersuchen. Aber ebenso um neue pharmakologische Ansatzpunkte zu finden und synthetische, möglicherweise spezifischere Substanzen zu entwickeln.

Grundlegend kommen zur Erforschung eines möglichen positiven Effekts von Cannabinoiden auf neurodegenerative Erkrankungen *in vitro* und *in vivo* Modelle in Frage. *In vitro* Modelle an betroffenen Zellen geben erste Hinweise auf die Wirksamkeit der Substanzen. Die Verträglichkeit und der Effekt auf die Krankheitsprogression kann mit deren Hilfe aber nur unzureichend beurteilt werden. Dazu wurden in Hinblick auf neurodegenerative Erkrankungen Krankheitsmodelle vornehmlich an der Maus und der Ratte, aber ebenso an Schweinen und Affen entwickelt. Diese sollen die Symptomatik der verschiedenen Erkrankungen möglichst realistisch wiedergeben. Dies ist aufgrund der Komplexität und Vielschichtigkeit neurodegenerativer Erkrankungen nicht vollständig möglich. Im Verlauf der letzten Jahrzehnte wurden jedoch

repräsentative Krankheitsmodelle entwickelt, welche interessante Aufschlüsse liefern können. Die Testung neuer potenzieller Pharmaka an diesen Modellen ist besonders sinnvoll, um die Wirkung auf das Krankheitsgeschehen und die Nebenwirkungen auf den Organismus abschätzen zu können. Dies wurde in Hinblick auf mögliche pharmakologische Zielstrukturen des Endocannabinoidsystems in umfassenden Studien untersucht.
Aber auch die klinische Testung von Substanzen an Patienten wird zunehmend durchgeführt. Dabei sind bisher vor allem phytocannabinoide Substanzen wie THC, CBD oder CBN zum Einsatz gekommen. Es steht jedoch noch aus, die neueren, spezifischeren Substanzen an Patienten zu testen, da das Wirkungs- und Nebenwirkungsprofil noch nicht zufriedenstellend ist.
Nachfolgend wird der aktuelle Standpunkt der Behandlungsmöglichkeit von neurodegenerativen Erkrankungen mit Cannabinoid-Derivaten beleuchtet.

4.3.2 Cannabinoide als Behandlungsoption bei neurodegenerativen Erkrankungen

In zahlreichen Studien an Tiermodellen neurodegenerativer Erkrankungen konnten positive Effekte von natürlichen oder synthetischen Substanzen, welche das ECS beeinflussen, nachgewiesen werden. Allerdings können aufgrund der Komplexität des ECS und der Erkrankungen an sich, je nach Krankheitsstadium, ein Agonismus aber auch ein Antagonismus an bestimmten Rezeptoren förderlich sein, sodass eine modifizierte Herangehensweise erforderlich ist.
Phytocannabinoide wie THC, CBD und CBN zeigten bei verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen positive Wirkungen. Beispielsweise konnte schon 1989 gezeigt werden, dass die Behandlung mit THC in Tiermodellen von MS an Ratten und Schweinen eine geringere Inflammation hervorruft und die Lebensdauer der Tiere verlängert (Lyman et al. 1989). Ebenso konnte THC in einer Studie an SOD-1^{G93A} transgenen Mäusen, einem Tiermodell von ALS, die motorischen Einschränkungen und das Überleben der Tiere verbessern (Raman et al. 2004). Eine Studie mit CBN am gleichen Tiermodell zögerte ebenfalls den Beginn der Erkrankung hinaus, hatte allerdings keinen Effekt auf die Lebensdauer der Tiere (Weydt et al. 2005). Auch bei Alzheimer konnte ein positiver Effekt von THC auf den Krankheitsprozess festgestellt werden. Es zeigte sich eine Inhibition

der Acetylcholinesterase durch THC, welche eine entscheidende Rolle in der Aß-Proteinaggregation spielt (Eubanks et al. 2006).

Genauso konnten synthetische Agonisten an CB_1 und CB_2 in Studien positive Effekte erzielen. Beispielweise konnte in Krankheitsmodellen von MS gezeigt werden, dass CB_1/CB_2-Agonisten Spastik und Tremor der Tiere mildern konnten, wohingegen Antagonisten zu einer Verschlechterung führten (Baker et al. 2000, Buccellato et al. 2011). In SOD-1 transgenen Mäusen konnte der selektive CB_2 Agonist AM-1241 das Auftreten von Symptomen hinauszögern und das Überleben verbessern (Kim K. et al. 2006a, Shoemaker et al. 2007). Ramirez et al. konnten in Experimenten an menschlichen Proben von Alzheimer-Patienten, einem entsprechenden Alzheimer-Modell in Ratten und *in vitro*, zeigen, dass Aβ-induzierte kognitive Defizite und die Aktivierung von Mikroglia durch einen dualen CB_1/CB_2-Rezeptor-Agonist reduziert werden konnten (Ramirez et al. 2005). Ebenso konnte durch CB_1-Agonisten die durch Aβ-Protein stimulierten Astrozyten gehemmt werden (Esposito et al. 2011). Demgegenüber zeigte jedoch auch die Behandlung mit CB1-Antagonisten positive Effekte bei einigen Krankheiten; beispielsweise bei Aβ-induzierter Amnesie (Mazzola et al. 2003) oder an mit MPTP-behandelten Affen, einem Krankheitsmodell von Morbus Parkinson, wo sie, wenn zusammen mit Levo-Dopa gegeben, die Symptomatik verbessern konnten (Cao et al. 2007).

Letztlich gelten Inhibitoren der Degradation der Endocannabinoide als vielversprechende Therapiemöglichkeit, da sie direkt am Ort der Produktion von Endocannabinoiden, also dem betroffenen Hirnareal wirken (Bisogno et Di Marzo 2010). Besonders sind dabei die Hauptenzyme MAGL und FAAH interessant.

Nomura et al. konnten zeigen, dass durch Vorbehandlung mit JZL184, einem irreversiblen MAGL-Inhibitor, LPS-induzierte Neuroinflammation in Mäusen reduziert werden konnte. Jedoch wurde dieser Effekt durch Antagonisten der Cannabinoid-Rezeptoren nicht beeinträchtigt, sodass angenommen wird, dass dieser auf die durch MAGL- Inhibition hervorgerufenen verringerten Prostaglandinspiegel zurückzuführen ist (Nomura et al. 2011). Außerdem beschreiben sie eine geringere Anfälligkeit MAGL-defizienter Mäuse im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen gegenüber der Behandlung mit MPTP (Nomura et al. 2011).

Ebenso wiesen FAAH-defiziente SOD-1^{G93A} Mäuse in einer Studie von Bilsland et al. einen wesentlich späteren Symptombeginn auf, wobei die Lebensdauer der

Tiere nicht beeinflusst war (Bilsland et al. 2006). Durch die Gabe von WIN 55, 212, einem CB_1-Agonisten, konnte dieser Effekt ebenfalls gezeigt werden (Bilsland et al. 2006). Auch in Mausmodellen von Alzheimer konnte die genetische oder pharmakologische Inhibition von MAGL das Gedächtnis und Lernverhalten der Tiere verbessern und darüber hinaus die Dichte der Amyloid-Plaques, die Produktion von inflammatorischen Cytokinen und die Aktivierung von Astrozyten und Mikroglia reduzieren (Chen R. et al. 2012).
In unserer Forschungsgruppe konnte in dem low-copy $SOD1^{G93A}$-Tiermodell von ALS gezeigt werden, dass die Administration von KML29 vor Beginn der Symptomatik diese hinauszögern und das Überleben insgesamt verlängern kann. Darüber hinaus zeigte sich eine Verbesserung der motorischen Fähigkeiten und des Gewichts der Tiere im Vergleich zur Kontrollgruppe (Pasquarelli et al. 2017).

All diese Studien sind nur ein kleiner Ausschnitt der vielen, welche die Effekte von cannabinoiden Substanzen bei neurodegenerativen Erkrankung untersuchen.
Es existiert jedoch ein klarer Mangel an Studien, die diese Ergebnisse auf die Behandlung von Menschen übertragen bzw. die Effekte dort reproduzieren können. Dies ist zum einen auf die schwierige Rechtslage zurückzuführen, da Cannabis oder dessen Derivate in den meistens Ländern illegal sind und so die Durchführung solcher Studien erschwert ist. Zum anderen zeigen diese Substanzen mehr oder minder starke Nebenwirkungen wie Ataxie, Übelkeit, gestörtes Kurzzeitgedächtnis, Schlaganfälle, kognitive und motorische Einschränkung, Halluzinationen, Schwindel, Müdigkeit, in höheren Dosen sogar Psychosen oder Angstzustände (Koppel et al. 2014, Moreira et al. 2009), sodass klinische Studien gegenüber den Patienten unzumutbar wären. Oft beziehen sich die vorhandenen Studien auf freiwillige Umfragen, bei denen Patienten berichten, sich mit Cannabis selbst zu therapieren, meistens in Form von Marijuana.
Eine Erkrankung, die damit besonders häufig in Zusammenhang gebracht wird, ist MS, da viele Betroffene Cannabis konsumieren, um ihre Symptome zu mildern. Sie berichten über geringere Steifheit, weniger Krämpfe, Verbesserung des Schlafs, der Schmerzen, der Kontinenzprobleme und der Mobilität (Pertwee 2007). Allerdings konnte ebenso gezeigt werden, dass sich die kognitive Leistung der MS-Patienten bei längerem Konsum und höheren Dosen verschlechtern kann (Ghaffar et Feinstein 2008). Eine klinische Studie, die an MS-Patienten die

neuroprotektiven Effekte einer THC-Behandlung über einen Zeitraum von 3 Jahren untersuchte, fand keine Hinweise auf Beeinflussung des Krankheitsverlaufs (Zajicek J. et al. 2013). Zahlreiche Studien konnten jedoch den positiven Einfluss von THC auf die Spastik der Patienten feststellen (Flachenecker et al. 2014, Lorente Fernandez et al. 2014, Serpell et al. 2013, Zajicek J. P. et al. 2012, Zajicek J. P. et al. 2005) und Sativex®, ein Mundspray mit THC und CBD als Wirkstoffkombination, ist in vielen Ländern, in Deutschland seit 2011, für diese Indikation zugelassen.

Patientenberichten zufolge kann die Selbstmedikation mit Cannabis auch bei ALS-Betroffenen Symptome wie Schmerzen, Spastik, Krämpfe, verringerter Appetit, übermäßigem Speichelfluss und depressive Verstimmung bessern (Amtmann et al. 2004).

Die Verbesserung bestimmter Symptome von neurodegenerativen Erkrankungen durch Cannabis ist mittlerweile weitgehend anerkannt. Es gibt hingegen keine Hinweise, dass durch den Konsum der Krankheitsprogress zum positiven beeinflusst wird (Velayudhan et al. 2014).

Eine klinische Studie mit Sativex® an Huntington-Patienten konnte beispielsweise keine Verbesserung des Krankheitsverlaufs oder der motorischen, kognitiven und verhaltensbezogenen Fähigkeiten feststellen (Lopez-Sendon Moreno et al. 2016).

Durch die teils freiwilligen Angaben der Patienten ergeben sich Selektionsbias. Es besteht also ein klarer Bedarf nach mehr randomisierten Doppelblind-Studien an Patienten mit ECS-modulierenden Derivaten, um genauere Aussagen treffen zu können.

4.4 Ausblick

Alles in allem ergeben sich nach momentanem Forschungsstand Hinweise darauf, dass das ECS ein interessantes Ziel für pharmakologische Interventionen bei der Behandlung von neurodegenerativen Erkrankungen darstellt. Eine Möglichkeit besteht in der Verabreichung von Cannabis sativa als medizinisches Produkt. Der Vorteil dieser Substanz ist die weite Verbreitung und die günstige Herstellung. Die immer permissivere Gesetzeslage in Hinblick auf medizinisches Cannabis erleichtert die Verwendung zusätzlich. Allerdings gibt es entscheidende Nachteile.

Es ist pharmakologisch sehr unspezifisch, sodass Nebenwirkungen wie Müdigkeit oder psychiatrische Probleme vermehrt auftreten. Dies wird noch dadurch verstärkt, dass durch den Konsum über längere Zeit die Cannabinoidrezeptoren runterreguliert werden und immer höhere Dosen von Nöten sind. Darüber hinaus stellt die inhalative Applikation durch das Rauchen keine sinnvolle Methode dar, da damit auch das Lungenkrebsrisiko erhöht ist.
Vorteilhafter ist die Verabreichung von einzelnen Wirkstoffen wie THC, CBN oder CBD. Allerdings haben diese ebenso mehrere pharmakologische Ansatzpunkte und, im Falle von THC, ein klassisches Nebenwirkungsprofil. Dieses kann jedoch, wie im Falle von Sativex®, mit der Coadministration mit CBD gemindert werden.
Cannabinoid-Rezeptor-Agonisten oder –Antagonisten haben den Vorteil, dass sie ein sehr spezifisches pharmakologisches Ziel aufweisen. Allerdings sind die Rezeptoren in verschiedenen Erkrankungen unterschiedlich betroffen und werden auch in Hirnregionen, wo keine Krankheitsaktivität herrscht, beeinflusst. So können ebenfalls unerwünschte, bzw. sogar entgegengesetzte Wirkungen auftreten. Dies ist vor allem bei CB_1-Agonisten bekannt, da sie in höheren Dosen die typischen tetraiden Effekte hervorrufen können. Daraus folgt, dass sie je nach Erkrankung und Krankheitsstadium an die jeweiligen biologischen Veränderungen angepasst eingesetzt werden müssen.
Außerdem besteht die Möglichkeit, sich durch Hemmung der Endocannabinoid-Degradation mittels MAGL- oder FAAH-Inhibitoren die körpereigenen Endocannbinoide zunutze zu machen. Wie oben bereits beschrieben, haben diese Substanzen den Vorteil, dass sie vor allem dort wirken, wo hohe Spiegel des jeweiligen Endocannabinoids anfallen, also in aktiven Krankheitsarealen. Jedoch können auch diese Substanzen typische Nebenwirkungen aufweisen. Dies gilt besonders für duale MAGL/ FAAH-Inhibitoren, die deshalb wahrscheinlich keine klinische Bedeutung besitzen. Ein möglicher Nachteil besteht darüber hinaus auch in der konsekutiven Runterregulierung der Cannabinoid-Rezeptoren bei längerer Behandlungsdauer mit höheren Dosen.

Es ergeben sich folglich mehrere Ziele der Forschung auf diesem Gebiet. Erstens bedarf es eines noch besseren Grundverständnisses der neurodegenerativen Erkrankungen und der Rolle, die dabei das ECS spielt. Zweitens besteht die pharmakologische Herausforderung, Substanzen zu entwickeln, die noch

spezifischer wirken, möglicherweise sogar nur in einzelnen Hirnarealen, um unerwünschte Nebenwirkungen zu vermeiden. Zuletzt sollten die vorhandenen Wirkstoffe auf ihre Effektivität und ihre Verträglichkeit umfassender untersucht und vor allem falls möglich klinische Studien mit betroffenen Patienten durchgeführt werden.

5 Zusammenfassung

Neurodegenerative Erkrankungen wie Morbus Alzheimer, Morbus Parkinson, Multiple Sklerose, Amyotrophe Lateralsklerose oder Chorea Huntington stellen weltweit eine Herausforderung für die Gesundheitssysteme dar. Die Betroffenen sind erheblich erkrankt und im Verlauf in hohem Maße auf externe Hilfe angewiesen. Kausale Therapiemöglichkeiten, den Krankheitsprogress zu verhindern oder zu verlangsamen, fehlen weitgehend und den Patienten bleiben oftmals nur symptomatische Behandlungsmöglichkeiten. Es besteht somit die dringende Notwendigkeit, Therapiemöglichkeiten zu entwickeln, welche gezielt ins Krankheitsgeschehen eingreifen und den Verlauf der Erkrankungen mildern können.

Das Endocannabinoidsystem (ECS) stellt in dieser Hinsicht einen besonders interessanten Ansatzpunkt dar, da es maßgeblich entscheidende pathologischen Prozesse neurodegenerativer Erkrankungen wie Exzitotoxizität und Neuroinflammation beeinflussen kann. Das ECS besteht aus den Endocannabinoiden, den zugehörigen Rezeptoren und den für Auf- und Abbau verantwortlichen Enzymen. Vielversprechende pharmakologische Zielstrukturen sind die Cannabinoid-Rezeptoren 1 (CB_1) und 2 (CB_2) und die Abbauenzyme Monoacylglycerol Lipase (MAGL) und Fettsäureamid Hydrolase (FAAH).

In dieser Studie wurden diese vier Proteine in primären Neuronen, Astrozyten, Oligodendrozyten und Mikroglia untersucht, um so Rückschlüsse auf die Funktion und die Effekte möglicher pharmakologischer Interventionen an diesen Zielstrukturen zu ziehen. Dabei konnte bestätigt werden, dass CB_2 primär von Mikroglia exprimiert wird und somit CB_2-Agonisten vermutlich vorwiegend antiinflammatorisch wirken. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Abbauenzyme MAGL und FAAH vor allem in Astrozyten exprimiert werden und diese anscheinend eine ganz wesentliche Rolle in der Regulierung der Endocannabinoid-Spiegel spielen. Diesen Ergebnissen entsprechend sind Astrozyten der Hauptangriffspunkt von MAGL-Inhibitoren wie KML29. Es ist somit lohnenswert die Rolle von Astrozyten im ECS näher zu beleuchten und weiterführend die Endocannabinoid-Spiegel selbst zu untersuchen.

6 Literaturverzeichnis

1. Aguado T, Romero E, Monory K, Palazuelos J, Sendtner M, Marsicano G, Lutz B, Guzman M, Galve-Roperh I: The CB1 cannabinoid receptor mediates excitotoxicity-induced neural progenitor proliferation and neurogenesis. *J Biol Chem 282*: 23892-23898 (2007)

2. Amtmann D, Weydt P, Johnson K L, Jensen M P, Carter G T: Survey of cannabis use in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Am J Hosp Palliat Care 21*: 95-104 (2004)

3. Baek J H, Zheng Y, Darlington C L, Smith P F: Cannabinoid CB2 receptor expression in the rat brainstem cochlear and vestibular nuclei. *Acta Otolaryngol 128*: 961-967 (2008)

4. Baker D, Pryce G, Croxford J L, Brown P, Pertwee R G, Huffman J W, Layward L: Cannabinoids control spasticity and tremor in a multiple sclerosis model. *Nature 404*: 84-87 (2000)

5. Bari M, Battista N, Valenza M, Mastrangelo N, Malaponti M, Catanzaro G, Centonze D, Finazzi-Agro A, Cattaneo E, Maccarrone M: In vitro and in vivo models of Huntington's disease show alterations in the endocannabinoid system. *FEBS J 280*: 3376-3388 (2013)

6. Becher B, Antel J P: Comparison of phenotypic and functional properties of immediately ex vivo and cultured human adult microglia. *Glia 18*: 1-10 (1996)

7. Benito C, Nunez E, Tolon R M, Carrier E J, Rabano A, Hillard C J, Romero J: Cannabinoid CB2 receptors and fatty acid amide hydrolase are selectively overexpressed in neuritic plaque-associated glia in Alzheimer's disease brains. *J Neurosci 23*: 11136-11141 (2003)

8. Benito C, Tolon R M, Pazos M R, Nunez E, Castillo A I, Romero J: Cannabinoid CB2 receptors in human brain inflammation. *Br J Pharmacol 153*: 277-285 (2008)

9. Bilsland L G, Dick J R, Pryce G, Petrosino S, Di Marzo V, Baker D, Greensmith L: Increasing cannabinoid levels by pharmacological and genetic manipulation delay disease progression in SOD1 mice. *FASEB J 20*: 1003-1005 (2006)

10. Bisogno T, Berrendero F, Ambrosino G, Cebeira M, Ramos J A, Fernandez-Ruiz J J, Di Marzo V: Brain regional distribution of endocannabinoids: implications for their biosynthesis and biological function. *Biochem Biophys Res Commun 256*: 377-380 (1999)

11. Bisogno T, Di Marzo V: Cannabinoid receptors and endocannabinoids: role in neuroinflammatory and neurodegenerative disorders. *CNS Neurol Disord Drug Targets 9*: 564-573 (2010)

12. Blankman J L, Cravatt B F: Chemical probes of endocannabinoid metabolism. *Pharmacol Rev 65*: 849-871 (2013)

13. Blazquez C, Sanchez C, Daza A, Galve-Roperh I, Guzman M: The stimulation of ketogenesis by cannabinoids in cultured astrocytes defines carnitine palmitoyltransferase I as a new ceramide-activated enzyme. *J Neurochem 72*: 1759-1768 (1999)

14. Borner C, Smida M, Hollt V, Schraven B, Kraus J: Cannabinoid receptor type 1- and 2-mediated increase in cyclic AMP inhibits T cell receptor-triggered signaling. *J Biol Chem 284*: 35450-35460 (2009)

15. Bouaboula M, Bourrie B, Rinaldi-Carmona M, Shire D, Le Fur G, Casellas P: Stimulation of cannabinoid receptor CB1 induces krox-24 expression in human astrocytoma cells. *J Biol Chem 270*: 13973-13980 (1995)

16. Breivogel C S, Sim-Selley L J: Basic neuroanatomy and neuropharmacology of cannabinoids. *Int Rev Psychiatry 21*: 113-121 (2009)

17. Brown S M, Wager-Miller J, Mackie K: Cloning and molecular characterization of the rat CB2 cannabinoid receptor. *Biochim Biophys Acta 1576*: 255-264 (2002)

18. Brusco A, Tagliaferro P, Saez T, Onaivi E S: Postsynaptic localization of CB2 cannabinoid receptors in the rat hippocampus. *Synapse 62*: 944-949 (2008a)

19. Brusco A, Tagliaferro P A, Saez T, Onaivi E S: Ultrastructural localization of neuronal brain CB2 cannabinoid receptors. *Ann N Y Acad Sci 1139*: 450-457 (2008b)

20. Buccellato E, Carretta D, Utan A, Cavina C, Speroni E, Grassi G, Candeletti S, Romualdi P: Acute and chronic cannabinoid extracts administration affects motor function in a CREAE model of multiple sclerosis. *J Ethnopharmacol 133*: 1033-1038 (2011)

21. Cabral G A, Marciano-Cabral F: Cannabinoid receptors in microglia of the central nervous system: immune functional relevance. *J Leukoc Biol 78*: 1192-1197 (2005)

22. Cabranes A, Venderova K, de Lago E, Fezza F, Sanchez A, Mestre L, Valenti M, Garcia-Merino A, Ramos J A, Di Marzo V, Fernandez-Ruiz J: Decreased endocannabinoid levels in the brain and beneficial effects of agents activating cannabinoid and/or vanilloid receptors in a rat model of multiple sclerosis. *Neurobiol Dis 20*: 207-217 (2005)

23. Cao X, Liang L, Hadcock J R, Iredale P A, Griffith D A, Menniti F S, Factor S, Greenamyre J T, Papa S M: Blockade of cannabinoid type 1 receptors augments the antiparkinsonian action of levodopa without affecting dyskinesias in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-treated rhesus monkeys. *J Pharmacol Exp Ther 323*: 318-326 (2007)

24. Carlisle S J, Marciano-Cabral F, Staab A, Ludwick C, Cabral G A: Differential expression of the CB2 cannabinoid receptor by rodent macrophages and

macrophage-like cells in relation to cell activation. *Int Immunopharmacol 2*: 69-82 (2002)

25. Carrier E J, Kearn C S, Barkmeier A J, Breese N M, Yang W, Nithipatikom K, Pfister S L, Campbell W B, Hillard C J: Cultured rat microglial cells synthesize the endocannabinoid 2-arachidonylglycerol, which increases proliferation via a CB2 receptor-dependent mechanism. *Mol Pharmacol 65*: 999-1007 (2004)

26. Centonze D, Bari M, Rossi S, Prosperetti C, Furlan R, Fezza F, De Chiara V, Battistini L, Bernardi G, Bernardini S, Martino G, Maccarrone M: The endocannabinoid system is dysregulated in multiple sclerosis and in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain 130*: 2543-2553 (2007a)

27. Centonze D, Finazzi-Agro A, Bernardi G, Maccarrone M: The endocannabinoid system in targeting inflammatory neurodegenerative diseases. *Trends Pharmacol Sci 28*: 180-187 (2007b)

28. Chen Q Y, Alarcon S, Tharp A, Ahmed O M, Estrella N L, Greene T A, Rucker J, Breslin P A: Perceptual variation in umami taste and polymorphisms in TAS1R taste receptor genes. *Am J Clin Nutr 90*: 770-779 (2009)

29. Chen R, Zhang J, Wu Y, Wang D, Feng G, Tang Y P, Teng Z, Chen C: Monoacylglycerol lipase is a therapeutic target for Alzheimer's disease. *Cell Rep 2*: 1329-1339 (2012)

30. De Petrocellis L, Vellani V, Schiano-Moriello A, Marini P, Magherini P C, Orlando P, Di Marzo V: Plant-derived cannabinoids modulate the activity of transient receptor potential channels of ankyrin type-1 and melastatin type-8. *J Pharmacol Exp Ther 325*: 1007-1015 (2008)

31. DeSilva T M, Kabakov A Y, Goldhoff P E, Volpe J J, Rosenberg P A: Regulation of glutamate transport in developing rat oligodendrocytes. *J Neurosci 29*: 7898-7908 (2009)

32. Di Filippo M, Pini L A, Pelliccioli G P, Calabresi P, Sarchielli P: Abnormalities in the cerebrospinal fluid levels of endocannabinoids in multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry 79*: 1224-1229 (2008)

33. Di Marzo V, Bisogno T, De Petrocellis L, Melck D, Orlando P, Wagner J A, Kunos G: Biosynthesis and inactivation of the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol in circulating and tumoral macrophages. *Eur J Biochem 264*: 258-267 (1999)

34. Di Marzo V, Fontana A, Cadas H, Schinelli S, Cimino G, Schwartz J C, Piomelli D: Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. *Nature 372*: 686-691 (1994)

35. Di Marzo V, Hill M P, Bisogno T, Crossman A R, Brotchie J M: Enhanced levels of endogenous cannabinoids in the globus pallidus are associated with a reduction in movement in an animal model of Parkinson's disease. *FASEB J 14*: 1432-1438 (2000)

36. Di S, Popescu I R, Tasker J G: Glial control of endocannabinoid heterosynaptic modulation in hypothalamic magnocellular neuroendocrine cells. *J Neurosci 33*: 18331-18342 (2013)

37. Dinh T P, Carpenter D, Leslie F M, Freund T F, Katona I, Sensi S L, Kathuria S, Piomelli D: Brain monoglyceride lipase participating in endocannabinoid inactivation. *Proc Natl Acad Sci U S A 99*: 10819-10824 (2002)

38. Docs K, Hegyi Z, Hollo K, Kis G, Hegedus K, Antal M: Selective axonal and glial distribution of monoacylglycerol lipase immunoreactivity in the superficial spinal dorsal horn of rodents. *Brain Struct Funct 220*: 2625-2637 (2015)

39. Egertova M, Cravatt B F, Elphick M R: Comparative analysis of fatty acid amide hydrolase and cb(1) cannabinoid receptor expression in the mouse brain: evidence of a widespread role for fatty acid amide hydrolase in regulation of endocannabinoid signaling. *Neuroscience 119*: 481-496 (2003)

40. Egertova M, Giang D K, Cravatt B F, Elphick M R: A new perspective on cannabinoid signaling: complementary localization of fatty acid amide hydrolase and the CB1 receptor in rat brain. *Proc Biol Sci 265*: 2081-2085 (1998)

41. Eljaschewitsch E, Witting A, Mawrin C, Lee T, Schmidt P M, Wolf S, Hoertnagl H, Raine C S, Schneider-Stock R, Nitsch R, Ullrich O: The endocannabinoid anandamide protects neurons during CNS inflammation by induction of MKP-1 in microglial cells. *Neuron 49*: 67-79 (2006)

42. Esposito G, Scuderi C, Valenza M, Togna G I, Latina V, De Filippis D, Cipriano M, Carratu M R, Iuvone T, Steardo L: Cannabidiol reduces Abeta-induced neuroinflammation and promotes hippocampal neurogenesis through PPARgamma involvement. *PLoS One 6*: e28668 (2011)

43. Eubanks L M, Rogers C J, Beuscher A E t, Koob G F, Olson A J, Dickerson T J, Janda K D: A molecular link between the active component of marijuana and Alzheimer's disease pathology. *Mol Pharm 3*: 773-777 (2006)

44. Facchinetti F, Del Giudice E, Furegato S, Passarotto M, Leon A: Cannabinoids ablate release of TNFalpha in rat microglial cells stimulated with lypopolysaccharide. *Glia 41*: 161-168 (2003)

45. Farkas S, Nagy K, Jia Z, Harkany T, Palkovits M, Donohou S R, Pike V W, Halldin C, Mathe D, Csiba L, Gulyas B: The decrease of dopamine D(2)/D(3) receptor densities in the putamen and nucleus caudatus goes parallel with maintained levels of CB(1) cannabinoid receptors in Parkinson's disease: a preliminary autoradiographic study with the selective dopamine D(2)/D(3) antagonist [(3)H]raclopride and the novel CB(1) inverse agonist [(1)(2)(5)I]SD7015. *Brain Res Bull 87*: 504-510 (2012)

46. Farquhar-Smith W P, Egertova M, Bradbury E J, McMahon S B, Rice A S, Elphick M R: Cannabinoid CB(1) receptor expression in rat spinal cord. *Mol Cell Neurosci 15*: 510-521 (2000)

47. Felder C C, Nielsen A, Briley E M, Palkovits M, Priller J, Axelrod J, Nguyen D N, Richardson J M, Riggin R M, Koppel G A, Paul S M, Becker G W: Isolation and measurement of the endogenous cannabinoid receptor agonist, anandamide, in brain and peripheral tissues of human and rat. *FEBS Lett 393*: 231-235 (1996)

48. Ferri C P, Prince M, Brayne C, Brodaty H, Fratiglioni L, Ganguli M, Hall K, Hasegawa K, Hendrie H, Huang Y, Jorm A, Mathers C, Menezes P R, Rimmer E, Scazufca M, Alzheimer's Disease I: Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *Lancet 366*: 2112-2117 (2005)

49. Flachenecker P, Henze T, Zettl U K: Nabiximols (THC/CBD oromucosal spray, Sativex(R)) in clinical practice--results of a multicenter, non-interventional study (MOVE 2) in patients with multiple sclerosis spasticity. *Eur Neurol 71*: 271-279 (2014)

50. Gaoni Y, Mechoulam R: Isolation, Structure, and Partial Synthesis of an Active Constituent of Hashish. *Journal of the American Chemical Society 86*: 1646-1647 (1964)

51. Garcia-Gutierrez M S, Manzanares J: Overexpression of CB2 cannabinoid receptors decreased vulnerability to anxiety and impaired anxiolytic action of alprazolam in mice. *J Psychopharmacol 25*: 111-120 (2011)

52. Ghaffar O, Feinstein A: Multiple sclerosis and cannabis: a cognitive and psychiatric study. *Neurology 71*: 164-169 (2008)

53. Glass M, Dragunow M, Faull R L: Cannabinoid receptors in the human brain: a detailed anatomical and quantitative autoradiographic study in the fetal, neonatal and adult human brain. *Neuroscience 77*: 299-318 (1997)

54. Glass M, Dragunow M, Faull R L: The pattern of neurodegeneration in Huntington's disease: a comparative study of cannabinoid, dopamine, adenosine and GABA(A) receptor alterations in the human basal ganglia in Huntington's disease. *Neuroscience 97*: 505-519 (2000)

55. Gomez O, Sanchez-Rodriguez A, Le M, Sanchez-Caro C, Molina-Holgado F, Molina-Holgado E: Cannabinoid receptor agonists modulate oligodendrocyte differentiation by activating PI3K/Akt and the mammalian target of rapamycin (mTOR) pathways. *Br J Pharmacol 163*: 1520-1532 (2011)

56. Gong J P, Onaivi E S, Ishiguro H, Liu Q R, Tagliaferro P A, Brusco A, Uhl G R: Cannabinoid CB2 receptors: immunohistochemical localization in rat brain. *Brain Res 1071*: 10-23 (2006)

57. Gordon S: Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol 3*: 23-35 (2003)

58. Gottlieb M, Wang Y, Teichberg V I: Blood-mediated scavenging of cerebrospinal fluid glutamate. *J Neurochem 87*: 119-126 (2003)

59. Griffin G, Wray E J, Tao Q, McAllister S D, Rorrer W K, Aung M M, Martin B R, Abood M E: Evaluation of the cannabinoid CB2 receptor-selective antagonist, SR144528: further evidence for cannabinoid CB2 receptor absence in the rat central nervous system. *Eur J Pharmacol 377*: 117-125 (1999)

60. Gubellini P, Picconi B, Bari M, Battista N, Calabresi P, Centonze D, Bernardi G, Finazzi-Agro A, Maccarrone M: Experimental parkinsonism alters endocannabinoid degradation: implications for striatal glutamatergic transmission. *J Neurosci 22*: 6900-6907 (2002)

61. Gulyas A I, Cravatt B F, Bracey M H, Dinh T P, Piomelli D, Boscia F, Freund T F: Segregation of two endocannabinoid-hydrolyzing enzymes into pre- and postsynaptic compartments in the rat hippocampus, cerebellum and amygdala. *Eur J Neurosci 20*: 441-458 (2004)

62. Guzman M: Cannabinoids: potential anticancer agents. *Nat Rev Cancer 3*: 745-755 (2003)

63. Habayeb O M, Taylor A H, Bell S C, Taylor D J, Konje J C: Expression of the endocannabinoid system in human first trimester placenta and its role in trophoblast proliferation. *Endocrinology 149*: 5052-5060 (2008)

64. Heneka M T, Carson M J, Khoury J E, Landreth G E, Brosseron F, Feinstein D L, Jacobs A H, Wyss-Coray T, Vitorica J, Ransohoff R M, Herrup K, Frautschy S A, Finsen B, Brown G C, Verkhratsky A, Yamanaka K, Koistinaho J, Latz E, Halle A, Petzold G C, Town T, Morgan D, Shinohara M L, Perry V H, Holmes C, Bazan N G, Brooks D J, Hunot S, Joseph B, Deigendesch N, Garaschuk O, Boddeke E, Dinarello C A, Breitner J C, Cole G M, Golenbock D T, Kummer M P: Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Lancet Neurol 14*: 388-405 (2015)

65. Herkenham M, Lynn A B, de Costa B R, Richfield E K: Neuronal localization of cannabinoid receptors in the basal ganglia of the rat. *Brain Res 547*: 267-274 (1991)

66. Herkenham M, Lynn A B, Little M D, Johnson M R, Melvin L S, de Costa B R, Rice K C: Cannabinoid receptor localization in brain. *Proc Natl Acad Sci U S A 87*: 1932-1936 (1990)

67. Hillard C J: Endocannabinoids and vascular function. *J Pharmacol Exp Ther 294*: 27-32 (2000)

68. Hooten K G, Beers D R, Zhao W, Appel S H: Protective and Toxic Neuroinflammation in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neurotherapeutics 12:* 364-375 (2015)

69. Howlett A C, Barth F, Bonner T I, Cabral G, Casellas P, Devane W A, Felder C C, Herkenham M, Mackie K, Martin B R, Mechoulam R, Pertwee R G: International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacol Rev 54*: 161-202 (2002)

70. Jellinger K A: Neurodegenerative Erkrankungen (ZNS) – Eine aktuelle Übersicht. *Journal für Neurologie, Neurochirurgie und Psychiatrie 6*: 9-18 (2005)

71. Jung K M, Astarita G, Yasar S, Vasilevko V, Cribbs D H, Head E, Cotman C W, Piomelli D: An amyloid beta42-dependent deficit in anandamide mobilization is associated with cognitive dysfunction in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging 33*: 1522-1532 (2012)

72. Jung M, Calassi R, Rinaldi-Carmona M, Chardenot P, Le Fur G, Soubrie P, Oury-Donat F: Characterization of CB1 receptors on rat neuronal cell cultures: binding and functional studies using the selective receptor antagonist SR 141716A. *J Neurochem 68*: 402-409 (1997)

73. Kano M, Ohno-Shosaku T, Hashimotodani Y, Uchigashima M, Watanabe M: Endocannabinoid-mediated control of synaptic transmission. *Physiol Rev 89*: 309-380 (2009)

74. Katona I, Sperlagh B, Sik A, Kafalvi A, Vizi E S, Mackie K, Freund T F: Presynaptically located CB1 cannabinoid receptors regulate GABA release from axon terminals of specific hippocampal interneurons. *J Neurosci 19*: 4544-4558 (1999)

75. Khaspekov L G, Brenz Verca M S, Frumkina L E, Hermann H, Marsicano G, Lutz B: Involvement of brain-derived neurotrophic factor in cannabinoid receptor-dependent protection against excitotoxicity. *Eur J Neurosci 19*: 1691-1698 (2004)

76. Kiernan M C, Vucic S, Cheah B C, Turner M R, Eisen A, Hardiman O, Burrell J R, Zoing M C: Amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet 377*: 942-955 (2011)

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

78. Kim S H, Won S J, Mao X O, Jin K, Greenberg D A: Molecular mechanisms of cannabinoid protection from neuronal excitotoxicity. *Mol Pharmacol 69*: 691-696 (2006b)

79. Klegeris A, Bissonnette C J, McGeer P L: Reduction of human monocytic cell neurotoxicity and cytokine secretion by ligands of the cannabinoid-type CB2 receptor. *Br J Pharmacol 139*: 775-786 (2003)

80. Koppel B S, Brust J C, Fife T, Bronstein J, Youssof S, Gronseth G, Gloss D: Systematic review: efficacy and safety of medical marijuana in selected neurologic disorders: report of the Guideline Development Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology 82*: 1556-1563 (2014)

81. Lanciego J L, Barroso-Chinea P, Rico A J, Conte-Perales L, Callen L, Roda E, Gomez-Bautista V, Lopez I P, Lluis C, Labandeira-Garcia J L, Franco R: Expression of the mRNA coding the cannabinoid receptor 2 in the pallidal complex of Macaca fascicularis. *J Psychopharmacol 25*: 97-104 (2011)

82. Lange S C, Bak L K, Waagepetersen H S, Schousboe A, Norenberg M D: Primary cultures of astrocytes: their value in understanding astrocytes in health and disease. *Neurochem Res 37*: 2569-2588 (2012)

83. Laprairie R B, Kelly M E, Denovan-Wright E M: The dynamic nature of type 1 cannabinoid receptor (CB(1)) gene transcription. *Br J Pharmacol 167*: 1583-1595 (2012)

84. Ledent C, Valverde O, Cossu G, Petitet F, Aubert J F, Beslot F, Bohme G A, Imperato A, Pedrazzini T, Roques B P, Vassart G, Fratta W, Parmentier M: Unresponsiveness to cannabinoids and reduced addictive effects of opiates in CB1 receptor knockout mice. *Science 283*: 401-404 (1999)

85. Lee H G, Zhu X, Casadesus G, Pallas M, Camins A, O'Neill M J, Nakanishi S, Perry G, Smith M A: The effect of mGluR2 activation on signal transduction pathways and neuronal cell survival. *Brain Res 1249*: 244-250 (2009)

86. Lee S F, Newton C, Widen R, Friedman H, Klein T W: Differential expression of cannabinoid CB(2) receptor mRNA in mouse immune cell subpopulations and following B cell stimulation. *Eur J Pharmacol 423*: 235-241 (2001)

87. Liu Q R, Pan C H, Hishimoto A, Li C Y, Xi Z X, Llorente-Berzal A, Viveros M P, Ishiguro H, Arinami T, Onaivi E S, Uhl G R: Species differences in cannabinoid receptor 2 (CNR2 gene): identification of novel human and rodent CB2 isoforms, differential tissue expression and regulation by cannabinoid receptor ligands. *Genes Brain Behav 8*: 519-530 (2009)

88. Locatelli G, Baggiolini A, Schreiner B, Palle P, Waisman A, Becher B, Buch T: Mature oligodendrocytes actively increase in vivo cytoskeletal plasticity following CNS damage. *J Neuroinflammation 12*: 62-74 (2015)

89. Locatelli G, Wortge S, Buch T, Ingold B, Frommer F, Sobottka B, Kruger M, Karram K, Buhlmann C, Bechmann I, Heppner F L, Waisman A, Becher B: Primary oligodendrocyte death does not elicit anti-CNS immunity. *Nat Neurosci 15*: 543-550 (2012)

90. Lopez-Sendon Moreno J L, Garcia Caldentey J, Trigo Cubillo P, Ruiz Romero C, Garcia Ribas G, Alonso Arias M A, Garcia de Yebenes M J, Tolon R M, Galve-Roperh I, Sagredo O, Valdeolivas S, Resel E, Ortega-Gutierrez S, Garcia-Bermejo M L, Fernandez Ruiz J, Guzman M, Garcia de Yebenes Prous J: A double-blind, randomized, cross-over, placebo-controlled, pilot trial with Sativex in Huntington's disease. *J Neurol 263*: 1390-1400 (2016)

91. Lorente Fernandez L, Monte Boquet E, Perez-Miralles F, Gil Gomez I, Escutia Roig M, Bosca Blasco I, Poveda Andres J L, Casanova-Estruch B: Clinical experiences with cannabinoids in spasticity management in multiple sclerosis. *Neurologia 29*: 257-260 (2014)

92. Lu H C, Mackie K: An Introduction to the Endogenous Cannabinoid System. *Biol Psychiatry 79*: 516-525 (2016)

93. Lu Q, Straiker A, Lu Q, Maguire G: Expression of CB2 cannabinoid receptor mRNA in adult rat retina. *Vis Neurosci 17*: 91-95 (2000)

94. Ludanyi A, Hu S S, Yamazaki M, Tanimura A, Piomelli D, Watanabe M, Kano M, Sakimura K, Magloczky Z, Mackie K, Freund T F, Katona I: Complementary synaptic distribution of enzymes responsible for synthesis and inactivation of the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol in the human hippocampus. *Neuroscience 174*: 50-63 (2011)

95. Lyman W D, Sonett J R, Brosnan C F, Elkin R, Bornstein M B: Delta 9-tetrahydrocannabinol: a novel treatment for experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol 23*: 73-81 (1989)

96. Ma D, Lu P, Yan C, Fan C, Yin P, Wang J, Shi Y: Structure and mechanism of a glutamate-GABA antiporter. *Nature 483*: 632-636 (2012)

97. Maccarrone M: Metabolism of the Endocannabinoid Anandamide: Open Questions after 25 Years. *Front Mol Neurosci 10*: 166-175 (2017)

98. Malfitano A M, Basu S, Maresz K, Bifulco M, Dittel B N: What we know and do not know about the cannabinoid receptor 2 (CB2). *Semin Immunol 26*: 369-379 (2014)

99. Maragakis N J, Rothstein J D: Mechanisms of Disease: astrocytes in neurodegenerative disease. *Nat Clin Pract Neurol 2*: 679-689 (2006)

100. Marchalant Y, Baranger K, Wenk G L, Khrestchatisky M, Rivera S: Can the benefits of cannabinoid receptor stimulation on neuroinflammation, neurogenesis and memory during normal aging be useful in AD prevention? *J Neuroinflammation 9*: 10-12 (2012)

101. Maresz K, Carrier E J, Ponomarev E D, Hillard C J, Dittel B N: Modulation of the cannabinoid CB2 receptor in microglial cells in response to inflammatory stimuli. *J Neurochem 95*: 437-445 (2005)

102. Marsicano G, Goodenough S, Monory K, Hermann H, Eder M, Cannich A, Azad S C, Cascio M G, Gutierrez S O, van der Stelt M, Lopez-Rodriguez M L, Casanova E, Schutz G, Zieglgansberger W, Di Marzo V, Behl C, Lutz B: CB1 cannabinoid receptors and on-demand defense against excitotoxicity. *Science 302*: 84-88 (2003)

103. Marsicano G, Lutz B: Expression of the cannabinoid receptor CB1 in distinct neuronal subpopulations in the adult mouse forebrain. *Eur J Neurosci 11*: 4213-4225 (1999)

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

105. Mazzola C, Micale V, Drago F: Amnesia induced by beta-amyloid fragments is counteracted by cannabinoid CB1 receptor blockade. *Eur J Pharmacol 477*: 219-225 (2003)

106. McTigue D M, Tripathi R B: The life, death, and replacement of oligodendrocytes in the adult CNS. *J Neurochem 107*: 1-19 (2008)

107. Mechoulam R, Hanus L O, Pertwee R, Howlett A C: Early phytocannabinoid chemistry to endocannabinoids and beyond. *Nat Rev Neurosci 15*: 757-764 (2014)

108. Mechoulam R, Parker L A: The endocannabinoid system and the brain. *Annu Rev Psychol 64*: 21-47 (2013)

109. Mehta A, Prabhakar M, Kumar P, Deshmukh R, Sharma P L: Excitotoxicity: bridge to various triggers in neurodegenerative disorders. *Eur J Pharmacol 698*: 6-18 (2013)

110. Miller J P, Holcomb J, Al-Ramahi I, de Haro M, Gafni J, Zhang N, Kim E, Sanhueza M, Torcassi C, Kwak S, Botas J, Hughes R E, Ellerby L M: Matrix metalloproteinases are modifiers of huntingtin proteolysis and toxicity in Huntington's disease. *Neuron 67*: 199-212 (2010)

111. Moldrich G, Wenger T: Localization of the CB1 cannabinoid receptor in the rat brain. An immunohistochemical study. *Peptides 21*: 1735-1742 (2000)

112. Molina-Holgado E, Vela J M, Arevalo-Martin A, Almazan G, Molina-Holgado F, Borrell J, Guaza C: Cannabinoids promote oligodendrocyte progenitor survival: involvement of cannabinoid receptors and phosphatidylinositol-3 kinase/Akt signaling. *J Neurosci 22*: 9742-9753 (2002a)

113. Molina-Holgado F, Molina-Holgado E, Guaza C, Rothwell N J: Role of CB1 and CB2 receptors in the inhibitory effects of cannabinoids on lipopolysaccharide-induced nitric oxide release in astrocyte cultures. *J Neurosci Res 67*: 829-836 (2002b)

114. Molochnikov L, Rabey J M, Dobronevsky E, Bonucelli U, Ceravolo R, Frosini D, Grunblatt E, Riederer P, Jacob C, Aharon-Peretz J, Bashenko Y, Youdim M B, Mandel S A: A molecular signature in blood identifies early Parkinson's disease. *Mol Neurodegener 7*: 26-35 (2012)

115. Monory K, Blaudzun H, Massa F, Kaiser N, Lemberger T, Schutz G, Wotjak C T, Lutz B, Marsicano G: Genetic dissection of behavioural and autonomic effects of Delta(9)-tetrahydrocannabinol in mice. *PLoS Biol 5*: 2354-2368 (2007)

116. Moreira F A, Grieb M, Lutz B: Central side-effects of therapies based on CB1 cannabinoid receptor agonists and antagonists: focus on anxiety and depression. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab 23*: 133-144 (2009)

117. Mulder J, Zilberter M, Pasquare S J, Alpar A, Schulte G, Ferreira S G, Kofalvi A, Martin-Moreno A M, Keimpema E, Tanila H, Watanabe M, Mackie K,

Hortobagyi T, de Ceballos M L, Harkany T: Molecular reorganization of endocannabinoid signaling in Alzheimer's disease. *Brain 134*: 1041-1060 (2011)

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

119. Murataeva N, Straiker A, Mackie K: Parsing the players: 2-arachidonoylglycerol synthesis and degradation in the CNS. *Br J Pharmacol 171*: 1379-1391 (2014)

120. Nave K A: Myelination and support of axonal integrity by glia. *Nature 468*: 244-252 (2010)

121. Nicholls D G: Mitochondrial dysfunction and glutamate excitotoxicity studied in primary neuronal cultures. *Curr Mol Med 4*: 149-177 (2004)

122. Nomura D K, Morrison B E, Blankman J L, Long J Z, Kinsey S G, Marcondes M C, Ward A M, Hahn Y K, Lichtman A H, Conti B, Cravatt B F: Endocannabinoid hydrolysis generates brain prostaglandins that promote neuroinflammation. *Science 334*: 809-813 (2011)

123. O'Shaughnessy W B: On the preparation of the Indian hemp, or Gunjah (Cannabis Indica) and their effects on the animal system in health and their utility in the treatment of tetanus and other convulsive disorders. *Trans Med Phys Soc Calcutta 8*: 421-461 (1842)

124. Okubo Y, Sekiya H, Namiki S, Sakamoto H, Iinuma S, Yamasaki M, Watanabe M, Hirose K, Iino M: Imaging extrasynaptic glutamate dynamics in the brain. *Proc Natl Acad Sci U S A 107*: 6526-6531 (2010)

125. Onaivi E S, Ishiguro H, Gong J P, Patel S, Perchuk A, Meozzi P A, Myers L, Mora Z, Tagliaferro P, Gardner E, Brusco A, Akinshola B E, Liu Q R, Hope B, Iwasaki S, Arinami T, Teasenfitz L, Uhl G R: Discovery of the presence and functional expression of cannabinoid CB2 receptors in brain. *Ann N Y Acad Sci 1074*: 514-536 (2006)

126. Onaivi E S, Ishiguro H, Gu S, Liu Q R: CNS effects of CB2 cannabinoid receptors: beyond neuro-immuno-cannabinoid activity. *J Psychopharmacol 26*: 92-103 (2012)

127. Orgado J M, Fernandez-Ruiz J, Romero J: The endocannabinoid system in neuropathological states. *Int Rev Psychiatry 21*: 172-180 (2009)

128. Palazuelos J, Aguado T, Pazos M R, Julien B, Carrasco C, Resel E, Sagredo O, Benito C, Romero J, Azcoitia I, Fernandez-Ruiz J, Guzman M, Galve-Roperh I: Microglial CB2 cannabinoid receptors are neuroprotective in Huntington's disease excitotoxicity. *Brain 132*: 3152-3164 (2009)

129. Panikashvili D, Mechoulam R, Beni S M, Alexandrovich A, Shohami E: CB1 cannabinoid receptors are involved in neuroprotection via NF-kappa B inhibition. *J Cereb Blood Flow Metab 25*: 477-484 (2005)

130. Parolaro D: Presence and functional regulation of cannabinoid receptors in immune cells. *Life Sci 65*: 637-644 (1999)

131. Pasquarelli N, Engelskirchen M, Hanselmann J, Endres S, Porazik C, Bayer H, Buck E, Karsak M, Weydt P, Ferger B, Witting A: Evaluation of monoacylglycerol lipase as a therapeutic target in a transgenic mouse model of ALS. *Neuropharmacology 124*: 157-169 (2017)

132. Pasquarelli N, Porazik C, Hanselmann J, Weydt P, Ferger B, Witting A: Comparative biochemical characterization of the monoacylglycerol lipase inhibitor KML29 in brain, spinal cord, liver, spleen, fat and muscle tissue. *Neuropharmacology 91*: 148-156 (2015)

133. Pazos M R, Nunez E, Benito C, Tolon R M, Romero J: Functional neuroanatomy of the endocannabinoid system. *Pharmacol Biochem Behav 81*: 239-247 (2005)

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

135. Pertwee R G, Howlett A C, Abood M E, Alexander S P, Di Marzo V, Elphick M R, Greasley P J, Hansen H S, Kunos G, Mackie K, Mechoulam R, Ross R A: International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXIX. Cannabinoid receptors and their ligands: beyond CB(1) and CB(2). *Pharmacol Rev 62*: 588-631 (2010)

136. Pisani V, Moschella V, Bari M, Fezza F, Galati S, Bernardi G, Stanzione P, Pisani A, Maccarrone M: Dynamic changes of anandamide in the cerebrospinal fluid of Parkinson's disease patients. *Mov Disord 25*: 920-924 (2010)

137. Puighermanal E, Marsicano G, Busquets-Garcia A, Lutz B, Maldonado R, Ozaita A: Cannabinoid modulation of hippocampal long-term memory is mediated by mTOR signaling. *Nat Neurosci 12*: 1152-1158 (2009)

138. Raman C, McAllister S D, Rizvi G, Patel S G, Moore D H, Abood M E: Amyotrophic lateral sclerosis: delayed disease progression in mice by treatment with a cannabinoid. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord 5*: 33-39 (2004)

139. Ramirez B G, Blazquez C, Gomez del Pulgar T, Guzman M, de Ceballos M L: Prevention of Alzheimer's disease pathology by cannabinoids: neuroprotection mediated by blockade of microglial activation. *J Neurosci 25*: 1904-1913 (2005)

140. Ranieri R, Marasco D, Bifulco M, Malfitano A M: Phytocannabinoids and cannabimimetic drugs: recent patents in central nervous system disorders. *Recent Pat CNS Drug Discov 10:* 157-177 (2016)

141. Rodriguez J J, Mackie K, Pickel V M: Ultrastructural localization of the CB1 cannabinoid receptor in mu-opioid receptor patches of the rat Caudate putamen nucleus. *J Neurosci 21*: 823-833 (2001)

142. Romero J, Hillard C J, Calero M, Rabano A: Fatty acid amide hydrolase localization in the human central nervous system: an immunohistochemical study. *Brain Res Mol Brain Res 100*: 85-93 (2002)

143. Roos R A: Huntington's disease: a clinical review. *Orphanet J Rare Dis 5*: 40-47 (2010)

144. Ross R A, Coutts A A, McFarlane S M, Anavi-Goffer S, Irving A J, Pertwee R G, MacEwan D J, Scott R H: Actions of cannabinoid receptor ligands on rat cultured sensory neurones: implications for antinociception. *Neuropharmacology 40*: 221-232 (2001)

145. Rossi S, Bernardi G, Centonze D: The endocannabinoid system in the inflammatory and neurodegenerative processes of multiple sclerosis and of amyotrophic lateral sclerosis. *Exp Neurol 224*: 92-102 (2010)

146. Rossi S, Furlan R, De Chiara V, Musella A, Lo Giudice T, Mataluni G, Cavasinni F, Cantarella C, Bernardi G, Muzio L, Martorana A, Martino G, Centonze D: Exercise attenuates the clinical, synaptic and dendritic abnormalities of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Neurobiol Dis 36*: 51-59 (2009)

147. Ryberg E, Larsson N, Sjogren S, Hjorth S, Hermansson N O, Leonova J, Elebring T, Nilsson K, Drmota T, Greasley P J: The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor. *Br J Pharmacol 152*: 1092-1101 (2007)

148. Salio C, Doly S, Fischer J, Franzoni M F, Conrath M: Neuronal and astrocytic localization of the cannabinoid receptor-1 in the dorsal horn of the rat spinal cord. *Neurosci Lett 329*: 13-16 (2002)

149. Sanchez C, Galve-Roperh I, Canova C, Brachet P, Guzman M: Delta9-tetrahydrocannabinol induces apoptosis in C6 glioma cells. *FEBS Lett 436*: 6-10 (1998a)

150. Sanchez C, Galve-Roperh I, Rueda D, Guzman M: Involvement of sphingomyelin hydrolysis and the mitogen-activated protein kinase cascade in the Delta9-tetrahydrocannabinol-induced stimulation of glucose metabolism in primary astrocytes. *Mol Pharmacol 54*: 834-843 (1998b)

151. Savinainen J R, Saario S M, Laitinen J T: The serine hydrolases MAGL, ABHD6 and ABHD12 as guardians of 2-arachidonoylglycerol signalling through cannabinoid receptors. *Acta Physiol (Oxf) 204*: 267-276 (2012)

152. Sekiyama K, Sugama S, Fujita M, Sekigawa A, Takamatsu Y, Waragai M, Takenouchi T, Hashimoto M: Neuroinflammation in Parkinson's Disease and Related Disorders: A Lesson from Genetically Manipulated Mouse Models of alpha-Synucleinopathies. *Parkinsons Dis 2012*: 1-8 (2012)

153. Serpell M G, Notcutt W, Collin C: Sativex long-term use: an open-label trial in patients with spasticity due to multiple sclerosis. *J Neurol 260*: 285-295 (2013)

154. Shoemaker J L, Seely K A, Reed R L, Crow J P, Prather P L: 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 (2007)

155. Sinha D, Bonner T I, Bhat N R, Matsuda L A: Expression of the CB1 cannabinoid receptor in macrophage-like cells from brain tissue: immunochemical characterization by fusion protein antibodies. *J Neuroimmunol 82*: 13-21 (1998)

156. Skaper S D, Di Marzo V: Endocannabinoids in nervous system health and disease: the big picture in a nutshell. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 367*: 3193-3200 (2012)

157. Solas M, Francis P T, Franco R, Ramirez M J: CB2 receptor and amyloid pathology in frontal cortex of Alzheimer's disease patients. *Neurobiol Aging 34*: 805-808 (2013)

158. Spandou E, Soubasi V, Papoutsopoulou S, Augoustides-Savvopoulou P, Loizidis T, Pazaiti A, Karkavelas G, Guiba-Tziampiri O: Neuroprotective effect of long-term MgSO4 administration after cerebral hypoxia-ischemia in newborn rats is related to the severity of brain damage. *Reprod Sci 14*: 667-677 (2007)

159. Stefano G B, Liu Y, Goligorsky M S: Cannabinoid receptors are coupled to nitric oxide release in invertebrate immunocytes, microglia, and human monocytes. *J Biol Chem 271*: 19238-19242 (1996)

160. Stella N: Cannabinoid and cannabinoid-like receptors in microglia, astrocytes, and astrocytomas. *Glia 58*: 1017-1030 (2010)

161. Stella N: Cannabinoid signaling in glial cells. *Glia 48*: 267-277 (2004)

162. Stella N: Endocannabinoid signaling in microglial cells. *Neuropharmacology* (2009)

163. Suarez J, Bermudez-Silva F J, Mackie K, Ledent C, Zimmer A, Cravatt B F, de Fonseca F R: Immunohistochemical description of the endogenous cannabinoid system in the rat cerebellum and functionally related nuclei. *J Comp Neurol 509*: 400-421 (2008)

164. Suarez J, Llorente R, Romero-Zerbo S Y, Mateos B, Bermudez-Silva F J, de Fonseca F R, Viveros M P: Early maternal deprivation induces gender-dependent changes on the expression of hippocampal CB(1) and CB(2) cannabinoid receptors of neonatal rats. *Hippocampus 19*: 623-632 (2009)

165. Sun Y, Alexander S P, Kendall D A, Bennett A J: Cannabinoids and PPARalpha signaling. *Biochem Soc Trans 34*: 1095-1097 (2006)

166. Svizenska I, Dubovy P, Sulcova A: Cannabinoid receptors 1 and 2 (CB1 and CB2), their distribution, ligands and functional involvement in nervous system structures--a short review. *Pharmacol Biochem Behav 90*: 501-511 (2008)

167. Swamy M, Sirajudeen K N, Chandran G: Nitric oxide (NO), citrulline-NO cycle enzymes, glutamine synthetase, and oxidative status in kainic acid-mediated excitotoxicity in rat brain. *Drug Chem Toxicol 32*: 326-331 (2009)

168. Tanimura A, Uchigashima M, Yamazaki M, Uesaka N, Mikuni T, Abe M, Hashimoto K, Watanabe M, Sakimura K, Kano M: Synapse type-independent degradation of the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol after retrograde synaptic suppression. *Proc Natl Acad Sci U S A 109*: 12195-12200 (2012)

169. Toth A, Blumberg P M, Boczan J: Anandamide and the vanilloid receptor (TRPV1). *Vitam Horm 81*: 389-419 (2009)

170. Tsou K, Brown S, Sanudo-Pena M C, Mackie K, Walker J M: Immunohistochemical distribution of cannabinoid CB1 receptors in the rat central nervous system. *Neuroscience 83*: 393-411 (1998a)

171. Tsou K, Mackie K, Sanudo-Pena M C, Walker J M: Cannabinoid CB1 receptors are localized primarily on cholecystokinin-containing GABAergic interneurons in the rat hippocampal formation. *Neuroscience 93*: 969-975 (1999)

172. Tsou K, Nogueron M I, Muthian S, Sanudo-Pena M C, Hillard C J, Deutsch D G, Walker J M: Fatty acid amide hydrolase is located preferentially in large neurons in the rat central nervous system as revealed by immunohistochemistry. *Neurosci Lett 254*: 137-140 (1998b)

173. Uchigashima M, Yamazaki M, Yamasaki M, Tanimura A, Sakimura K, Kano M, Watanabe M: Molecular and morphological configuration for 2-arachidonoylglycerol-mediated retrograde signaling at mossy cell-granule cell synapses in the dentate gyrus. *J Neurosci 31*: 7700-7714 (2011)

174. Ueda N, Tsuboi K, Uyama T, Ohnishi T: Biosynthesis and degradation of the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol. *Biofactors 37*: 1-7 (2011)

175. Van der Stelt M, Di Marzo V: Cannabinoid receptors and their role in neuroprotection. *Neuromolecular Med 7*: 37-50 (2005)

176. Van Laere K, Casteels C, Lunskens S, Goffin K, Grachev I D, Bormans G, Vandenberghe W: Regional changes in type 1 cannabinoid receptor availability in Parkinson's disease in vivo. *Neurobiol Aging 33*: 620-628 (2012)

177. Van Sickle M D, Duncan M, Kingsley P J, Mouihate A, Urbani P, Mackie K, Stella N, Makriyannis A, Piomelli D, Davison J S, Marnett L J, Di Marzo V, Pittman Q J, Patel K D, Sharkey K A: Identification and functional characterization of brainstem cannabinoid CB2 receptors. *Science 310*: 329-332 (2005)

178. Velayudhan L, Van Diepen E, Marudkar M, Hands O, Suribhatla S, Prettyman R, Murray J, Baillon S, Bhattacharyya S: Therapeutic potential of cannabinoids in neurodegenerative disorders: a selective review. *Curr Pharm Des 20*: 2218-2230 (2014)

179. Vonsattel J P: Huntington disease models and human neuropathology: similarities and differences. *Acta Neuropathol 115*: 55-69 (2008)

180. Wagner J A, Varga K, Ellis E F, Rzigalinski B A, Martin B R, Kunos G: Activation of peripheral CB1 cannabinoid receptors in haemorrhagic shock. *Nature 390*: 518-521 (1997)

181. Waksman Y, Olson J M, Carlisle S J, Cabral G A: The central cannabinoid receptor (CB1) mediates inhibition of nitric oxide production by rat microglial cells. *J Pharmacol Exp Ther 288*: 1357-1366 (1999)

182. Walter L, Dinh T, Stella N: ATP induces a rapid and pronounced increase in 2-arachidonoylglycerol production by astrocytes, a response limited by monoacylglycerol lipase. *J Neurosci 24*: 8068-8074 (2004)

183. Walter L, Franklin A, Witting A, Moller T, Stella N: Astrocytes in culture produce anandamide and other acylethanolamides. *J Biol Chem 277*: 20869-20876 (2002)

184. Walter L, Franklin A, Witting A, Wade C, Xie Y, Kunos G, Mackie K, Stella N: Nonpsychotropic cannabinoid receptors regulate microglial cell migration. *J Neurosci 23*: 1398-1405 (2003)

185. Walter L, Stella N: Endothelin-1 increases 2-arachidonoyl glycerol (2-AG) production in astrocytes. *Glia 44*: 85-90 (2003)

186. Wang J, Ueda N: Biology of endocannabinoid synthesis system. *Prostaglandins Other Lipid Mediat 89*: 112-119 (2009)

187. Weydt P, Hong S, Witting A, Moller T, Stella N, Kliot M: Cannabinol delays symptom onset in SOD1 (G93A) transgenic mice without affecting survival. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord 6*: 182-184 (2005)

188. Witting A, Walter L, Wacker J, Moller T, Stella N: P2X7 receptors control 2-arachidonoylglycerol production by microglial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A 101*: 3214-3219 (2004a)

189. Witting A, Weydt P, Hong S, Kliot M, Moller T, Stella N: Endocannabinoids accumulate in spinal cord of SOD1 G93A transgenic mice. *J Neurochem 89*: 1555-1557 (2004b)

190. Wyss-Coray T, Mucke L: Inflammation in neurodegenerative disease - a double-edged sword. *Neuron 35*: 419-432 (2002)

191. Yiangou Y, Facer P, Durrenberger P, Chessell I P, Naylor A, Bountra C, Banati R R, Anand P: COX-2, CB2 and P2X7-immunoreactivities are increased in activated microglial cells/macrophages of multiple sclerosis and amyotrophic lateral sclerosis spinal cord. *BMC Neurol 6*: 12-25 (2006)

192. Yu S Y, Wu D C, Liu L, Ge Y, Wang Y T: Role of AMPA receptor trafficking in NMDA receptor-dependent synaptic plasticity in the rat lateral amygdala. *J Neurochem 106*: 889-899 (2008)

193. Zajicek J, Ball S, Wright D, Vickery J, Nunn A, Miller D, Cano M G, McManus D, Mallik S, Hobart J, group C i: Effect of dronabinol on progression in progressive multiple sclerosis (CUPID): a randomised, placebo-controlled trial. *Lancet Neurol 12*: 857-865 (2013)

194. Zajicek J P, Hobart J C, Slade A, Barnes D, Mattison P G, Group M R: Multiple sclerosis and extract of cannabis: results of the MUSEC trial. *J Neurol Neurosurg Psychiatry 83*: 1125-1132 (2012)

195. Zajicek J P, Sanders H P, Wright D E, Vickery P J, Ingram W M, Reilly S M, Nunn A J, Teare L J, Fox P J, Thompson A J: Cannabinoids in multiple sclerosis (CAMS) study: safety and efficacy data for 12 months follow up. *J Neurol Neurosurg Psychiatry 76*: 1664-1669 (2005)

196. Zhang J, Chen C: Endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol protects neurons by limiting COX-2 elevation. *J Biol Chem 283*: 22601-22611 (2008)

197. Zhao P, Ignacio S, Beattie E C, Abood M E: Altered presymptomatic AMPA and cannabinoid receptor trafficking in motor neurons of ALS model mice: implications for excitotoxicity. *Eur J Neurosci 27*: 572-579 (2008)

198. Zimmer A, Zimmer A M, Hohmann A G, Herkenham M, Bonner T I: Increased mortality, hypoactivity, and hypoalgesia in cannabinoid CB1 receptor knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A 96*: 5780-5785 (1999)

199. Zlotnik A, Gurevich B, Tkachov S, Maoz I, Shapira Y, Teichberg V I: Brain neuroprotection by scavenging blood glutamate. *Exp Neurol 203*: 213-220 (2007)

Danksagung

Die Inhalte dieser Seite wurden aus Gründen des Datenschutzes enfernt.

.

Lebenslauf

Die Inhalte dieser Seite wurden aus Gründen des Datenschutzes enfernt.

Die Inhalte dieser Seite wurden aus Gründen des Datenschutzes enfernt.