



JOHANNES GUTENBERG
UNIVERSITÄT MAINZ

**Der Einfluss des Cannabinoid-Rezeptor 1
auf die Prozessierung des Amyloid-Vorläuferproteins
und die autophagosomale Degradation**

Dissertation

Zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften

Am Fachbereich Biologie
Der Johannes Gutenberg-Universität Mainz
vorgelegt von

Christof Hiebel

geboren am 01.12.1981 in Mainz

Mainz, 2013

Dekan: Prof. Dr. Hans Zischler
1. Berichterstatter: Prof. Dr. Christian Behl
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Jacqueline Trotter-Kyewski
Tag der mündlichen Prüfung: 18.12.2013

Die vorliegende Dissertation wurde unter der Anleitung und Anregung von Prof. Dr. Christian Behl am Institut für Pathobiochemie der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz angefertigt.

Die wesentlichen Ergebnisse dieser Arbeit sind in die im Anhang aufgelisteten wissenschaftlichen Publikationen eingegangen.

Abkürzungsverzeichnis

2-AG	2-Arachidonylglycerol
A β	Amyloid- β -Protein
AD	Alzheimer'sche Demenz
fAD	familäre Form der AD
sAD	sporadische Form der AD
ADAM9	<i>A disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 9</i>
ADAM10	<i>A disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10</i>
ADAM17	<i>A disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 17</i>
AEA (Anandamide)	N-Arachidonylethanolamine
ALS	Amyotrophe Laterale Sklerose
ApoE	Apolipoprotein E
APL-1	<i>APP-related protein 1</i>
APLP1	<i>APP-like protein 1</i>
APLP2	<i>APP-like protein 2</i>
APP	Amyloid-Vorläufer-Protein (<i>amyloid precursor protein</i>)
APP _{CTFα}	C-terminales APP-Fragment α
APP _{CTFβ}	C-terminales APP-Fragment β
sAPP α	N-terminales, lösliches APP-Fragment α
sAPP β	N-terminales, lösliches APP-Fragment β
APPL	<i>beta-amyloid-like protein</i>
ATG	Autophagie-relevante Gene (<i>autophagy-related genes</i>)
AV	autophagische Vesikel
BACE1	<i>β-site of APP cleaving enzyme 1</i>
BAG	<i>Bcl-2-associated athanogen</i>
Bcl-2	<i>B-cell CLL/lymphoma 2</i>
BDNF	<i>brain-derived neurotrophic factor</i>
BECLIN1	<i>coiled-coil myosin-like BCL2-interacting protein 1</i>
BECLIN2	<i>coiled-coil myosin-like BCL2-interacting protein 2</i>
bFGF	<i>basic fibroblast growth factor</i>
ca.	<i>circa</i>
CA1-Region	<i>Cornu Ammonis 1</i> - Region des Hippocampus
CB1	Cannabinoid receptor 1
CB2	Cannabinoid receptor 2
cDNA	komplementäre DNA (<i>complementary DNA</i>)
cm	Zentimeter
CMA	Chaperone-vermittelte Autophagie (<i>Chaperon-mediated Autophagie</i>)
CREB	<i>cAMP response element binding protein</i>
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
ddH ₂ O	doppelt-destilliertes Wasser

DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
DOR	δ -Opioid-Rezeptoren
ECS	Das Endocannabinoid-System
ERK1/2	<i>extracellular-signal-regulated kinases 1/2</i>
etc.	<i>et cetera</i>
FAK	<i>focal adhesion kinase</i>
FCS	fötales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
G-418	Geneticin G-418
GFP	grün-fluoreszierendes Protein
eGFP	verstärkt grün-fluoreszierendes Protein
GPR3	G-Protein-gekoppelter Rezeptor 3
h	Stunde
HEK-Zellen	humane embryonale Nierenzellen (<i>human embryonic kidney cells</i>)
HRP	Meerrettich-Peroxidase (<i>horseradish peroxidase</i>)
KR	kalorische Restriktion
l	Liter
LAMP1	<i>lysosomal-associated membrane protein 1</i>
LAMP2	<i>lysosomal-associated membrane protein 2</i>
LRP	<i>(low-density lipoprotein receptor)-like protein</i>
mA	Milliampere
MAPK	<i>mitogen activated protein kinase</i>
MEK1/2	<i>mitogen-activated protein kinase kinase 1/2</i>
min	Minute
ml	Milliliter
μ l	Mikroliter
mM	millimolar
μ M	micromolar
μ m	Micrometer
mRNA	Boten-RNA (<i>messenger RNA</i>)
mTOR	<i>mammalian target of rapamycin</i>
N2A-Zellen	murine Neuroblastomzellen 2A
NFT	neurofibrilläre Bündel (<i>neurofibrillary tangles</i>)
nm	Nanometer
p62/SQSTM1	Sequestosom-Protein 1
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (<i>phosphate-buffered saline</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
pmol	Pikomol
PS1	Presenilin-1 Protein

<i>psen1</i>	Gen des Presenilin-1
<i>psen2</i>	Gen des Presenilin-2
Rab	<i>Ras-related in brain</i>
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
RPL19	ribosomales Protein 19
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	PCR nach reverser Transkription der mRNA in cDNA
sec	Sekunde
SNARE	<i>soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor</i>
St.Abw.	statistische Standardabweichung
St.Fehler	statistischer Standardfehler
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
THC	Delta-9-Tetrahydrocannabinol
Thy1	<i>thymocyte differentiation antigen 1</i>
TRPV1	<i>transient receptor potential vanilloid 1</i>
Ub	Ubiquitin
UK	Vereinigtes Königreich (<i>United Kingdom</i>)
ULK1	<i>unc-51 like autophagy activating kinase 1</i>
UPS	Ubiquitin-Proteasom-System
USA	Vereinigte Staaten von Amerika (<i>United States of America</i>)
WIPI	<i>WD repeat domain phosphoinositide-interacting protein</i>
WT	wildtypisch
z.B.	zum Beispiel
ZNS	zentrales Nervensystem

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1. Die Alzheimer'sche Demenz.....	1
1.1.1. Histopathologische Veränderungen bei Morbus Alzheimer.....	2
1.1.2. Familiäre Formen und genetische Risikofaktoren der AD.....	4
1.1.3. Das Amyloid-Vorläufer-Protein (APP).....	5
1.1.3.1. Proteolytische Prozessierung des APP und die Bildung der A β -Peptide.....	6
1.1.3.2. Physiologische Funktionen des APP und seiner Prozessierungsprodukte.....	8
1.1.4. APP23-Mäuse als Tiermodell der Alzheimer'schen Krankheit.....	9
1.2. Autophagie.....	11
1.2.1. Autophagie als wichtiger Bestandteil der Proteinhomöostase.....	11
1.2.2. Regulation der Autophagie.....	12
1.2.3. Nicht-kanonische Wege der Autophagie.....	15
1.3. Das Endocannabinoid-System.....	16
1.3.1. Biosynthese und Metabolismus der endogenen Cannabinoide.....	19
1.3.2. Bekannte biologische Funktionen des Endocannabinoid-Systems.....	20
1.3.3. Der Einfluss des ECS auf die Alzheimer'sche Demenz.....	22
1.4. Zielsetzung der Arbeit.....	25
2. Material und Methoden.....	27
2.1. Material.....	27
2.1.1. Zelllinien und Bakterien.....	27
2.1.2. Mausstämme.....	27
2.1.3. Plasmide, Primer und siRNA.....	28
2.1.4. Antikörper.....	29
2.1.5. Protein- und DNA-Größenstandards.....	30
2.1.6. Chemikalien und Reagenzienansätze.....	30
2.1.6.1. Chemikalien.....	30
2.1.6.2. Reagenzienansätze.....	32
2.1.7. Puffer und Lösungen.....	32
2.1.7.1. Puffer und Lösungen für molekularbiologische Methoden.....	32
2.1.7.2. Puffer und Lösungen für zellbiologische Methoden.....	33
2.1.7.3. Puffer und Lösungen für proteinbiochemische Methoden.....	34
2.1.8. Geräte.....	36
2.1.9. Firmenregister.....	36

2.2. Methoden.....	39
2.2.1. Molekularbiologische Methoden.....	39
2.2.1.1. RNA-Isolation.....	39
2.2.1.2. cDNA-Synthese.....	40
2.2.1.3. Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	40
2.2.1.4. Quantitative <i>real-time</i> PCR (qPCR) und qPCR-Array.....	41
2.2.1.5. Agarose-Gelelektrophorese.....	42
2.2.1.6. Transformation und Selektion kompetenter Bakterien.....	42
2.2.1.7. Plasmidpräparation.....	43
2.2.1.7.1. Plasmid-Mini-Präparation.....	43
2.2.1.7.2. Plasmid-Maxi-Präparation.....	43
2.2.2. Zellbiologische Methoden.....	44
2.2.2.1. Kultivieren der Zellen.....	44
2.2.2.2. Zellkultur für Immunfluoreszenz-Färbungen.....	44
2.2.2.3. Transfektionen der Zelllinien.....	45
2.2.2.3.1. Transiente Transfektionen mittels Elektroporation.....	45
2.2.2.3.2. Transiente Transfektionen unter Verwendung von FuGene.....	45
2.2.2.3.3. Erzeugung stabil-transgener Zelllinien.....	46
2.2.2.4. Kryokonservierung von Zelllinien in Flüssig-Stickstoff.....	47
2.2.2.5. Cannabinoidbehandlungen.....	47
2.2.3. Proteinbiochemische Methoden.....	48
2.2.3.1. Aufarbeitung von Proteinproben für SDS-PAGE.....	48
2.2.3.1.1. Aufarbeitung von Proteinproben für SDS-PAGE aus Gewebe.....	48
2.2.3.1.2. Aufarbeitung von Proteinproben für SDS-PAGE aus Zellen.....	48
2.2.3.1.3. Fraktionierung von Gewebeproben.....	48
2.2.3.2. Proteinbestimmung mittels BCA-Reagenz.....	49
2.2.3.3. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	49
2.2.3.4. Western-Blot.....	50
2.2.3.5. Coomassiefärbung von SDS-Polyacrylamid-Gelen.....	51
2.2.3.6. Immunfärbungen für fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen.....	51
2.2.3.6.1. Immunfärbungen von Gehirnschnitten.....	51
2.2.3.6.2. Immunfärbungen von Zellen.....	52
2.2.3.7. Messung der lysosomalen Aktivität (CathepsinB-Aktivität).....	52
2.2.3.8. Inhibition der Translation mittels Cycloheximid.....	53
2.2.4. Statistik.....	54
3. Ergebnisse.....	55
3.1. Einfluss des CB1 auf die APP-Prozessierung.....	55
3.1.1. Erweiterte Charakterisierung des APP23xCBN-Mausstammes.....	55
3.1.2. Proteinspiegel des APP und seiner proteolytischen Fragmente in N2A-Zellen mit veränderter CB1-Expression.....	59

3.1.3. Pharmakologische Inhibition der CB1-Signalwege in N2A-Zellen.....	62
3.2. CB1-Aktivität moduliert den autophagischen Flux.....	65
3.2.1. Analyse autophagischer Indikatoren in APP23xCBN Mäusen.....	65
3.2.2. Herunterregulation des CB1 erhöht den autophagischen Flux aber nicht die proteasomale Aktivität.....	67
3.2.3. CB1-Überexpression beeinflusst den autophagischen Flux nicht.....	70
3.2.4. Pharmakologische Modulation der CB1-Aktivität verändert den autophagischen Flux.....	70
3.2.5. CB1-Herunterregulation verändert nicht die lysosomale Aktivität.....	72
3.2.6. CB1 moduliert den autophagischen Flux unabhängig des mTOR- und des BECLIN1-Komplexes.....	74
3.2.7. Autophagie-relevante Gene werden unverändert exprimiert nach Herunterregulation des CB1.....	77
4. Diskussion.....	80
4.1. Der CB1 als Ziel einer Behandlungsstrategie der AD.....	80
4.1.1. Erweiterte Charakterisierung der APP23xCBN-Mauslinie.....	82
4.1.2. Einfluss der CB1-Expression auf die APP-Prozessierung.....	83
4.2. Der Einfluss des CB1-Rezeptors auf die Autophagie.....	88
4.2.1. CB1-Aktivität moduliert den autophagischen Flux.....	92
4.2.2. Nicht-kanonische Regulation der Autophagie durch den CB1.....	94
5. Zusammenfassung (Summary).....	98
6. Literaturverzeichnis.....	100
7. Anhang.....	124
7.1. Abbildungsverzeichnis.....	124
7.2. Tabellenverzeichnis.....	124
7.3. Publikationen.....	125

1. Einleitung

1.1. Die Alzheimer'sche Demenz

Das Krankheitsbild der Alzheimer'schen Demenz (AD) wurde erstmals zu Beginn des 20. Jahrhunderts vom deutschen Nervenarzt Alois Alzheimer beschrieben (Alzheimer, 1907). Diese Erkrankung des zentralen Nervensystems (ZNS) führt zu einer massiven Schädigung von Nervenzellen und einer damit verbundenen Abnahme der Gehirnmasse. Zudem treten Proteinablagerungen in Form von extrazellulären neuritischen Plaques und intrazellulären neuritischen Bündeln auf. Patienten zeigen eine progressiv verlaufende Verringerung ihrer kognitiven Leistungsfähigkeit, welche oft mit Persönlichkeitsveränderungen der Betroffenen einhergeht. In der Regel treten zunächst Störungen des Kurzzeitgedächtnisses und Probleme bei der zeitlichen und räumlichen Orientierung auf. Während der schleichenden Entwicklung der Krankheit, kommen Sprachstörungen und psychiatrische Veränderungen (Wechsel zwischen Depression und Euphorie, Wahnvorstellungen etc.) hinzu. Das Langzeitgedächtnis ist erst in den späten Phasen der Krankheit betroffen, was in deren Folge zur vollständigen Amnesie führen kann (Rabinowicz et al., 2000). Nach durchschnittlich 6 bis 12 Jahren tritt der Tod des Patienten ein, der oft sekundär durch Infektionserkrankungen bedingt ist. AD ist eine bisher nur bedingt therapierbare und unheilbare Erkrankung und stellt heute die verbreitetste Form der neurodegenerativen Krankheiten im Alter da. Bedingt durch den demographischen Wandel vor allem in den Industrie- und Schwellenländern und der damit verbundenen steigenden Lebenserwartung, wird voraussichtlich ein Drittel der Weltbevölkerung (Afrika ausgenommen) Mitte dieses Jahrhunderts älter als 60 Jahre sein (WHO, 2012). Die Wahrscheinlichkeit an der spät auftretenden Form der AD zu erkranken steigt ab dem 65. Lebensjahr sehr stark an. Diese sporadische Form repräsentiert den Großteil der AD-Fälle, wohingegen die früh auftretende familiäre Form der AD weniger als 5 % aller AD-Fälle ausmacht (Selkoe, 2001). Altern stellt also den Hauptrisikofaktor dar an AD zu erkranken und es ist davon auszugehen, dass im Zuge des demographischen Wandels die Anzahl der AD-Patienten in den nächsten Jahren stark ansteigen wird. Dabei stellen die Fälle von AD ca. 80 % der gesamten Demenz Erkrankungen. Epidemiologische Studien belegen auch bereits, dass die Anzahl der Demenz-Patienten und damit gleichsam der AD-Erkrankungen in Industrienationen deutlich ansteigen (Ferri et al., 2005). Die genauen molekularen Zusammenhänge zwischen

1.1. Die Alzheimer'sche Demenz

Alterung und dem Auftreten der sporadischen Form der AD sind dabei bislang noch nicht verstanden (Kern und Behl, 2009). Neben der Alterung ist auch das Geschlecht ein Risikofaktor der AD. Frauen tragen hier ein höheres Risiko an der AD zu erkranken, als Männer und stellen ca. zwei Drittel der Patienten dar. Zu den Faktoren, die das Risiko an AD zu erkranken beeinflussen, zählen auch Vorerkrankungen wie Diabetes, ein Schlaganfall oder eine Kopfverletzung. Zusätzlich beeinflussen auch Faktoren, die durch die Lebensweise bestimmt werden (das Bildungsniveau, körperliche und geistige Ertüchtigung im Alter, Alkohol- und Tabakkonsum oder auch die Ernährung) die Wahrscheinlichkeit an AD zu erkranken (Dalvi, 2012).

1.1.1. Histopathologische Veränderungen bei Morbus Alzheimer

Die grundsätzlichen histologischen Merkmale der Erkrankung wurden bereits durch Alois Alzheimer anhand der 51-jährigen Patientin Auguste D. beschrieben. Als charakteristische histologische Kennzeichen beschrieb Alzheimer nach der Obduktion die beobachteten neuritischen extrazellulären Plaques, die intrazellulären Bündel und einen massiven Verlust an Gehirnmasse seiner Patientin (Alzheimer, 1907).

Amyloide Plaques sind Proteinablagerungen, die im extrazellulären Bereich des Gehirns (vor allem in der grauen Substanz) und in zerebralen Blutgefäßen zu finden sind (Selkoe, 1999). Sie bestehen zum größten Teil aus aggregierten Amyloid- β -Proteinen (A β), welche Prozessierungsprodukte des Amyloid-Vorläufer-Proteins (*amyloid precursor protein* - APP) darstellen (siehe Kapitel 1.1.3.1). Es werden dabei zwei Arten von extrazellulären Plaques unterschieden: neuritische (senile) Plaques und nicht-neuritische (diffusen) Plaques, wobei Letztere das umgebende Gewebe nicht nachteilig zu beeinflussen scheinen (Yamaguchi et al., 1989). Im Gegensatz zu den diffusen Plaques zeigen neuritische Plaques einen dichteren Kern aus A β -Proteinen und sind umgeben von Astro- und aktivierten Mikrogliazellen (Braak et al., 1996; Johnston et al., 2011; Meyer-Luehmann et al., 2003). Neuriten in ihrer näheren Umgebung zeigen außerdem eine dystrophe Morphologie (Braak et al., 1996; Schellenberg und Montine, 2012). Deshalb dachte man zunächst, dass diese extrazellulären Plaques der Auslöser der Alzheimer'schen Erkrankung seien. Dafür sprach auch ein früher Bericht von Yankner und Kollegen nach dem die Plaques in hoher Konzentration *in vitro* zur Degeneration der umgebenden Neurone führten, was durch die Gabe von Neuropeptiden (Tachykininen) zu revertieren war (Yankner et al., 1990). Einige neuere Studien scheinen die Korrelation zwischen der Menge an A β -Plaques und der atrophischen Gehirnmorphologie in AD zu

1.1. Die Alzheimer'sche Demenz

bestätigen (Archer et al., 2006), andere widersprachen diesem Zusammenhang (Josephs et al., 2008; Neve und Robakis, 1998). Erste Ergebnisse einer Studie an Nonnen, die eine sehr gut vergleichbare Lebensweise führen, zeigten keine Korrelation zwischen der Anzahl der *post mortem* analysierten A β -Plaques und der kognitiven Fähigkeiten der Teilnehmer der Studie (Riley et al., 2005). Daher rücken in den letzten Jahren lösliche, intrazelluläre A β -Oligomere in den Fokus der Untersuchungen. Diese verbleiben länger im Stoffwechsel der Zellen und stören verschiedene zelluläre Mechanismen in neuronalen Zellen, was demnach für die Degeneration dieser postmitotischen Zellen ursächlich sein könnte (Crews und Masliah, 2010; Wirths et al., 2004).

Neben den extrazellulären amyloiden Plaques gibt es auch intrazelluläre Proteinaggregate, welche als neurofibrilläre Bündel (*neurofibrillary tangles* - NFT) bezeichnet werden (Braak und Braak, 1991). Diese filamentösen NFTs bestehen zum Großteil aus dem hyperphosphorylierten, Mikrotubuli-assoziierten Protein Tau (Brion et al., 1985). Tau ist unter physiologischen Bedingungen an der Stabilisierung des axonalen Mikrotubuligeflechts beteiligt (Friedhoff et al., 2000). Durch die Hyperphosphorylierung im Zuge des Fortschreitens der Alzheimer'schen Krankheit kann Tau diese Funktion nicht mehr ausführen. Dies führt unter anderem zu einem gestörten axonalen Transport und zur Degeneration der Neurone, was letztlich die axonalen Erregungsweiterleitung stört und sich beim Patienten durch den Verfall seiner kognitiven Fähigkeiten äußert.

Anhand des Auftretens der NFTs in unterschiedlichen Gehirnbereichen zu bestimmten Ausprägungsphasen der AD wurde die Krankheit von Braak und Braak in Stadien unterteilt. Zu Beginn treten die NFTs im transentorhinalen Cortex auf (Braak Stadien I und II). Später finden sich diese auch im entorhinalen Cortex und dem Ammonshorn des Hippocampus (Braak Stadien III und IV). Im weiteren Verlauf der Krankheit sind auch der isocorticale Assoziationscortex und der sensorische Cortex (Braak Stadien V und VI) betroffen. Auch das zeitliche und räumliche progressive Auftreten der A β -Plaques während der Krankheitsentwicklung wurde zur Klassifizierung herangezogen. Als erstes sind hier vor allem schwach-myelinisierte Bereiche des basalen Neocortex betroffen (Braak Stadium A). Auch hier ergibt sich ein graduelles Fortschreiten der A β -Plaque-Verteilung während der Krankheitsentwicklung. Diese schreitet über angrenzende neocortikale Bereiche und den Hippocampus (Braak Stadium B) fort, bis die A β -Plaques in allen Bereichen des Cortex zu finden sind (Braak Stadium C). Diese histopathologischen Merkmale begleiten die Degeneration vor allem der cholinergen Neurone der corticalen Gehirnbereiche (Braak und Braak, 1997).

1.1.2. Familiäre Formen und genetische Risikofaktoren der AD

Auch wenn die genetisch bedingten Fälle der Alzheimer'schen Krankheit mit rund 5 % aller AD-Fälle sehr selten sind, kann die Analyse genetischer Polymorphismen Hinweise auf die der Krankheit zu Grunde liegenden Mechanismen liefern. In der Regel erkranken die Patienten mit familiärer AD (fAD) früher als Patienten mit sporadischer AD (sAD), meist vor dem 65. Lebensjahr (Selkoe, 2001). Die Ursachen für das Ausbrechen der sAD sind noch weitestgehend unverstanden. Studien anhand von fAD-Fällen haben Mutationen identifiziert, die sich in Gruppen mit unterschiedlicher physiologischer Funktion einordnen lassen (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1: Gen-Produkte die im Zusammenhang mit dem Auftreten der fAD stehen

Gen	Wahrscheinliche physiologische Funktion	
<i>app</i>	siehe 1.1.3.2. Physiologische Funktionen des APP und seiner Prozessierungsprodukte	autosomal dominant oder rezessiv
<i>psen1</i>	γ -Secretase-Aktivität	autosomal dominant
<i>psen2</i>	γ -Secretase-Aktivität	autosomal dominant
<i>apoE</i>	A β -Aggregation und -Abbau, LRP-Signalwege, Endozytose	Risikogen
<i>clu</i>	A β -Aggregation und -Abbau, molekulares Chaperone	Risikogen
<i>cr1</i>	A β -Aggregation und -Abbau, Komplementsystem-Aktivierung	Risikogen
<i>picalm</i>	Endozytose	Risikogen
<i>cd33</i>	Endozytose	Risikogen
<i>cd2ap</i>	Endozytose	Risikogen
<i>bin1</i>	Endozytose	Risikogen
<i>epha1</i>	synaptische Entwicklung und -Plastizität	Risikogen
<i>abca7</i>	Substrattransport über die Zellmembranen	Risikogen
<i>ms4a4a, ms4a6e</i>	noch nicht bekannt	Risikogen

Drei dieser Gene (Amyloid-Vorläufer-Protein, *app*; Presenilin-1, *psen1* und Presenilin-2, *psen2*) sind biochemisch eng mit der Bildung der A β -Peptide verknüpft (Selkoe, 2001). Mutationen im Gen des APP, welches sich auf Chromosom 21 befindet, wurden schon früh mit fAD in Verbindung gebracht. Personen, die unter dem Down-Syndrom (Trisomie 21) leiden und damit eine zusätzliche Kopie des APP tragen, bilden auch eine frühe Form der Alzheimer'schen Krankheit aus (Goate et al., 1991; Mann et al., 1984; Wisniewski et al., 1985). Die Proteine Presenilin-1 (Chromosom 14) und Presenilin-2 (Chromosom 1) bilden das katalytische Zentrum der γ -Secretase und sind damit an der proteolytischen Spaltung des APPs und der A β -Produktion beteiligt (Citron et al., 1997; De Strooper et al., 1998). Mutationen im *app*, Trisomie 21 und die Mutationen in den *psen1* und *psen2*

1.1. Die Alzheimer'sche Demenz

führen damit zur vermehrten Bildung der A β -Peptide und so wird angenommen zum frühzeitigen Ausbruch der Alzheimer'schen Krankheit.

Die Expression der Isoform ApoE- ϵ 4 des Apolipoproteins E (ApoE, Chromosom 19) ist der am besten untersuchte und am frühesten beschriebene allgemeine genetische Risikofaktor für AD (Corder et al., 1993). ApoE ist ein Ligand, der an der Rezeptor-vermittelten Endozytose von Lipoproteinen beteiligt ist. Die vorherrschende Isoform ApoE- ϵ 3, die im Großteil der Bevölkerung homozygot (ApoE- ϵ 3 ϵ 3) vorliegt, ist nicht mit dem Ausbruch der Alzheimer'schen Krankheit assoziiert. Eine weitere, seltene Isoform (ApoE- ϵ 2) gilt als protektiv gegenüber der Entwicklung von AD. Die heterozygoten Träger des ApoE- ϵ 4-Allels (ApoE- ϵ 3 ϵ 4) haben ein ca. dreifach erhöhtes Risiko, homozygote Träger (ApoE- ϵ 4 ϵ 4) ein ca. 15-fach erhöhtes Risiko, an AD zu erkranken (Corder et al., 1993, 1994; Farrer et al., 1997; Strittmatter et al., 1993). Seit 2009 wird intensiv durch Genom-weite Analysen nach weiteren genetischen Risikofaktoren gesucht. Dies hat bereits zur Identifikation einiger weiterer Risikogene geführt, deren genaue physiologische Funktionen und ihr Einfluss auf das Ausbrechen der Alzheimer'schen Krankheit jedoch noch weiter verifiziert werden müssen. Teilweise scheinen sie mit dem Abbau der A β -Peptide in Zusammenhang zu stehen (*clu*, *cr1*). Andere sind an endozytotischen Prozessen beteiligt (*picalm*, *cd33*, *cd2ap*, *bin1*), haben einen Einfluss auf die synaptische Entwicklung (*ephal*) oder den Substrattransport über Zellmembranen (*abca7*). Die physiologische Funktion der Produkte einiger AD-assoziierter Genloci ist jedoch noch gänzlich unbekannt (*ms4a4a*, *ms4a6e*) und es bleibt abzuwarten, in wieweit die Liste der Risikogene für AD in den nächsten Jahren noch wächst (Bettens et al., 2013).

1.1.3. Das Amyloid-Vorläufer-Protein (APP)

Das Amyloid-Vorläufer-Protein (APP) ist namensgebend für eine Familie von konservierten Genen, zu der auch die mammalia APLP1 (Wasco et al., 1992) und APLP2 (Wasco et al., 1993) sowie APPL (Rosen et al., 1989) aus *Drosophila melanogaster* und APL-1 (Daigle and Li, 1993) aus *Caenorhabditis elegans* gehören. APP ist dabei das einzige Protein aus der APP-Familie, welches über eine A β -Domäne verfügt und kann damit zu A β -Peptiden prozessiert werden (Abb. 1A). APP wird ubiquitär exprimiert, also nicht nur in Neuronen und Glia, wobei die biologische Funktionen des Proteins noch immer nicht geklärt sind (siehe Kapitel 1.1.3.2.). APP ist ein integrales Membranprotein mit einer großen extrazellulären amino-terminalen (N-terminalen) Region, einer einfachen Transmembran-Domäne und einer kürzeren zytoplasmatischen carboxy-terminalen (C-

1.1. Die Alzheimer'sche Demenz

terminalen) Region (Abb. 1). Das *app* beinhaltet 19 Exons aus denen hauptsächlich drei Isoformen durch alternatives Splicing der Exons 7 (Kunitz-Proteaseinhibitor-Domäne, KPI) und 8 (OX-2-Antigen-Homolog) entstehen (Sandbrink et al., 1996) (Abb. 1B). Diese drei Isoformen unterscheiden sich durch ihr Expressionsmuster, wobei die APP₆₉₅-Isoform hauptsächlich in Neuronen exprimiert wird, die APP₇₇₀- und APP₇₅₁-Isoformen hingegen in peripheren Geweben und Astroglia (Weidemann et al., 1989). Der extrazelluläre Teil des APP, welcher den Hauptteil der Aminosäuresequenz des Proteins ausmacht, kann in zwei Hauptdomänen (E1- und E2-Domäne) unterteilt werden. Die N-terminale E1-Domäne wird dabei in die Heparin-binde-/Wachstumsfaktor-ähnliche-Domäne (HFBD/GFLD), eine Kupfer- (CuBD) und eine Zink-bindende-Domäne unterteilt (ZnBD). An die E1-Domäne schließt sich eine Aspartat- und Glutamat-reiche Proteinregion (DE) und die KPI-Domäne (im APP₆₉₅ nicht vorhanden) an. Die E2-Domäne besteht aus einer weiteren HFBD/GFLD-Domäne (HFBD2) und einer *random coil* (RC) Region. An die E2-Domäne wiederum schließt sich die Aβ-Domäne und die C-Terminale zytoplasmatische Region an (Jacobsen und Iverfeldt, 2009) (Abb. 1A).

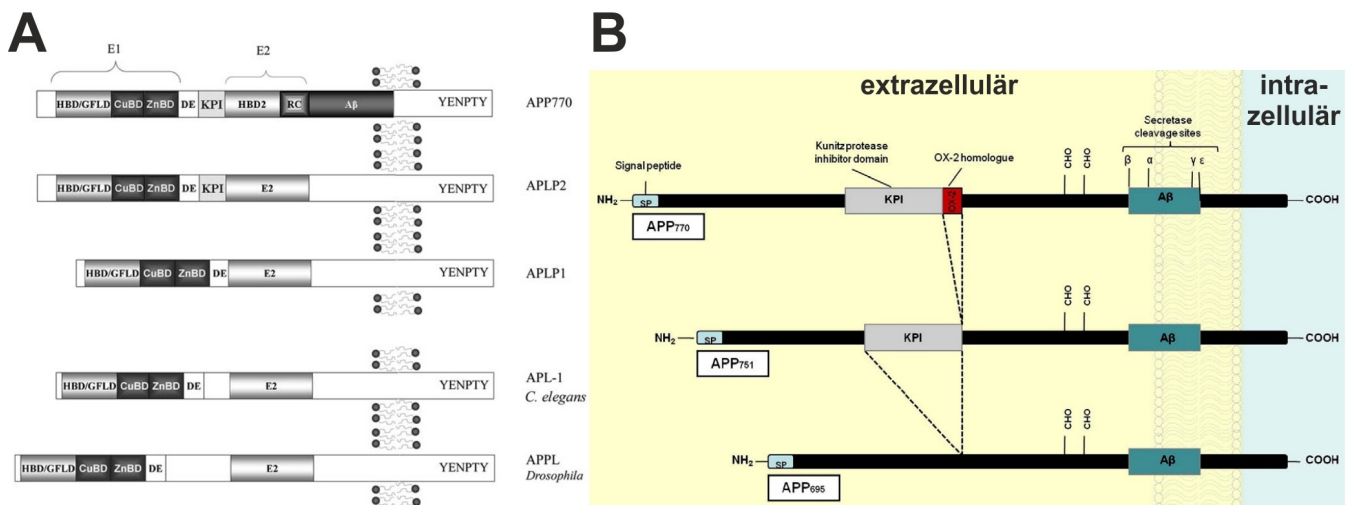


Abbildung 1: APP-Homologe und -Isoformen

[A] Illustration der Domänen-Struktur der Proteine der APP-Familie. Gezeigt sind die mammalia Proteine APP₇₇₀, APLP1 und APLP2 sowie das APL-1 aus *Caenorhabditis elegans* und das APPL aus *Drosophila melanogaster*. (aus Jacobsen und Iverfeldt, 2009). [B] Schematische Darstellung der Hauptisoformen des APP (APP₇₇₀, APP₇₅₁ und APP₆₉₅), die aus alternativem Splicing der Exons 7 (KPI-Domäne) und 8 (OX-2-Antigen-Homolog) entstehen (modifiziert nach Beckett et al., 2012).

1.1.3.1. Proteolytische Prozessierung des APP und die Bildung der Aβ-Peptide

Die proteolytische Spaltung des APP kann grundsätzlich nach zwei unterschiedlichen Prozessierungspfaden erfolgen: nach dem amyloidogene Weg, der zur Bildung von Aβ-Peptiden

1.1. Die Alzheimer'sche Demenz

führt und nach dem nicht-amyloidogenen Weg, bei dem keine A β -Peptide gebildet werden. Drei verschiedenen proteolytischen Spaltungen spielen dabei eine entscheidende Rolle (Abb. 2). In den meisten Fällen wird APP über den nicht-amyloidogenen Weg prozessiert. Dieser beginnt mit einer Spaltung des APP durch eine α -Secretase (ADAM9, 10 oder 17) in der Plasmamembran (Hooper und Turner, 2002; Lammich et al., 1999; Parvathy et al., 1999). Dabei ist ADAM10 die relevante konstitutive α -Secretase in primären Neuronen (Kuhn et al., 2010). Da die Spaltung des APP durch die α -Secretasen innerhalb der A β -Domäne erfolgt, verhindert die α -Secretase-Aktivität die Bildung der A β -Peptide und damit auch die Bildung amyloider Ablagerungen. In der Cerebrospinalflüssigkeit von AD-Patienten wurden auch reduzierte Spiegel an sAPP α festgestellt (Sennvik et al., 2000). Das membranständige, C-terminale Schnittfragment (C89 oder APP_{CTF α}) wird weiter proteolytisch durch die γ -Secretase prozessiert. Diese Proteinase ist ein Proteinkomplex bei dem ein Heterodimer aus Presenilin-1 und Presenilin-2 das katalytische Zentrum bildet (Sannerud und Annaert, 2009). Als Prozessierungsprodukte werden ein kleines, nicht-toxisches Protein (p3) und die APP-intrazelluläre-Domäne (AICD) gebildet, welche in das Zytoplasma entlassen und dort schnell abgebaut wird (Edbauer et al., 2002; Nunan et al., 2001).

Beim alternativen, amyloidogenen Weg wird APP zunächst durch Endozytose internalisiert und dann in späten Endosomen durch die β -Secretase (BACE1) außerhalb der A β -Domäne geschnitten (Belyaev et al., 2010; Cordy et al., 2003; Eehalt et al., 2003). Dabei entstehen wiederum ein lösliches, N-terminales- (sAPP β) und ein membranständiges, C-terminales Fragment (C99 oder APP_{CTF β}). Neuere Berichte zeigen, dass sAPP β durch die Metalloprotease Meprin- β weiter prozessiert wird und das entstehende N-terminale Peptid an den *death receptor 6* (DR6) binden kann (Jefferson et al., 2011; Nikolaev et al., 2009). Das membranständige APP_{CTF β} -Fragment wird wiederum durch die γ -Secretase geschnitten, was zur cytoplasmatischen Freisetzung der AICD-Domänen und teils durch Exocytose zur extrazellulären Freisetzung der A β -Peptide führt (Vetrivel et al., 2004). Durch die γ -Secretase-Aktivität entstehen A β -Peptide mit unterschiedlicher Länge, wobei die beiden hauptsächlich prozessierten und am besten untersuchten A β -Spezies das A β ₄₀ und A β ₄₂ sind. Diese liegen normalerweise im Verhältnis 10 : 1 (A β ₄₀ : A β ₄₂) in gesunden Menschen vor (Sastre et al., 2001; Yu et al., 2001). In Fällen von familiärer AD wurde eine Verschiebung hin zum stärker hydrophoben und potentiell toxischeren A β ₄₂ beobachtet (Selkoe et al., 2004), wobei auch geringfügige Veränderungen des Gleichgewichts zwischen A β ₄₀ und A β ₄₂ neurotoxisch zu wirken scheinen (Kuperstein et al., 2010). Für A β -Peptide wurden auch einige toxische Eigenschaften gezeigt, welche unabhängig von ihrer extrazellulären Akkumulation in amyloiden Plaques zu sein

1.1. Die Alzheimer'sche Demenz

scheinen. So sind A β -Peptide in der Lage oxidativen Stress durch freie Radikale zu induzieren (Behl et al., 1994; Harris et al., 1995), den Calcium-Metabolismus der Zellen zu stören und die Aggregation von hyperphosphoryliertem Tau zu fördern (Götz et al., 2001; Luo et al., 1995; Oddo et al., 2004; Wolozin et al., 1995).

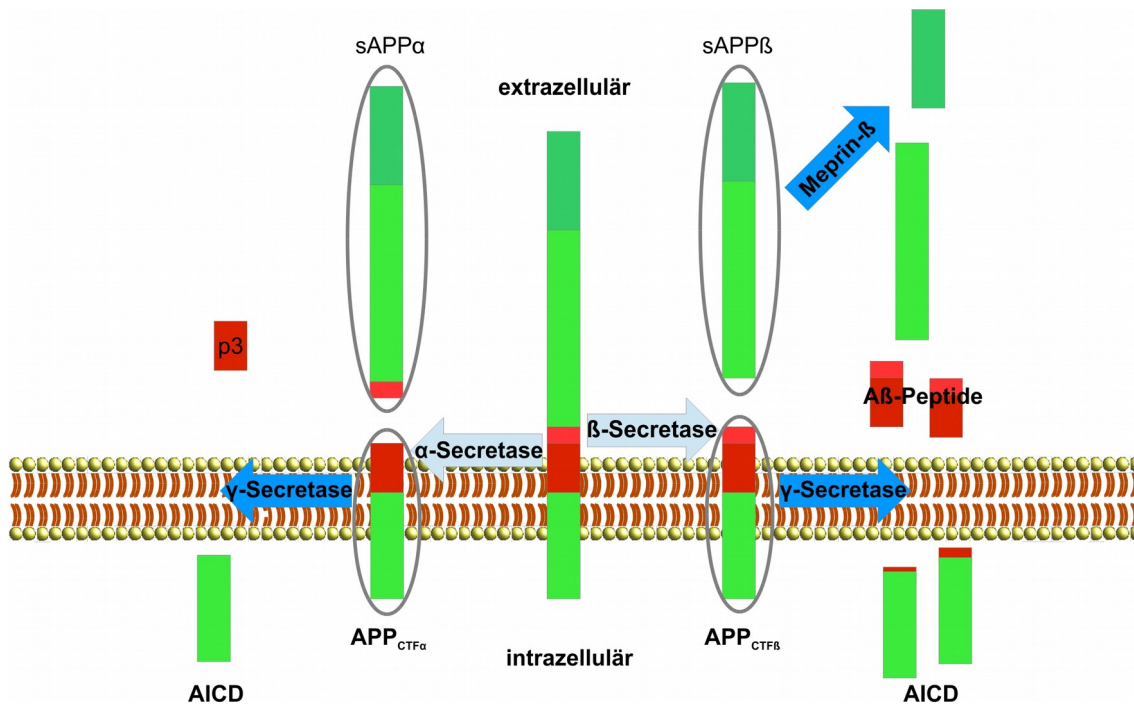


Abbildung 2: APP-Prozessierung

Schematische Darstellung der proteolytischen Spaltung des APP und der beteiligten Enzyme sowie der resultierenden Prozessierungsprodukte. Beim nicht-amyloidogenen Pfad der APP-Prozessierung wird das APP zunächst innerhalb der A β -Domäne durch die α -Secretase gespalten und anschließend das C-terminale APP_{CTF α} -Fragment durch die γ -Secretase geschnitten. Der amyloidogene Pfad der Prozessierung beginnt mit der Spaltung des APP durch die β -Secretase außerhalb der A β -Domäne. Das C-terminale Fragment APP_{CTF β} wird weiter durch die γ -Secretase geschnitten. (nach Jefferson et al., 2011; Nikolaev et al., 2009; Pietrzik und Behl, 2005)

1.1.3.2. Physiologische Funktionen des APP und seiner Prozessierungsprodukte

Das Amyloid-Vorläufer-Protein ist durch seine Verbindung zur Alzheimer Pathologie eines der am intensivsten untersuchten Proteine überhaupt, jedoch sind seine physiologischen Funktionen bisher noch wenig bekannt. APP könnte möglicherweise einen Zelloberflächenrezeptor darstellen, welcher extrazelluläre Signale bei der Zelladhäsion in das Zytoplasma weiterleitet. So wurde gezeigt, dass APP extrazelluläre Matrix-Proteine wie Kollagen, Laminin oder Heparin binden und durch Homo- und Heterodimerisierung mit Proteinen der APP-Familie die Zelladhäsion fördern kann (Soba et al., 2005; Storey et al., 1996). Zudem wurde schon früh eine konservierte G-Protein-Bindedomäne am zytoplasmatischen C-Terminus des APP identifiziert, womit APP auch als G-Protein-gekoppelter

1.1. Die Alzheimer'sche Demenz

Rezeptor fungieren könnte (Mahlapuu et al., 2003; Nishimoto et al., 1993; Okamoto et al., 1995, 1996). Weiter spielt APP eine Rolle beim axonalen Transport und dem Neuriten-Wachstum (Jin et al., 1994; Koo et al., 1990; Mattson, 1997; Morin et al., 1993).

Eines der löslichen, N-terminalen Schnittfragmente des APP (sAPP α) fördert die Neuriten-Bildung, gilt als neuroprotektiv und steigert die Langzeitpotenzierung (LTP) der neuronalen Reizweiterleitung sowie das räumliche Gedächtnis (Stein et al., 2004; De Strooper, 2010; Taylor et al., 2008; Weyer et al., 2011). Zudem konnten Stein und Kollegen zeigen, dass sAPP α die Expression neuroprotektiver Gene stimuliert und in organotypischen, hippocampalen Kulturen vor A β -induzierter Toxizität schützt (Stein et al., 2004). Die neurotrophen Eigenschaften der N-terminalen, sezernierten Spaltprodukte des APP scheinen sich jedoch nicht nur auf das durch die α -Secretase generierte sAPP α zu beschränken. So wurde kürzlich gezeigt, dass neben sAPP α auch sAPP β das Neuriten-Wachstum stimulieren kann (Chasseigneaux et al., 2011). Die intrazelluläre Domäne des APP (AICD), welche nach der Proteolyse durch die γ -Secretase freigesetzt wird, gilt als Transkriptionsregulator und soll darüber Zellmigration, Zell-Zell-Kommunikation, apoptotische Signalwege und den axonalen Transport beeinflussen (Beckett et al., 2012; Zheng und Koo, 2006). Besonderes Interesse gilt auch den physiologischen Funktionen der A β -Peptide selbst, jedoch ist auch hier bisher wenig bekannt. Grimm und Kollegen konnten zeigen, dass A β -Peptide an der Regulation des Cholesterin- und Sphingomyelin-Stoffwechsels beteiligt sind (Grimm et al., 2005). Die genauen physiologischen Funktionen des APP und seiner Prozessierungsprodukte aufzuklären, ist sicher eine der wichtigen Herausforderungen für die zukünftige Alzheimer-Forschung.

1.1.4. APP23-Mäuse als Tiermodell der Alzheimer'schen Krankheit

Die frühe Charakterisierung der Alzheimer'schen Krankheit und ihr Verlauf wurden anhand von Patienten-Beobachtungen und Autopsie-Analysen durchgeführt. Später nutzte man Zell- und Gewebekulturen um Erkenntnisse über molekulare Zusammenhänge zu erlangen. Erst mit der Entwicklung von molekular-biologischen Klonierungstechniken war es möglich genetische Tiermodelle dieser Erkrankung zu generieren um komplexere proteinbiochemische Prozesse in Geweben und Verhalten experimentell zu untersuchen. In Folge dessen wurden unterschiedliche transgene Mausmodellen etabliert, die sich durch die verwendeten Promotoren und der zur Expression eingebrachten Erbinformationen unterscheiden (Spires und Hyman, 2005). Da in den letzten Jahren verstärkt der Einfluss der löslichen A β -Oligomere auf die Alzheimer Pathologie das

1.1. Die Alzheimer'sche Demenz

Interesse der Forschung weckte, wurden hierzu neue Mausmodelle generiert. Diese Tiere akkumulieren intrazellulär A β -Peptide in Neuronen, bevor eine Bildung amyloider Plaques zu beobachten ist. Zudem ist diesen Mausmodellen gemein, dass es zu einem verstärkten neuronalen Zelltod, im Vergleich zu den zuvor erzeugten transgenen Tieren kommt (Casas et al., 2004; Oakley et al., 2006; Wirths et al., 2006).

Die für diese Dissertation verwendeten APP23-Mäuse wurden Ende der 1990er Jahre entwickelt und zählen zu den am besten untersuchten Mausmodellen der Alzheimer'schen Krankheit (Sturchler-Pierrat et al., 1997). APP23-Mäuse überexprimieren ca. siebenfach die „schwedische“ Doppelmutante des APP₇₅₁ unter der Kontrolle des neuronenspezifischen, murinen Thy1-Promotors (siehe Kapitel 2.1.2.). Diese mutante APP-Variante wird vermehrt über den amyloiden Weg prozessiert. Im Vergleich zu vielen anderen oft mehrfach-transgenen AD-Mausmodellen stellt dies eine recht einfache genetische Manipulation der Tiere dar. Trotzdem zeigen die APP23-Mäuse viele charakteristische Merkmale der Alzheimer Pathologie beim Menschen. Ab einem Alter von sechs Monaten treten im Neocortex und Hippocampus erste amyloide Plaques auf, deren Menge altersabhängig ansteigt. Zudem tritt im Zuge der Alterung, nach Entstehung erster amyloiden Plaques, verstärkt hyperphosphoryliertes Tau auf, was bei vielen anderen amyloid basierten AD-Mausmodellen nicht der Fall ist. Intrazelluläre, neurofibrilläre Tau-Bündel wie beim Menschen sind allerdings nicht zu beobachten (Spires und Hyman, 2005; Sturchler-Pierrat et al., 1997). Außerdem zeigen APP23-Mäuse deformierte Neuriten in der Nähe der amyloiden Plaques, eine Degeneration der Neuronen in der CA1-Region des Hippocampus (Calhoun et al., 1998; Sturchler-Pierrat et al., 1997), eine verstärkte Gliose (vermehrtes Auftreten aktivierter Mikro- und Astrogliazellen) in den von der Plaque-Bildung betroffenen Gehirnregionen des Cortex und Hippocampus und Verhaltensveränderungen, die Teile der Alzheimer Pathologie widerspiegeln. Dazu zählt ein generell aggressiveres Verhalten als wildtypische Mäuse (Vloeberghs et al., 2006) und eine eingeschränkte Lernleistung, wobei APP23-Mäuse bereits vor dem Auftreten der ersten amyloiden Plaques, eine Beeinträchtigung des Lernverhaltens zeigten (Van Dam et al., 2003; Kelly et al., 2003). Dies spricht auch in diesem Mausmodell, das auf der vermehrten Bildung der A β -Peptide beruht, gegen die amyloiden Plaques als primären kausalen Faktor der Alzheimer Pathologie.

1.2. Autophagie

1.2.1. Autophagie als wichtiger Bestandteil der Proteinhomöostase

Ein Kernproblem jeder Zelle ist es die Integrität und die Funktionalität der Gesamtheit ihrer Proteine, ihres Proteoms, zu erhalten. Dazu gehört die korrekte Faltung jedes Proteins in die spezifische Konformation, so wie das Entsorgen fehlgefalteter Proteine. Diese können entweder durch Rückfaltung in ihre native Konformation wieder hergestellt, oder wenn dies nicht mehr möglich ist über proteolytische Abbauege degradiert werden. Proteinaggregate, wie sie z.B. bei vielen neurodegenerativen Erkrankungen auftreten, stellen eine weitere Möglichkeit für die Zelle dar, fehlgefaltete und damit potentiell toxische Proteine aus ihrem Stoffwechsel zu entfernen. Sah man früher Proteinaggregation *per se* als rein passiven und schädlichen Vorgang an, so setzt sich heute immer mehr die Meinung durch, dass die Aggregation ein gut regulierter Prozess ist, welcher zur Zytoprotektion beitragen kann (Duennwald, 2011; Tyedmers et al., 2010).

Die Notwendigkeit die Proteinfaltung zu kontrollieren, tritt für die Zelle bereits an der naszierenden Aminosäurekette während der Translation auf. So werden z.B. hydrophobe Aminosäurebereiche von Chaperonen abgedeckt um sie vom hydrophilen Zytoplasma abzuschirmen. Molekulare Chaperone sind definiert als Proteine, die während der Faltungs- und Rückfaltungsprozesse mit den Proteinen interagieren um ihnen die Faltung in ihre physiologische Konformation zu ermöglichen. Chaperone sind dabei am Ende nicht Teil der fertigen Proteinstruktur (Chen et al., 2011a; Hartl et al., 2011). Chaperone assistieren damit bei einer Vielzahl von biologischen Prozessen wie der *de novo* Faltung und Rückfaltung denaturierter Proteine, dem Proteintransport in subzelluläre Kompartimente, der Bildung von Oligomeren und der Entsorgung von Proteinen über proteolytische Degradation (Arndt et al., 2007; Powers et al., 2009). Prominente Repräsentanten der Chaperone sind solche der Familie der Hitzeschockproteine (HSPs) mit der Gruppe der HSP70-Proteine. Neben ihrer Beteiligung bei Faltungs- und Refaltungsprozessen spielen sie eine Rolle für den Transport fehlgefalteter Proteine zu den Degradationssystemen der Autophagie oder des Ubiquitin-Proteasom-Systems (UPS) (Gamerding et al., 2009; Hartl et al., 2011).

Das UPS ist die primäre Proteindegredationsmaschine der Zelle für den Abbau von zytosolischen sowie fehlgefalteten Proteinen. Diese werden über eine dreistufige Kaskade von Enzymen mit dem Signalprotein Ubiquitin (Ub) markiert (Wilkinson et al., 1980). Ub wird durch die Klasse der E1-Enzyme aktiviert, durch E2-Enzyme konjugiert und über E3-Ub-Ligasen auf die Zielproteine

1.2. Autophagie

übertragen. Dabei werden vor allem Proteine proteasomal abgebaut, die mit einer tetra-Ub-Kette, welche über die Lysine 48 und 63 verknüpft sind, markiert wurden. Deubiquitinasen sind für das Entfernen von Ubiquitin und der Ub-Ketten verantwortlich (Komander, 2009). Mittlerweile wurden auch Ub-unabhängige proteasomale Abbauewege beschrieben, über die meist kleine fehlgefaltete Proteine abgebaut werden (Jariel-Encontre et al., 2008). Das eukaryotische 26S-Proteasom ist dabei tonnenartig aus dem katalytisch aktiven Kern (20S-Proteasom) und regulatorischen (11S- oder 19S-) Untereinheiten zusammengesetzt (Jung und Grune, 2013).

Werden Proteine mit Mono-Ub-Verknüpfungen versehen oder exponieren ein spezifisches Signalpeptid (KFERQ), so werden sie nicht über das Proteasom abgebaut, sondern autophagischen Degradationsprozessen zugeführt (Arias und Cuervo, 2011; Komander, 2009). Zudem werden auch defekte Zellorganellen, wie z.B. Mitochondrien, oder Proteinaggregate autophagisch abgebaut. Der Begriff der Autophagie fasst mehrere hoch konservierte eukaryotische Abbauewege zusammen, welche alle in der lysosomalen Degradation münden. Man kann drei grundsätzlich unterschiedliche Formen autophagischer Abbauewege unterscheiden (Abb. 3A). Zum einen kommt es bei mikroautophagischen Prozessen zu einer Invagination der Lysosomenmembran und damit einem direkten Substrateinschluss im Lysosom. Der Chaperon-vermittelten Autophagie (CMA) geht die Erkennung der Peptidsequenz KFERQ durch HSP70 voraus, welches dann unter der Beteiligung weiterer Chaperone den Transport zum Lysosom vermittelt. Über den CMA-Rezeptor LAMP2a in der lysosomalen Membran werden diese Substrate dann wiederum direkt in das Lysosom geschleust und anschließend degradiert. Der Prozess der Makroautophagie beruht auf der Bildung spezifischer autophagischer Vesikel, den Autophagosomen, welche die zu degradierenden Substrate umschließen und über die Fusion mit Lysosomen ihren Inhalt dem lysosomalen Abbau zuführen (Tanida, 2011). Da in dieser Arbeit ausschließlich der makroautophagische Abbau untersucht wurde, wird im Folgenden Makroautophagie vereinfachend als Autophagie bezeichnet.

1.2.2. Regulation der Autophagie

Autophagie wurde zunächst als zellphysiologische Reaktion auf Hungerzustände beschrieben, bei der zytoplasmatische Bestandteile verdaut werden um Aminosäuren und Energie für den Stoffwechsel der Zelle weiter zur Verfügung zu stellen. Spätere morphologische und biochemische Studien zeigten dann ihre grundsätzliche Bedeutung in der Proteinhomöostase, der Degradation von Zellorganellen und als Verteidigungsstrategie bei zellulärem Parasitenbefall (Kirkin et al., 2009). In

1.2. Autophagie

den letzten Jahren wird verstärkt an der Rolle der Autophagie bei Erkrankungen, welche meist mit der Störung der Proteinhomöostase einhergehenden, geforscht (Mizushima et al., 2008).

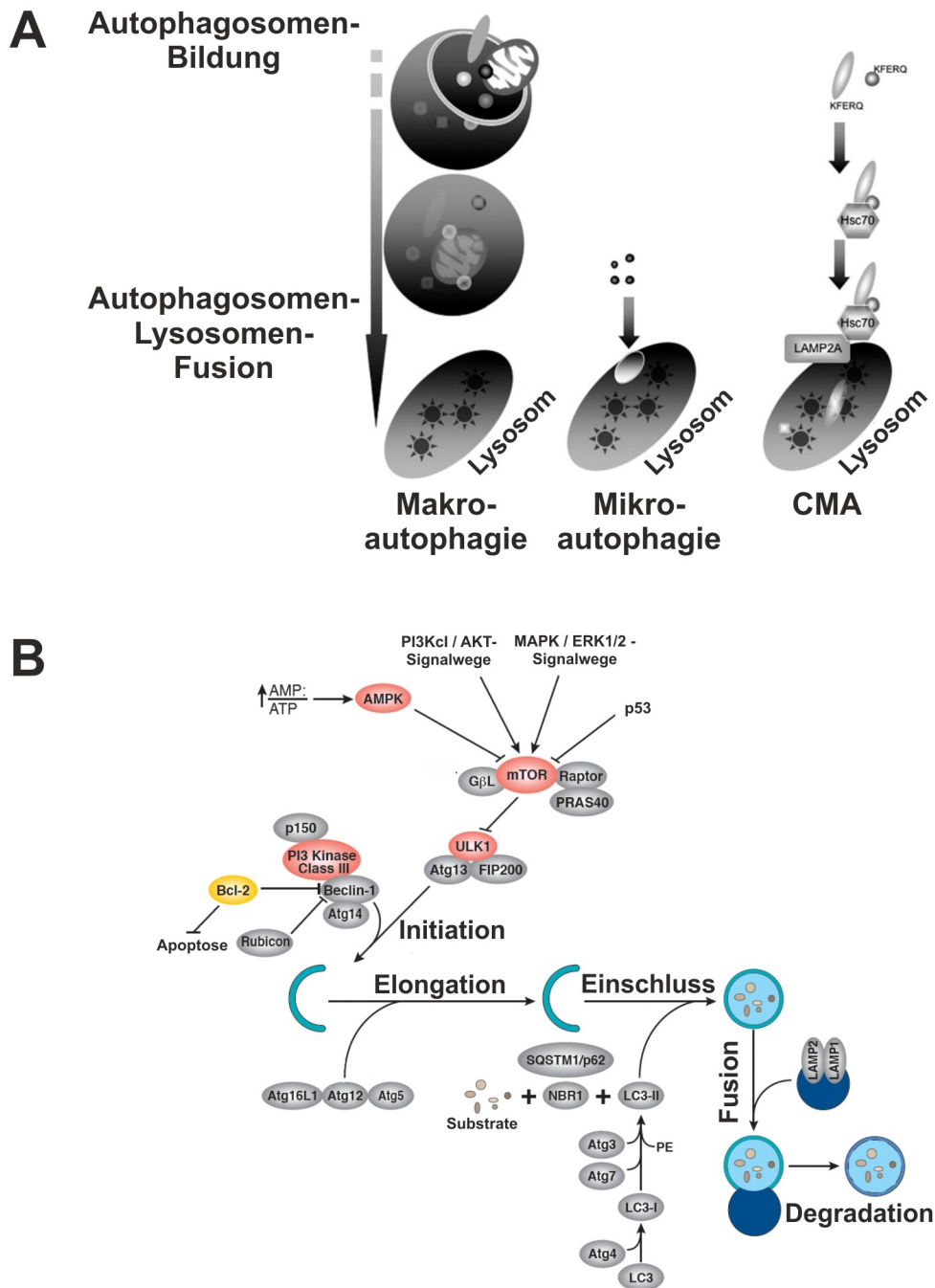


Abbildung 3: Formen der Autophagie und makroautophagische Regulationswege

[A] Schematische Darstellung der drei unterschiedlichen Formen der Autophagie: Makro-, Mikro- und Chaperonvermittelte Autophagie (CMA) (modifiziert aus Tanida, 2011). [B] Illustration der Regulationswege sowie den Hauptphasen des makroautophagischen Abbaus (modifiziert nach Cell Signaling, 2013). Die Initiation der Autophagosomenbildung wird durch die mTOR- und BECLIN1-Proteinkomplexe reguliert. Für die Elongation der Autophagosomenmembran ist das ATG12-Konjugations-System verantwortlich. Dem Einschluss der Autophagiesubstrate geht die Erkennung durch Autophagierezeptoren (wie p62 oder NBR1) voraus, die LC3-II binden. Über die Fusion mit Lysosomen werden die Autophagiesubstrate schließlich degradiert.

1.2. Autophagie

Zwei Multiproteinkomplexe sind an der Regulation der Autophagie maßgeblich beteiligt, der *mammalian target of rapamycin complex 1* (mTORC1) und der BECLIN1-Komplex. Der evolutionär konservierte Enzymkomplex mTORC1 ist ein negativer Regulator der Autophagie über den viele unterschiedliche zelluläre Signale integriert werden (Abb. 3B). Rapamycin verhindert die Phosphorylierung der zentralen Kinase mTOR an Serin 2448 (S2448), inhibiert so die mTOR-Aktivität und stimuliert dadurch die Autophagie (Chiang und Abraham, 2005). Deshalb wird die mTOR-Phosphorylierung an S2448 auch weithin als Maß für die mTOR-Aktivität und den dadurch vermittelten Einfluss auf die Autophagie analytisch genutzt. Die Inhibition der Autophagie übt mTOR nicht direkt aus, sondern durch Hemmung des nachgeschalteten, aktivierenden ULK1-Komplexes. Mehr als 30 ATGs (Autophagie-relevante Gene) wurden bisher identifiziert (Suzuki und Ohsumi, 2007). Neben dem ULK1-Komplex (bestehend aus ULK1, ATG13, FIP200) ist auch der zweite große regulatorische Protein-Komplex, der BECLIN1-Komplex, an der Bildung der Autophagosomen beteiligt.

BECLIN1 (bestehend aus BECLIN1, ATG14, PI3Kc3, p150) stellt dabei das zentrale Protein dieses Komplexes dar, an das sich weitere Proteine anlagern. Die Phosphatidylinositol-3-OH-Kinase Klasse 3 (PI3Kc3) generiert hierbei das Signalmolekül Phosphatidylinositol-3-Phosphat (PI3) (Fimia et al., 2007; Itakura et al., 2008; Kang et al., 2011). Die regulatorischen Proteine Rubicon und Bcl-2 inhibieren den BECLIN1-Komplex durch Bindung an BECLIN1 (Matsunaga et al., 2009; Zhong et al., 2009; Zhou et al., 2011). Außerdem sind noch ATG9, ATG2 und WIPI1-4 an der Initialisierung der Autophagosomen beteiligt. Das ATG12-Konjugations-System (bestehend aus ATG12, ATG5 und ATG16L1) ist essentiell für die korrekte Elongation der autophagosomalen Doppelmembran. Zudem ist für die Bildung funktioneller Autophagosomen die Anlagerung von LC3 vor allem an die innere Membran nötig. Hierfür werden diese Autophagie-Adapter-Proteine mit einem lipophilen Phosphatidylethanolamin- (PE-) Schwanz versehen und in der Membran verankert. LC3-I wird dazu zunächst von ATG4 durch einen C-terminalen Schnitt aus pro-LC3 prozessiert, bevor ATG7 (aktivierendes Enzym) und ATG3 (konjugierendes Enzym) die PE-Lipidierung zu LC3-II durchführen können (Mizushima et al., 2011). Autophagie-Rezeptoren, wie p62/Sequestosome 1 (p62) oder Neighbor of brcal gene 1 (NBR1), detektieren zum Einen ubiquitinierte Autophagiesubstrate und binden zum Anderen an die in der autophagosomalen Membran verankerten Autophagieadaptoen über ihre LC3-Interaktions-Domäne (LIR). Durch diese Eigenschaft stellen sie eine wichtige molekulare Brücke zwischen dem UPS und der Autophagie dar, da sie ubiquitinierte Proteine dem Abbau durch das UPS entziehen und der

1.2. Autophagie

Autophagie zuführen können (Kirkin et al., 2009). Außerdem können Autophagie-Rezeptoren oligomerisieren, was zur Bildung von Inklusionskörpern aus Autophagiesubstraten führt. Diese werden dann spezifisch von autophagosomalen Membranen durch die Bindung an LC3-II umschlossen und der lysosomalen Degradation zugeführt (Bjørkøy et al., 2005; Pankiv et al., 2007) (Abb. 3B).

Dieses konzertierte Zusammenspiel der beiden regulatorischen Proteinkomplexe, mTOR- und BECLIN1- Komplex sowie das hierarchische Zusammenwirken der ATG-Proteine wird als kanonischer Weg der Autophagie bezeichnet.

1.2.3. Nicht-kanonische Wege der Autophagie

In den letzten Jahren mehren sich die Berichte, wonach die Bildung von Autophagosomen nicht Zwangsweise die Beteiligung aller Komponenten der kanonischen Autophagie benötigt. Werden der mTOR-, der BECLIN1-Komplex oder Teile des hierarchischen Zusammenspiels der ATG-Proteine zur Autophagosomen-Bildung umgangen, so spricht man von nicht-kanonischer Autophagie (Codogno et al., 2012). So wurde eine Induktion der Autophagie, unabhängig des BECLIN1-Komplexes, in Modellen des programmierten Zelltods, bei der Zelldifferenzierung, bei der Mitophagie (autophagischer Abbau von Mitochondrien) und als Reaktion auf bakterielle Toxine gezeigt (Arsov et al., 2011; Chu et al., 2007; Grishchuk et al., 2011; Mestre et al., 2010; Tian et al., 2010; Zhu et al., 2007). Zudem wurde beobachtet, dass es bei Ammoniak-induzierter Autophagie sowie bei Glukose-Entzug zur Induktion von Autophagie kommt, die unabhängig der mTOR-ULK1-Achse abläuft (Cheong et al., 2011). In ATG5-depletierten Zellen wurde in elektronenmikroskopischen Analysen beobachtet, dass nach Behandlung mit Etoposid (TopoisomeraseII-Inhibitor) LC3-freie Autophagosomen gebildet werden, die allerdings eine amorphe Struktur zeigen (Nishida et al., 2009). Zudem scheinen noch nicht alle an der Regulation der Autophagie in höheren Eukaryonten beteiligten Proteine identifiziert zu sein. Erst kürzlich wurde mit BECLIN2 ein weiteres Protein identifiziert, welches im Gegensatz zu BECLIN1 eine spezifische Rolle für den autophagischen Abbau G-Protein-gekoppelter Rezeptoren und im Energiemetabolismus zu haben scheint (He et al., 2013). Weitere Untersuchungen sind notwendig, um zu klären unter welchen physiologischen Gegebenheiten die unterschiedlichen Wege der Autophagieinduktion ablaufen.

1.3. Das Endocannabinoid-System

Cannabis sativa wird als Heilpflanze in der chinesischen und indischen Medizin bereits seit über 4000 Jahren genutzt. 1964 konnte die chemische Struktur von Delta-9-Tetrahydrocannabinol (THC, Abb. 4A) der hauptsächlich enthaltenen psychoaktiven Substanz der Hanfpflanze aufgeklärt werden (Gaoni und Mechoulam, 1964). *Cannabis sativa* enthält auch weitere Phytocannabinoide, die strukturell mit dem THC verwandt sind, jedoch keine (Cannabinol, Abb. 4A) oder nur eine sehr schwache (Cannabidiol, Abb. 4A) psychoaktive Wirkung haben (Loewe, 1945; Mahadevan et al., 2000; Mechoulam und Shvo, 1963). Es dauerte nach der Isolation und der Synthese des THC durch Gaoni und Mechoulam noch weitere 20 Jahre bis ein Rezeptor des THC identifiziert werden konnte; der Cannabinoid Rezeptor 1 (CB1) (Devane et al., 1988). Nachdem kurz darauf auch die codierende Sequenz des CB1 aufgeklärt wurde (Matsuda et al., 1990), konnte ein weiterer Cannabinoid Rezeptor (CB2) mit Hilfe der CB1-Sequenz identifiziert werden (Munro et al., 1993). Beide Rezeptoren sind strukturell sehr ähnlich, so besitzen sie sieben Transmembran-Domänen und gehören zu den $G_{i/o}$ -Protein-gekoppelten Rezeptoren. Der CB2-Rezeptor wird hauptsächlich in peripheren Immunzellen sowie in immunologisch relevanten Organen (wie den Mandeln und der Milz) exprimiert (Breivogel und Childers, 1998; Galiègue et al., 1995; Pertwee, 1997). Die CB2-Expression wurde jedoch auch in bestimmten Zellen im ZNS, wie Mikroglia und neuronalen Zellen des Hirnstamms, nachgewiesen (Van Sickle et al., 2005; Walter et al., 2003). Der CB1-Rezeptor wird primär in neuronalen Zellen des ZNS exprimiert, weshalb er lange als der neuronale und der CB2 als der periphere Cannabinoid Rezeptor galt. Als die hauptsächlichste physiologische Rolle des CB2 gilt dabei immernoch eine regulatorische Funktion im Immunsystem (Howlett, 2002). Die CB1-Expression wurde jedoch mittlerweile neben dem ZNS auch in einer Vielzahl peripherer Organe und Gewebe nachgewiesen. Dazu zählt das Fettgewebe, Zellen des Gastrointestinaltrakts, die Nebenniere, die Skelettmuskeln, die Schilddrüse, Hepatozyten, die Nieren, die Reproduktionsorgane und endokrine Zellen des Pankreas (Chorvat et al., 2012; Jenkin et al., 2010; Pagotto et al., 2006). Der CB1 scheint deshalb eine Reihe weiterer physiologischer Funktionen auszufüllen, welche über seine Rolle bei der retrograden synaptischen Signal-Transduktion im ZNS hinaus gehen (siehe Kapitel 1.3.2.). Neben der Lokalisation in der Plasmamembran an der Synapse und am Axon wurde schon früh beschrieben, dass der CB1 auch intrazellulär vorkommt. Dabei kann auch in Neuronen ein großer Anteil des Proteins innerhalb der Zelle liegen, ohne dass der Transmembranrezeptor über das lysosomale System abgebaut wird (Leterrier et al., 2004; Pickel et

1.3. Das Endocannabinoid-System

al., 2004). Die dauerhafte Inkubation mit Agonisten verstärkt die intrazelluläre Lokalisation des CB1 (Letierrier et al., 2006). Ein Teil des endozytierten CB1 wird dann konstant über die lysosomale Degradationsmaschine abgebaut (Grimsey et al., 2010). Erst kürzlich veröffentlichten He und Kollegen, dass die Degradation des CB1 auch abhängig von autophagischen Prozessen stattfindet und die Bildung von Autophagosomen dafür notwendig ist. Dabei werden neben dem CB1 auch andere G-Protein-gekoppelte Rezeptoren über den BECLIN2-abhängigen autophagosomalen Abbauweg degradiert (He et al., 2013). Der endosomale Transport des Rezeptors und seine Degradation über das autophagosomale/lysosomale System scheinen jedoch nicht die einzigen Gründe für die intrazelluläre Lokalisation des CB1 zu sein. Funktionelle CB1-Rezeptoren wurden auch als integraler Teil der Lysosomenmembran und in Mitochondrien beschrieben (Bénard et al., 2012; Brailoiu et al., 2011; Sarnataro et al., 2005). Dabei wird schon länger eine Funktion von intrazellulären G-Protein-gekoppelten Rezeptoren bei der Regulation von autophagischen Prozessen diskutiert (Gohla et al., 2007). So veröffentlichten Noonan und Kollegen 2010 einen Bericht, wonach CB1-Aktivität zur Stabilisierung der Lysosomenmembran in einem A β -induzierten Proteinstressmodell führt (Noonan et al., 2010). Da der CB1 auch in vielen nicht-neuronalen Zelltypen und Geweben exprimiert wird und er dort folglich nicht die synaptische Reizweiterleitung modulieren kann, wäre es möglich dass er dort hauptsächlich bei der lysosomalen Degradation eine Rolle spielt. Dabei wurde bislang noch nicht ausreichend untersucht, ob der CB1 eine Rolle bei der Autophagosomen-Bildung spielt. In den letzten Jahren wurden Untersuchungen veröffentlicht die zeigen, dass eine Stimulation des CB2 mit hohen Dosen an Cannabinoiden zu einer Steigerung der autophagischen Aktivität führt (Carracedo et al., 2006). Die CB2-abhängige Stimulation der Autophagie scheint dabei eine Reaktion auf Ceramid-vermittelten Stress des Endoplasmatischen Retikulums zu sein und über den AMPK-mTOR-Signalweg induziert zu werden (Salazar et al., 2009; Vara et al., 2011).

Durch die Identifizierung der THC-Rezeptoren konnten auch endogene Liganden, die Endocannabinoide, identifiziert werden. Man unterscheidet heute drei Gruppen von Cannabinoiden: (1) aus *Cannabis Sativa* und weiteren Pflanzen gewonnen Phytocannabinoide (2) künstlich hergestellte synthetische Cannabinoide (3) im Körper selbst synthetisierten Endocannabinoide. Die ersten beschriebenen Moleküle der aus Phospholipid-Vorläufern gebildeten Stoffklasse der Endocannabinoide waren das N-Arachidonylethanolamin (Anandamid, AEA; Abb. 4B) und das 2-Arachidonylglycerol (2-AG, Abb. 4B) (Devane et al., 1992; Mechoulam et al., 1995; Sugiura et al., 1995).

1.3. Das Endocannabinoid-System

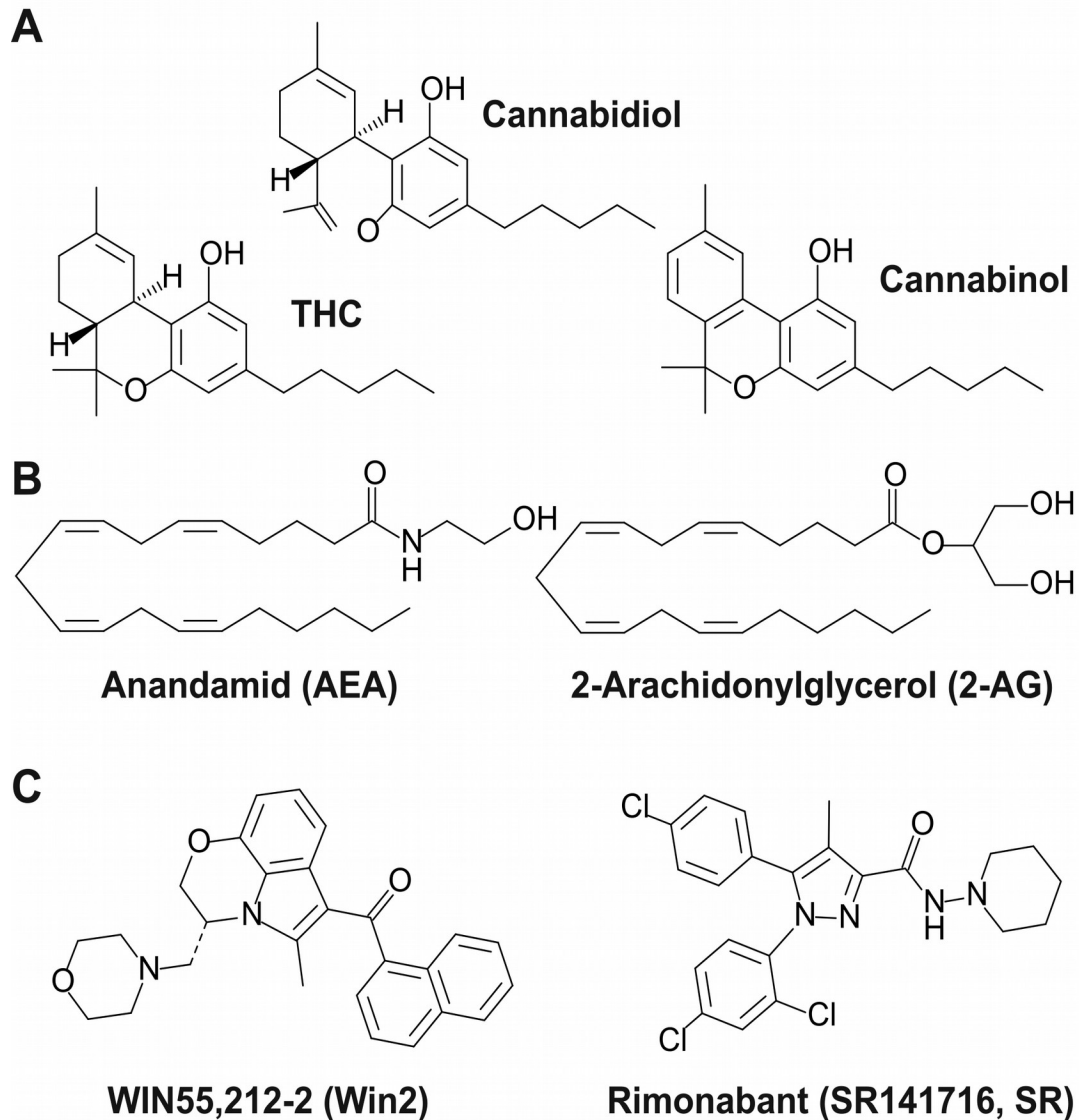


Abbildung 4: Strukturformeln einiger Cannabinoide

[A] Strukturformeln der Phytocannabinoide Delta-9-Tetrahydrocannabinol (THC), Cannabidiol und Cannabinol. [B] Strukturformeln der prominenten Endocannabinoide N-Arachidonylethanolamin (Anandamid, AEA) und 2-Arachidonylglycerol (2-AG). [C] Strukturformel des synthetischen CB1- und CB2-Agonisten WIN55,212-2 (Win2) und des CB1-spezifischen Antagonisten Rimonabant (SR141716, SR).

Endocannabinoide und die Cannabinoid-Rezeptoren bilden mit ihrem komplexen Zusammenspiel das so genannte Endocannabinoid-System (ECS) aus. Es gibt jedoch Hinweise darauf, dass einige Endocannabinoide (wie AEA oder 2-AG) nicht nur an CB1- und CB2-Rezeptoren binden, sondern auch mit dem *orphan* G-protein-gekoppelten Rezeptor GPR55 und dem *peroxisome proliferation receptor gamma* und *alpha* (PPAR γ und PPAR α) interagieren (Bouaboula et al., 2005; Mackie und Stella, 2006; O'Sullivan, 2007). Zudem scheint Anandamide das ECS mit dem Vanilloid-System zu verbinden, da AEA auch an den Vanilloid-Rezeptor TRPV1 bindet und diesen aktivieren kann (Di Marzo et al., 1998; Zygmunt et al., 1999). Endocannabinoide scheinen also unterschiedliche

1.3. Das Endocannabinoid-System

endokrine Systeme miteinander verknüpfen zu können.

Ein wichtiges synthetisches Cannabinoid ist das Aminoalkylinol-Derivat Win55,212-2 (Win2, Abb. 4C). Win2 ist kein selektiver Agonist des CB1, sondern bindet auch an den CB2, wobei die Affinität für den CB2 höher ist (Felder et al., 1995; Song et al., 1999). Da Win2 aber auch eine höhere Bindungsaffinität an den CB1 hat als THC, wird es in Tier- und Zellmodellen oft als CB1- oder CB2-Agonist eingesetzt (Kuster et al., 1993). Ein wichtiger synthetischer und spezifischer Antagonist des CB1 ist das Blut-Hirn-Schranken-gängige Rimonabant (SR141716, SR; Abb. 4C) (Rinaldi-Carmona et al., 1994). Rimonabant wurde sehr erfolgreich zur Behandlung von Adipositas eingesetzt, musste jedoch auf Grund von psychiatrisch-relevanten Nebenwirkungen, wie Depression, wieder vom Markt genommen werden (de Kloet und Woods, 2009). In den letzten Jahren sind etliche synthetische Liganden für die Cannabinoid-Rezeptoren entwickelt worden, die zum Teil auch nicht Blut-Hirn-Schranken-gängig sind und somit nur periphere Rezeptoren binden (Gunderson, 2013).

1.3.1. Biosynthese und Metabolismus der endogenen Cannabinoide

Neben den bereits genannten Anandamid (AEA) und 2-AG wurden noch weitere strukturell ähnliche Stoffe wie das Palmithylethanolamin (PEA) als Cannabinoid-Rezeptor-Liganden identifiziert (Ueda et al., 2013). Den Endocannabinoiden ist dabei gemein, dass sie Phospholipidderivate darstellen und auf Grund ihres stark lipophilen Charakters nicht in Vesikeln gespeichert werden, sondern bei Bedarf aus ihren Lipidvorläufern direkt in der Membran synthetisiert werden (Di Marzo et al., 1994). Trotz der Möglichkeit einer Ca^{2+} -unabhängigen Stimulation der Endocannabinoidsynthese durch metabotrope Glutamat-Rezeptoren (Varma et al., 2001), sind Ca^{2+} und das zyklische Adenosinmonophosphat (cAMP) die zentralen Signalmoleküle bei der Stimulation der Endocannabinoidsynthese (Cadas et al., 1996; Di et al., 2005). Der Lipidvorläufer des Anandamid, N-Arachidonyl-Phosphatidylethanolamin, wird durch die Ca^{2+} -abhängige N-Acetyltransferase umgesetzt und anschließend durch die Phospholipidase D zu AEA umgewandelt. Anandamid wird dabei vor allem im Gehirn, Teilen des Immunsystems (Makrophagen), in Endothelzellen und in Thrombozyten synthetisiert. Der Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration induziert bei der 2-AG-Synthese zunächst die Aktivierung der Phospholipase C und den Umsatz von 2-Achidonoyl-Phosphatidylinositol, die Diacylglycerinlipase (DAGL) bildet dann im Anschluss das 2-AG. Der Abbau des AEA erfolgt über die

1.3. Das Endocannabinoid-System

Fettsäureaminhydrolase (FAAH) zu Ethanolamin und Arachidonsäure. 2-AG wird über die Monoacylglycerinlipase (MAGL) zu Glycerin und Arachidonsäure degradiert (Ueda et al., 2013).

1.3.2. Bekannte biologische Funktionen des Endocannabinoid-Systems

Die bisher am besten untersuchte Funktion des CB1 steht im Zusammenhang mit der durch das ECS generierten retrograden synaptischen Signaltransduktion (Ohno-Shosaku et al., 2001; Wilson und Nicoll, 2001). Bei Bedarf werden die lipophilen Endocannabinoide an der Postsynapse synthetisiert, gelangen über einen noch immer nicht verstandenen Mechanismus über den hydrophilen synaptischen Spalt und aktivieren an der Präsynapse den CB1. Dabei wird das intrazelluläre $G_{i/o}$ -Protein des Rezeptors aktiviert, was zunächst zu einer Schließung der spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanäle und zur Öffnung von K^+ -Kanälen (Typ K_{ir}^+) führt (Abb. 5) und dadurch die Erregbarkeit der Präsynapse reduziert (Kreitzer und Regehr, 2001).

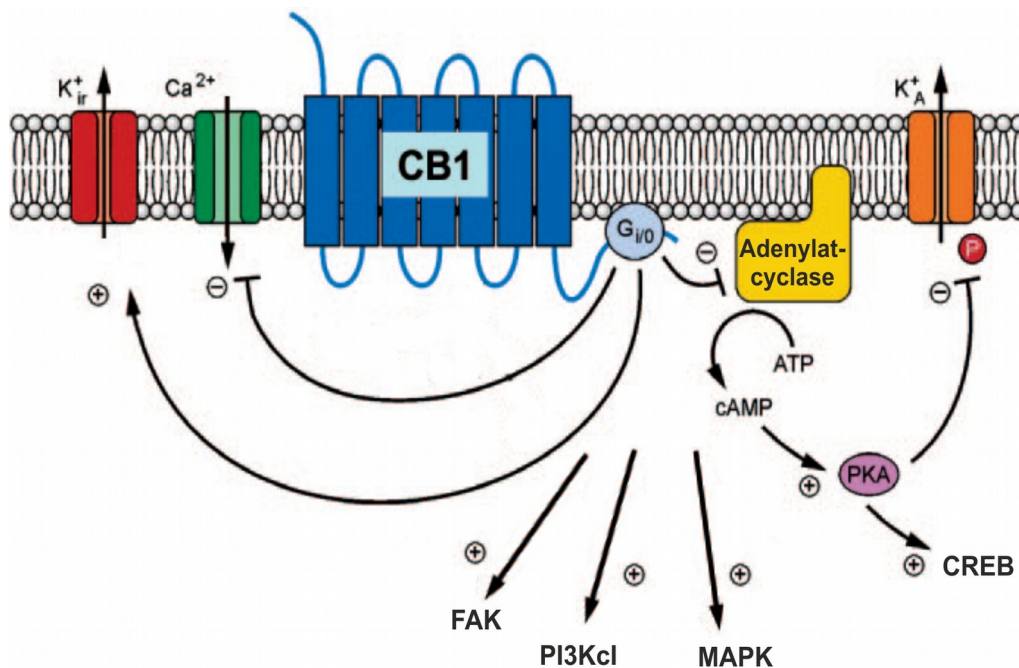


Abbildung 5: Durch den CB1-Rezeptor vermittelte Signaltransduktion

Schematische Darstellung der Signaltransduktions-Wege, die durch den CB1-Rezeptor moduliert werden (modifiziert nach Pagotto et al., 2006). Durch die Aktivierung des CB1 werden spannungsabhängige K^+ -Kanäle geöffnet und Ca^{2+} -Kanäle geschlossen. Über die Inhibition der Adenylatcyclase inhibiert CB1-Aktivität den CREB-Signalweg. Die FAK-, PI3Kcl- und MAPK-Signalwege werden durch CB1-Aktivität stimuliert.

Zudem wird über die Inhibition der Adenylatcyclase (AC) die Synthese des cAMPs reduziert und die durch cAMP in ihrer Aktivität stimulierte Proteinkinase A (PKA) in der Folge gehemmt. Dadurch kann die PKA weitere K^+ -Kanäle (Typ K_A^+) nicht phosphorylieren und damit nicht mehr

1.3. Das Endocannabinoid-System

schließen, was zusätzlich den K^+ -Ausstrom weiter fördert (Pagotto et al., 2006). Außerdem wird in Folge der Inhibition der PKA auch der CREB-Signalweg gehemmt. Stimulierend wirkt die Aktivität des CB1 hingegen auf die *mitogen-activated protein kinase* (MAPK), die Phosphatidylinositol-3-OH-Kinase Klasse 1 (PI3Kc1) und die *focal adhesion kinase* (FAK) (Derkinderen et al., 2003; Howlett, 2005; Pagotto et al., 2006). Zudem scheint der CB1 mit anderen Neurotransmitter-Rezeptoren (Orexin-, Serotonin- und Dopamin-Rezeptoren) zu interagieren und deren Signalwege zu beeinflussen (Devlin und Christopoulos, 2002; Hilairet et al., 2003; Kern et al., 2005). In den letzten Jahren mehren sich die Hinweise, nach denen der CB1 auch in der Kommunikation zwischen Glia-Zellen und Neuronen eine Rolle spielt. So wurden die für die Endocannabinoid-Synthese notwendigen Enzyme auch in Oligodendrozyten, Astro- und Mikrogliazellen nachgewiesen (Gomez et al., 2010; Hegyi et al., 2012; Stella, 2010).

Durch die Aktivierung des CB2 wird das assoziierte G-Protein analog zum CB1 aktiviert, was die Adenylatcyclase inhibiert und die MAPK aktiviert (Bouaboula et al., 1996; Slipetz et al., 1995). Im Gegensatz zum CB1 beeinflusst der CB2 durch seine Aktivität die spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanäle nicht, da er fast ausschließlich von Zellen des Immunsystems exprimiert wird (siehe Kapitel oben 1.3.) (Felder et al., 1995). Daher verwundert es nicht, dass die CB2-Aktivität bisher vor allem in Verbindung mit anti-inflammatorischen oder immunsuppressiven Funktionen beschrieben wurde (Atwood et al., 2012). Im Gegensatz zu den CB1 Knockout-Mäusen zeigen CB2 Knockout-Mäuse einen eher subtilen Phänotyp, der auf die Modulation des Immunsystems zurück zu führen ist. So ist in diesen Tieren die Lymphozyten-Proliferation gestört sowie die Sezernierung inflammatorischer Zytokine und die Aktivität von Makrophagen erhöht. Folglich lässt sich durch CB2-Stimulation die Ausschüttung inflammatorischer Zytokine sowie die chemotaktische Bewegung der Makrophagen und die mikrogliale Aktivierung unterdrücken (Buckley, 2008). Außerdem zeigen CB2 Knockout-Mäuse eine reduzierte Knochenmasse, was auf eine gestörte Funktion der CB2-exprimierenden Osteoblasten, Osteozyten und Osteoclasten hindeutet (Ofek et al., 2006). Zudem konnte eine CB2-vermittelte, anti-arteriosklerotische Wirkung durch die Gabe niedriger Dosen von Phytocannabinoiden in Mäusen beobachtet werden (Steffens et al., 2005).

Die meisten bisher beschriebenen physiologischen Funktionen des CB1 beruhen auf seiner oben beschriebenen Funktion in der retrograden synaptischen Signaltransduktion im ZNS. So zeigen CB1 Knockout-Mäuse eine veränderte Bewegungsfähigkeit sowie verstärktes Angstverhalten und eine reduzierte Lernleistung (Bilkei-Gorzo et al., 2005; Stumm und Hiebel et al., 2013; Zimmer et al., 1999). Da der CB1 im Cerebellum und in den Basalganglien verstärkt exprimiert wird, verwundert

1.3. Das Endocannabinoid-System

es nicht, dass er auch einen Einfluss auf Körperhaltung und Koordination beim Menschen hat (van der Stelt und Di Marzo, 2003). Zudem ist der CB1 an der Regulation der synaptischen Plastizität und der Entwicklung von Verhalten, wie Emotionen und Stress beteiligt (Häring et al., 2012). Außerdem zeigen CB1 Knockout-Mäuse ein geringeres Körpergewicht, als wildtypische Tiere (Cota et al., 2003; Stumm und Hiebel et al., 2013). Im umgekehrten Fall wird der CB1 selbst auch in Abhängigkeit der Ernährung differenziell reguliert. Mäuse die einer kalorischen Restriktion (KR) unterzogen wurden, zeigten eine verstärkte CB1-Expression, wohingegen Tiere, die mit cholesterinreicher Nahrung gefüttert wurden, reduzierte CB1-Spiegel zeigten (Hayakawa et al., 2007). Es wurden zudem unterschiedliche CB1-Polymorphismen identifiziert, die entweder mit einem reduzierten *body mass index* (BMI) in gesunden Menschen, oder mit Adipositas korrelierten (Benzinou et al., 2008; Gazzero et al., 2007). Aufgrund seiner starken Expression im ZNS wird die appetitfördernde Wirkung der CB1-Aktivität auch den neuronalen Funktionen im Hypothalamus und der Leptin-regulierten Signalwege des ZNS zugeschrieben (Quarta et al., 2011). In den letzten Jahren mehren sich die Berichte, dass der CB1 auch unabhängig seiner appetitfördernden Wirkung im ZNS direkt in peripheren Geweben an der Regulation des Energiemetabolismus beteiligt ist (O'Keefe et al., 2013).

1.3.3. Der Einfluss des ECS auf die Alzheimer'sche Demenz

Neben den antioxidativen chemischen Eigenschaften einiger Cannabinoide, stehen einige der neuroprotektiven Eigenschaften des ECS in direkter Verbindung mit der CB2-vermittelten Modulation des Immunsystems (siehe Kapitel 1.3.2.). Viele neurologische Erkrankungen wie AD, die Parkinson'sche Krankheit, Amyotrophe Laterale Sklerose (ALS) oder Multiple Sklerose (MS), gehen mit einer Entzündung im ZNS einher, die zur Neurodegeneration beiträgt. Die Unterdrückung neuroinflammatorischer Prozesse gilt daher als neuroprotektiv (Williamson et al., 2011). Die Endocannabinoide Anandamid (AEA), 2-AG und PEA besitzen anti-inflammatorische Eigenschaften, die zusätzlich zu den Cannabinoidrezeptoren (CB1 und CB2) über Aktivierung der PPAR α - und PPAR γ -Rezeptoren vermittelt sind (O'Sullivan und Kendall, 2010). In einem Ratten-Modell wurde eine Reduktion der durch Lipopolysaccharid-Injektion induzierten Neuroinflammation durch Behandlung der Tiere mit dem synthetischen CB1-/CB2-Agonisten Win2 beobachtet. Die mit Win2-behandelten Tiere zeigen auch eine verbesserte Gedächtnisleistung (Marchalant et al., 2008). Außerdem konnten Cannabinoid-Behandlungen in Modellen der MS das Überleben von

1.3. Das Endocannabinoid-System

Oligodendrozyten-Vorläufern verbessern und die mikrogliale Aktivierung unterdrücken, was auch zu einer verbesserten Motorik von behandelten Mäusen führte (Arévalo-Martín et al., 2003; Loría et al., 2008; Molina-Holgado et al., 2002). Auch in anderen Modellen neurodegenerativer Erkrankungen, wie die Parkinson'sche Krankheit oder ALS, wurden CB2-Agonisten eingesetzt um die Neuroinflammation zu unterdrücken und den degenerativen Phänotyp abzumildern (Price et al., 2009; Shoemaker et al., 2007). Dabei bleibt die anti-inflammatorische Wirkung der CB2-Liganden nicht darauf beschränkt, die Proliferation der Mikroglia zu unterdrücken, sondern es werden auch weitere anti-inflammatorische Signalmoleküle, wie das Interleukin-10, nach CB2-Aktivierung verstärkt ausgeschüttet (Correa et al., 2010). Die durch den CB1 vermittelte Neuroprotektion steht in den meisten Fällen im direkten Zusammenhang mit seiner Rolle bei der retrograden synaptischen Signaltransduktion im ZNS (siehe Kapitel 1.3.2.). So zeigten Marsicano und Kollegen, dass CB1-Rezeptor-Aktivität vor Kainat-induzierter Exzitotoxizität schützt und die Injektion des Kainats wiederum zur verstärkten Ausschüttung von AEA führt (Marsicano et al., 2003). Zudem scheint der CB1 das neuronale Zellüberleben durch Hemmung der Caspase-3-Aktivität zu fördern, da in CB1 Knockout-Mäusen eine erhöhte Caspase-3-Aktivität zu beobachten ist (Jackson et al., 2005a). Außerdem scheint CB1-Aktivität auch die Produktion neurotropher Faktoren, wie BDNF und bFGF, zu steigern (Aguado et al., 2007; Marsicano et al., 2003).

In den vergangenen Jahren wurde in einigen Studien Veränderungen des ECS bei der Alzheimer'schen Krankheit und der direkte Einfluss des ECS auf die AD-Pathologie untersucht. Dabei tragen auch im Fall der AD inflammatorische Prozesse zur Neurodegeneration bei. In Gehirnen von AD-Patienten wurde eine starke Überexpression des CB2 in aktivierten Mikroglia-Zellen beobachtet. Diese ging einher mit einer Überexpression des AEA-Degradationsenzym Fettsäureaminhydrolase (FAAH) in aktivierten Astrozyten (Benito et al., 2003). Zudem berichteten Ramirez und Kollegen von einer reduzierten Anzahl CB1 positiver Neurone im Cortex von AD-Patienten (Ramírez et al., 2005). Neben der veränderten Expression der CB1- und CB2-Rezeptoren weisen auch die an der Endocannabinoid-Synthese und -Degradation beteiligten Enzyme eine veränderte Expression und subzelluläre Lokalisation im Gehirn der AD-Patienten auf (Mulder et al., 2011). In unterschiedlichen Nagermodellen der AD zeigte die Behandlung mit Cannabinoiden protektive Effekte, wie eine reduzierte Neuroinflammation, verbessertes Lernverhalten und einen Schutz vor A β -induzierter Toxizität (Aso et al., 2012; Esposito et al., 2011; Martín-Moreno et al., 2012; Ramírez et al., 2005). Kürzlich wurde gezeigt, dass die neuroprotektiven und anti-inflammatorischen Eigenschaften des Win2 bei A β -induzierter Toxizität durch CB1- und CB2-

1.3. Das Endocannabinoid-System

Aktivierung vermittelt wird (Fakhfour et al., 2012). Umgekehrt scheinen auch die A β -Peptide das ECS zu beeinflussen und durch eine Veränderung der Signalwege des ECS toxische Effekte auszulösen (Chen et al., 2011b; Jung et al., 2012; Mulder et al., 2011). Dabei ist noch nicht genau verstanden, über welchen Mechanismus zusätzlich zur anti-inflammatorischen Wirkung, die Cannabinoide ihre neuroprotektive Wirkung bei der AD-Pathologie ausüben. Diskutiert werden hier vor allem eine Beteiligung des MAPK- oder des *glycogen synthetase 3 beta* (GSK3 β -) Signalwegs (Martín-Moreno et al., 2012; Milton, 2002). Außerdem wurden als Wirkmechanismus die Hemmung der Acetylcholinesterase oder die chemische Eigenschaft vieler Cannabinoide als Antioxidantien vorgeschlagen (Eubanks et al., 2006; Marsicano et al., 2002a). Als weitere Möglichkeit wurde auch eine aggregationshemmende Wirkung der Cannabinoide auf A β -Peptide vorgeschlagen (Eubanks et al., 2006). Dies scheint allerdings auf Grundlage aktueller Erkenntnisse, nach denen A β -Aggregate nicht die toxische Spezies der A β -Peptide darstellen, unwahrscheinlich (siehe Kapitel 1.1.1.). Zudem zeigt auch nicht zuletzt das für diese Studie verwendete Mausmodell der Alzheimer'schen Krankheit, dass die Anzahl an amyloiden Plaques nicht mit der Lernleistung der Tiere korrelieren. Das Fehlen des CB1-Rezeptors führt jedoch gleichzeitig zu einer Verschlechterung des kognitiven AD-Phänotyps der APP23-Mäuse (Stumm und Hiebel et al., 2013).

1.4. Zielsetzung der Arbeit

Im ersten Teil dieser Arbeit sollten zunächst Fragestellungen geklärt werden, die sich aus der vorangegangenen Charakterisierung der APP23xCBN-Mauslinie durch Christoph Stumm ergeben haben (Stumm, 2011). Dazu sollte die Morphologie der Astro- und Mikrogliazellen bei der in den 20-Monate alten APP23- und APP23/CB1^{-/-}-Tieren beobachteten Gliose genauer untersucht werden. Zudem galt es das Gewicht der unterschiedlichen Genotypen durchgehend zu bestimmen um zu klären, ob sich hier eine Veränderung zu einem bestimmten Entwicklungszeitpunkt während der Alterung der Mäuse zeigt. Eine wichtige Frage dabei war, ob die veränderte Prozessierung des APP in Abhängigkeit der CB1-Expression in den 20-Monate alten Mäusen ein Effekt der verpaarten Mauslinien ist, oder ob dies einen generellen, zellphysiologischen Zusammenhang der CB1-Expression mit der APP-Prozessierung widerspiegelt. Dafür sollten zunächst junge (2-Monate alte) Tiere der APP23xCBN-Mauslinie auf eine veränderte APP-Prozessierung hin untersucht werden. Weiterführend sollte analysiert werden, ob in einem neuronalen Zellmodell eine genetische Modulation der CB1-Expression die APP-Prozessierung beeinflusst. Abschließend sollte geklärt werden, welcher der intrazellulären Signalwege die durch die CB1-Aktivität verändert werden, diese Modulation der APP-Prozessierung vermitteln könnte.

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte die Hypothese überprüft werden, ob eine CB1-abhängige Veränderung der autophagischen Aktivität verantwortlich für den degenerativen Phänotyp der APP23/CB1^{-/-} gegenüber der APP23-Mäuse ist. Diese Hypothese beruht auf der Erkenntnis, dass die Autophagie Einfluss auf pathologische Prozesse bei der AD hat und das ECS wiederum auch einen Einfluss auf die autophagische Aktivität ausübt. Es sollte also untersucht werden, ob eine mögliche CB1-abhängige Veränderung der Autophagie den „*second hit*“ in diesem Mausmodell ausmacht. Da der dynamische Prozess der Autophagie auf molekularer Ebene sowie methodisch besser in zellulären Modellen untersucht werden kann, sollte anhand einer endogen CB1-exprimierenden Zelllinie der mögliche Einfluss des CB1 auf die autophagische Aktivität untersucht werden. Später könnte über den pharmakologischen Zugang des CB1 die autophagische Aktivität moduliert werden, was die Möglichkeit einer neuartigen Behandlungsstrategie für die Alzheimer'sche Krankheit eröffnen könnte.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Zelllinien und Bakterien

In dieser Doktorarbeit kamen murine Neuroblastom Zellen (N2A) sowie *human embryonic kidney*-293A-Zellen (HEK-293a) zum Einsatz. Außerdem wurden auf Basis dieser Zelllinien stabil-transgene Zelllinien generiert (siehe Kapitel 2.2.2.3.3.). Zudem kamen stabil D2eGFP-exprimierende Zellen zum Einsatz, welche bereits zuvor beschrieben wurden (Gamerdinger et al., 2009). Diese wurden auf Basis von *human embryonic kidney*-293T-Zellen (HEK-293t) generiert und tragen ein Expressionsplasmid, welches eine cDNA für ein modifiziertes Grün-fluoreszierendes-Protein (GFP) trägt (HEK::D2eGFP). Dieses beinhaltet eine PEST-Sequenz (kodierend für die Aminosäuren: Prolin [P], Glutamat [E], Serin [S] und Threonin [T]), welches die Halbwertszeit des GFP stark verkürzt ($t_{1/2} = \text{ca. } 2 \text{ h}$) und zu einem schnellen Abbau im Proteasom führt (Andreatta et al., 2001).

Die für die Transfektionen der Zelllinien verwendeten Plasmide wurden in kompetenten Bakterien des Stamms *Escherichia coli* DH5 α (Invitrogen) amplifiziert.

2.1.2. Mausstämme

Die verwendeten Mausstämme wurden in der Tierhaltung des Instituts für Pathobiochemie nach den Richtlinien der Zentralen Versuchstier-Einrichtung Mainz (ZVTE, „Nutzordnung für die Tierhaltung“) in einem 12h:12h Hell:Dunkel-Zyklus gehalten. Wasser und Futter waren den Mäusen *ad libitum* bereit gestellt. Die verwendeten Mauslinien basieren alle auf dem C57/BL6n Inzuchtmausstamm.

Die hier verwendete Linie der Cannabinoid Rezeptor 1 Knockout Mäuse (CBN) stammen aus dem Labor von Prof. Beat Lutz (Institut für Physiologische Chemie, Universitätsmedizin Mainz). Es handelt sich hierbei um Tiere mit einem konventionellen CB1 Knock-out, bei dem sich die Tiere von Anfang an und in allen Geweben ohne funktionellen CB1 entwickeln (Marsicano et al., 2002b). Die bereits von Novartis generierten APP23-Tiere (Sturchler-Pierrat et al., 1997) dienten als Mausmodell der Alzheimer'schen Erkrankung. Diese Mäuse tragen die cDNA einer doppelt-

2.1. Material

mutanten Version des humanen *Amyloid Precursor Protein* (APP₇₅₁, Aminosäureposition 670/671: KM → NL), der sogenannten schwedischen Mutante des APP, unter der Kontrolle des murinen Thy-1 Promotors. Dies führt zur neuronenspezifischen Überexpression des mutanten APP (Lüthi et al., 1997). Die Mäuse wurden dabei stets so gezüchtet, dass man hemizygot Tiere erhielt. Des Weiteren wurden auch ausschließlich hemizygot Mäuse analysiert. Im Gegensatz zu wildtypischen Tieren, entwickeln die APP23-Mäuse durch die Überexpression des mutanten APP eine Amyloidpathologie, die ab dem sechsten Lebensmonat in Form von amyloiden, extrazellulären Plaques zu beobachten ist (Sturchler-Pierrat et al., 1997).

2.1.3. Plasmide, Primer und siRNA

Die für diese Doktorarbeit verwendeten Plasmide (Tabelle 2), Primer- (Tabelle 3) und siRNA-Sequenzen (Tabelle 4) sind in den unten stehenden Tabellen aufgeführt.

Tabelle 2: Plasmide

Vector::Insert	Prokaryotische Resistenz	Eukaryotische Resistenz	Bezugsquelle
pCDNA3.1	Neomycin	Ampicillin	Invitrogen
pCDNA3.1::hCB1	Neomycin	Ampicillin	Missouri S&T cDNA Resource Center
pCDNA3.1::hCB2	Neomycin	Ampicillin	Missouri S&T cDNA Resource Center
pEGFP-N1	Neomycin	Kanamycin	Clontech
pEGFP-N1::msCB1	Neomycin	Kanamycin	Prof. Beat Lutz (Mainz)
pEGFP-LC3	Neomycin	Kanamycin	Addgen (Jackson et al., 2005b)

Tabelle 3: Primer

	Primer	Sequenz
<i>Primer für RT-PCR und qPCR</i>		
humaner CB1	for-hCB1	5'-CGTCTGAGGATGGGAAGGTA-3'
	rev-hCB1	5'-TGTCGCAGGTCCTTACTCCT-3'
humaner CB2	for-hCB2	5'-GCCATTGACCGATACTCTG-3'
	rev-hCB2	5'-GATTCCGGAAAAGAGGAAGG-3'
humaner/muriner CB1	for-h/mCB1	5'-TGTGGAAGGCTCACAGCCA-3'
	rev-h/mCB1	5'-GTGGAGTTCAGCAGGCAGA-3'
humanes/murines RPL-19	for-RPL19	5'-GAAATCGCCAATGCCAACTC-3'
	rev-RPL19	5'-TTCCTTGGTCTTAGACCTGCG-3'
muriner CB1	for-mCB1	5'-GTCACCAGTGTGCTGTTGCT-3'
	rev-mCB1	5'-TCAACACCACCAGGATCAGA-3'
murines APP	for-mAPP	5'-GGAAGCAGCCAATGAGAGAC-3'
	rev-mAPP	5'-GTTTCATGCGCTCGTAGATCA-3'

2.1. Material

Primer zur Genotypisierung der Mäuse

CB1-KO 5'(loxP)	cnr1-KO 5'(loxP)	5'-GCTGTCTCTGGTCCTCTTAAA-3'
CB1-KO 3'(loxP)	cnr1-KO 3'(loxP)	5'-GGTGTACCTCTGAAAACAGA-3'
CB1-KO Neomycin-Resistenz 3'	cnr1-KO neo-0 3'	5'-CCTACCCGGTAGAATTAGCTT-3'
APP (schwedische Mutante)	app23 for	5'-GAATTCCGACATGACTCAGG-3'
	app23 rev	5'-GTTCTGCTGCATCTTGGACA-3'
Aktin	actin for	5'-GACAGGATGCAGAAGAGAAT-3'
	actin rev	5'-TTGCTGATCCACATCTGCTG-3'

Tabelle 4: siRNA (Sense-Strang)

Ziel	siRNA	Sequenz
	Nonsense murin	5'-GGGAAAUGCGUUAGCAGUGAU-3'
	Nonsense human	5'-AUUCUCCGAACGUGUCACG-3'
humanes BECLIN1	hBECLIN1-#1	5'-UCAGAGAGAAUACAGUGAA-3'
	hBECLIN1-#2	5'-CAGUUACAGAUGGAGCUAA-3'
humaner CB1	hCB1-#1	5'-CCAGGUGAACAUUACAGAA-3'
	hCB1-#2	5'-GAUGAACAAAGCUCAUUAAG-3'
muriner CB1	mCB1-#1	5'-AGAUGACGGCAGGAGACAA-3'
	mCB1-#2	5'-CCAACAUUACAGAGUUCUA-3'

2.1.4. Antikörper

Die für diese Doktorarbeit verwendeten Primär- (Tabelle 5) und Sekundär-Antikörper (Tabelle 6) sind in den unten stehenden Tabellen aufgeführt.

Tabelle 5: Primär-Antikörper

Antigen	Wirtsspezies	Hersteller
Aktin	Kaninchen	Sigma-Aldrich
APP (A β -Domaine, 6E10)	Maus	Covance
APP (C-Terminus, A8717)	Kaninchen	Sigma-Aldrich
APP (N-Terminus, 22C11)	Maus	Merck-Millipore
BAG3	Kaninchen	Proteintech
BECLIN1	Kaninchen	Cellsignaling
CB1	Kaninchen	Frontier Science
ERK (p44/42 MAP-Kinase) - Gesamtprotein	Kaninchen	Cellsignaling
ERK - phosphoryliert	Maus	Cellsignaling
GFP/eGFP	Kaninchen	Clontech
GFAP	Kaninchen	Dako
HSC70	Ratte	ENZO
HSP72	Maus	ENZO

2.1. Material

LAMP1	Kaninchen	Abcam
LAMP2	Maus	Abcam
LC3b I&II (LC3)	Kaninchen	Sigma-Aldrich
mTOR - Gesamtprotein	Maus	Merck-Millipore
mTOR – phosphoryliert an Serin 2448	Kaninchen	Abcam
NBR1	Maus	Abcam
p62/SQSTM1	Meerschweinchen	Progen
Tubulin	Maus	Sigma-Aldrich
WIPI1	Kaninchen	Sigma-Aldrich

Tabelle 6: Sekundär-Antikörper

Antigen	Konjugat	Hersteller
Meerschweinchen Immunglobulin	DyeLight-649	Jackson ImmunoResearch
Meerschweinchen Immunglobulin	HRP	Jackson ImmunoResearch
murines Immunglobulin	Cy3	Jackson ImmunoResearch
murines Immunglobulin	HRP	Jackson ImmunoResearch
Kaninchen Immunglobulin	DyeLight-488	Jackson ImmunoResearch
Kaninchen Immunglobulin	HRP	Jackson ImmunoResearch
Ratte Immunglobulin	HRP	Jackson ImmunoResearch

2.1.5. Protein- und DNA-Größenstandards

Tabelle 7: Protein- und DNA-Größenmarker

	Marker	Hersteller
DNA	MassRuler DNA Ladder Mix, ready-to-us	Fermentas
Proteine	PageRuler Prestained Protein Ladder	Fermentas

2.1.6. Chemikalien und Reagenzienansätze

2.1.6.1. Chemikalien

Tabelle 8: Chemikalien und Reagenzien

Chemikalie	Hersteller
40 % Acrylamid / Bisacrylamid AccuGel (29:1)	National Diagnostics
Agarose	Biozym
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich
Ampicillin	Sigma-Aldrich
Bacto Agar	BD
Bacto Peptone	BD
Bacto Tryptone	BD

2.1. Material

Bis-Tris	Roth
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich
Bromphenolblau	Merck
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Sigma-Aldrich
Coomassie Brilliant Blue G-250	Thermo Scientific
Cycloheximid	Merck
Diethylpyrocarbonat (DEPC) behandeltes Wasser	Ambion
DMEM (# 41965-039)	Invitrogen
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Sigma-Aldrich
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth
Essigsäure	Roth
Ethanol (99,9 % p.a.)	Roth
Ethylendiamintetraazetat (EDTA)	Sigma-Aldrich
Ethylenglykolbisaminoethylethertetraessigsäure (EGTA)	Sigma-Aldrich
Ethidiumbromid	Roth
Fötale Kälberserum (FCS)	PAA
Fötale Kälberserum, delipidiert (dIFCS)	Lonza
para-Formaldehyd (PFA)	Sigma-Aldrich
FuGene	Promega
G-418	PAA
Glycerin	Merck
Glycin	Roth
Hefeextrakt	Invitrogen
HEPES	Sigma-Aldrich
para-Hydroxycoumarinsäure	Sigma-Aldrich
Isopropanol	Roth
Kaliumchlorid (KCl)	Sigma-Aldrich
Kanamycin	Roth
Luminol	Sigma-Aldrich
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Sigma-Aldrich
β-Mercaptoethanol	Roth
Methanol	Roth
Natriumacetat(3H ₂ O) (Na-Acetat[3H ₂ O])	Sigma-Aldrich
Natriumchlorid (NaCl)	Roth
Natriumfluorid (NaF)	Sigma-Aldrich
Natriumhydroxid (NaOH)	Roth
Natrium-Orthovanadat	Sigma-Aldrich
Natrium Pyruvat (100 mM)	Invitrogen
Orange G	Merck

2.1. Material

dPBS	Invitrogen
p-Phenylendiamin	Sigma-Aldrich
Phosphataseinhibitoren-Cocktail, <i>PhosStop</i>	Roche
Proteinaseinhibitoren-Cocktail, <i>complete EDTA-free</i>	Roche
Polyornithin	Sigma-Aldrich
Polyvinylalkohol	Sigma-Aldrich
Saccharose	Roth
<i>Sodiumdodecylsulfat</i> (SDS)	BioRad
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	BioRad
Tris-Base	Roth
Tris-HCl	Roth
Trypsinlösung	Invitrogen
Tween20	Roth

2.1.6.2. Reagenzienansätze

Tabelle 9: Reagenzienansätze

Name	Verwendung	Hersteller
BCA-Reagenz	siehe 2.2.3.2. Proteinbestimmung mittels BCA-Reagenz	Thermo Scientific
Jetstar 2.0 Maxi Kit	siehe 2.2.1.7. Plasmidpräparation	Genomed
NucleoSpin Plasmid	siehe 2.2.1.7. Plasmidpräparation	Macherey-Nagel
NucleoSpin RNA II Kit	siehe 2.2.1.1. RNA-Isolation	Macherey-Nagel
Omniscript RT Kit	siehe 2.2.1.2. cDNA-Synthese	Quiagen

2.1.7. Puffer und Lösungen

2.1.7.1. Puffer und Lösungen für molekularbiologische Methoden

Ampicillin Stamm-Lsg. (1000x)

100 mg/ml Ampicillin in ddH₂O

Kanamycin Stamm-Lsg. (1000x)

50 mg/ml Kamamycin in ddH₂O

LB-Agar

15 g Bacto Agar auf 1 L LB-Medium

LB-Medium (1 L in ddH₂O)

10 g Bacto Trypton

10 g NaCl

5 g Hefeextrakt

pH 7,5 (eingestellt mit NaOH)

2.1. Material

10x Orange-G-Ladepuffer (in ddH₂O)

50 % Glycerin
0,5 % Orange G

1xTAE Puffer

40 mM Tris-Base
20 mM Na-Acetat(3H₂O)
1 mM EDTA

2.1.7.2. Puffer und Lösungen für zellbiologische Methoden

Elektroporationspuffer

135 mM KCl
0,2 mM CaCl₂
2 mM MgCl₂
10 mM HEPES
5 mM EGTA
25% Hitze-inaktiviertes FCS
pH 7,3

Kryomedium zum Einfrieren von Zellen

90 % Nährmedium (siehe unten)
10 % DMSO

Nährmedium der Zelllinien

DMEM (# 41965-039)
+ 1 mM Natrium Pyruvat
+ 10 % FCS

Nährmedium (lipidfrei) der Zelllinien

DMEM (# 41965-039)
+ 1 mM Natrium Pyruvat
+ 10 % dIFCS

Nährmedium (Phenolrot-frei) der Zelllinien

DMEM (# 21063)
+ 1 mM Natrium Pyruvat
+ 10 % FCS

Nährmedium (serumfrei) der Zelllinien

DMEM (# 41965-039)
+ 1 mM Natrium Pyruvat

Trypsinlösung (in dPBS)

0,05 % Trypsin
0,02 % EDTA

2.1. Material

2.1.7.3. Puffer und Lösungen für proteinbiochemische Methoden

Blockierlösung

50 mM Tris
150 mM NaCl
3 % BSA
0,1 % Triton X-100
pH 7,3 einstellen und steril filtrieren

Coomassie-Entfärbelösung

70 % ddH₂O
20 % Ethanol
10 % Essigsäure

Coomassie-Färbelösung

0,25 % Coomassie Brilliant Blue G-250
in ddH₂O

Coomassie-Fixierlösung

50 % Methanol
40 % ddH₂O
10 % Essigsäure

Eindeckmedium

7 ml dPBS
1 g Polyvinylalkohol
→ bei 60°C komplett lösen
3 ml Glycerin
→ gut durchrühren, dann auf 4°C abkühlen
10 mg p-Phenylendiamin
pH 8-8,5 (eingestellt mit NaOH)

Inkubationspuffer für Immunfluoreszenz-Färbungen

50 mM Tris
150 mM NaCl
1 % BSA
pH 7,3 einstellen und sterilfiltrieren

Luminol-Entwicklerlösung

Lösung A: 0,1 M Tris-HCl
0,025 % Luminol
pH 8,6
Lösung B: 0,11 % para-Hydroxycommarinsäure in DMSO

Lysispuffer, standard

50 mM Tris-HCl
10 % Saccharose
1 mM EDTA

2.1. Material

1 mM EGTA
15 mM HEPES
1 mM Na-Orthovanadat
1 mM NaF
Proteinaseinhibitoren-Cocktail, *complete EDTA-free* (Roche)
Phosphataseinhibitoren-Cocktail, *PhosStop* (Roche)
auf pH 6,8 mit NaOH eingestellt und sterilfiltriert

Lysispuffer, hypotonisch
20 mM Tris-HCl
Proteinaseinhibitoren-Cocktail, *complete EDTA-free* (Roche)
Phosphataseinhibitoren-Cocktail, *PhosStop* (Roche)
auf pH 6,8 mit NaOH eingestellt und sterilfiltriert

Lysispuffer, SDS-haltig
150 mM Tris-HCl
30 % Saccharose
6% SDS
auf pH 6,8 mit NaOH eingestellt und sterilfiltriert

Gelpuffer
1,25 M Bis-Tris
pH 6,8

SDS-Ladepuffer (5x)
40 ml 1,25 M Tris-HCl (pH 6,8)
50 ml 100% Glycerin
0,01 % Bromphenolblau
8 % SDS
25 % β -Mercaptoethanol

Transferpuffer (Westernblot)
250 mM Glycin
25 mM Tris-Base (pH 8)
20% Methanol

Tris-gepufferte Salzlösung (TBS)
30 mM Tris
137 mM NaCl
3 mM KCl
pH 7,3

Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween20 (TBSt)
500 μ l Tween20 in 1 l TBS (siehe oben)

Waschpuffer für Immunfluoreszenz-Färbungen
50 mM Tris
150 mM NaCl; pH 7,3 eingestellt und sterilfiltriert

2.1. Material

2.1.8. Geräte

Tabelle 10: Geräteverzeichnis

Gerät	Hersteller
96-Loch-Platten-Fluoreszenzphotometer, <i>Fluoroscan Ascent FL</i>	Thermo Scientific
96-Loch-Platten-Photometer, <i>MultiskanSR</i>	Thermo Scientific
Agarosegel-Apperatur, <i>Agagel Mini</i>	Biometra
Brutschrank	Binder
Dunkelkammer-Dokumentiersystem, <i>Fusion-Capt</i>	PeqLab
Elektroporationsgerät, <i>Nucleofector I</i>	Lonza
Heizblock, <i>Thermomixer comfort</i>	Eppendorf
<i>Laser-scanning</i> -Mikroskop (konfokal), <i>LSM 710</i>	Zeiss
Mikrowellenofen	Progress
Rotationskryomikrotom, <i>CM 1900</i>	Leica
Spektralphotometer, <i>Nanodrop 1000</i>	Thermo Scientific
Schüttelinkubator, <i>Certomat</i>	BBI
Standzentrifuge, <i>Multifuge 3 S-R</i>	Heraeus
Thermozykler, <i>iCycler</i>	BioRad
Tischzentrifuge, <i>5415 R</i>	Eppendorf
Tischzentrifuge groß, <i>Universal 32r</i>	Hettich
<i>real-time</i> Thermocycler, <i>iCycler</i>	BioRad
Ultraschall-Sonifizierstaab, <i>UP50H</i>	Hielscher
Ultrazentrifuge, <i>TLX 120</i>	Beckman
UV-Geldokumentationsgerät, <i>Gel Jet Imager</i>	Intas
Zellkulturbrutschrank	Binder

2.1.9. Firmenregister

Tabelle 11: Firmenregister

Unternehmen	Sitz	Homepage
Abbott	Wiesbaden, Deutschland	http://www.abbott.de/
Abcam	Cambridge, UK	http://www.abcam.com/
Ambion	Karlsruhe, Deutschland	http://www.invitrogen.com/ambion
BD Biosciences (BD)	Heidelberg, Deutschland	http://www.bdbiosciences.com/
Beckman	Krefeld, Deutschland	http://www.beckmancoulter.de/
Binder	Tuttlingen, Deutschland	http://www.binder-world.com/

2.1. Material

Biomol	Hamburg, Deutschland	http://www.biomol.de/
Bioline	Luckenwalde, Deutschland	http://www.bioline.com/
Biometra	Göttingen, Deutschland	http://www.biometra.com/
BioRad	München, Deutschland	http://www.bio-rad.com/
Biozym	Oldendorf, Deutschland	http://www.biozym.com/
Braun Biotech International (BBI)	Berlin, Deutschland	http://bbi-biotech.com/
Cellsignaling	Danvers, USA	http://www.cellsignal.com/
Clontech	Saint-Germain-en-Laye, Frankreich	http://www.clontech.com/
Covance	Delaware, USA	http://www.covance.com/de/
Dako	Hamburg, Deutschland	http://www.dako.com/de/
ENZO	Lörrach, Deutschland	http://www.enzolifesciences.com/
Eppendorf	Hamburg, Deutschland	http://www.eppendorf.de/
Eurofins-MWG-Operon	Ebersberg, Deutschland	http://www.mwg-biotech.com/
Expedeon	Harston, UK	http://www.expedeon.com/
Fermentas	St. Leon-Rot, Deutschland	http://www.thermoscientificbio.com/fermentas/
Frontier Science	Ishikari, Japan	http://www.frontier-science.co.jp/FIwebE/antibodyshopE.html
Genomed	Löhne, Deutschland	http://www.genomed-dna.com/
Hartenstein	Würzburg, Deutschland	http://www.laborversand.de/
Heraeus	Langenselbold, Deutschland	siehe Thermo Scientific
Hettich	Tuttlingen, Deutschland	http://www.hettich-zentrifugen.de/
Hielscher	Teltow, Deutschland	http://www.hielscher.com/
Intas	Göttingen, Deutschland	http://www.intas.de/
Invitrogen	Karlsruhe, Deutschland	http://www.invitrogen.com/
Jackson ImmunoResearch	Suffolk, UK	http://www.jireurope.com/

2.1. Material

Lonza	Basel, Schweiz	http://www.lonza.com/
Leica	Wetzlar, Deutschland	http://www.leica-microsystems.com/
Macherey-Nagel	Düren, Deutschland	http://www.mn-net.com/
Marienfeld	Lauda-Königshofen, Deutschland	http://www.marienfeld-superior.com/
Menzel	Braunschweig, Deutschland	http://www.menzel.de/
Merck	Darmstadt, Deutschland	http://www.merck.de/
Merck-Millipore	Darmstadt, Deutschland	http://www.millipore.com/
Missouri S&T cDNA Resource Center	Rolla, USA	http://www.cdna.org/
National Diagnostics	Hessle, UK	https://www.nationaldiagnostics.com/
Novartis	Basel, Schweiz	http://www.novartis.com/
PAA	Cölbe, Deutschland	http://www.paa.com/
PeqLab	Erlangen, Deutschland	http://www.peqlab.de/
Progen	Heidelberg, Deutschland	http://www.progen.de/
Progress	Nürnberg, Deutschland	http://www.progress-hausgeraete.de/
Promega	Mannheim, Deutschland	http://www.promega.de/
Proteintech	Chicago, USA	http://www.ptglab.com/
Quiagen	Hilden, Deutschland	http://www.qiagen.com/
Roche	Basel, Schweiz	http://www.roche.com/
Roth	Karlsruhe, Deutschland	http://www.carlroth.com/
Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland	http://www.sigmaaldrich.com/
Thermo Scientific	Waltham, USA	http://www.thermoscientific.com/
Techno Plastic Products (TPP)	Trasadingen, Schweiz	http://www.tpp.ch/
VWR International (VWR)	Darmstadt, Deutschland	https://de.vwr.com/
Zeiss	München, Deutschland	http://corporate.zeiss.com/

2.2. Methoden

2.2.1. Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1. RNA-Isolation

RNA-Isolationen wurden mit dem NucleoSpin RNA II Kit (Macherey-Nagel) durchgeführt. Die Zellen wurden dafür in der Zellkulturschale einmal mit eiskaltem dPBS (Invitrogen) gewaschen, in 1 ml eiskaltem dPBS mit einem Zellspatel (TPP) abgeschabt und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß (Hartenstein) überführt. Die Zellen wurden bei 4 °C und 3.000 g für 5 min in einer Tischzentrifuge pelletiert; der Überstand wurde verworfen. Das Zellpellet wurde in frisch mit jeweils 3,5 µl β-Mercaptoethanol (Roth) versetzten 350 µl Lysispuffer (RA1, Macherey-Nagel) lysiert. Sollte die RNA-Isolation zu einem späteren Zeitpunkt erfolgen, wurde das Lysat so bei -80 °C gelagert und erst kurz vor der weiteren Isolation bei RT aufgetaut. Anschließend wurde das Lysat auf eine Vorfiltersäule (Macherey-Nagel) geladen und bei 4 °C und 11.000 g für 2 min zentrifugiert. Der Durchfluss wurde mit 350 µl Diethylpyrocarbonat (DEPC) behandeltem Wasser (Ambion) gemischt, auf eine RNA-Bindesäule (Macherey-Nagel) geladen und diese bei 4 °C und 11.000 g für 1 min zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen, die Säule mit 350 µl MDB-Puffer (Macherey-Nagel) beladen und bei 4 °C und 11.000 g für 1 min zentrifugiert. Der Durchfluss wurde wiederum verworfen und die Säule erneut bei 4 °C und 11.000 g für 1 min zentrifugiert. Anschließend erfolgte ein Verdau der auf der Säule gebundenen Nucleinsäuren mit je 10 µl DNaseI (Macherey-Nagel) in 100 µl Reaktionpuffer (Macherey-Nagel) für eine Stunde bei 37 °C in einem Brutschrank. Danach wurden die Säulen aus dem Brutschrank entfernt und auf RT abgekühlt sowie mit 250 µl Hochsalz-Waschpuffer (RA2, Macherey-Nagel) beladen und bei 4 °C und 11.000 g für 1 min zentrifugiert. Anschließend wurden die Säulen erst mit 600 µl, dann mit 300 µl Niedrigsalz-Waschpuffer (RA3, Macherey-Nagel) beladen und jeweils bei 4 °C und 11.000 g für 1 min zentrifugiert. Danach wurde noch einmal bei 4 °C und 11.000 g für 1 min zentrifugiert um Waschpufferreste vollständig zu entfernen. Die Elution der RNA erfolgte mit 60 µl DEPC-Wasser (60 °C) bei 11.000 g für 2 min in der Tischzentrifuge.

2.2. Methoden

2.2.1.2. cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthesen aus mRNA Transkripten erfolgten mit dem Omniscript RT Kit (Quiagen). Zunächst wurde die Konzentration der RNA-Proben mit dem Nanodrop Spektralphotometer bestimmt. Anschließend wurden gleiche Mengen an RNA (je nach erhaltener Konzentration der RNA-Präparation: 500 ng oder 1 µg) in 10 µl RNase-freien Wasser (Quiagen) verdünnt. Diese wurde dann bei 65 °C für 5 min in einem Thermozykler erhitzt und nach Ablauf der Zeit direkt für 1 min auf Eis schock-gekühlt. Die cDNA-Synthese erfolgte nach Zugabe von je 10 µl Reaktionsansatzes (2 µl RNase-freies Wasser [Quiagen], 2 µl 10x RT-Puffer [Quiagen], 2 µl dNTP-Mix [5 mM, Quiagen], 2 µl oligo(dT)15-Primer [10 µM, Promega], 1 µl RNasin [Promega], 1 µl reverse Transkriptase [Quiagen]) für 60 min bei 37 °C in einem Thermozykler. Zur Überprüfung der Qualität des DNaseI Verdaus (siehe 1.2.1.1. RNA-Isolation) wurde eine Kontrolle (MOCK) bestehend aus der verdünnten RNA mit Reaktionsansatz, bei dem das Enzym reverse Transkriptase durch RNase-freies Wasser ersetzt wurde, angesetzt. Sollte die cDNA nicht umgehend weiter analysiert werden, wurde diese bei -20 °C gelagert und kurz vor der Weiterverwendung auf Eis aufgetaut.

2.2.1.3. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die für die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) verwendeten Primer (Tabelle 3) wurden alle von Eurofins-MWG-Operon bezogen und haben jeweils eine Schmelztemperatur von 60 °C. Die PCR wurde in einem Thermozykler mit einem Reaktionsansatz von 25 µl (2 µl cDNA, 2,5 µl 10x PCR Puffer [Invitrogen], 0,75 µl MgCl₂ [50 mM, Invitrogen], 0,5 µl dNTPs [10 mM, PeqLab], 0,5 U Taq DNA-Polymerase [Invitrogen], je 0,5 µl Vorwärts- und Rückwärts-Primer [je 100 pmol/µl], 17,75 µl autoklaviertes Reinst-Wasser) in Reaktionsgefäßstreifen (Thermo scientific) durchgeführt. Hierbei wurde 4 min bei 95 °C initial aufgeköcht und dann für 35 Zyklen (1 min bei 95°C aufkochen, bei 60 °C für 30 sec Primer-binden, bei 72 °C für 30 sec elongieren) amplifiziert. Abschließend wurde für 5 min bei 72 °C final elongiert. Die amplifizierten DNA-Fragmente wurden in Agarosegelen mittels Gelelektrophorese analysiert (siehe Kapitel 2.2.1.5.).

2.2. Methoden

2.2.1.4. Quantitative *real-time* PCR (qPCR) und qPCR-Array

Zur Bestimmung der relativen Expressionsspiegel von mRNA-Transskripten wurden quantitative *real-time* PCR (qPCR) durchgeführt. Die hierfür verwendeten Primer (Tabelle 3; Eurofins-MWG-Operon) haben jeweils eine Schmelztemperatur von 60 °C. Die mRNA wurde jeweils mit dem NucleoSpin RNA II Kit (Macherey-Nagel; siehe 2.2.1.1. RNA-Isolation) präpariert und unter Verwendung des Omniscript RT Kits (Quiagen; siehe auch Kapitel 2.2.1.2.) in cDNA revers transkribiert. Die qPCR wurde für jedes Transkript in einem dreifachen 25 µl Ansatz (1 µl cDNA, 10,5 µl autoklaviertes Reinst-Wasser, je 0,5 µl Vorwärts- und Rückwärts-Primer [je 100 pmol/µl], 12,5 µl 2x SensiMix SYBR & Fluorescein [Bioline]) in 96-Loch Platten (Thermo scientific) durchgeführt. Hierbei wurde 15 min bei 95 °C initial aufgekocht und dann für 35 Zyklen (30 sec bei 95°C aufkochen, bei 60 °C für 30 sec Primer-bindern, bei 72 °C für 30 sec elongieren) in einem *real-time* Thermozykler amplifiziert. Nach jedem Amplifikations-Zyklus wurde für jeden Ansatz die Fluoreszenzintensität des SyBr-Farbstoffes bestimmt, die Intensität des Fluoresceins diente als Referenz-Korrektur. Der verwendete SyBr-Farbstoff (SyBr Green I) absorbiert im blauen Wellenlängenbereich des Lichts ($\lambda_{\max} = 494 \text{ nm}$), wenn er doppelsträngige DNA gebunden hat und emittiert dann im grünen Wellenlängenbereich ($\lambda_{\max} = 521 \text{ nm}$). Hierdurch ist eine Mengenbestimmung der im Ansatz enthaltenen doppelsträngigen DNA über die Intensitätsbestimmung der Fluoreszenz des SyBr-Farbstoffes möglich. Für die relative Berechnung der mRNA-Spiegel wurde der Zyklus, an dem die Fluoreszenz-Intensität des SyBr-Farbstoffs den Grenzwert (Ct) übersteigt, verwendet. Zusätzlich wurde für jeden Ansatz eine Schmelztemperatur-Analyse durchgeführt um die Spezifität der PCR zu überprüfen. Die relative Genexpression wurde mit Hilfe des REST-Softwaretools bestimmt (Pfaffl et al., 2002).

Die Expression 88 autophagie-relevanter Gene wurde mittels qPCR und der HATPL-1 (*Human Autophagy Primer Library*, Biomol) angepasst an die Vorgaben des Herstellers in zwei unabhängigen Experimenten durchgeführt. Dazu wurden die Primer der HATPL-1-Bibliothek zu je 1 µl pro Loch in 96-Loch-Platten aliquotiert und mit je 19 µl Reaktionsmischung (1 µl cDNA, 10 µl 2x SensiMix SYBR & Fluorescein [Bioline], 8 µl autoklaviertes Reinst-Wasser) versetzt. Die qPCR-Reaktion wurde in einem *real-time* Thermozykler wie oben beschrieben durchgeführt, jedoch die Binde-Temperatur der Primer auf 58 °C (für 45s) erniedrigt. Die Expression des Gens *actin beta* diente als Referenz (Primer in der HATPL-1 enthalten). Die relative Genexpression wurde wiederum mit Hilfe des REST-Softwaretools bestimmt (Pfaffl et al., 2002).

2.2. Methoden

2.2.1.5. Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese diente der Auftrennung von DNA Fragmenten in Abhängigkeit ihrer Größe. Durch die Phosphat-Gruppen im Zucker-Phosphat-Rückgrat der Nukleinsäuren sind diese negativ geladen und wandern im elektrischen Feld entsprechend ihrer Ladung zur Anode (Plus-Pol). Als Trennmatrix wurden Agarosegele verwendet, welche im erkalteten, festen Zustand in Abhängigkeit der Konzentration des Zuckers unterschiedlich dichte Poren bilden. Hier wurden stets horizontale 1 % Agarosegele verwendet; dafür wurde die entsprechende Menge Agarose in TAE Puffer aufgeköcht (siehe Kapitel 2.1.7.1.), mit Ethidiumbromid versetzt und zum Erkalten in die Gelappatur (Agagel Mini, Biometra) gegossen. Zum Beladen der Gele wurde zu den Proben 10x Orange-G-Ladepuffer (siehe Kapitel 2.1.7.1.) gegeben und diese dann bei 50 mA aufgetrennt. Die DNA-Banden wurden durch Anregung des interkalierten Ethidiumbromids unter UV-Licht (366 nm) in einem UV-Geldokumentationsgerät (Intas) sichtbar gemacht und dokumentiert.

2.2.1.6. Transformation und Selektion kompetenter Bakterien

Die Transformation der Bakterien des kompetenten Stammes *Escherichia coli* DH5 α (Invitrogen) erfolgte mittels Hitzeschocktransformation. Hierzu wurde ein Aliquot der Bakterien (25 μ l) mit 2 μ l der entsprechenden Plasmid-Lösung versetzt und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend folgte für 2 min bei 42 °C im Heizblock ein Hitzeschock, nachdem die Bakterien kurz auf Eis gestellt wurden. Danach wurden 500 μ l LB-Medium zu den Bakterien gegeben und sie für 1 h bei 37 °C im Heizblock inkubiert. Abhängig von der im Vektor enthaltenen Resistenzinformation wurden anschließend 100 μ l der Bakteriensuspension auf LB-Agarplatten ausgestrichen, die das entsprechende Selektionsantibiotikum enthielten und die Platten danach über Nacht im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Danach wurden Kolonien mit einer autoklavierten Pipettenspitze in 3 ml LB-Medium mit Selektionsantibiotikum umgeimpft und für 8 h bei 37 °C auf dem Schüttelinkubator inkubiert. Anschließend wurden entweder 2 ml des Ansatzes für eine Plasmid-Mini-Präparation verwendet (siehe Kapitel 2.2.1.7.) oder 1 ml zum Animpfen von 400 ml LB-Medium mit Selektionsantibiotikum für eine Plasmid-Maxi-Präparation (siehe Kapitel 2.2.1.7.) für die das angeimpfte LB-Medium bei 37 °C über Nacht auf dem Schüttelinkubator inkubiert wurde.

2.2. Methoden

2.2.1.7. Plasmidpräparation

2.2.1.7.1. Plasmid-Mini-Präparation

Die Plasmid-Mini-Präparationen wurden mit dem NucleoSpin Plasmid Kit (Macherey-Nagel) durchgeführt. Hierfür wurden 2 ml einer Bakterien-Schüttelkultur (siehe Kapitel 2.2.1.6.) für 2 min bei 11.000 g, 4 °C in der Tischzentrifuge abzentrifugiert, der Überstand wurde verworfen und in 250 µl RNase-haltigem Puffer (A1, Macherey-Nagel) resuspendiert. Anschließend wurden 250 µl Lysispuffer (A2, Macherey-Nagel) hinzugegeben und die Lösung nach mehrmaligem Invertieren für 5 min bei RT inkubiert. Danach wurden 300 µl Neutralisierungspuffer (A3, Macherey-Nagel) hinzugegeben und Lösung erneut mehrfach invertiert. Daraufhin wurde die Lösung für 10 min bei 11.000 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde auf eine Plasmidbindesäule geladen (Macherey-Nagel) und diese für 1 min bei 11.000 g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und die an der Säulenmatrix gebundene DNA zunächst mit 500 µl Waschpuffer (50 °C AW, Macherey-Nagel) und anschließend mit 600 µl Waschpuffer (A4, Macherey-Nagel) gewaschen, wobei die Säule jeweils für 1 min bei 11.000 g zentrifugiert wurde. Die Elution wurde in 50 µl auf 70 °C vorgeheiztem, autoklaviertem ddH₂O durchgeführt, wobei die Säule für 1 min vorinkubiert und anschließend für 1 min bei 11.000 g zentrifugiert wurde.

2.2.1.7.2. Plasmid-Maxi-Präparation

Die Plasmid-Maxi-Präparationen wurden mit dem Jet Star 2.0 Maxi Kit (Genomed) durchgeführt. Hierfür wurden die Bakterien einer 400 ml Über-Nacht-Kultur (siehe Kapitel 2.2.1.6.) bei 3.500 g und RT für 15 min in 600 ml Zentrifugationsbechern in der Standzentrifuge abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Bakterien in 15 ml RNase-haltigem Resuspensionspuffer (E1, Genomed) resuspendiert. Anschließend wurden 15 ml Lysispuffer (E2, Genomed) zur Suspension gegeben, diese mehrmals invertiert und für 5 min bei RT inkubiert. Danach wurden 15 ml Neutralisierungspuffer (E3, Genomed) zur Lösung gegeben und diese nach erneutem Invertieren für 15 min bei 9.000 g in der großen Tischzentrifuge zentrifugiert. Währenddessen wurde die Plasmidbindesäule (Genomed) mit 30 ml Equilibrierungspuffer (E4, Genomed) equilibriert und der Zentrifugationsüberstand anschließend auf die Säule gegeben. Nachdem der Überstand durch die Säule geflossen war wurde die Säulenmatrix mit 15 ml Waschpuffer (E5, Genomed) gewaschen. Die Elution erfolgte mit 20 ml Eutionspuffer (E6, Genomed) in ein mit 15 ml Isopropanol (Roth) beladenes Reaktionsgefäß (Greiner). Die gefällten Plasmide wurden dann für 90 min bei 9.000 g

2.2. Methoden

und 4 °C pelletiert, der Überstand verworfen und das Pellet mit 5 ml 70 % Ethanol (in autoklaviertem ddH₂O) überschichtet. Danach wurde für 30 min bei 9.000 g und 4 °C zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Plasmidpellet bei RT für 1 h getrocknet. Zum Schluss wurde das getrocknete Plasmidpellet in 400 µl autoklaviertem ddH₂O gelöst und die Konzentration der DNA im Spektralphotometer bestimmt.

2.2.2. Zellbiologische Methoden

2.2.2.1. Kultivieren der Zellen

Die verwendeten Zelllinien (siehe 2.1.1.) wurden subkonfluent auf 60 cm² Plastikschalen (Greiner) im Zellkulturbrutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂-Atmosphäre und gesättigter Luftfeuchte kultiviert. Das Nährmedium (siehe Kapitel 2.1.7.2.) wurde spätestens nach zwei Tagen gewechselt, oder die Zellen umgesetzt, falls sie zu dicht zum weiteren Kultivieren waren. Zum Umsetzen wurde zunächst die Dichte der Zellen mikroskopisch abgeschätzt und dadurch der gewünschte Verdünnungsfaktor bestimmt. Um die Zellen von der Plastikschale abzulösen, wurde zunächst einmal mit dPBS gewaschen und dann mit 1 ml der Trypsinlösung bei RT inkubiert, bis die Zellen sich begannen abzulösen. Zum Abstoppen wurde 5 ml Nährmedium verwendet und die Zelllösung in ein Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen wurden für 4 min bei RT und 800 g in einer Standzentrifuge pelletiert und anschließend in 10 ml frischem Nährmedium resuspendiert. Sollten die Zellen direkt für Experimente verwendet oder ausgesät werden, wurde die exakte Zellzahl mittels einer Neubauer Zählkammer (Marienfeld) bestimmt und die entsprechende Zellzahl verwendet; für die Standardkultur wurde gemäß des bestimmten Verdünnungsfaktors ausgesät.

2.2.2.2. Zellkultur für Immunfluoreszenz-Färbungen

Zellen für cytochemische Färbungen wurden in 24-Loch Platten (Greiner) kultiviert. Hierfür wurden Deckgläschen (Ø 12 mm, VWR) in den Löchern der 24-Loch Platte für 1 h bei 37 °C im Zellkulturbrutschrank mit Polyornithin (10 µg/ml in dPBS) beschichtet um den Zellen den Halt auf der Glasoberfläche zu erleichtern. Anschließend wurden die Deckgläschen in der 24-Loch Platte je einmal erst mit dPBS und dann mit Nährmedium gewaschen, bevor die Zellen in frischem Nährmedium auf die 24-Loch Platte ausgesät wurden.

2.2. Methoden

Zur Fixierung für zytochemische Färbungen wurden die Zellen nach dem jeweiligen Versuch einmal mit dPBS gewaschen und dann mit 1 ml Fixierlösung (4 % PFA in dPBS) pro Loch der 24-Loch Platte für 15 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde einmal mit dPBS gewaschen.

2.2.2.3. Transfektionen der Zelllinien

2.2.2.3.1. Transiente Transfektionen mittels Elektroporation

Transiente Transfektionen mittels Elektroporation bei Zelllinien wurden mit einem Nucleofector I Elektroporationsgerät, unter Verwendung von Elektroporationsküvetten mit einem 0,4 cm Spalt (Sigma-Aldrich), durchgeführt. Hierbei wurde das Zellpellet der gezählten Zellen (siehe Kapitel 2.2.2.1.) in 300 µl Elektroporationspuffer/Elektroporationsküvette resuspendiert und auf die Elektroporationsküvetten verteilt. Für die Transfektion wurden 30 µg Plasmid oder 30 µg siRNA (siehe Tabelle 2 und Tabelle 4) verwendet. Im Falle der siRNA kamen zwei unterschiedliche Sequenzen zu je 15 µg zum Einsatz um eine höhere Spezifität zu erreichen. Die siRNA-Sequenzen wurden mit dem siRNA-Design Online-Werkzeug (Eurofins-MWG-Operon) erstellt und haben einen Reynolds-Score von > 4 (Reynolds et al., 2004) sowie ein $\Delta G > -8$ der errechneten Sekundärstruktur (siRNA-Design Online-Werkzeug) im Bereich der mRNA-Sequenz. Die Elektroporation erfolgte für die Zelllinien jeweils mit dem Programm T-24. Nach Abgabe des Schlags durch das Elektroporationsgerät wurden die Zellen in der Küvette zur Regeneration für 5 min in den Zellkulturbrutschrank gestellt (37 °C, 5 % CO₂, gesättigte Luftfeuchte) und anschließend ausgesät.

2.2.2.3.2. Transiente Transfektionen unter Verwendung von FuGene

Für mikroskopische Aufnahmen von Zellen wurden diese am Vortag auf beschichtete Deckgläschen ausgesät (siehe Kapitel 2.2.2.2.) und mit Hilfe der FuGene Reagenz (Promega) transfiziert. Die zu verwendende Menge an FuGene wurde nach der Regel bestimmt: $3 \times \text{Nucleinsäuren} [\mu\text{g}] = \text{FuGene} [\mu\text{l}]$. Es wurden zunächst die Nucleinsäuren und das FuGene in zwei getrennten Ansätzen von je 500 µl Nährmedium ohne FCS verdünnt und anschließend der FuGene Ansatz zum Nucleinsäureansatz langsam hinzuge tropft. Danach wurde die Lösung mehrfach invertiert und für 15 min bei RT inkubiert. Zur Transfektion eines Deckgläschens in 1 ml einer 24-Loch Platte wurden 75 µl des oben beschriebenen FuGene-Transfektionsansatzes verwendet, für eine 60 cm² Schale wurde 1 ml des Ansatzes verwendet. Da keine toxischen Effekte des FuGene-Transfektionsansatzes auf die Zellen zu beobachten war, wurde der Ansatz auf den Zellen belassen, bis ein

2.2. Methoden

Mediumwechsel vor der Behandlung der Zellen im Zuge eines Versuchs stattfand.

2.2.2.3.3. Erzeugung stabil-transgener Zelllinien

Im Zuge dieser Doktorarbeit wurden stabil-transgene Zelllinien generiert:

Tabelle 12: Stabil-transgene Zelllinien

Bezeichnung	Basiszelllinie	Plasmid	Selektionsantibiotikum
N2A::eGFP	N2A	peGFP-N1	G-418 (Geneticin)
N2A::hCB1	N2A	pcDNA3.1::hCB1	G-418 (Geneticin)
N2A::msCB1eGFP	N2A	peGFP-N1::msCB1	G-418 (Geneticin)

Hierfür wurde zunächst ein möglichst ursprüngliches Aliquot (möglichst geringe Passagenzahl seit Einführung der Zellen) der Basiszelllinie aufgetaut und diese für zwei Passagen kultiviert (siehe Kapitel 2.2.2.1.). Anschließend wurden die 1,2 Millionen Zellen Mittels Elektroporation (siehe Kapitel 2.2.2.3.1.) mit dem entsprechenden Plasmid transfiziert und die Zellen auf eine 60 cm² Schale ausgesät. 24 h nach der Transfektion wurde den Zellen das Nährmedium gewechselt. Nach 48 h erfolgte ein erneuter Nährmediumwechsel, bei dem dem Nährmedium zuvor 1 mg/ml des Selektionsantibiotikums G-418 (PAA) zugegeben wurde. Die Zellen wurden nach 72 h das erste Mal umgesetzt (siehe Kapitel 2.2.2.1.), wobei das Nährmedium jetzt immer 1 mg/ml G-418 enthielt. Nach drei Passagen wurden die Zellen gezählt und je 150 Zellen in 30 ml Nährmedium (mit 1 mg/ml G-418) verdünnt. Die Zellsuspension wurde mit 100 µl pro Loch auf drei 96-Loch Platten (Greiner) verteilt und die Zellen im Zellkulturbrutschrank (37 °C, 5 % CO₂, gesättigte Luftfeuchte) kultiviert. Nach fünf Tagen wurde kontrolliert und vermerkt in welchen Löchern genau ein Zellklon gewachsen war und dort ein Nährmediumwechsel (100 µl mit 1 mg/ml G-418) durchgeführt. Anschließend wurde täglich kontrolliert, ob die Zellen die Fläche des Lochs dicht bewachsen hatten. Die Wachstumsgeschwindigkeit der generierten Zelllinien zeigten keine größeren Unterschiede. Sobald die Zellen eines Klons das Loch komplett bewachsen hatten, wurden sie mechanisch abgespült und in ein Loch einer 24-Loch Platte mit 1 ml frischem Nährmedium (mit 1 mg/ml G-418) übertragen. Nach 24 h wurde ein Nährmediumwechsel (mit 1 mg/ml G-418) durchgeführt und die Zelldichte täglich kontrolliert. Sobald die Zellen des Klons das Loch dicht bewachsen hatten, wurden sie einmal mit dPBS gewaschen und mit 100 µl Trypsinlösung inkubiert. Nach 2 min wurden die Zellen mit 1 ml frischem Nährmedium abgespült, für 4 min bei RT und 800 g in einer Standzentrifuge pelletiert und in 10 ml frischem Nährmedium (mit 1 mg/ml G-418) resuspendiert. Die so erhaltenen Zellen jedes Klons wurden auf je zwei 20 cm² Schalen (Greiner) ausplattiert. Nach 24 h erfolgte ein Nährmediumwechsel (mit 1 mg/ml G-418). Sobald die Zellen

2.2. Methoden

die Schale dicht bewachsen hatten, wurde je eine Platte zur Expressionsanalyse geerntet und die Zellen der anderen Platte in flüssigem Stickstoff kryokonserviert (siehe Kapitel 2.2.2.4.).

2.2.2.4. Kryokonservierung von Zelllinien in Flüssig-Stickstoff

Um Zelllinien langfristig zu erhalten und zu lagern wurden diese in 1,5 ml Kryogefäßen (Greiner) in Tanks mit flüssigem Stickstoff gelagert. Hierzu wurden die Zellen bei einer Passage (siehe Kapitel 2.2.2.1.) pelletiert und in Kryomedium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde auf die Kryogefäße verteilt und diese in *Mr.Frosty* Isopropanol-gefüllten Kryobehältern (Thermo Scientific) verlangsamt von RT auf -80 °C über Nacht eingefroren. Anschließend wurden die Kryogefäße in Lagertanks mit flüssigem Stickstoff gelagert.

Beim Auftauen der Zellen wurden die tiefgefrorenen Kryogefäße im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut und die enthaltene Zellsuspension in 10 ml frisches Nährmedium gegeben. Die Zellen wurden dann für 4 min bei RT und 800 g in einer Standzentrifuge pelletiert und in frischem Nährmedium ausgesät.

2.2.2.5. Cannabinoidbehandlungen

Die zu behandelnden Zellen wurden wie oben beschrieben (siehe Kapitel 2.2.2.1.) gezählt und auf Plastikschalen (TPP) in Nährmedium ausgesät. Nach 24 h wurde das Medium gewechselt und durch Nährmedium (delipidiert) ausgetauscht. Dies ist nötig, da sich eine hohe Konzentration an Endocannabinoiden im Serum befindet, die eine zusätzliche Stimulation mit extern zugegebenen Cannabinoiden erschweren (Marazzi et al., 2011). Nach weiteren 24 h wurde das Nährmedium (delipidiert) abgezogen und die Zellen mit den Cannabinoiden behandelt. Die Behandlung fand in serumfreiem Nährmedium statt, da sonst die stark lipophilen Cannabinoide durch den hohen Anteil an Bovinem Serum-Albumin (BSA) im Serum „weggefangen“ werden. Die verwendeten Konzentrationen an Cannabinoiden konnte so in einem niedrigen Konzentrationsbereich (nM) gehalten werden, was Rezeptor-unspezifische, lipophile Effekte der Cannabinoide auf die Zellen reduziert. Zur Messung des autophagischen Fluxes wurde für je 4 h mit den angegebenen Cannabinoiden vorinkubiert, bevor die Behandlung mit Bafilomycin (BafA1) für weitere 4 h erfolgte.

2.2.3. Proteinbiochemische Methoden

2.2.3.1. Aufarbeitung von Proteinproben für SDS-PAGE

2.2.3.1.1. Aufarbeitung von Proteinproben für SDS-PAGE aus Gewebe

Die zu präparierenden Tiere wurden zunächst mit Isofluran (Forene, Abbott) betäubt und dekapitiert. Die entnommenen Gewebe wurden in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und direkt in flüssig-Stickstoff schock-gefroren; die Lagerung der Proben fand anschließend bei -80 °C statt. Dabei wurde jeweils aus der linken Gehirn-Hemisphäre Cortex, Cerebellum und Hippocampus präpariert und für proteinbiochemische Untersuchungen verwendet. Aus der rechten Gehirn-Hemisphäre wurde entweder ebenfalls Cortex, Cerebellum und Hippocampus präpariert um Proben für RNA-Isolationen zurück zu halten, oder die gesamte rechte Gehirn-Hemisphäre wurde umgehend in 4 % PFA (in dPBS) überführt und für mindestens 24 h bei 4 °C fixiert (siehe Kapitel 2.2.3.6.). Die Gewebe, welche zur SDS-PAGE aufgearbeitet werden sollten, wurden zunächst mit Lysispuffer (siehe Kapitel 2.1.7.3.) versetzt und mit einem Plastikmörser (Eppendorf) im Reaktionsgefäß zerkleinert. Anschließend wurden die Proben mit einem Ultraschall-Sonifizierstab 3x 10 sec bei voller Leistung auf Eis sonifiziert und der Proteingehalt der Proben mittels BCA-Test (siehe Kapitel 2.2.3.2.) bestimmt.

2.2.3.1.2. Aufarbeitung von Proteinproben für SDS-PAGE aus Zellen

Die adhärenen Zellen wurden zunächst einmal mit eiskaltem dPBS gewaschen, dann in 1 ml eiskaltem dPBS mit einem Zellspatel abgeschabt (TPP) und für 5 min bei 4 °C und 3.000 g pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in eiskaltem Lysispuffer (siehe Kapitel 2.1.7.3.) resuspendiert. Anschließend wurden die Proben mit einem Ultraschall-Sonifizierstab 3x 10 sec bei voller Leistung auf Eis sonifiziert und der Proteingehalt der Proben mittels BCA-Test (siehe Kapitel 2.2.3.2.) bestimmt.

2.2.3.1.3. Fraktionierung von Gewebeproben

Zur Fraktionierung der Gewebeproben in Membranfraktion und lösliche Fraktion wurden die Gewebestücke zunächst in 300 µl hypotonischem Lysispuffer (siehe Kapitel 2.1.7.3.) aufgenommen und mit einem Plastikmörser (Eppendorf) im Reaktionsgefäß zerkleinert und homogenisiert. Anschließend wurde das Homogenat in der Ultrazentrifuge bei 100.000 g (TLA.120 Rotor, 55.000

2.2. Methoden

rpm) für 1 h bei 4 °C abzentrifugiert und der Überstand als lösliche Fraktion aufgefangen. Danach wurde das Pellet vorsichtig mit 300 µl hypotonischem Lysispuffer überschichtet und erneut bei 100.000 g für 15 min bei 4 °C zentrifugiert; der Überstand wurde verworfen. Das Pellet (Membranfraktion) wurde mit 300 µl SDS-haltigem Lysispuffer (siehe Kapitel 2.1.7.3.) versetzt und 3x auf Eis für je 10 sec sonifiziert.

2.2.3.2. Proteinbestimmung mittels BCA-Reagenz

Der BCA-Test basiert auf Bicinchoninsäure (*engl.: bicinchoninic acid [BCA]*) und der Reduktion von Cu^{+2} zu Cu^{+1} durch Proteine. Diese Reduktion erzeugt ein purpur-farbenes Produkt, welches aus zwei chelatierten BCA-Molekülen mit einem Cu^{+1} besteht. Dieser wasserlösliche Komplex zeigt eine starke Absorbtion bei 562 nm. Es wurden jeweils 2 µl der Proben in 100 µl BCATM-Reagenz (Reagenz A 50:1 Reagenz B) gegeben. Zudem wurde eine Standardreihe mit den BSA-Konzentrationen 2 µg/µl, 1 µg/µl, 500 ng/µl, 250 ng/µl, 125 ng/µl, 60 ng/µl und 30 ng/µl (je 2 µl) sowie einer Leerprobe gemessen. Proben und Standardreihe wurden für 30 min bei 60 °C inkubiert und anschließend die Absorbtion an einem MultiskanSR 96-Loch-Platten-Photometer (Thermo Scientific) gemessen. Anhand der Standardreihe wurde eine Eichgerade erstellt und danach die Protein-Konzentrationen der Proben bestimmt.

2.2.3.3. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung von Proteinen zur Erstellung von Westernblots und Coomassie-Färbungen, erfolgte per SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) von 10 %igen Bis-Tris-gepufferten Acrylamidgelen mit Mini Trans-Blot[®]Cell-Systemen (Biorad). Als Laufpuffer diente TRIS-MOPS-SDS-Puffer (Expedeon). Um Disulfid-Brückenbindungen zu trennen wurde als reduzierendes Argenz β-Mercaptoethanol verwendet, welches im SDS-Ladepuffer (siehe Kapitel 2.1.7.3.) enthalten war. SDS (Sodiumdodecylsulfat) ist ein anionisches Detergenz, welches an die hydrophoben Teile der Proteine bindet. Zusätzlich erhalten diese einen Überschuss an negativer Ladung, so dass die unterschiedlichen Eigenladungen überlagert werden. Wird ein elektrisches Feld angelegt, so ist die Wanderungsgeschwindigkeit der Proteine durch das Polyacrylamidgel fast ausschließlich durch deren Molekulargewicht bestimmt.

Damit das in der Acrylamid-Lsg. enthaltene Acrylamid zu Polyacrylamid auspolymerisiert, wurde eine 10 %ige Ammonium-Persulfat-Lösung als Radikaldonator eingesetzt (100 µl auf je 10 ml Gel-

2.2. Methoden

Lsg.). Um die Polymerisierungs-Reaktion zu beschleunigen, kam TEMED (10µl auf je 10ml Gel-Lsg.) als Katalysator zum Einsatz. Um besonders deutliche und fokussierte Protein-Banden zu erhalten, wurden hier diskontinuierliche Gele mit zwei unterschiedlich dichten Gel-Bereichen verwendet. Der untere Trenngelbereich bestand aus einem 10 %igem Acrylamidgel (2,5 ml Acrylamid-Lsg., 3 ml Gelpuffer und 4,5 ml ddH₂O), der obere Sammelgelbereich aus einem 4 % Acrylamidgel (1 ml Acrylamid-Lsg., 3 ml Gelpuffer und 6 ml ddH₂O). Es wurde zunächst das Trenngel gegossen und mit 2-Propanol überschichtet, um eine glatte, blasenfreie Gelkante zu erreichen. Nachdem das Trenngel auspolymerisiert war, wurde das überschüssige 2-Propanol abgegossen und mit ddH₂O etwaige 2-Propanol-Reste ausgespült, die das Auspolymerisieren des Sammelgels hätten beeinträchtigen können. Anschließend wurde das Sammelgel gegossen, welches nach dem Auspolymerisieren auf Grund des niedrigeren Acrylamid-Anteils grobmaschiger wird. Das Sammelgel dient der Fokussierung der Proteine, die dann durch das Trenngel aufgetrennt werden. Zunächst wurde der Proteingehalt der Proben mittels BCA-Test (siehe Kapitel 2.2.3.2.) bestimmt und die Proben auf die gleiche Proteinkonzentration in Lysispuffer (siehe Kapitel 2.1.7.3.) verdünnt; wenn möglich wurden stets 20 µg Protein je Probe verwendet. Anschließend wurden die Proben mit SDS-Ladepuffer (siehe Kapitel 2.1.7.3.) versetzt und für 5 min bei 99 °C aufgeköcht und dann für 1 min auf Eis schock-gekühlt. Die Proteine wurden bei 100 V für ca. 2 h aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrozellulosemembran übertragen (siehe Kapitel 2.2.3.4.).

2.2.3.4. Western-Blot

Western-Blots dienen dem Fixieren der Proteine auf einer Nitrozellulosemembran, auf der sie auch für Antikörper besser zugänglich sind. Man macht sich hier wiederum zunutze, dass die Proteine nach der SDS-Behandlung (siehe Kapitel 2.2.3.3.) über einen Überschuss an negativer Ladung verfügen und im elektrischen Feld zur Anode wandern. Damit kann man sie auf eine Nitrozellulosemembran übertragen, welche relativ unspezifisch Proteine bindet.

Die Westernblots wurden mit Trans-Blot-Cell-Systemen (Biorad) durchgeführt. Das Blotten erfolgte für 1h bei 100 V und dann für 4 h bei 50 V im Kühlraum (4 °C) in vorgekühltem Transferpuffer. Anschließend wurden die Membranen in 4 % fettfreiem Milchpulver (in TBSt) blockiert, um die Bindungsaffinität der Membranen gegenüber Proteinen abzusättigen.

Um Proteine auf der Nitrozellulosemembran nachzuweisen, wurde mit unkonjugierten Primär-Antikörpern (in TBSt, Tabelle 5) über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die Sekundär-Antikörper (in TBSt, Tabelle 6) erkennen spezifisch Primär-Antikörper einer bestimmten Spezies und sind mit dem

2.2. Methoden

Enzym *horseradish-peroxidase* (HRP) konjugiert. Sie wurden für 2 h bei RT inkubiert. Das Enzym HRP setzt Wasserstoffperoxid (H_2O_2) zu Wasser (H_2O) um, damit gekoppelt wird Luminol umgesetzt, wobei Lichtenergie frei wird und man so die über die Antikörper markierten Proteine nachweisen kann. Hierfür wurden 2 ml Luminol-Entwicklungslösung, bestehend aus 1,8 ml Lösung A (Luminol-haltig), 190 μ l Lösung B und 10 μ l 30 % H_2O_2 pro Westernblot frisch angesetzt und die Westernblots in dem Dunkelkammer-Dokumentiersystem entwickelt und dokumentiert. Die densitometrische Auswertung der Daten wurde mit dem Programm ImageJ (NIH) durchgeführt.

2.2.3.5. Coomassiefärbung von SDS-Polyacrylamid-Gelen

Die SDS-Polyacrylamid-Gele (siehe Kapitel 2.2.3.3.) wurden zunächst dreimal für 15 min in Coomassie-Fixierlösung (siehe Kapitel 2.1.7.3.) fixiert. Anschließend wurden die fixierten Gele einmal für eine Minute in ddH₂O gewaschen und in Coomassie-Färbelösung (siehe Kapitel 2.1.7.3.) überführt. Danach wurden die Gele in der Coomassie-Färbelösung in dem Mikrowellenofen aufgeköcht und für drei Stunden gefärbt. Nach der Färbung wurden die Gele dreimal für 30 min in Coomassie-Entfärbelösung (siehe Kapitel 2.1.7.3.) gewaschen und schließlich in dem Dunkelkammer-Dokumentiersystem dokumentiert.

2.2.3.6. Immunfärbungen für fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen

2.2.3.6.1. Immunfärbungen von Gehirnschnitten

Die präparierten und in 4 % PFA fixierten Gehirnhemisphären (siehe auch Kapitel 2.2.3.1.1.) wurden als Frostschutz nach dem Fixieren in 30 % Saccharose (in dPBS, sterilfiltriert) bei 4 °C für mindestens 24 h inkubiert. Anschließend wurden die Gehirnhemisphären in *Tissue-Tek* Einfriermedium (Leica) eingegossen und auf einem Trockeneis-Ethanol-Bad eingefroren. Die Lagerung bis zum Schneiden fand bei -80 °C statt. Die Gehirnhemisphären wurden mit dem Rotationskryomikrotom in 10 μ m dicke Schnitte geschnitten und diese auf Objektträger (Menzel) übertragen. Die Lagerung der Schnitte bis zur Immunfärbung erfolgte bei -20 °C. Zu Beginn der Immunfärbungen wurden die Schnitte zunächst für 1 min bei RT aufgetaut und anschließend bei 4 °C für 1 h in Blockierlösung (siehe Kapitel 2.1.7.3.) permeabilisiert und blockiert. Danach wurden die Schnitte einmal mit Waschpuffer gewaschen und anschließend mit in Inkubationpuffer verdünnten Primär-Antikörpern (siehe Tabelle 5) über Nacht bei 4 °C inkubiert (Puffer: siehe Kapitel 2.1.7.3.). Dann wurden die Schnitte dreimal mit Waschpuffer gewaschen und mit den

2.2. Methoden

entsprechenden Sekundär-Antikörpern (siehe Tabelle 6) verdünnt in Inkubationspuffer für 2 h bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte zweimal mit Waschpuffer gewaschen; sollte eine Färbung der Zellkerne mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) erfolgen, so wurden die Schnitte für 15 min mit einer DAPI-Lösung (500 ng/ml DAPI in Waschpuffer) bei RT inkubiert und dann noch einmal mit Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurden die Schnitte mit Eindeckmedium (siehe Kapitel 2.1.7.3.) überschichtet und ein Deckglas sanft aufgedrückt ohne die Schnitte zu beschädigen. Zur Versiegelung der Schnitte unter dem Deckglas wurden dessen Ränder mit Nagellack bestrichen und dieser für 15 min bei RT im Dunkeln getrocknet. Die so versiegelten und gefärbten Schnitte wurden dann mit dem konfokalen *Laser-scanning*-Mikroskop (LSM) dokumentiert und bei -20 °C gelagert.

2.2.3.6.2. Immunfärbungen von Zellen

Zu Beginn der Immunfärbungen wurden die in 4 % PFA fixierten Zellen (siehe Kapitel 2.2.2.2.) bei 4 °C für 5 min in Blockierlösung (siehe Kapitel 2.1.7.3.) permeabilisiert und blockiert. Danach wurden die Zellen einmal mit Waschpuffer gewaschen und anschließend mit in Inkubationspuffer verdünnten Primär-Antikörpern (siehe Tabelle 5) über Nacht bei 4 °C inkubiert (Puffer: siehe Kapitel 2.1.7.3.). Darauf hin wurden die Zellen dreimal mit Waschpuffer gewaschen und mit den entsprechenden Sekundär-Antikörpern (siehe Tabelle 6) verdünnt in Inkubationspuffer für 2 h bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit Waschpuffer gewaschen; sollte eine Färbung der Zellkerne mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) erfolgen, so wurden die Zellen für 15 min mit einer DAPI-Lösung (500 ng/ml DAPI in Waschpuffer) bei RT inkubiert und dann noch einmal mit Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurde Eindeckmedium (siehe Kapitel 2.1.7.3.) auf Objektträger (Menzel) vorgelegt, die Deckgläschen mit den Zellen in das Eindeckmedium eingelegt und sanft auf gedrückt ohne die Zellen zu beschädigen. Zur Versiegelung der Deckgläschen wurden dessen Ränder mit Nagellack bestrichen und dieser für 15 min bei RT im Dunkeln getrocknet. Die so versiegelten und gefärbten Präparate wurden dann mit dem konfokalen *Laser-scanning*-Mikroskop (LSM) dokumentiert und bei -20 °C gelagert.

2.2.3.7. Messung der lysosomalen Aktivität (CathepsinB-Aktivität)

Die lysosomale Aktivität wurde mittels eines spezifischen Substrates der lysosomalen Protease CathepsinB (Z-RR-AMC; ENZO) gemessen. Das Substrat beinhaltet ein Fluorophor (AMC), welches über eine Aminosäurebrücke (Arginin-Arginin: RR) mit einem Quencher (Z) verbunden ist,

2.2. Methoden

der das Fluoreszenzsignal des Fluorophors unterdrückt. Die Aminosäurebrücke beinhaltet ein Motiv, welches spezifisch für die lysosomalen Protease CathepsinB ist. Damit wird verhindert, dass diese Aminosäurebrücke von anderen Proteasen, vor allem im Zytosol, geschnitten wird. Erfolgt ein Schnitt in der Aminosäurebrücke, kann der Quencher sich räumlich vom Fluorophor entfernen und unterdrückt damit das Signal des Fluorophors nicht mehr. Damit ist die Fluoreszenz des Fluorophors ein Maß für die proteolytische Aktivität des Cathepsins, welche hier als Maß für lysosomale Aktivität benutzt wurde.

Zur Aktivitätsmessung wurden zunächst 96-Loch-Platten mit Polyornithin (10 µg/ml) beschichtet (siehe auch Kapitel 2.2.2.2.). Nach der Transfektion der Zellen mittels Elektroporation (siehe Kapitel 2.2.2.3.1.) wurden 4000 Zellen pro Loch in je 100 µl Nährmedium ausgesät. Nach 48 h wurde das Nährmedium abgesaugt und die Zellen in Phenolrot-freies Nährmedium (siehe Kapitel 2.1.7.2.) gesetzt. Zur Behandlung der Zellen mit DMSO oder Bafilomycin (BafA1), wurde das Phenolrot-freie Nährmedium abgesaugt und die Zellen für 4 h in frischem Phenolrot-freiem Nährmedium (50 µl) mit 2 µM BafA1 oder DMSO inkubiert. Anschließend wurden 50 µl Phenolrot-freies Nährmedium mit 200 µM Z-RR-AMC pro Loch hinzugegeben und die Zellen damit für eine weitere Stunde inkubiert. Danach wurde das Medium komplett abgezogen und die Zellen in 100 µl Reporter-Lysispuffer (Promega) bei -80 °C für eine Stunde lysiert. Das Zelllysate wurde für 45 min bei 37 °C aufgetaut und dann die Fluoreszenz des AMC-Fluorophors im 96-Loch-Platten-Fluoreszenzphotometer gemessen.

2.2.3.8. Inhibition der Translation mittels Cycloheximid

Zur Messung der proteasomalen Aktivität kamen HEK::D2eGFP-Zellen zum Einsatz (siehe Kapitel 2.1.1.), deren Translation mittels Cycloheximid inhibiert wurde, damit der Abbau des Proteasom-Reporters (D2eGFP), ohne den Einfluss der Neusynthese verfolgt werden konnte. Die Zellen wurden zunächst gezählt, mittels Elektroporation transfiziert und ausgesät (siehe Kapitel 2.2.2.1. und 2.2.2.3.1.). Nach 48 h wurde den Zellen das Nährmedium gewechselt. Nach 72 h wurde den Zellen das Nährmedium abgezogen und diese in frischem Nährmedium, welches 500 µM Cycloheximid enthielt, inkubiert. Hierbei wurde eine Zellschale nach 1 h, eine nach 2 h und eine nach 4 h Inkubation im Zellkulturbrutschrank geerntet; als Referenz wurde eine weitere Zellschale direkt geerntet, bevor das Cycloheximid die Translation der Zellen inhibieren konnte. Die Abnahme des D2eGFPs über die Zeit wurde durch Western-Blot-Analyse (siehe Kapitel 2.2.3.4.) der geernteten Zellproben bestimmt und diente als Maß der proteasomalen Aktivität.

2.2. Methoden

2.2.4. Statistik

Alle Experimente wurden wiederholt durchgeführt und die Mittelwerte der jeweiligen Messungen in den Abbildungen dargestellt; die genaue Anzahl der jeweils durchgeführten Experimente findet sich in den Abbildungslegenden. Die Fehlerbalken kennzeichnen die Standardabweichung oder den Standardfehler der entsprechenden Mittelwerte, je nach Kennzeichnung in der Abbildungslegende. Die statistische Signifikanz wurde mittels t-Test für unabhängige Stichproben ermittelt. Im Falle der Gewichtsdaten der APP23xCBN-Mäuse wurde ein 2-way-ANOVA Test mit abhängiger Messwiederholung (SPSS, IBM) zum Testen der statistischen Signifikanz verwendet. Diese wird für beide Tests in den Abbildungen durch Asterisken angezeigt: $P < 0,05$ galt als signifikant.

3. Ergebnisse

3.1. Einfluss des CB1 auf die APP-Prozessierung

3.1.1. Erweiterte Charakterisierung des APP23xCBN-Mausstammes

Der APP23xCBN-Mausstamm wurde zuvor von Christoph Stumm anhand von 20-Monate alten Mäusen in einer vorangegangenen Dissertation charakterisiert (Stumm, 2011). Die doppelt-transgenen APP23/CB1^{-/-} Mäuse zeigten hier einige Merkmale, die sie von den einfach-transgenen Tieren (APP23- und CB1^{-/-}-Mäuse) sowie den wildtypischen Tieren (WT) unterschieden. APP23/CB1^{-/-} Tiere hatten eine niedrigere Geburtenrate, eine erhöhte Sterberate, eine verringerte Lernleistung und ein niedrigeres Gewicht zum Zeitpunkt der Präparation (20 Monate), verglichen mit allen anderen Genotypen. Zudem zeigten die Gehirne der APP23/CB1^{-/-} Mäuse eine reduzierte Gliose und eine verringerte Anzahl von amyloiden Plaques verglichen mit APP23 Mäusen. In Hippocampuslysaten der APP23/CB1^{-/-} Tiere wurden verringerte Mengen der Schnittfragmente des amyloiden Vorläufer-Proteins (APP) sowie ein leicht reduzierter Proteinspiegel des Volllängen-APP (APP_{VL}) gegenüber der APP23 Tiere festgestellt (Stumm, 2011). Um zu klären ob diese Prozessierungs-Veränderungen erst im Zuge der Alterung auftritt, wurden Fraktionen aus Hippocampusproben von 2-Monate alten Mäusen analysiert. 2-Monate alte Tieren zeigen dort auch reduzierte Proteinspiegel des untersuchten, löslichen N-terminalen Schnittfragments des APP (sAPP α) sowie der membranständigen C-terminalen Schnittfragmente (APP_{CTF α} und APP_{CTF β}) in APP23/CB1^{-/-} Mäusen gegenüber der APP23 Mäuse. Zudem war auch der Proteinspiegel des APP_{VL} in APP23/CB1^{-/-} Mäusen gegenüber der APP23 Mäuse verringert (Abb. 6A). Des Weiteren sollte geklärt werden, ob APP23/CB1^{-/-} Tiere zu einem bestimmten Entwicklungszeitpunkt ein verringertes Körpergewicht gegenüber der Tiere anderer Genotypen zeigen. Dies könnte eine kritische Entwicklungsphase der Mäuse markieren, welche dann gesondert untersucht werden sollte. Das Körpergewicht der APP23/CB1^{-/-} Tiere war konstant geringer über den verfolgten Entwicklungszeitraum (2-20 Monate), als das der APP23, CB1^{-/-} und WT Tiere. Die APP23- und CB1^{-/-}-Mäuse zeigten gegenüber der WT Mäuse auch ein reduziertes Körpergewicht, was den bereits als hager beschriebenen Phänotyp dieser Tiere bestätigt (Abb. 6B).

3.1. Einfluss des CB1 auf die APP-Prozessierung

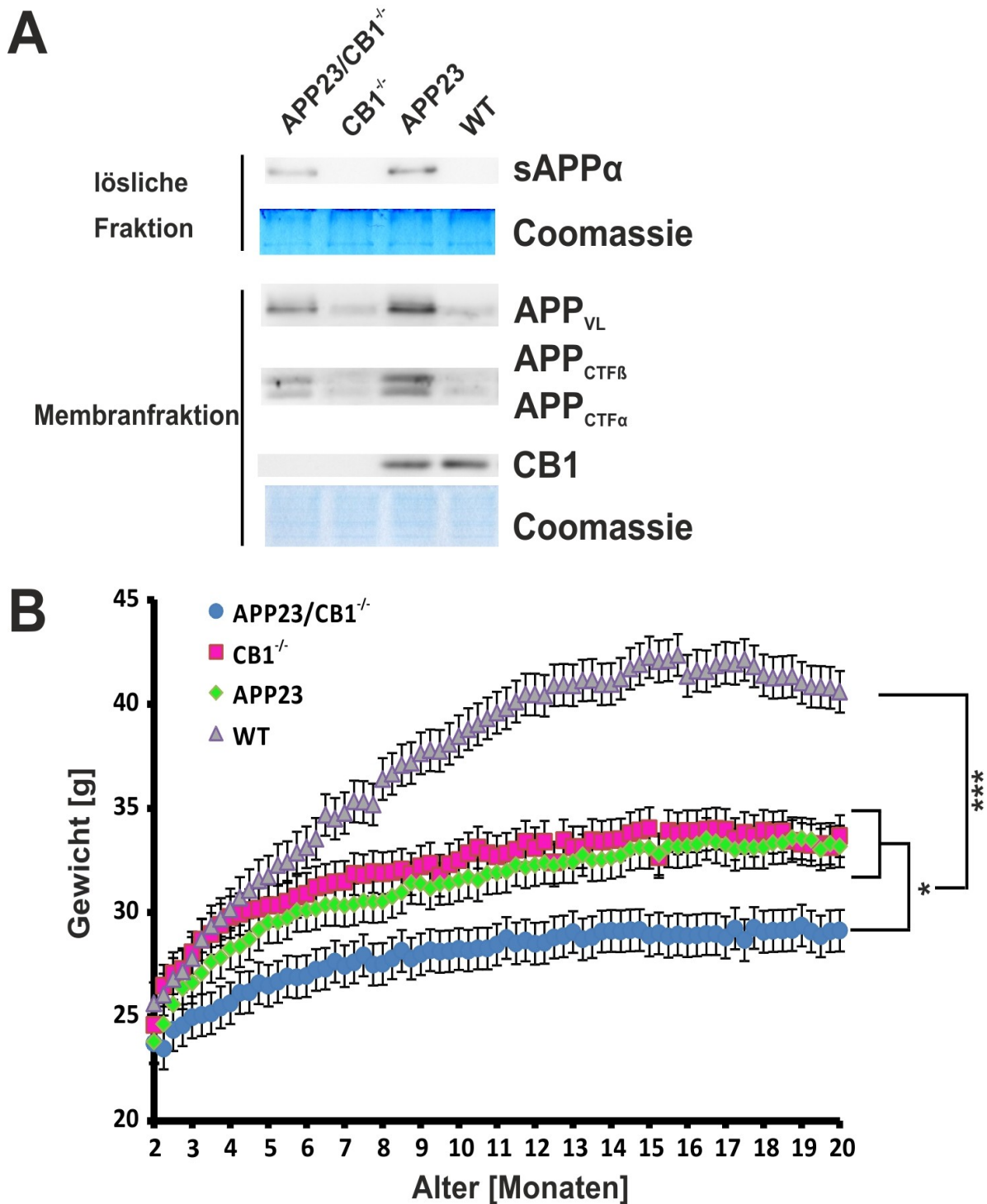


Abbildung 6: Charakterisierung des APP23xCBN-Mausstamms

[A] Die Western-Blot Analyse fraktionierter Hippocampus-Proben aus 2-Monate alten Mäusen zeigt eine Reduktion des N-terminalen APP- (sAPP α) sowie der C-terminalen APP-Schnittfragmente (APP_{CTF α} und APP_{CTFB}) und des Vollängen-APP (APP_{VL}). [B] Wiegekurven der APP23xCBN-Mäuse aus wöchentlich erhobenen Gewichtsdaten, welche auf das Lebensalter der Mäuse abgeglichen wurden. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm St.Fehler; die Daten der Mäuse wurden vom 3.-20. Lebensmonat mittels 2-way-ANOVA mit abhängiger Messwiederholung (Fisher-LSD) analysiert. APP23/CB1⁻ (n=7), CB1⁻ (n=9), APP23 (n=12) und WT (n=11) Mäuse; *** P<0,005, * P<0,05 (Stumm und Hiebel et al., 2013)

3.1. Einfluss des CB1 auf die APP-Prozessierung

Die Gliose der APP23/CB1^{-/-}- und APP23-Tiere wurde immunhistochemisch in Gehirnschnitten der Tiere mit Hilfe von immunfluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen analysiert. APP23/CB1^{-/-}- Tiere zeigten eine geringere Aktivierung der Mikroglia- sowie der Astroglia-Zellen. Mikroglia befanden sich hauptsächlich in räumlicher Nähe zu den amyloiden Plaques (Abb. 8A, obere Reihe) und zeigten zusätzlich die charakteristische Morphologie aktivierter mikrogliaer Zellen (Abb. 8A, untere Reihe). Astroglia zeigten eine breitere Verteilung in den Gehirnschnitten und keine direkte, räumliche Assoziation mit den amyloiden Plaques (Abb. 8B, obere Reihe). Maximalprojektionen von konfokalen, fluoreszenzmikroskopischen Bilderstapeln zeigten, dass sich die Morphologie der Astroglia-Zellen in APP23/CB1^{-/-}- und APP23-Tieren nicht unterscheidet (Abb. 8B, untere Reihe).

Da die Verteilung der Astroglia weniger stark mit der Lokalisation der Amyloiden-Plaques assoziiert war, sollte hier noch eine Quantifizierung der Astroglialen Aktivierung erfolgen. Dazu wurden Gehirnschnitte immunhistochemisch gegen GFAP gefärbt und unter den gleichen Bedingungen mittels des Durchlicht-Floureszenzmikroskops dokumentiert. Unter zu Hilfenahme des Analyseprogramms ImageJ (NIH) wurde die Fluoreszenzintensität der GFAP-Färbung über die Schnittfläche ermittelt. Hierbei zeigten APP23/CB1^{-/-}- gegenüber den APP23-Tieren ein signifikant reduziertes GFAP-Signal (Abb. 7). Diese Messung bestätigte die Beobachtung dass auch die astrogliale Aktivierung in den APP23/CB1^{-/-}- gegenüber den APP23-Mäusen reduziert ist, obwohl die GFAP-positiven Astroglia-Zellen nicht so stark auf die räumliche Nähe zu den amyloiden Plaques konzentriert sind (Abb. 8B, untere Reihe).

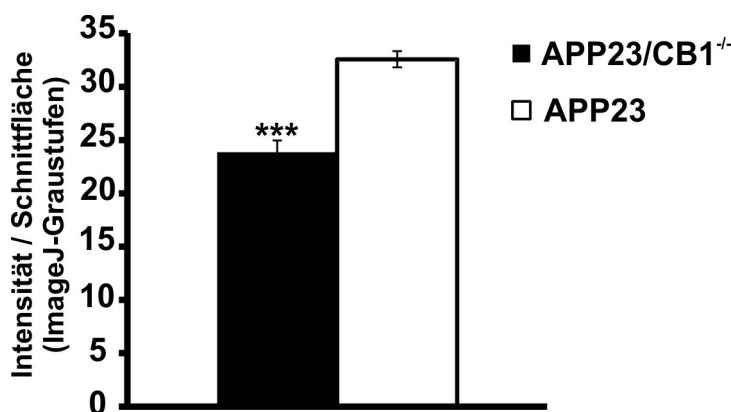


Abbildung 7: Reduzierte GFAP-Färbung in APP23/CB1^{-/-}- gegenüber APP23-Tieren

Drei immunhistochemisch gegen GFAP gefärbte Gehirnschnitte des Hippocampus (zwischen -2,7 mm und -1,7 mm entfernt des Bregmas) wurden pro Tier unter den gleichen Bedingungen mittels des Durchlicht-Floureszenzmikroskops dokumentiert. Die Bilder wurden anschließend mittels ImageJ desitometrisch ausgewertet. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm St.Fehler; die Daten wurden mittels t-Test analysiert; n=3 *** P<0,005. (Stumm und Hiebel et al., 2013)

3.1. Einfluss des CB1 auf die APP-Prozessierung

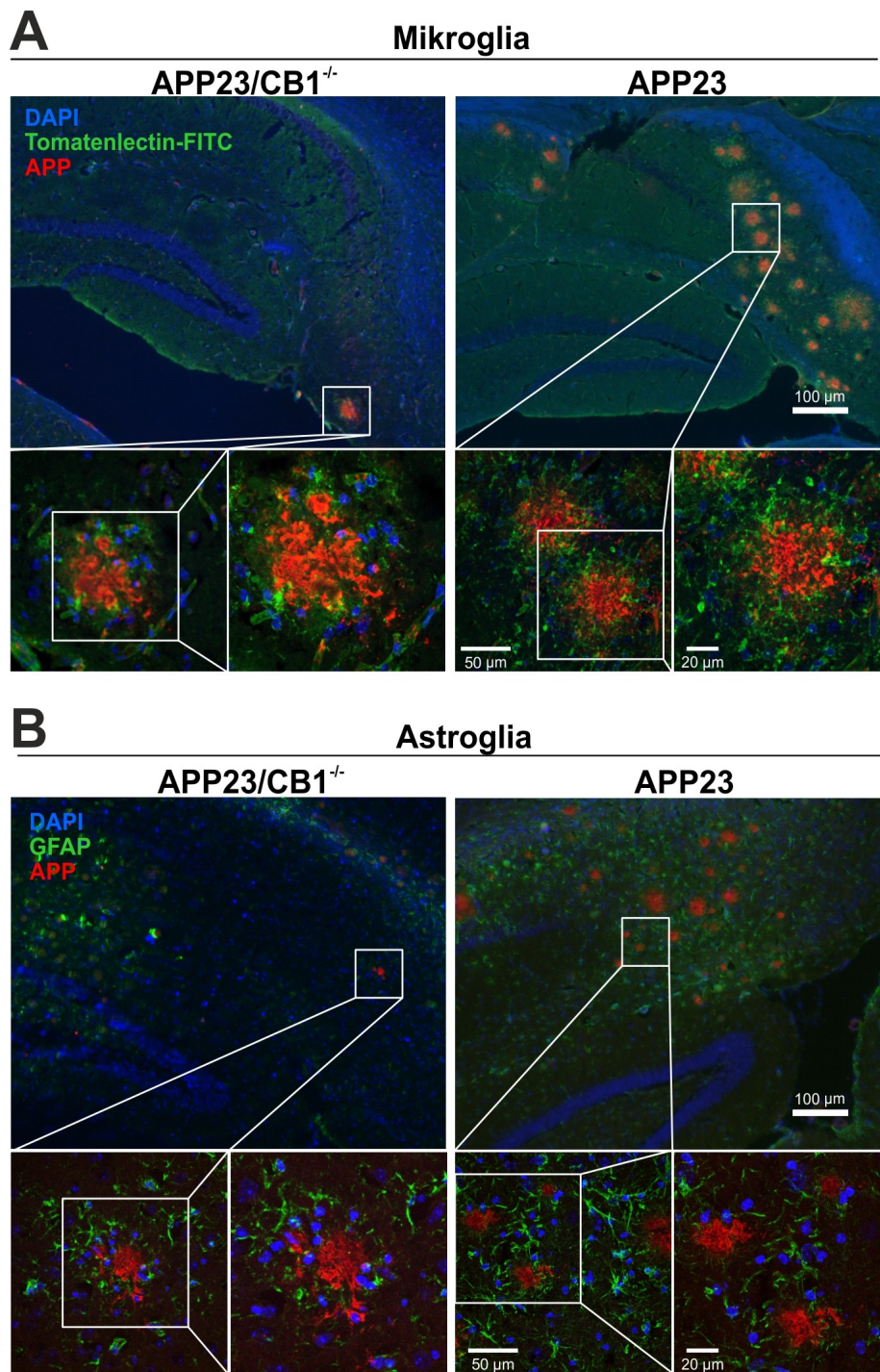


Abbildung 8: Gliose in APP23/CB1^{-/-}- und APP23-Mäusen

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen koronaler Gehirnschnitte der APP23/CB1^{-/-}- und APP23-Mäuse. Die Übersichtsaufnahmen zeigen Epifluoreszenzaufnahmen, die Vergrößerungen Maximalprojektionen konfokaler Aufnahmen. [A] *Obere Reihe*: Mikroglia, welche durch Tomatenlectin-FITC (grün) gefärbt wurden, liegen um die amyloiden Plaques konzentriert vor. Die amyloiden Plaques wurden mit Hilfe des 6E10-Antikörper gegen die A β -Domaine des APP gefärbt (rot), die Zellkerne durch DAPI (blau). *Untere Reihe*: Aufnahmen der ausgewählten Plaques zeigen aktivierte Mikroglia um die amyloiden Plaques. [B] *Obere Reihe*: Die Astrogliaverteilung ist kaum Plaque assoziiert; Astrogliazellen sind mit Hilfe des GFAP-Antikörper (grün) gefärbt. *Untere Reihe*: Die Aufnahmen zeigen die Morphologie der Astroglia in der Nähe der amyloiden Plaques (rot). (Stumm und Hiebel et al., 2013)

3.1.2. Proteinspiegel des APP und seiner proteolytischen Fragmente in N2A-Zellen mit veränderter CB1-Expression

Die hier verwendeten N2A-Zellen (N2A) exprimierten CB1 endogen. Die durch die Transfektion mit dem Plasmidvektor pCDNA3.1::hCB1 erzeugten stabil-transgenen N2A, überexprimieren den Rezeptor (N2A hCB1, Abb. 9A). Als Kontroll-Zellen wurden eGFP-überexprimierende (eGFP) und N2A, die eGFP-gekoppelten mCB1 exprimieren (CB1eGFP), generiert. Die CB1-überexprimierenden stabil-transgenen Zellen (hCB1 und CB1-eGFP) zeigen erhöhte Proteinspiegel des volllängen APP (APP_{VL}) und der proteolytischen Fragmente (sAPP α und APP_{CTF α} , Abb. 9B, C).

Die Herunterregulation um ca. 60 % des endogenen CB1 der N2A-Zellen durch die Transfektion mit mCB1-siRNA führte zu einem geringeren Proteinspiegel des APP_{CTF α} , die Proteinspiegel des volllängen APP (APP_{VL}) blieben jedoch konstant (Abb. 10A-C). Die relative Genexpression des endogenen *app* war zudem in N2A-Zellen mit herunterreguliertem CB1-mRNA-Spiegel auch nicht verändert (Abb. 10D). Dies spricht für einen Einfluss des CB1 auf die proteolytische Prozessierung des APPs und gegen einen genregulatorischen Effekt. Die Überexpression von CB1 und die Herunterregulation des Rezeptors mittels siRNA führten also zu einem gegensätzlichen Effekt auf die Proteinspiegel der Prozessierungsprodukte des APP. Diese Ergebnisse sind vergleichbar mit der Beobachtung in den APP23/CB1^{-/-}- verglichen mit den APP23-Tieren, in denen das Fehlen des CB1-Rezeptors zu einer Reduktion der proteolytischen Fragmente des APP führt (vergleiche Abb. 6A; (Stumm und Hiebel et al., 2013).

3.1. Einfluss des CB1 auf die APP-Prozessierung

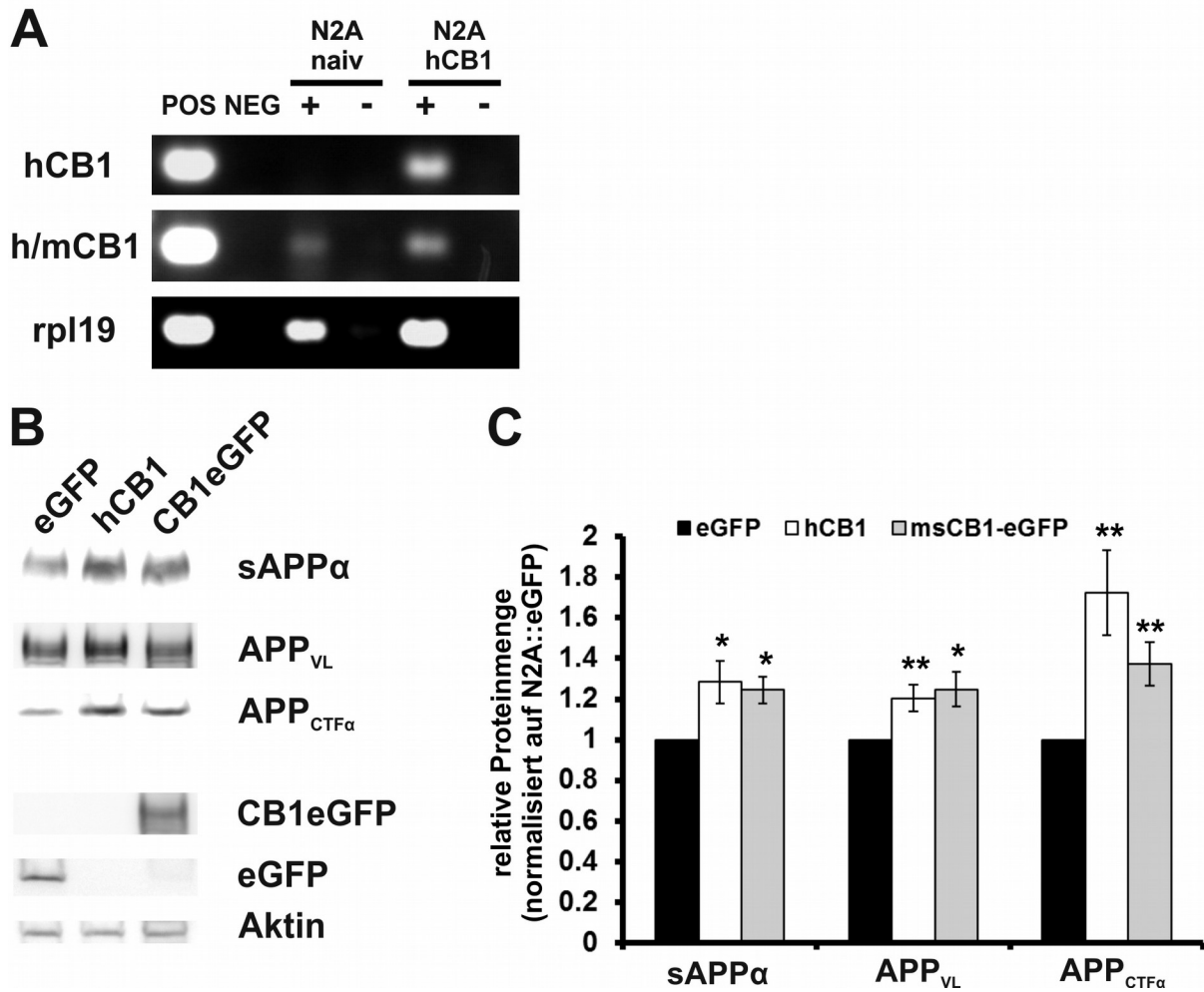


Abbildung 9: CB1-Überexpression erhöht die Menge an proteolytischen APP-Fragmenten

[A] RT-PCR: Naive N2A-Zellen (N2A) exprimieren endogen niedrige CB1-Spiegel. Die stabil-transgenen N2A (N2A hCB1) überexprimieren hCB1. Die Amplifikation der mRNA des *rpl19*-Gens dient als Positivkontrolle der reversen Transkription. POS: PCR-Positivkontrollen bestehend aus 2 ng des Vektors pCDNA3.1::hCB1 (hCB1- und h/mCB1-Ansatz) oder 2 μ l einer bereits erfolgreichen reversen Transkription aus HEKa-Zellen (rpl19-Ansatz). NEG: Negativkontrollen der PCR-Ansätze ohne Amplifikationsvorlage. +: RT-PCR-Reaktionen. -: Kontrollen der reversen Transkriptionsansätze, bei denen die Reverse-Transkriptase durch RNA-freies Wasser ersetzt wurde. [B] Die stabil hCB1-überexprimierenden N2A (hCB1) sowie die stabil msCB1-eGFP exprimierenden N2A (CB1eGFP), zeigen erhöhte Proteinspiegel des endogenen Vollängen-APP (APP_{VL}) und seiner proteolytischen Fragmente (sAPP α und APP_{CTF α}) welche durch α -Sekretase-Aktivität entstehen, gegenüber der stabil eGFP-exprimierenden N2A (eGFP). [C] Densitometrische Auswertung der Westernblot-Daten von sAPP α , APP_{VL} und APP_{CTF α} der stabil-transgenen Zelllinien. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm St.Fehler; die Daten wurden mittels t-Test analysiert; n=4 für die Mediumfraktion (sAPP α), n=6 für die Zelllysate; ** P<0,01 * P<0,05. (Stumm und Hiebel et al., 2013)

3.1. Einfluss des CB1 auf die APP-Prozessierung

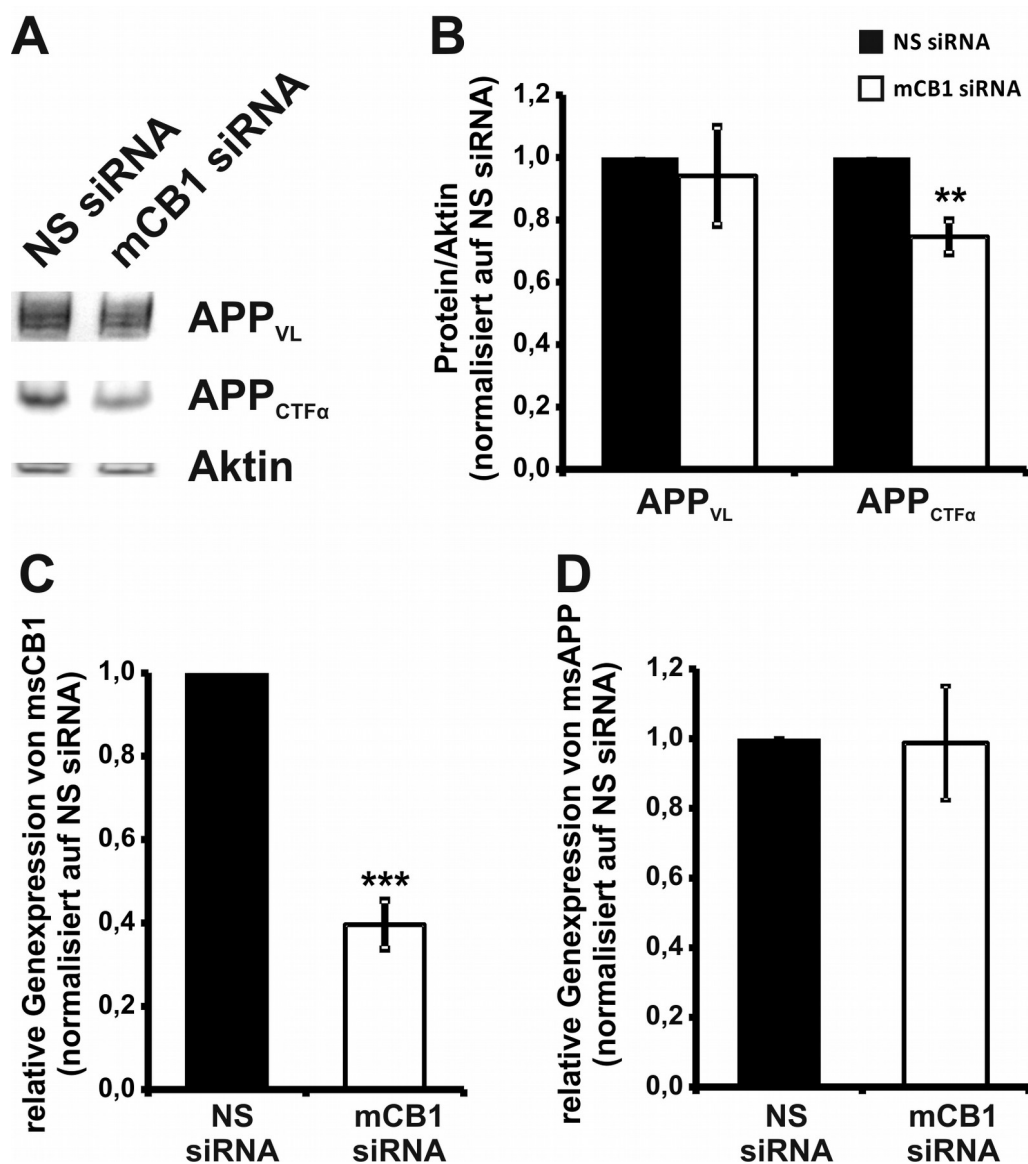


Abbildung 10: Herunterregulation des endogenen CB1 in N2A-Zellen

[A] Herunterregulation des endogenen CB1 in N2A-Zellen mittels siRNA führt zur Reduktion der Proteinspiegel von APP_{CTFα}, aber nicht zur Reduktion der Proteinspiegel des vollständigen APP (APP_{VL}). [B] Densitometrische Auswertung der Westernblot-Daten von APP_{VL} und APP_{CTFα} in N2A, die entweder mit Nonsense siRNA (NS) oder mit mCB1 siRNA transfiziert wurden. [C] Durch die Transfektion mit mCB1 siRNA wird die Expression der mCB1-mRNA um 60 % reduziert. [D] Das Expressions-Niveau der mRNA des endogenen APP bleibt nach Herunterregulation von mCB1 unverändert. Gezeigt sind die Mittelwerte ±St.Fehler; die Daten wurden mittels t-Test analysiert; n=3 *** P<0,005 ** P<0,01. (Stumm und Hiebel et al., 2013)

3.1.3. Pharmakologische Inhibition der CB1-Signalwege in N2A-Zellen

Die CB1-Aktivität wurde zunächst mit dem spezifischen Antagonisten Rimonabant (SR141716: SR) und mit *Pertussis toxin* (PTX), einem Inhibitor G-Protein-gekoppelter Rezeptoren, in naiven N2A-Zellen inhibiert. In beiden Fällen war eine signifikante Reduktion des Prozessierungsprodukts APP_{CTF α} zu beobachten. Die Proteinspiegel des Vollängen-APP (APP_{VL}) blieben jedoch unverändert gegenüber der Lösungsmittelkontrolle (Abb. 11A, B). Diese pharmakologische Inhibition der Rezeptor-Aktivität führte also zu einem vergleichbaren Ergebnis, wie die Reduktion des Rezeptors durch den Einsatz von siRNA (siehe Abb. 10A, B). Weiter sollte analysiert werden, welcher der weiterführende Signalweg ist, der für die Reduktion der Prozessierung des APP_{VL} verantwortlich ist. Die Aktivität des CB1-Rezeptors stimuliert den *mitogen-activated protein kinase – extracellular-signal-regulated kinases 1/2* (MAPK-ERK1/2) Signalweg und inhibiert die Adenylat-Cyclase, was wiederum zu einer Inhibition der Proteinkinase A (PKA) führt und damit den *cAMP response element-binding protein* (CREB) Signalweg inhibiert. Dazu wurden die naiven N2A-Zellen mit den Inhibitoren der MEK1/2 (U0126) und der PKA (H89) behandelt und deren Einfluss auf die Proteinspiegel des Prozessierungsproduktes (APP_{CTF α}) mittels Westernblot-Analyse ermittelt. Die Inhibition der MEK1/2 (U0126) sollte demnach einer Inhibition des CB1-Rezeptors entsprechen, die Inhibition der PKA (H89) dagegen einer Stimulation der Rezeptoraktivität. Die Behandlung der naiven N2A-Zellen mit U0126 führte zu einer signifikanten Reduktion der Proteinspiegel der APP_{CTF α} . Die Behandlung mit H89 führte zu keiner signifikanten Veränderung der Proteinspiegel der APP_{CTF α} . Die Proteinspiegel des APP_{VL} waren weder durch Behandlung mit U0126, noch durch die Inkubation mit H89 signifikant verändert (Abb.11A, B). Weiter wurde analysiert wie die Aktivität der MEK1/2 durch die Behandlungen mit den einzelnen Inhibitoren verändert ist. Hierfür wurde die Phosphorylierung eines Substrats der MEK1/2, die ERK1/2, als Indikator verwendet. Die Behandlung der naiven N2A-Zellen mit SR, PTX und U0126 reduzierten signifikant die Spiegel an phosphoryliertem ERK1/2 (p-ERK1/2) gegenüber der Lösungsmittelkontrolle. Die Inkubation der Zellen mit H89 hatte keinen signifikanten Einfluss auf die p-ERK1/2-Spiegel (Abb. 11C, D). Dies spricht für einen Einfluss des CB1-Rezeptors über die Modulation des MAPK-ERK1/2-Signalwegs auf die APP-Prozessierung. Einen ähnlichen Einfluss der MAPK-ERK1/2-Aktivität auf die APP-Prozessierung wurde zuvor auch für den Östrogenrezeptor beschrieben (Manthey et al., 2001; Peng et al., 2011).

3.1. Einfluss des CBI auf die APP-Prozessierung

3.1. Einfluss des CB1 auf die APP-Prozessierung

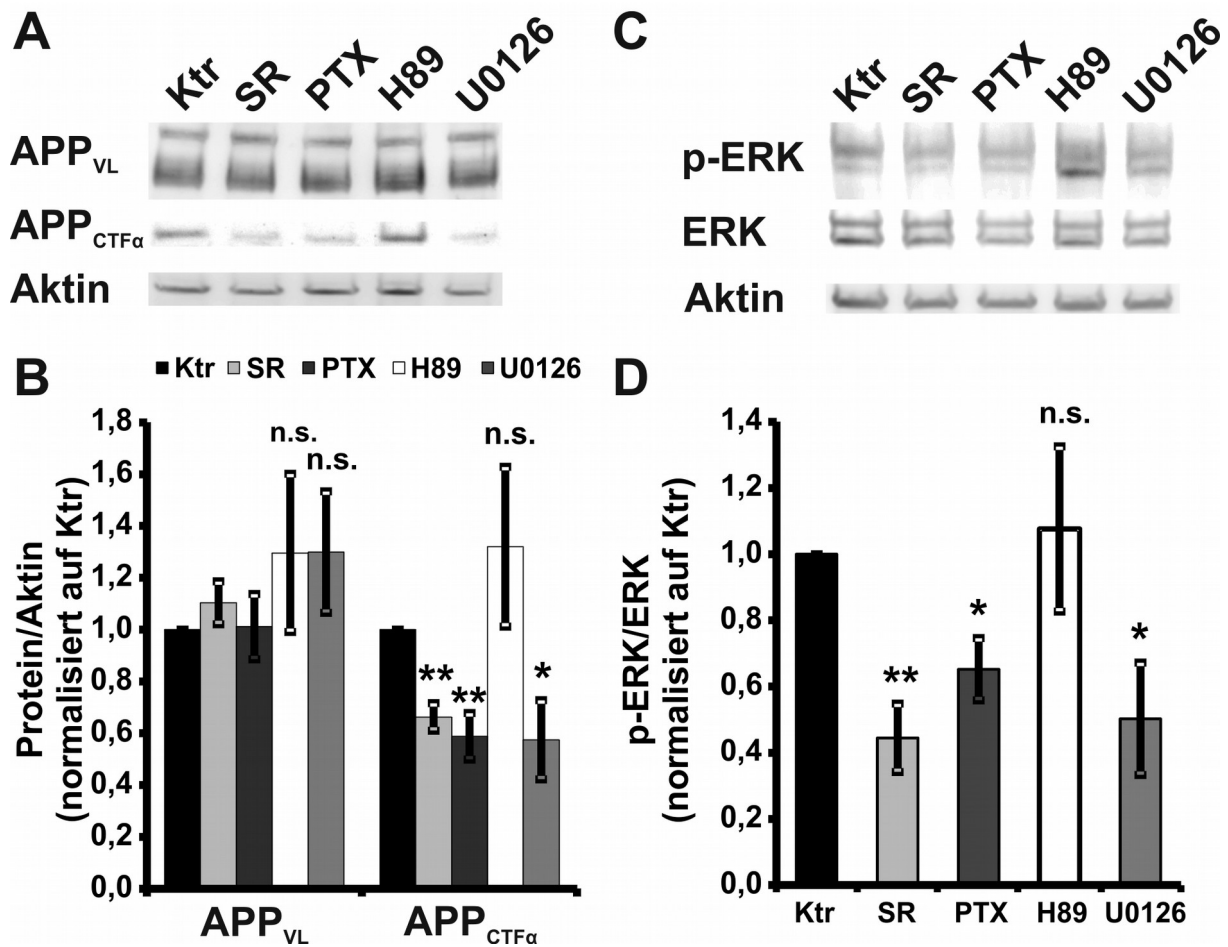


Abbildung 11: Pharmakologische Inhibition der CB1-Signalwege

[A] Behandlung der naiven N2A mit dem CB1-Antagonisten Rimonabant (SR141716, SR; 100 nM, 8 h) sowie dem Inhibitor G-Protein gekoppelter Rezeptoren Pertussis toxin (PTX; 2 µg/ml, 8 h) und dem MEK1/2-Inhibitor (U0126; 10 µM, 8 h) führt zu niedrigeren CTFα-Spiegeln, verglichen zur Lösungsmittelkontrolle (Kontrolle, Ktr; DMSO, 8h). Die Inhibition des CREB-Signalweges mittels H89 (10 µM, 8 h) hat keinen Einfluss auf die CTFα-Spiegel. Die Proteinspiegel des vollängen APP (APP_{VL}) wird durch keine Behandlung signifikant verändert. [B] Densitometrische Auswertung der Westernblot-Daten der angegebenen Behandlungen. [C] Die Behandlung mit SR, PTX und U0126 reduziert die ERK1/2-Phosphorylierung (p-ERK1/2) in den behandelten Zellen gegenüber der Kontrolle (Ktr). [D] Densitometrische Auswertung der Westernblot-Daten der p-ERK1/2 und gesamt ERK1/2 Spiegel der angegebenen Behandlungen. Gezeigt sind die Mittelwerte ±St.Fehler; die Daten wurden mittels t-Test analysiert; n=3 n.s.=nicht signifikant * P<0,05 ** P<0,01.

3.2. CB1-Aktivität moduliert den autophagischen Flux

3.2.1. Analyse autophagischer Indikatoren in APP23xCBN Mäusen

Wie bereits gezeigt wurde, zeigen APP23/CB1^{-/-} im Vergleich zu APP23-Mäusen eine reduzierte Anzahl von amyloiden Plaques und verringerte Proteinspiegel an Aβ-Peptiden (Abb. 8; Stumm und Hiebel et al., 2013). Trotz einer geringeren Anzahl der amyloiden Plaques und eines reduzierten Proteinspiegels der Aβ-Peptide, zeigten APP23/CB1^{-/-} gegenüber der APP23-Mäuse eine verringerte Lernleistung (Stumm und Hiebel et al., 2013). Die Anzahl der amyloiden Plaques sowie die Proteinspiegel der Aβ-Peptide waren also nicht ursächlich für die reduzierte Gedächtnisleistung der APP23/CB1^{-/-}-Tiere. In den letzten Jahren verfestigen sich die Ergebnisse, wonach Autophagie in der Alzheimer-Pathologie eine wichtige Rolle spielt und Aβ-Peptide die Regulation dieses konservierten Protein-Abbauprozesses beeinflussen (Morawe et al., 2012). Zudem konnte von Noonan und Kollegen gezeigt werden, dass die Stimulation des CB1 die Stabilität der lysosomalen Membran unter Aβ-induziertem Proteinstress erhöht (Noonan et al., 2010). Deshalb sollte untersucht werden, ob es in den APP23xCBN-Tieren zu Veränderungen im autophagischen/lysosomalen System kommt. Hierfür wurden zunächst Proteinlysate aus zwei unterschiedlichen Gehirnregionen, Cortex und Cerebellum, mit einander verglichen, um diese Theorie zu prüfen. Da APP23/CB1^{-/-}-Tiere bereits ab dem vierten Lebensmonat eine erhöhte Mortalität zeigen wurden Tiere im Alter von zwei Monaten analysiert. In den Cerebellumproben der 2-Monate alten APP23xCBN-Tiere wurde zwischen den Genotypen keine Unterschiede in den analysierten Autophagie-assoziierten Indikatoren gefunden (Abb. 12B). In den Cortexproben zeigten sich erhöhte Proteinspiegel des *heat shock proteins 72* (HSP72, die induzierbare Form des cytosolischen HSP70), des Lysosomen-Indikators LAMP1 und des Autophagie-Rezeptors p62/SQSTM1 (p62) in APP23/CB1^{-/-} und CB1^{-/-}-Mäusen. Andere Autophagie-assoziierten Indikatoren, wie die konstitutive Form des cytosolischen HSP70 (HSC70) oder LC3-II zeigten auch hier keine Veränderungen unter den Genotypen (Abb. 12A). Die Beobachtungen waren jedoch nicht statistisch signifikant (bis auf die cortikale Erhöhung der p62-Proteinspiegel in APP23/CB1^{-/-}-gegenüber den WT-Mäusen), zeigten jedoch die Tendenz, dass bereits das Fehlen des CB1-Rezeptors zu Veränderungen des autophagischen/lysosomalen Systems führt. Um den autophagischen Flux sowie die autophagische- und lysosomale Aktivität zu messen, wurde weiter ein zelluläres, leicht manipulierbares Modellsystem verwendet. Es sollte hierbei die Frage geklärt

3.2. CB1-Aktivität moduliert den autophagischen Flux

werden, ob der CB1-Rezeptor ohne zusätzlichen Proteinstress bereits einen Einfluss auf die Autophagie ausübt.

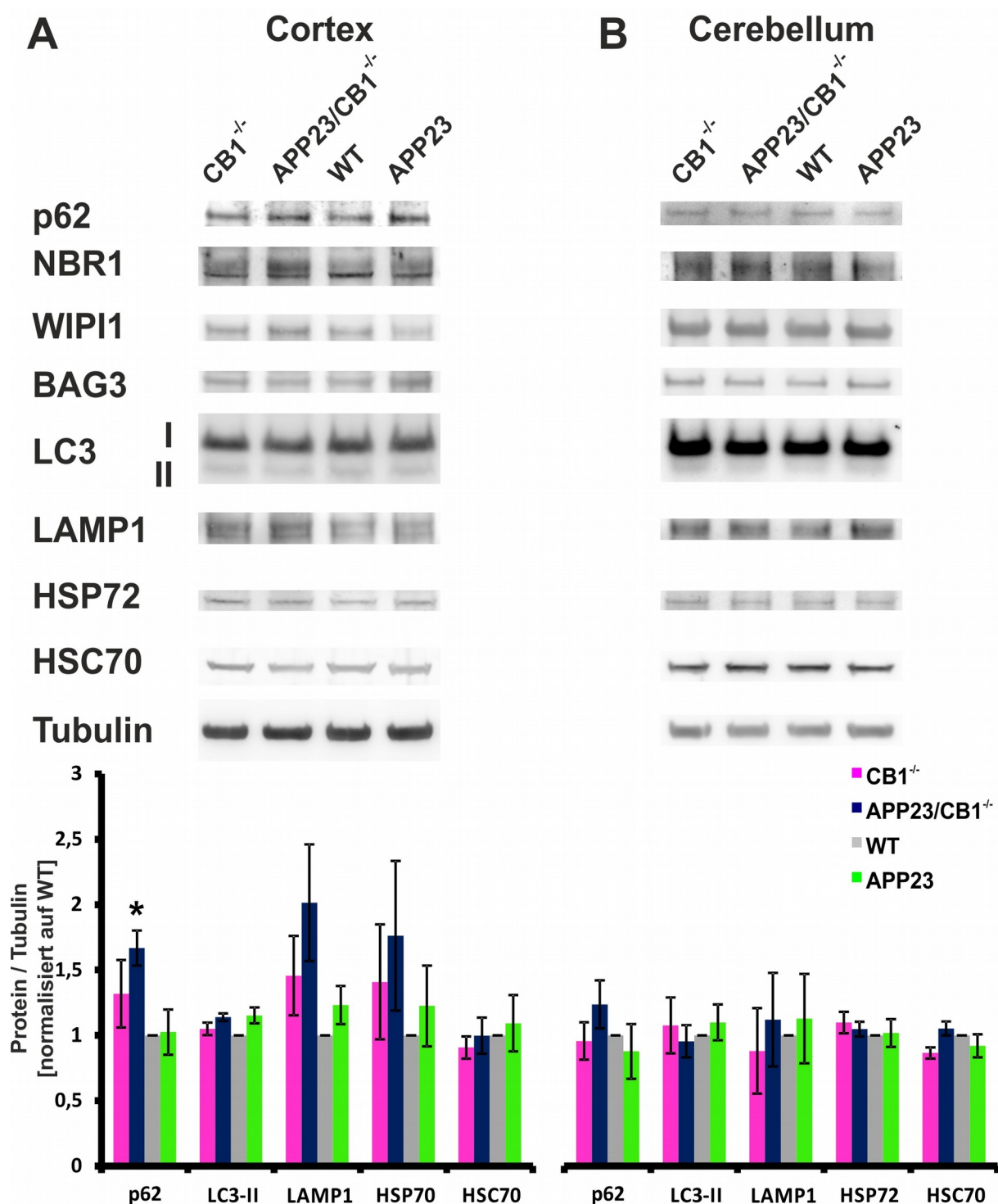


Abbildung 12: Indikatoren des autophagischen/lysosomalen Systems in APP23xCBN-Mäusen
 Westernblot-Analyse von Proteinindikatoren des autophagisch/lysosomalen Systems in Cortex- [A] und Cerebellum-Lysaten [B] von 2-Monate alten APP23xCBN-Mäusen. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm St.Fehler; die Daten wurden mittels t-Test analysiert; n=3 * P<0,05 gegenüber WT.

3.2.2. Herunterregulation des CB1 erhöht den autophagischen Flux aber nicht die proteasomale Aktivität

Die für diese Studie verwendeten HEK- und HEK::D2eGFP-Zellen exprimieren endogen den CB1-, aber nicht den CB2-Rezeptor. Die Expression des *rpl19*-Gens wurde als Positivkontrolle für die

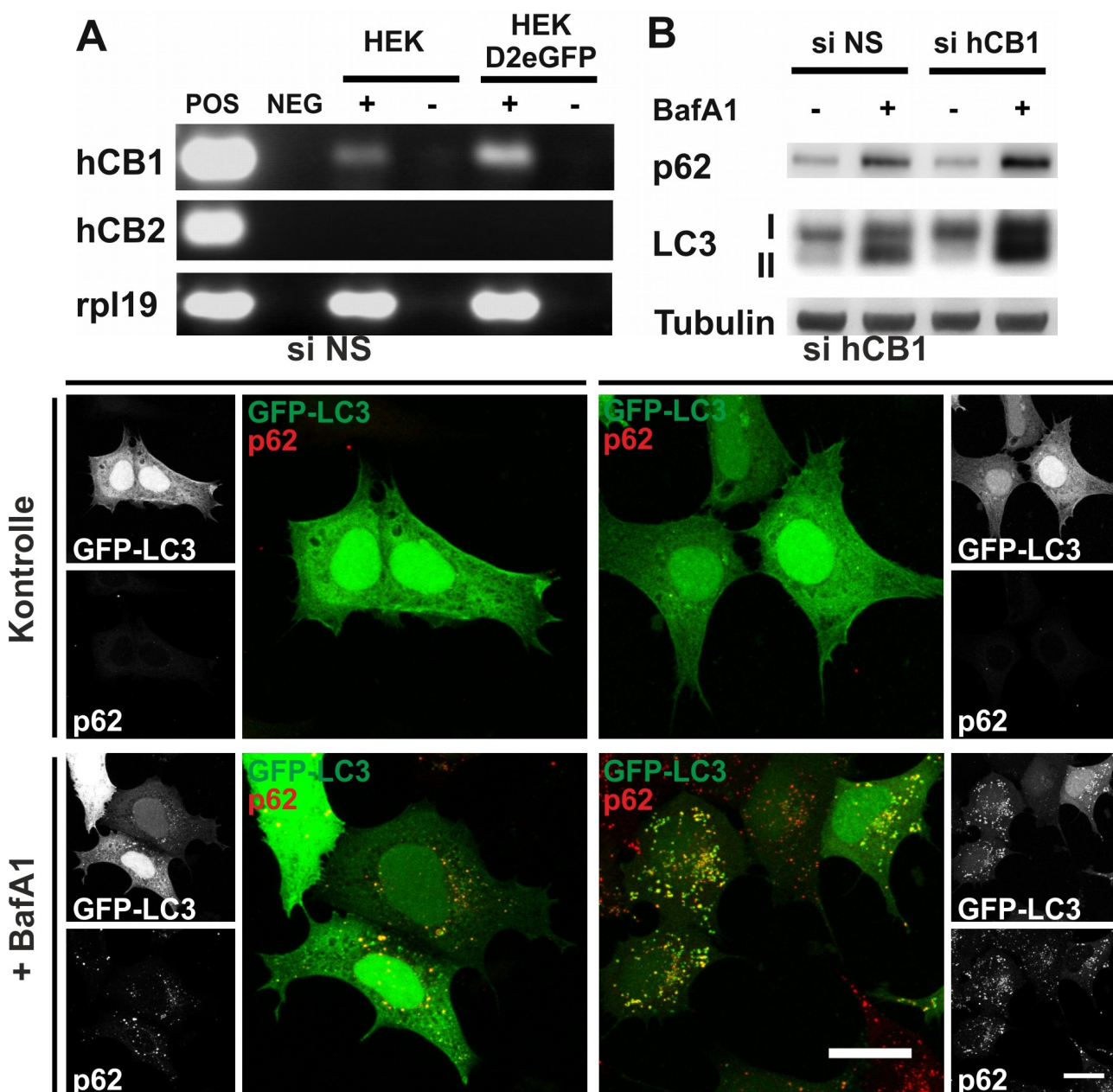


Abbildung 14: HEK-Zellen mit reduziertem CB1-Spiegel bilden mehr autophagische Vesikel

Gezeigt sind Maximalprojektionen aus konfokalen fluoreszenz-mikroskopischen Bilderstapeln von HEK-Zellen, die mit Nonsense-siRNA (si NS) oder hCB1-siRNA transfiziert und mit BafilomycinA1 (BafA1) behandelt wurden. Die Zellen wurden mit dem GFP-LC3 Expressionsplasmid kotransfiziert um erfolgreich transfizierte Zelle zu identifizieren und die LC3-Verteilung (grün) in den Zellen zu verfolgen. Durch eine Immunfluoreszenzfärbung wurde zusätzlich p62 (rot) dargestellt. Größenbalken: 20 μ m

3.2. CB1-Aktivität moduliert den autophagischen Flux

reverse Transkription der mRNA gezeigt (Abb. 13A). Die Herunterregulation des CB1-Rezeptors durch Transfektion der HEK-Zellen mit hCB1-siRNA wurde mittels qPCR nachgewiesen, da der CB1-Antikörper die endogenen Proteinspiegel in den HEK-, wie zuvor in N2A-Zellen nicht detektieren konnte. Die Transfektion der HEK-Zellen mit hCB1-siRNA (si hCB1) führt zur Reduktion der mRNA-Spiegel um 60 % (Abb. 13C). Die Westernblot-Analyse der Autophagie-Indikatoren p62/SQSTM1 (p62) und LC3 nach Herunterregulation des CB1-Rezeptors und anschließender BafilomycinA1-Behandlung (BafA1) zeigte eine stärkere Akkumulation von p62 und LC3-II in Zellen mit reduziertem CB1-Spiegel (si hCB1, Abb. 13B). Neben den zweifach höheren LC3-II Spiegeln in si hCB1-Zellen unter BafA1-Behandlung verglichen mit den Nonsense-siRNA transfizierten Zellen (si NS), wurde auch ein erhöhter autophagischer Flux (gemessen als Quotient der LC3-II Spiegel nach BafA1-Behandlung/Lösungsmittelkontrolle) beobachtet (Abb. 13C, D).

Die Behandlung mit BafA1 führt in si NS- und in si hCB1-Zellen zu einer deutlichen Akkumulation autophagischer Vesikel durch die Inhibition der lysosomalen Degradation. Dieses Auflaufen der Autophagosomen unter BafA1-Behandlung ist in Zellen mit reduzierten CB1-Spiegel ausgeprägter, als in Zellen, die mit Nonsense-siRNA transfiziert wurden (Abb. 14).

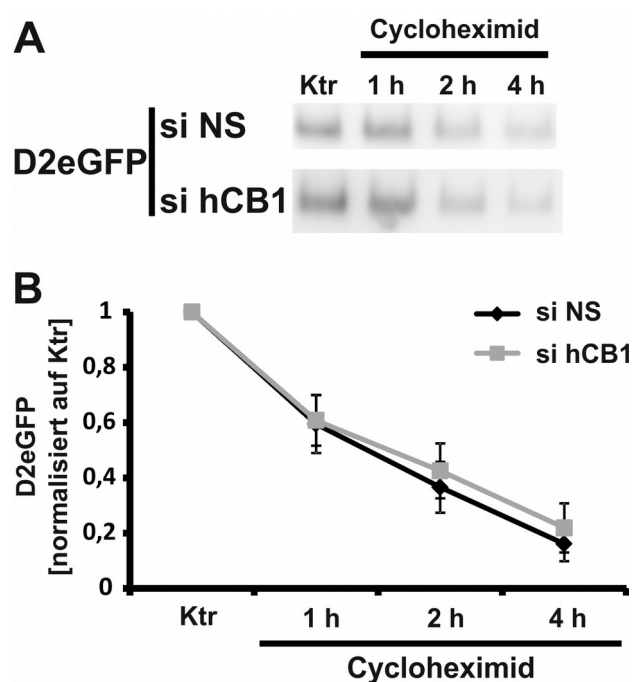


Abbildung 15: CB1-Herunterregulation beeinflusst nicht die proteasomale Aktivität

[A] Westernblot-Analyse von HEK::D2eGFP-Zellen, die mit Nonsense- oder hCB1-siRNA transfiziert wurden. 72 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit 500 μ M Cycloheximid für 0 h (Ktr), 1 h, 2 h oder 4 h behandelt, um den zeitabhängigen Abbau des Proteasom-Substrates zu verfolgen. [B] Die densitometrische Auswertung der Westernblot-Daten zum zeitabhängigen Abbau des D2eGFPs. n=4 Gezeigt sind die Mittelwerte \pm St.Abw.; die Daten wurden mittels t-Test analysiert.

3.2. CB1-Aktivität moduliert den autophagischen Flux

Im Gegensatz zum gesteigerten autophagischen Flux ist die proteasomale Aktivität in Zellen mit reduziertem CB1-Spiegel nicht verändert. Um die proteasomale Aktivität zu messen, wurden die bereits beschriebenen stabil-transgenen HEK::D2eGFP-Zellen eingesetzt (Gamerding et al., 2009). Diese HEK-Zellen tragen stabil ein Expressionsplasmid, welches eine cDNA für ein modifiziertes Grün-fluoreszierendes-Protein (GFP) trägt. Dieses GFP beinhaltet eine PEST-Sequenz (kodierend für die Aminosäuren: Prolin [P], Glutamat [E], Serin [S] und Threonin [T]), welches die Halbwertszeit des GFP stark verkürzt ($t_{1/2} = \text{ca. } 2 \text{ h}$) und zu einem schnellen Abbau im Proteasom führt (Andreatta et al., 2001). D2eGFP kann damit ohne Ubiquitinierung proteasomal abgebaut werden, weswegen es als direkter proteinogener Reporter für die Proteasom-Aktivität benutzt wird. HEK::D2eGFP-Zellen wurden mit Nonsense- (si NS) oder hCB1-siRNA (si hCB1) transfiziert, 72 h nach der Transfektion die Proteintranslation der Zellen mit Hilfe von Cycloheximide gehemmt und nach 0 h (Ktr), 1 h, 2 h oder 4 h geerntet. Dadurch konnte der zeitabhängige, proteasomale Abbau des D2eGFP ohne den Einfluss der Neusynthese verfolgt werden. HEK::D2eGFP-Zellen mit reduzierten CB1-Spiegeln bauten das Proteasom-Reportersubstrat in vergleichbarer Geschwindigkeit zu den si NS-Zellen ab. Es ergaben sich zu keinem der Zeitpunkte signifikante

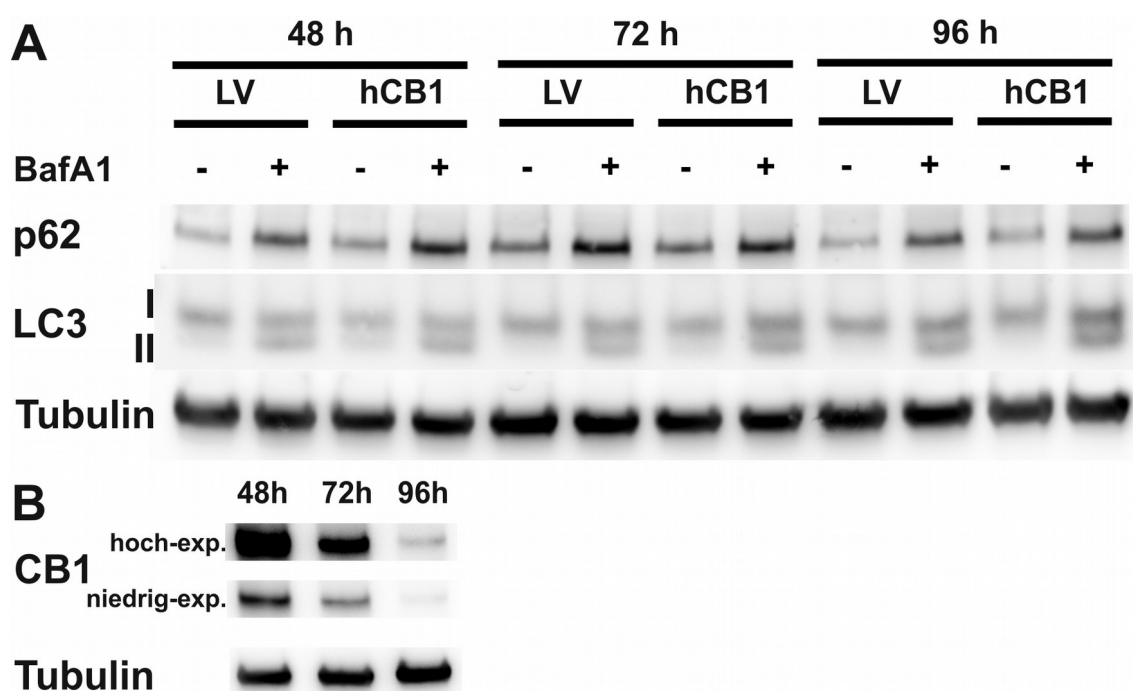


Abbildung 16: Überexpression des CB1-Rezeptors in HEK-Zellen

[A] Westernblot-Analyse der Autophagie-Indikatoren p62 und LC3 nach Transfektion mit dem hCB1-Expressionsplasmid oder dem Leervektor (LV) in HEK-Zellen nach 48 h, 72 h oder 96 h. +: BafilomycinA1-Behandlung (BafA1; 1 μM , 4h); -: Lösungsmittelkontrolle (DMSO, 4h). [B] Westernblot-Analyse der relativen Expressionsspiegel des CB1-Rezeptors 48 h, 72 h oder 96 h post-transkriptionell. Die CB1-Entwicklung ist einmal stark-entwickelt (hoch-exp.) und einmal schwach-entwickelt (niedrig-exp.) gezeigt.

3.2. *CB1-Aktivität moduliert den autophagischen Flux*

Unterschiede im D2eGFP-Abbau. Dies spricht gegen einen Einfluss des CB1 auf die proteasomale Aktivität.

3.2.3. CB1-Überexpression beeinflusst den autophagischen Flux nicht

Es sollte weiter überprüft werden, ob die Überexpression des CB1-Rezeptors den gegenteiligen Effekt der Herunterregulation des CB1 zeigt. Dazu wurden HEK-Zellen mit dem CB1-Expressionsplasmid (hCB1) oder dem Leervektor (LV) transfiziert und 48 h, 72 h oder 96 h nach der Transfektion der autophagische Flux mit BafilomycinA1 (BafA1) inhibiert. Der autophagische Flux zeigte zu keinem der beobachteten Zeitpunkte einen Unterschied zwischen den CB1-überexprimierenden Zellen und den Zellen, die mit dem LV transfiziert wurden (Abb. 16A). Um die durch die Transfektion erreichten CB1-Spiegel vergleichen zu können, wurde eine Westernblot-Analyse der Proteinlysate nach 48 h, 72 h und 96 h (ohne BafA1-Behandlung) durchgeführt. Die Proteinspiegel des überexprimierten CB1-Rezeptors waren 48 h nach der Transfektion am höchsten und nahmen dann über die Zeit stark ab (Abb. 16B). Die Überexpression des CB1-Rezeptors hatte zu keinem der beobachteten Zeitpunkte und den damit verbunden unterschiedlichen Expressions-Niveaus des CB1-Rezeptors einen Einfluss auf den autophagischen Flux. Dies spricht dafür, dass das CB1-Protein nicht über eine direkte Protein-Protein-Interaktion an der Regulation des autophagischen Fluxes beteiligt ist.

3.2.4. Pharmakologische Modulation der CB1-Aktivität verändert den autophagischen Flux

Die Überexpression des CB1-Rezeptors hatte keinen Effekt auf den autophagischen Flux, jedoch die Herunterregulation des Rezeptors durch siRNA-Transfektion führte zu einer gesteigerten Bildung autophagischer Vesikel. Deshalb sollte geklärt werden, ob hier die reduzierte Aktivität des CB1-Rezeptors ursächlich für den gesteigerten autophagischen Flux war, oder dies eine Stressantwort der Zellen auf die transiente Herunterregulation des Rezeptors darstellte. Dafür wurde die Zellen mit spezifischen CB1-Rezeptor-Liganden behandelt. Der verwendete Agonist WIN55,212-2 (Win2) aktiviert spezifisch CB1- und CB2-Rezeptoren. In den hier verwendeten HEK-Zellen wurde jedoch keine CB2-Expression fest gestellt (Abb. 13A), weshalb die beobachteten Effekte auf CB1-Aktivität beruhen. Die HEK-Zellen wurden mit dem spezifischen

3.2. CB1-Aktivität moduliert den autophagischen Flux

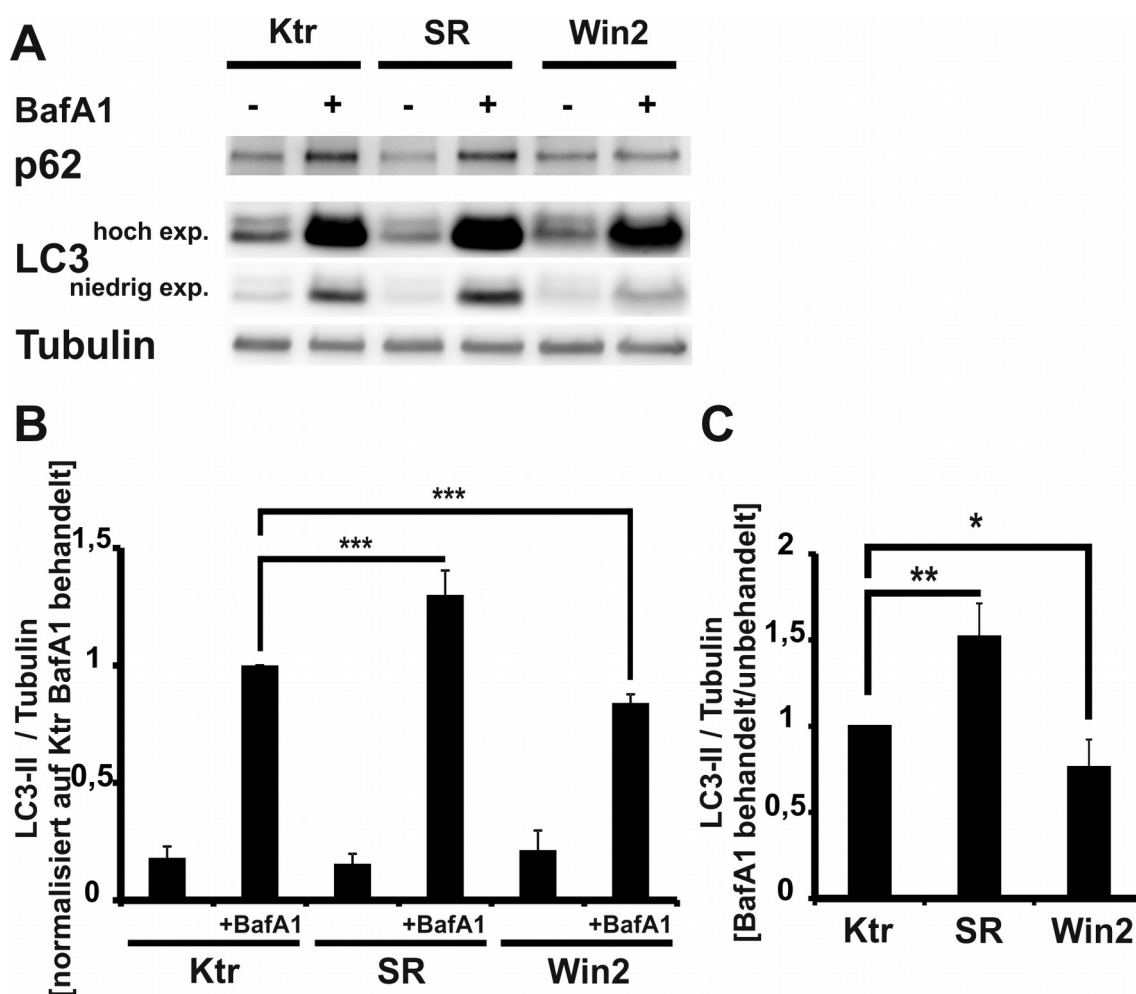


Abbildung 17: CB1-Rezeptor-Aktivität moduliert den autophagischen Flux

[A] Westernblot-Analyse der Autophagie-Indikatoren p62 und LC3 von HEK-Zellysaten, welche mit dem CB1-Antagonisten Rimonabant (SR141716, SR; 100 nM, 4 h), dem CB1-Agonisten WIN55,212-2 (Win2; 100 nM, 4 h) oder dem Lösungsmittel (DMSO, Ktr; 4 h) behandelt wurden. Anschließend wurden die Zellen mit BafilomycinA1 (BafA1; 1 μ M, 4 h) oder dem Lösungsmittel (DMSO; 4 h) behandelt. [B] Densitometrische Analyse der Westernblot-Daten der LC3-II Spiegel nach obigen Behandlungen. [C] Der autophagische Flux, gemessen als Quotient der LC3-II Spiegel nach BafA1-Behandlung/Lösungsmittelkontrolle, der obigen Behandlungen. n=4. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm St.Abw.; die Daten wurden mittels t-Tests analysiert; * P<0,05 ** P<0,01 *** P<0,001.

CB1-Rezeptor-Antagonisten Rimonabant (SR141716, SR), Win2 oder dem Lösungsmittel (DMSO, Ktr) für vier Stunden vorinkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit je BafilomycinA1 (BafA1) oder dem Lösungsmittel (DMSO) für weitere 4 h behandelt, um die lysosomale Degradation zu inhibieren und damit den autophagischen Flux zu stoppen (Abb. 18A). LC3-II akkumulierte dabei nach Inhibition der CB1-Aktivität mit Rimonabant signifikant stärker und nach Aktivierung des Rezeptors mit Win2 signifikant schwächer, als in der Kontrolle (Abb. 18B). Entsprechend der LC3-II Akkumulation nach BafA1-Behandlung, zeigte sich ein erhöhter autophagischer Flux in Zellen unter Rimonabant Behandlung und erniedrigter autophagischer Flux in Zellen unter Win2

3.2. CB1-Aktivität moduliert den autophagischen Flux

Behandlung (Abb. 18C). Der autophagische Flux war also modulierbar durch den Einsatz von CB1-Rezeptor-Agonist und -Antagonist. Dies spricht wiederum dafür, dass die Rezeptor-Aktivität und nicht das Rezeptor-Protein *per se* ursächlich für die beobachteten Effekte ist.

3.2.5. CB1-Herunterregulation verändert nicht die lysosomale Aktivität

Die Standardmethoden zum Messen des autophagischen Fluxes beruhen auf der Inhibition des lysosomalen Abbaus und der dadurch gestörten Degradation autophagischer Vesikel. Eine verstärkte Akkumulation des Autophagie-Indikators LC3-II deutet dabei auf einen erhöhten autophagischen Flux hin, weshalb dieser als Standardmarker für autophagische Aktivität gilt. Liegt jedoch ein gestörter lysosomaler Abbau vor, so können die unvollständig degradierten Autophagosomen auch akkumulieren und damit die LC3-II Spiegel steigen, ohne dass eine verstärkte Bildung autophagischer Vesikel vorliegt. Um dies zu untersuchen, sollte die lysosomale Aktivität nach Herunterregulation des CB1-Rezeptors untersucht werden. Hierfür wurde zunächst wieder der Spiegel des CB1-Rezeptors mittels siRNA-Transfektion herunterreguliert und die lysosomale Degradation anschließend durch Behandlung mit BafilomycinA1 (BafA1) inhibiert.

3.2. CB1-Aktivität moduliert den autophagischen Flux

Eine Westernblot-Analyse des lysosomalen Indikator-Proteins LAMP1 ergab keinen Unterschied in den Proteinspiegeln von LAMP1 zwischen Zellen mit herunterreguliertem CB1 (si hCB1) und der Kontrolle (si NS). Die vierstündige Behandlung der Zellen mit BafA1 führte zu keiner signifikanten Veränderung der LAMP1 Spiegel (Abb. 18A, B). Es sollte nun weiter die lysosomale Aktivität gemessen werden. Hierfür wurden die zuvor mit hCB1-siRNA (si hCB1) oder Nonsense-siRNA (si NS) transfizierten Zellen mit einem spezifischen Enzymsubstrat (Z-RR-AMC) für lysosomale Proteinrasen (Cathepsine) inkubiert. Dieses Substrat besteht aus einem Fluorophor (AMC), welches

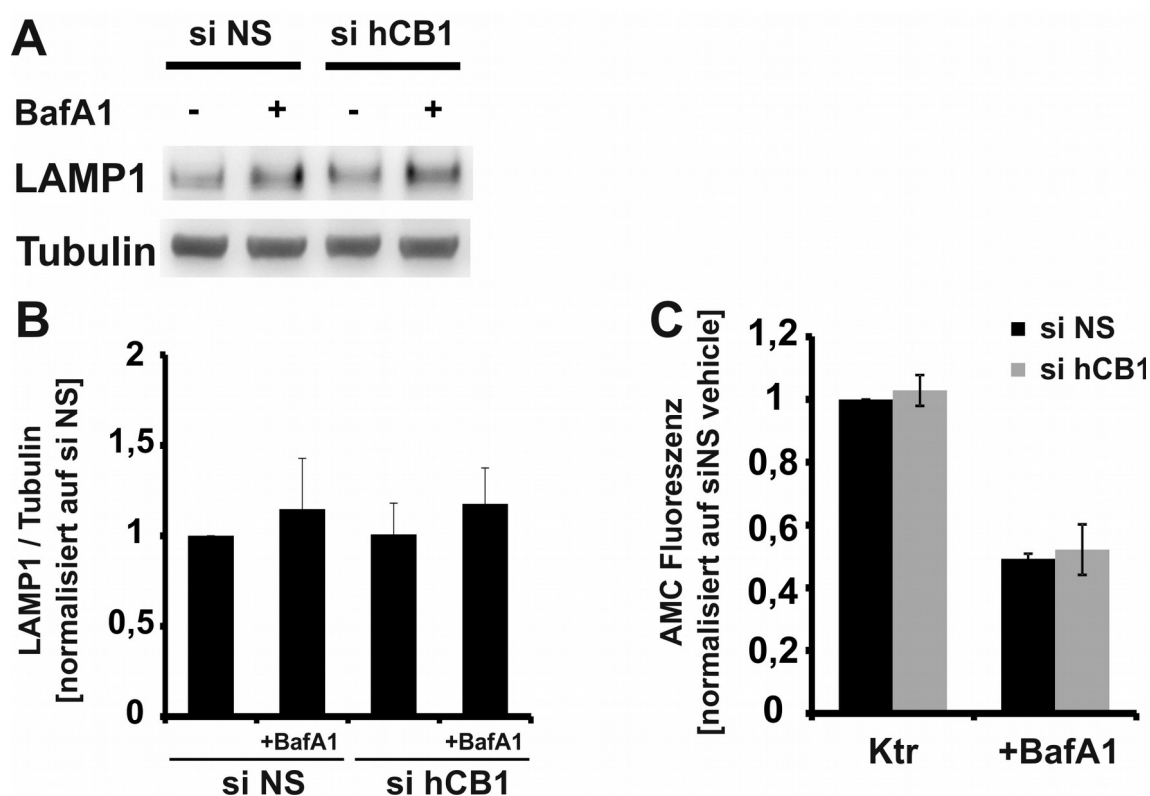


Abbildung 18: Unveränderte lysosomale Aktivität nach CB1-Herunterregulation

[A] Westernblot-Analyse des lysosomalen Indikators LAMP1 nach Nonsense- (si NS) oder hCB1-siRNA (si hCB1) Transfektion in HEK-Zellen. +: BafilomycinA1-Behandlung (BafA1; 1 μ M, 4h); -: Lösungsmittelkontrolle (DMSO, 4h). [B] Densitometrische Analyse der Westernblot-Daten von LAMP1 nach siRNA-Herunterregulation von hCB1 und BafA1-Behandlung (1 μ M, 4 h) in HEK-Zellen. n=3. [C] Die lysosomale Aktivität wurde mit dem für lysosomales Cathepsin spezifischen Enzymsubstrat (Z-RR-AMC, CathepsinB) gemessen. n=3. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm St.Abw.; die Daten wurden mittels t-Test analysiert.

über eine Aminosäuren-Verbindung mit einem Fluoreszenzabsorbierer (Z) verbunden ist. Durch die Aminosäure-Sequenz der Aminosäure-Verbindung und die Anreicherung in Lysosomen ergibt sich die Spezifität des Substrats. Verdaut nun das entsprechende Cathepsin (hier CathepsinB) die Aminosäure-Verbindung, wird das Fluorophor freigesetzt und fluoresziert nun wenn es mit dem Licht der spezifischen Wellenlänge angeregt wird. Die gemessene Fluoreszenz des Fluorophors ist

3.2. CB1-Aktivität moduliert den autophagischen Flux

also ein Maß für die enzymatische Aktivität des Cathepsin und damit für die lysosomale Degradations-Aktivität. Es wurde keine unterschiedliche Fluoreszenz des AMC-Fluorophors in Zellen mit herunterregulierten CB1-Spiegeln verglichen zu den Kontroll-Zellen gemessen. Die Behandlung mit BafA1 führt in beiden Fällen zu einer reduzierten AMC-Fluoreszenz um 50 % der Kontrolle (Abb. 18C).

Immunzytochemische Färbungen der wie oben transfizierten und mit BafA1-behandelten HEK-Zellen zeigten keinen Unterschied in der Dichte an Lysosomen in den Zellen. Nach BafA1-

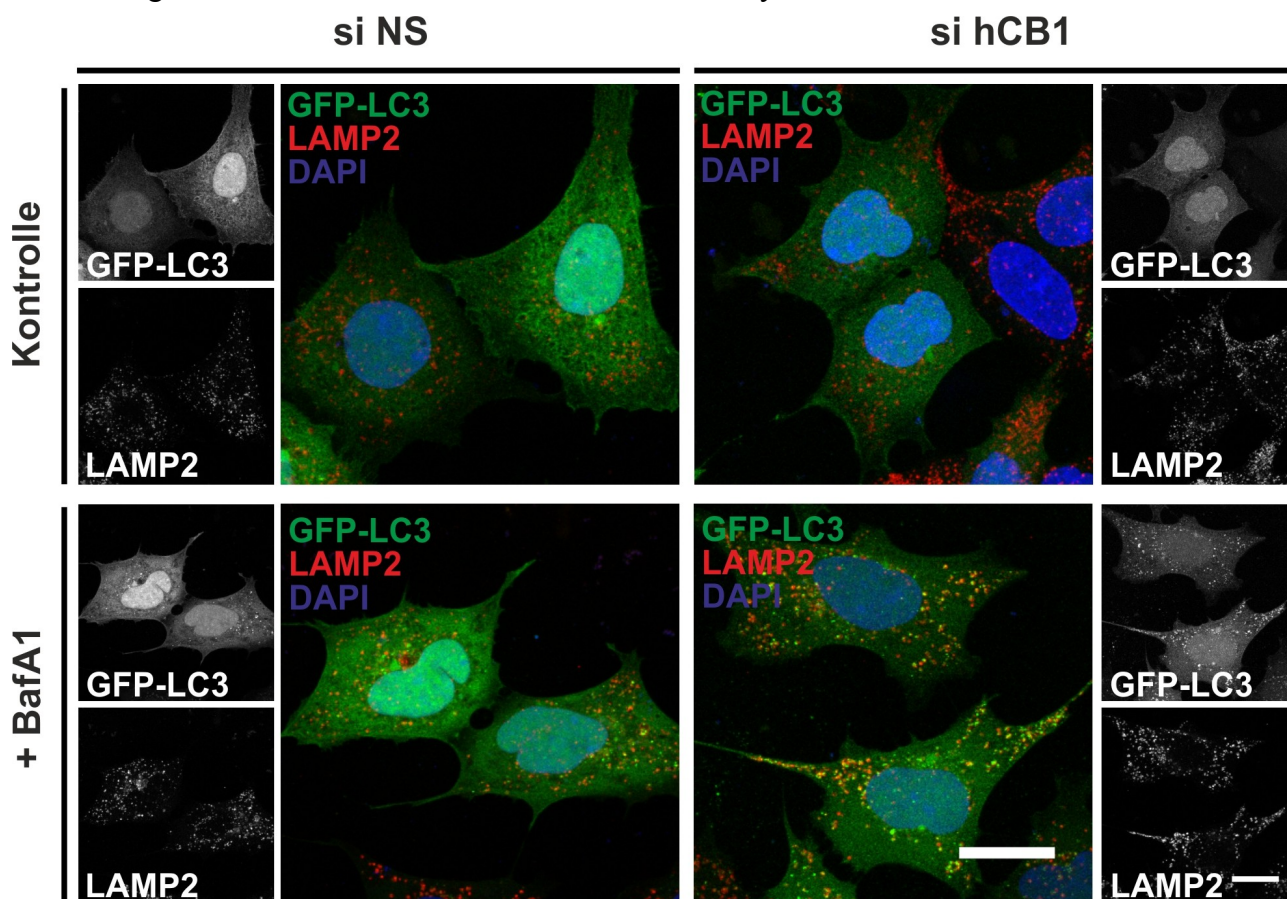


Abbildung 19: Lysosomendichte nach CB1-Herunterregulation

Gezeigt sind Maximalprojektionen aus konfokalen fluoreszenz-mikroskopischen Bilderstapeln von HEK-Zellen, die mit Nonsense-siRNA (si NS) oder hCB1-siRNA transfiziert und mit BafilomycinA1 (BafA1) behandelt wurden. Die Zellen wurden mit dem GFP-LC3 Expressionsplasmid kotransfiziert um erfolgreich transfizierte Zelle zu identifizieren und die LC3-Verteilung (grün) in den Zellen zu verfolgen. Durch eine Immunfluoreszenzfärbung wurde zusätzlich der Lysosomen-Marker LAMP2 (rot) dargestellt. Größenbalken: 20 µm

Behandlung war jedoch eine stärkere Beladung der Lysosomen mit autophagischen Vesikeln fest zu stellen, erkennbar an der stärkeren Kolokalisation der LAMP2- mit den GFP-LC3-positiven Vesikeln (Abb. 19).

3.2.6. CB1 moduliert den autophagischen Flux unabhängig des mTOR-

und des BECLIN1-Komplexes

Der *mammalian target of rapamycin complex 1* (mTORC1) ist einer der beiden großen Proteinkomplexe, welche an der Kontrolle der autophagischen Aktivität beteiligt sind. Dabei ist mTORC1 ein negativer Regulator der Autophagie, da seine Aktivität die Autophagosomen-Bildung unterdrückt. Die Darstellung der Phosphorylierung der zentralen Kinsase mTOR an Serin 2448 (p-mTOR) wird allgemein als Indikator für die mTOR-Aktivität genutzt. An Serin 2448 inhibiert auch das für mTOR namensgebende Antibiotikum Rapamycin die Phosphorylierung und sorgt so für eine gesteigerte autophagische Aktivität (Chiang und Abraham, 2005).

Die Westernblot-Analyse der mTOR Protein-Spiegel und der p-mTOR Spiegel zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen den Zellen mit herunterreguliertem CB1 (si hCB1) und den Kontrollen (si NS). Auch die vierstündige Behandlung der beiden Zellgruppen mit BafilomycinA1 (BafA1) veränderte weder mTOR- noch p-mTOR-Spiegel signifikant. Die Behandlung von HEK-Zellen mit Rapamycin führte hingegen zu einer deutlichen Reduktion der p-mTOR Spiegel (Abb. 20).

Der BECLIN1-Komplex (im Folgenden: BECLIN1) ist der zweite große Protein-Komplex, der an der Regulation der autophagischen Aktivität beteiligt ist. Dieser Protein-Komplex induziert in der Regel die Bildung von Autophagosomen (vergleiche Kapitel 1.2.2.). Es sollte nun untersucht werden, ob der gesteigerte autophagische Flux durch CB1-Inaktivierung über einen BECLIN1-vermittelten Signalweg stattfindet. Dazu wurden die BECLIN1-Spiegel durch die Transfektion der HEK-Zellen mit BECLIN1-siRNA herunterreguliert und die Zellen anschließend mit Rimonabant (SR141716) behandelt. Um den autophagischen Flux messen zu können, wurde wiederum die lysosomale Degradation mittels BafilomycinA1 (BafA1) inhibiert. Die Herunterregulation von BECLIN1 führte zu einer verringerten Akkumulation von LC3-II nach BafA1-Behandlung (Abb. 21A, B) sowie einem reduzierten autophagischen Flux (Abb. 21C) im Vergleich zur Kontrolle (si NS). Die Inhibition der CB1-Aktivität durch Rimonabant (SR141716) führt wiederum in Kontrollzellen, aber auch in Zellen mit reduziertem BECLIN1 Spiegel zu einer verstärkten Akkumulation von LC3-II nach BafA1-Behandlung (Abb. 21A, B) und einem gesteigerten autophagischen Flux (Abb. 21C). Es ergaben sich hier keine signifikanten Unterschiede nach Rimonabant-Behandlung zwischen Zellen mit reduziertem BECLIN1-Spiegel und den Kontroll-Zellen (Abb. 21B, C). Dies spricht dafür, dass die Induktion des autophagischen Fluxes durch die Inhibition der CB1-Aktivität

3.2. CB1-Aktivität moduliert den autophagischen Flux

nicht über einen BECLIN1-Komplex vermittelten Signalweg stattfindet.

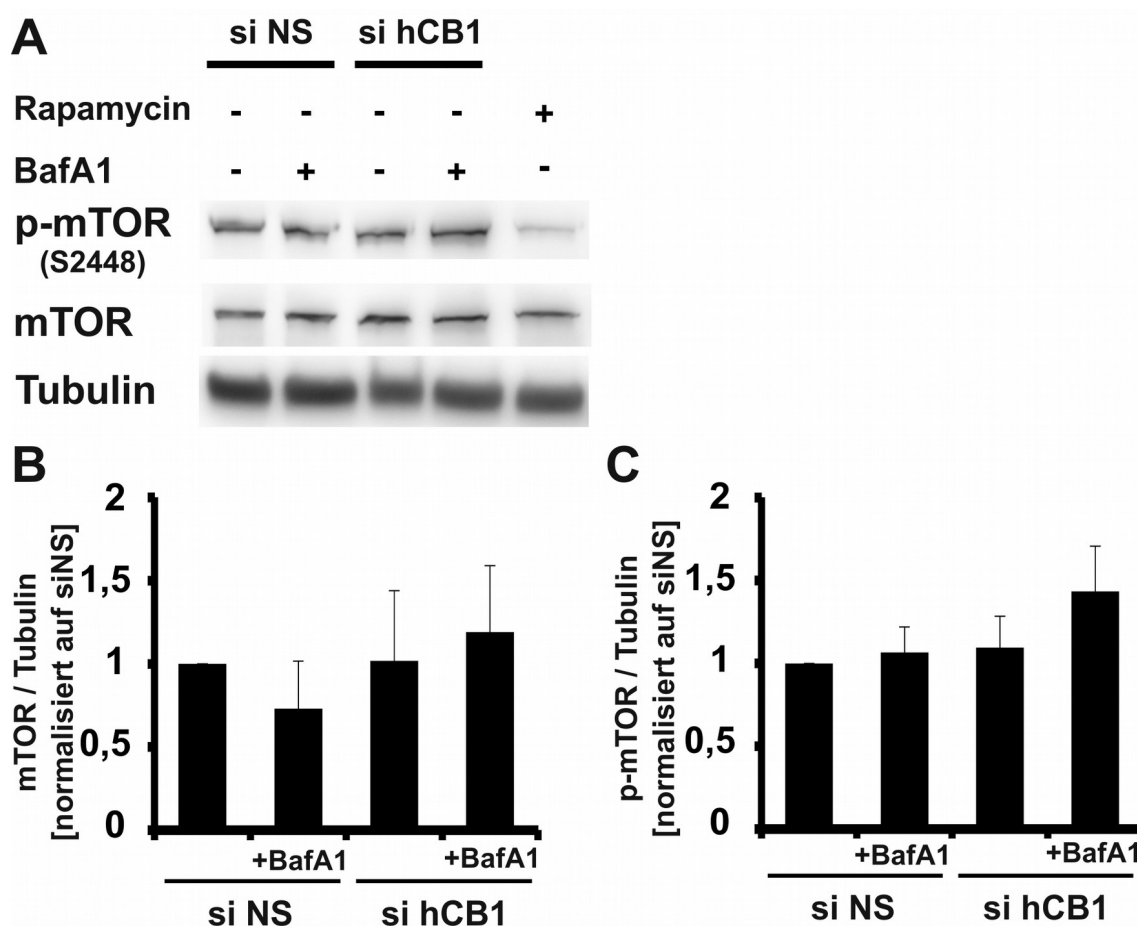


Abbildung 20: Modulation des autophagischen Fluxes durch CB1 unabhängig von p-mTOR

[A] Die gesamte Protein-Spiegel von mTOR und die mTOR-Phosphorylierung an Serin 2448 (p-mTOR) bleiben unverändert nach Herunterregulation von CB1 durch siRNA-Transfektion. Die BafilomycinA1-Behandlung (BafA1; 1 μ M, 4 h) verändert die mTOR- und p-mTOR-Spiegel nicht. Die Rapamycin-Behandlung (10 μ M, 4 h) reduziert die p-mTOR-Spiegel. Densitometrische Analyse der Westernblot-Daten von mTOR gesamt-Protein [B] und p-mTOR [C] nach siRNA-Herunterregulation von hCB1 und BafA1-Behandlung in HEK-Zellen. n=3. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm St.Abw.; die Daten wurden mittels t-Test analysiert.

3.2. CB1-Aktivität moduliert den autophagischen Flux

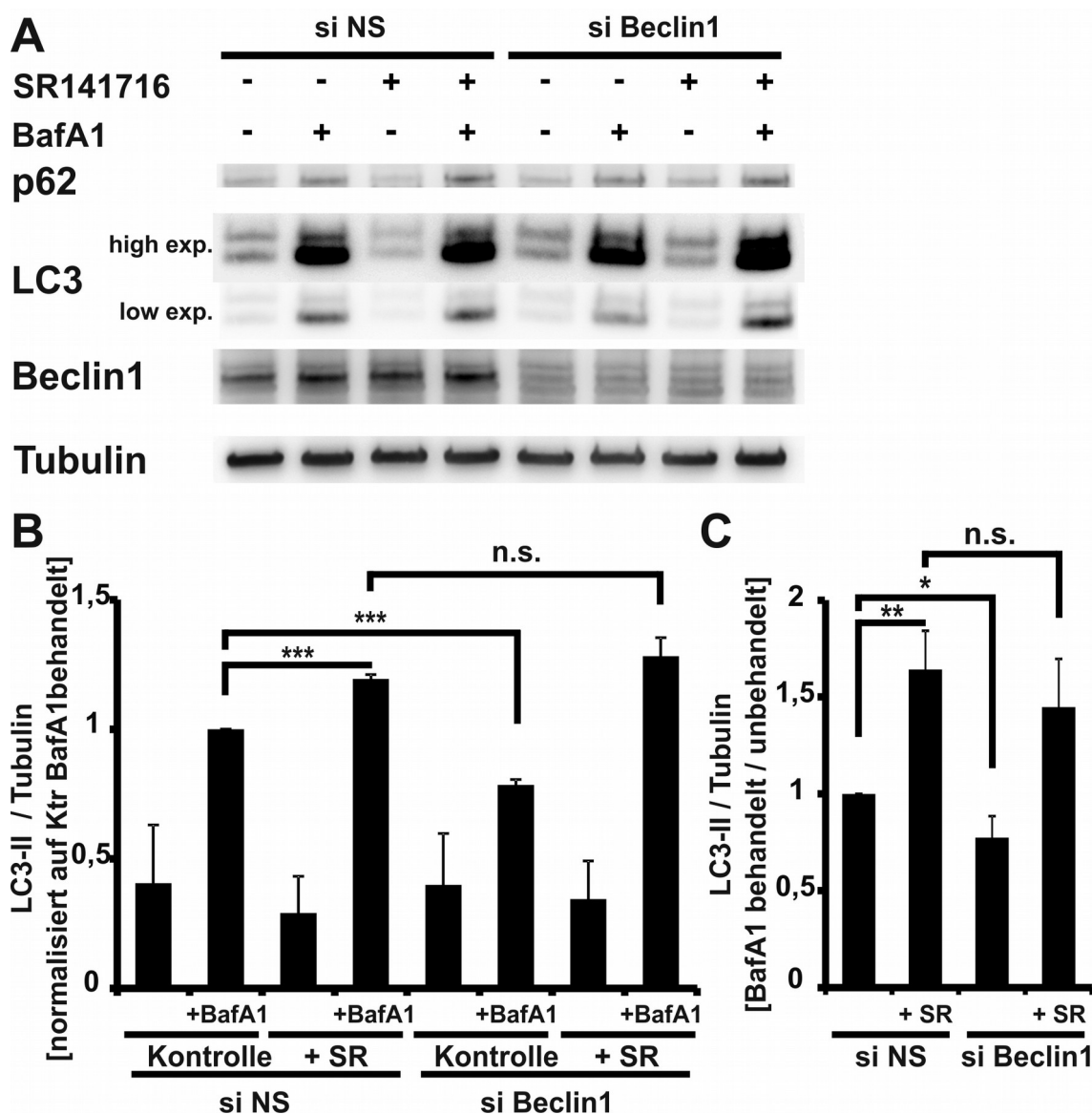


Abbildung 21: Rimonabant wirkt der BECLIN1-Herunterregulation entgegen

[A] Westernblot-Analyse der Autophagie-Indikatoren p62 und LC3 nach Nonsense- (si NS) oder BECLIN1-siRNA (si BECLIN1) Transfektion in HEK-Zellen und anschließender Rimonabant (SR141716; 100 nM, 4 h) Behandlung. Danach wurde eine BafilomycinA1-Behandlung (BafA1; 1 μ M, 4h) durchgeführt. [B] Densitometrische Analyse der Westernblot-Daten von LC3-II nach obiger Behandlung in HEK-Zellen. [C] Der autophagische Flux, gemessen als Quotient der LC3-II Spiegel nach BafA1-Behandlung/Lösungsmittelkontrolle, der obigen Behandlungen. n=4. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm St.Abw.; die Daten wurden mittels t-Test analysiert; n.s.=nicht signifikant * P<0,05 ** P<0,01 *** P<0,001.

3.2.7. Autophagie-relevante Gene werden unverändert exprimiert nach Herunterregulation des CB1

3.2. CB1-Aktivität moduliert den autophagischen Flux

Um zu kontrollieren, ob nach Herunterregulation des CB1 Rezeptors durch Transfektion mit CB1-siRNA autophagie-relevante Gene verändert exprimiert werden, wurde eine qPCR-Analyse mit Hilfe der *Human Autophagy Primer Library* (Biomol), die Primer für 88 Autophagie-assoziierte Gen-Transkripte enthält, in zwei unabhängigen Experimenten durchgeführt. Keines der gemessenen Gene zeigte eine relevant, veränderte Expression nach beiden Durchgängen; ein Regulationsfaktor von mindestens 1,5 wurde als Schwellenwert für eine relevante genetische Regulation angesehen. Die gemessene Expression der proteinogenen Gene, deren Genprodukte in den vorher gezeigten Versuchen analysiert wurden, sind in Tabelle 13 dargestellt.

Tabelle 13: Genregulation nach CB1-siRNA Transfektion (normiert auf Nonesense-siRNA)

Gen	Regulationsfaktor	St.Abw
<i>beclin1</i>	1,072	± 0,000
<i>lamp1</i>	1,000	± 0,000
<i>lamp2</i>	1,323	± 0,092
<i>lc3b</i>	1,036	± 0,036
<i>mTOR</i>	1,142	± 0,272
<i>p62/SQSTM1</i>	1,149	± 0,000

4. Diskussion

4.1. Der CB1 als Ziel einer Behandlungsstrategie der AD

Die Alzheimer Demenz (AD) stellt bis heute eine unheilbare, neurodegenerative Erkrankung dar und die ursächlichen Faktoren sind noch immer nicht geklärt, weshalb zur Zeit nur eine symptomatische Behandlung Anwendung findet. Bei mild bis moderat ausgeprägter AD kommen Acetylcholinesterase-Inhibitoren zum Einsatz, die den hydrolytischen Abbau des synaptischen Acetylcholin verzögern und dadurch die Stimulation der cholinergen Rezeptoren auf einem höheren Niveau halten. Sie verlangsamen so den Verfall der kognitiven Leistungen um bis zu drei Jahre. In moderaten bis schweren Fällen kommt der N-methyl-D-Aspartat (NMDA) – Rezeptor Antagonist Memantin zum Einsatz. Dieser soll durch Inhibition der NMDA-Glutamatrezeptoren, Exzitotoxizität und damit neuronalen Zellschaden verhindern. Zudem kommen Psychopharmaka zum Einsatz, um Symptome wie Aggressivität oder Depression zu lindern (Aisen et al., 2012). Neben den etablierten, symptomatischen Therapien wurden in den vergangenen Jahren auch Therapieansätze verfolgt, die auf die Beseitigung der amyloiden Plaques und der A β -Peptide beruhen. Die bisher entwickelten spezifischen und unspezifischen γ -Secretase- und spezifischen β -Secretase-Inhibitoren sind jedoch auch auf Grund von Teils schwerer Nebenwirkungen wie Hautirritationen, gastrointestinale Störungen und Hautneoplasmen nicht für die Behandlung von Patienten zugelassen (Doody et al., 2013; Schenk et al., 2012). Die Entwicklung der β - und γ -Secretase-Inhibitoren als Therapeutika ist also kritisch zu sehen, so lange nicht die genauen physiologischen Funktionen des APP und seiner Prozessierungsprodukte sowie die Substrate der β - und γ -Secretase bekannt sind. Auf Basis von nicht-steroiden anti-inflammatorischen Medikamenten (NSAIDs) wurden deshalb γ -Secretase-Modulatoren entwickelt, die jedoch keine Wirkung bei AD-Patienten zeigten (Green et al., 2009; Weggen et al., 2001). Eine weitere experimentelle Behandlungsstrategie beruht auf dem Verhindern der amyloiden Plaques durch Aggregationsinhibitoren (AIs). Da sich in den letzten Jahren jedoch die Erkenntnis verfestigt, dass nicht die amyloiden Plaques, sondern lösliche A β -Oligomere die toxische Spezies des A β repräsentieren, ist die Grundlage dieser Behandlungsstrategie eher kritisch zu sehen (Crews und Masliah, 2010; Wirths et al., 2004). Auch immunologische Methoden, welche die Menge an A β -Peptiden reduzieren sollten, wurden erprobt. Eine PhaseII-Studie mit dem Impfstoff AN1792 (A β ₄₂-Peptid mit QS-21 als Adjuvanz) zur aktiven Immunisierung musste abgebrochen werden, da 6 %

4.1. Der CB1 als Ziel einer Behandlungsstrategie der AD

der Patienten eine schwere, sterile Meningoenzephalitis entwickelten (Orgogozo et al., 2003). Aufgrund der katastrophalen Folgen für die Gesundheit der Patienten durch die aktive Immunisierung werden zur Zeit unterschiedliche Impfstoffe für eine passive Immunisierung entwickelt. Nach den bisher verfügbaren Daten sind diese Impfstoffe zwar sicher, aber wie bei allen der genannten experimentellen Behandlungsstrategien, konnten diese ihre Wirksamkeit bei AD-Patienten noch nicht unter Beweis stellen (Schenk et al., 2012). Es scheint also notwendig, alternative Strategien zu entwickeln um AD zumindest in ihrem progressiven Verlauf stoppen zu können.

Dem Endocannabinoid System (ECS) wurde schon früh nach seiner Entdeckung neuroprotektive Eigenschaften zugeschrieben und zudem sind Komponenten des ECS im ZNS von AD-Patienten verändert (siehe Kapitel 1.3.3.). Gerade der CB1 mit seiner gut charakterisierten Funktion in der retrograden synaptischen Signaltransduktion und der damit verbunden anti-exzitotoxischen Wirkung könnte dabei ein viel versprechendes pharmakologisches Ziel darstellen (siehe Kapitel 1.3.2.). Um den Einfluss des CB1 auf die Alzheimer-Pathologie zu untersuchen, wurden deshalb APP23-Mäuse (ein weit verbreitetes Mausmodell der AD) mit CB1^{-/-}-Mäusen verkreuzt und die Phänotypen der transgenen Tiere untereinander verglichen. Hierbei fiel auf, dass das Fehlen des CB1 im genetischen Hintergrund der APP23-Tiere eine reduzierte APP-Prozessierung und weniger amyloide Plaques in den Gehirnen der 20-Monate alten Tiere zur Folge hatte. Dies konnte auch pharmakologisch in ersten Zellkulturexperimenten nachvollzogen werden. Zudem zeigten die APP23/CB1^{-/-}-Mäuse die geringste Geburtenrate, das geringste Körpergewicht mit 20 Monaten, eine erhöhte Mortalität, eine verringerte Lernleistung und gegenüber der APP23-Mäuse eine Reduktion der Gliose im Gehirn (Stumm, 2011). Diese initiale Beschreibung der APP23xCBN-Tiere durch Christoph Stumm, legte nahe, dass es einen physiologischen Zusammenhang zwischen der APP-Prozessierung, der CB1-Expression und den kognitiven Fähigkeiten der Mäuse gab.

In der hier vorliegenden Arbeit sollte zunächst eine erweiterte Charakterisierung der APP23xCBN-Tiere erfolgen. Zudem sollte *in vitro* der Einfluss der CB1-Expression auf die APP-Prozessierung untersucht werden um zu klären, ob ein physiologischen Zusammenhang zwischen der CB1-Expression und der APP-Prozessierung besteht.

4.1.1. Erweiterte Charakterisierung der APP23xCBN-Mauslinie

APP23- und CB1^{-/-}-Mäuse zeigten jeweils ein reduziertes Körpergewicht gegenüber den wildtypischen C57/BL6n (WT) Mäusen. Dies bestätigt den für die CB1^{-/-}-Tiere beschriebenen hageren Phänotyp und das für die APP23-Tiere beschriebene geringere Körpergewicht gegenüber der WT-Tiere (Cota et al., 2003; Lalonde et al., 2005). Zudem zeigten die doppelt transgenen APP23/CB1^{-/-}-Mäuse ein geringeres Körpergewicht, als die APP23- und CB1^{-/-}-Mäuse, was die ersten Ergebnisse der Gewichtsdaten der 20-Monate alten Tiere der unterschiedlichen Genotypen bestätigt (Stumm, 2011). Die Unterschiede im Körpergewicht der Genotypen resultierten dabei aus der unterschiedlichen Gewichtszunahme der Tiere bis zu ihrem 20. Lebensmonat, da keine sprunghafte Gewichtsabnahme zu einem bestimmten Lebensalter bei einem der Genotypen zu sehen war. Deshalb kann davon ausgegangen werden, dass dieser Phänotyp nicht zu einem bestimmten Entwicklungszeitpunkt der Mäuse auftritt, sondern durch einen kontinuierlichen Unterschied in der Gewichtszunahme zu erklären ist. Es ist weiter anzunehmen, dass sich das geringe Körpergewicht der doppelt transgenen APP23/CB1^{-/-}-Mäuse aus einer Addition der Phänotypen der einzeln transgenen APP23- und CB1^{-/-}-Mäuse ergibt. Die durch ein geringeres Körpergewicht ausgezeichneten APP23-Tiere werden durch den Wegfall der Appetit-steigernden CB1-Aktivität nur ein weiter verringertes Körpergewicht erreichen (Cota et al., 2003; Quarta et al., 2011). Neben der Gewichtsabnahme wurde bei keinem der Genotypen ein weiterer Unterschied im Aussehen oder im Verhalten festgestellt. Durch das geringere Körpergewicht könnten die transgenen gegenüber den wildtypischen Tieren jedoch in der Hierarchie der Käfiggemeinschaft abfallen und sich so beim Futterwettbewerb eine kontinuierliche Verstärkung der Gewichtsunterschiede ergeben. Diesem Effekt wirkte allerdings die *ad libitum* Fütterung der Tiere entgegen, sodass wahrscheinlich der jeweilige Genotyp der Tiere hauptsächlich den Gewichts-Phänotyp bestimmt.

Die morphologische Untersuchung der die amyloiden Plaques umgebenden Glia-Zellen bestätigten die ersten Ergebnisse zu einer reduzierten Gliose in APP23/CB1^{-/-}- gegenüber APP23-Mäusen (Stumm, 2011). Mikroglia-Zellen, welche den die amyloiden Plaques umgeben, zeigten die abgerundete Morphologie, welche für diese Zelltypen im aktivierten Zustand typisch ist. Aktivierte Astroglia-Zellen finden sich nicht in einer so deutlichen räumlichen Assoziation zu den amyloiden Plaques, wie Mikroglia-Zellen (siehe auch Stumm, 2011). Dennoch wurde anhand der Analyse der GFAP-histochemischen Färbungen gezeigt, dass auch die astrogliale Aktivierung der APP23/CB1^{-/-}- gegenüber der APP23-Mäuse geringer ausfällt. Neuroinflammation, und damit vor allem eine

4.1. Der CB1 als Ziel einer Behandlungsstrategie der AD

erhöhte Aktivierung und Proliferation der Mikroglia, gilt allgemein als schädlich für die neuronale Funktion und somit auch für die Lern- und Gedächtnisleistung (Williamson et al., 2011). Interessanter Weise liegt hier jedoch der Fall vor, dass die APP23/CB1^{-/-} gegenüber der APP23-Mäuse eine reduzierte astro- und mikrogliale Aktivierung zeigten und trotzdem über verringerte Lernleistungen verfügten (Stumm und Hiebel et al., 2013). Diese Beobachtungen sprechen also gegen eine direkte Verbindung zwischen glialer Aktivierung und den kognitiven Fähigkeiten dieser Mäuse.

4.1.2. Einfluss der CB1-Expression auf die APP-Prozessierung

Die pharmakologische Modulation der APP-Prozessierung gilt noch immer als eine mögliche Behandlungsstrategie der AD. Die Aktivität G-Protein-gekoppelter Rezeptoren zu modulieren, könnte dabei eine Alternative Strategie darstellen, ohne dass die Aktivität der Secretasen direkt verändert werden muss. In den frühen 1990er Jahren wurde bereits erstmals beschrieben, dass einige G-Protein-gekoppelte Rezeptoren die APP-Prozessierung beeinflussen (Thathiah und De Strooper, 2011).

Erste Ergebnisse aus der Verpaarung von APP23- und CB1^{-/-}-Tieren legten ebenfalls eine Regulierung der APP-Prozessierung durch den G-Protein-gekoppelten CB1 nahe. 20-Monate alte APP23/CB1^{-/-}-Mäuse zeigten gegenüber den APP23-Mäusen einen leicht verringerten APP_{VL}-Spiegel und eine verringerte Prozessierung des APPs im Hippocampus. Zudem war die Ratio von β - zu α -CTFs und der Gehalt an A β -Peptiden bei den APP23/CB1^{-/-}-Tieren reduziert (Stumm, 2011). Die verringerten APP_{VL}-Spiegel und die reduzierte APP-Prozessierung der Mäuse denen der CB1 fehlt, konnte sich nach diesen Daten auch während der Alterung entwickelt haben. In einem zellulären replikativen Seneszenz-Modell wurde zudem gezeigt, dass während der Alterung die Prozessierung des APPs und die APP_{VL}-Proteinspiegel abnehmen (Kern et al., 2006). Darum sollte zunächst geklärt werden, ob auch junge Mäuse eine veränderte APP-Prozessierung in Abhängigkeit der CB1-Expression besitzen. Die analysierten 2-Monate alten APP23/CB1^{-/-}-Mäuse zeigten gegenüber den APP23-Mäusen zwar keine veränderte Ratio von β - zu α -CTFs, aber eine Reduktion der proteolytischen Schnittfragmente des APPs sowie des APP_{VL}. Deshalb ist davon auszugehen, dass das Fehlen des CB1-Rezeptors im genetischen Hintergrund der APP23-Mäuse unabhängig der Alterung zu einer Reduktion der APP-Prozessierung führt.

Eine Regulation der APP-Prozessierung durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren wurde in einem

4.1. Der CB1 als Ziel einer Behandlungsstrategie der AD

Mausmodell der AD bisher für die δ -Opioid-Rezeptoren (DOR) beschrieben. Die Behandlung mit einem spezifischen DOR-Antagonisten führte zur einer reduzierten Plaquebildung im Hippocampus der Tiere. Nach Reduktion der DOR-Spiegel *in vivo* durch virale siRNA-Transfektion zeigten die Tiere eine verringerte A β ₄₀-Anreicherung im Hippocampus. Obwohl die Spiegel des als toxischer geltenden A β ₄₂ nicht verändert waren, verbesserte sich die Lernleistung durch die Herunterregulierten DOR-Spiegel (Teng et al., 2010). Im Gegensatz dazu führen die verringerten APP-Prozessierung und die damit verbundenen reduzierten A β -Spiegel durch den CB1 Knock-out nicht zu einer verbesserten Lernleistung in den APP23/CB1^{-/-}- gegenüber der APP23-Tiere (Stumm, 2011). Dies spräche gegen einen direkten Zusammenhang zwischen den A β -Spiegeln und der kognitiven Leistung der APP23-Mäuse.

Eine mögliche Erklärung dieser Beobachtung könnte jedoch die Selektion des Genotyps der APP23/CB1^{-/-}-Tiere hin zu einer ungewöhnlich niedrigen Expression und Prozessierung des mutanten APP sein. Da der als neuroprotektiv beschriebene CB1 fehlt (siehe Kapitel 1.3.3.), wären demnach nur die Individuen lebensfähig, die das toxische mutante APP ungewöhnlich niedrig exprimieren. Dies hätte zur Folge, dass die unterschiedlichen CB1-Spiegel keinen direkten Einfluss auf die APP-Prozessierung hatten. Um zu klären, ob ein direkter physiologischer Zusammenhang der CB1-Expression und der APP-Prozessierung existiert, wurde ein zelluläres *in vitro* Modell-System etabliert. Die hier verwendeten murinen Neuroblastom-Zellen (N2A) exprimieren endogen APP und auch CB1. Eine Modulation der Rezeptor-Expression war hier also in beide Richtungen möglich, wobei gleichzeitig die APP-Expression weiter unter dem endogenen Promotor reguliert wurde. Die Überexpression des unmarkierten CB1 und eines eGFP-markierten CB1-Fusionsproteins führte jeweils zu einem Anstieg des APP_{VL} sowie zum verstärkten Auftreten der proteolytischen APP-Fragmente sAPP α und APP_{CTF α} . In anderen Zellkulturmodellen förderte ebenfalls die Aktivierung G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, der muscarinen Acetylcholin-Rezeptoren und der metabotropen Glutamat-Rezeptoren, die hydrolytische Spaltung des APP durch die α -Secretase (Buxbaum et al., 1992; Lee et al., 1995; Nitsch et al., 1992). DOR scheinen durch ihre Aktivität spezifisch die amyloidogene Prozessierung des APP durch die Bildung eines Komplexes mit der β - und γ -Secretase zu stimulieren (Ni et al., 2006; Teng et al., 2010). Der *orphan* G-Protein-gekoppelte Rezeptor 3 (GPR3) scheint ebenfalls spezifisch die APP-Prozessierung über die Bildung eines Komplexes mit der γ -Secretase zu modulieren, unterdrückt jedoch die Bildung von A β -Peptiden (Thathiah et al., 2009). Durch die erhöhten Protein-Spiegel könnte der CB1 in den überexprimierenden Zellen ebenfalls über einen ähnlichen Mechanismus die

4.1. Der CB1 als Ziel einer Behandlungsstrategie der AD

nicht amyloidogene APP-Prozessierung stimulieren. Auf der anderen Seite führte die Reduktion der endogenen CB1-Expression durch siRNA-Transfektion zu verringerten Spiegeln an proteolytischen Schnittfragmenten des APP in naiven Zellen. In diesem *in vitro* Modell der transienten CB1-siRNA Transfektion zeigte sich jedoch keine signifikante Reduktion der APP_{VL}-Spiegel. Auch die endogene Expression des *app* blieb unter diesen Bedingungen unverändert, so dass davon auszugehen ist, dass die veränderte Expression des CB1 eine Modulation der APP-Prozessierung, jedoch primär keine veränderte Expression des APP bewirkte. Diese Ergebnisse waren also konsistent mit den vorherigen Beobachtungen zur APP-Prozessierung in den APP23- und APP23/CB1^{-/-}-Tieren, bei denen das Fehlen des CB1 zu einer Reduktion der proteolytischen Schnittfragmente des APP führte. Diese übereinstimmenden Ergebnisse in den unterschiedlichen *in vivo* und *in vitro* Modellen unterstützen die Annahme eines molekularen Zusammenhangs der veränderte APP-Prozessierung in Abhängigkeit der CB1-Expression. Ein primärer Einfluss der Alterung oder unspezifische Effekte aufgrund der Verpaarung der beiden transgenen Mauslinien sind also weitestgehend auszuschließen. Dabei könnte es sich bei der CB1-vermittelten Modulation der APP-Prozessierung um einen Mechanismus durch eine direkte Protein-Protein-Interaktion handeln, wie es für die G-Protein-gekoppelten DOR und GPR3 gezeigt wurde (Teng et al., 2010; Thathiah et al., 2009). Alternativ wäre auch die Modulation eines CB1-abhängigen Signalwegs als Ursache der veränderte Prozessierung des APPs denkbar.

Deshalb sollte weiter untersucht werden, ob sich die APP-Prozessierung durch Inhibition der CB1-Rezeptoraktivität auf unterschiedlichen Ebenen der Signaltransduktion, reduzieren lässt. Die verwendeten Zellkulturmedien beinhalten durch den Zusatz des Serums eine große Menge an aktiven Endocannabinoiden, die für Stimulation des CB1 sorgen können (Marazzi et al., 2011). In diesem grundsätzlich stimulierenden Milieu wurde die Rezeptor-Aktivität zunächst mit Rimonabant (SR141716, SR) als selektiver CB1-Antagonist und mit Pertussis toxin (PTX) als unspezifischer Inhibitor G-Protein-gekoppelter Rezeptoren, unterdrückt. Diese Inhibitoren verhindern die Aktivierung des Rezeptors (Rimonabant) oder der gebunden G-Proteine (PTX) und blockieren so die CB1-Signaltransduktion in einem frühen Stadium der Signalkette. Beide Inhibitoren reduzierten dabei die endogenen Spiegel der hydrolytischen APP-Fragmente. Dies spricht für die Beteiligung eines intrazellulären Signalwegs bei der CB1-vermittelten Modulation der APP-Prozessierung, da in diesem Fall die Expression des Rezeptor-Proteins nicht verändert wurde. Um weiter zu prüfen, über welchen der durch den CB1 beeinflussten Signalwege der Einfluss der CB1-Aktivität auf die proteolytische Spaltung des APP vermittelt wird, wurden spezifische Inhibitoren intrazellulärer

4.1. Der CB1 als Ziel einer Behandlungsstrategie der AD

Kinasen verwendet. Als wahrscheinlichster Kandidat hierfür galt der MAPK-ERK1/2-Signalweg, welcher mit dem spezifischen MEK1/2-Inhibitor U0126 unterdrückt wurde. Es wurde bereits gezeigt, dass eine Östrogenrezeptor-vermittelte Stimulation des MAPK-ERK1/2-Signalwegs zu einer gesteigerten APP-Prozessierung führt (Manthey et al., 2001; Peng et al., 2011). Außerdem scheint die Aktivität des MAPK-ERK1/2-Signalwegs in Gehirnen von AD-Patienten erhöht zu sein (Zhu et al., 2002). Zudem wurde der neuroprotektive Effekt einer *in vitro* Cannabinoid-Behandlung in einem A β -induzierten Toxizitätsmodell, durch die Gabe von U0126 deutlich abgeschwächt (Milton, 2002). Die Signaltransduktion über die Protein-Kinase A (PKA) war dabei ein weiterer möglicher Signalweg, der die APP-Prozessierung steigern kann (Su et al., 2003). Die Beteiligung eines PKA-abhängigen Signalwegs sollte mittels eines PKA-spezifischen Inhibitors (H89) untersucht werden. Da CB1-Aktivität die PKA hemmt, sollte H89 also auch die APP-Prozessierung fördern. Die Behandlung der Zellen mit H89 ergab jedoch keinen signifikanten Einfluss auf die APP-Prozessierung, wohingegen U0126 die Spiegel an proteolytischen Fragmenten ebenso senkte, wie es nach der Rimonabant- und der PTX-Behandlung der Fall war. Konsistent damit, waren die Spiegel an phosphoryliertem ERK1/2, als Substrat der MEK1/2 nach Rimonabant-, PTX- und U0126-Behandlung reduziert.

Die über die CB1-Aktivität vermittelte Modulation der APP-Prozessierung scheint hier also hauptsächlich über den MAPK-ERK1/2-Signalweg statt zu finden, ohne Beteiligung der PKA-Signalwege. Im Organismus könnten natürlich auch weitere Signalkaskaden eine Rolle spielen, da Endocannabinoide (wie das Anandamid) auch an weitere Rezeptoren wie den GPR55, TRPV1, PPAR α und PPAR γ binden können (Bouaboula et al., 2005; Mackie und Stella, 2006; O'Sullivan, 2007). Allerdings ist bisher nur für den PPAR γ -Rezeptor gezeigt worden, dass er die APP-Prozessierung beeinflusst (d' Abramo et al., 2005). Die Aktivierung des PPAR γ -Rezeptors durch NSAIDs unterdrückt dabei die Expression des BACE1-Gens und damit den amyloiden Prozessierungsweg (Sastre et al., 2006).

Die Entwicklung einer Behandlungsstrategie auf Basis der CB1-vermittelten Modulation der APP-Prozessierung ist jedoch kritisch zu sehen, da die als neuroprotektiv angesehene nicht-amyloidogene Prozessierung des APP durch die Inhibition der CB1-Aktivität reduziert wird (De Strooper, 2010). Zudem korrelierten die A β -Spiegel nicht mit der Lernleistung der APP23- und APP23/CB1^{-/-}-Tiere, da die Reduktion der amyloiden APP-Prozessierung durch den CB1 Knock-out mit einer schlechteren kognitiven Leistung der Tiere einher ging (Stumm und Hiebel et

4.1. Der CB1 als Ziel einer Behandlungsstrategie der AD

al., 2013).

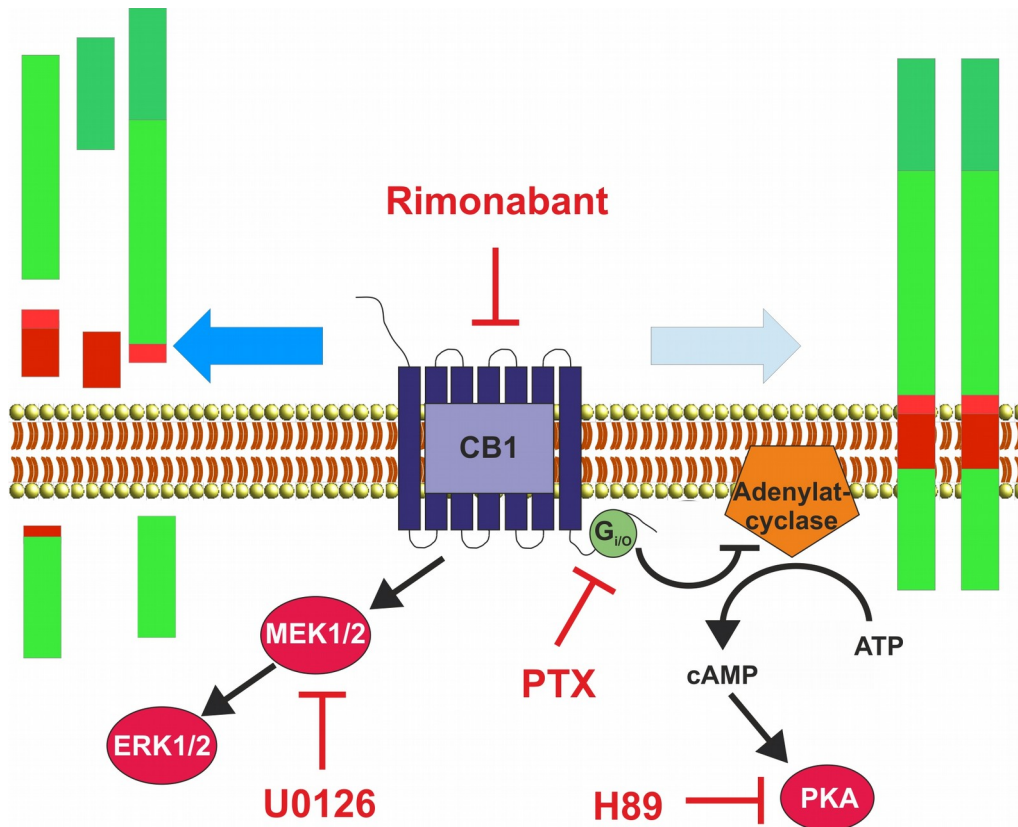


Abbildung 22: Regulation der APP-Prozessierung durch den CB1-Rezeptor

Schematische Darstellung der mittels Inhibitoren untersuchten Signalwege, die durch den CB1-Rezeptor moduliert werden und die APP-Prozessierung beeinflussen. Rimonabant ist ein spezifischer Antagonist des CB1-Rezeptors, *Pertussis Toxin* (PTX) inhibiert an den Rezeptor gekoppelte G-Proteine, U0126 ist ein MEK1/2-Inhibitor und H89 inhibiert die ProteinkinaseA (PKA).

4.2. Der Einfluss des CB1-Rezeptors auf die Autophagie

Trotz der geringeren Prozessierung des APPs über den amyloidogenen Weg und der damit verbunden reduzierten Anzahl an amyloiden Plaques im Gehirn, sind die APP23/CB1^{-/-}-Tiere stark geschädigt. Die Merkmale dieses Genotyps, wie geringere Geburtenrate, hohe Sterberate und eingeschränkte kognitive Fähigkeiten gegenüber den einfach transgenen APP23- und CB1^{-/-}-Tieren können also nicht über die Amyloid-Hypothese zur Auslösung der Alzheimer'schen Krankheit erklärt werden (Hardy und Selkoe, 2002; Stumm und Hiebel et al., 2013). Eine Störung des autophagosomalen/lysosomalen Systems, auf das Nervenzellen besonders angewiesen sind, könnte dabei eine Erklärung für den beobachteten Phänotyp der APP23/CB1^{-/-}-Mäuse sein (Nixon et al., 2008). Der systematische Knock-out des CB1 und die Thy1-Promotor getriebene Überexpression des mutanten APP prägen sich auf Grund der Promotorspezifität nur in Neuronen aus (Lüthi et al., 1997). Dabei wurde auf der einen Seite ein Einfluss auf das autophagosomale/lysosomale System durch den CB1 bereits beschrieben (Brailoiu et al., 2011; Sarnataro et al., 2005) und es besteht auf der anderen Seite auch ein Zusammenhang mit der Alzheimer-Pathologie.

Bereits 1967 berichteten Suzuki und Terry von dystrophen Schwellungen an Neuriten in Fällen von AD, die mit vakuolären Strukturen gefüllt waren und saure Phosphatasen enthielten (Suzuki und Terry, 1967). Später wurde gezeigt, dass diese Strukturen spezifisch für die Alzheimer'sche Krankheit sind und durch Ultrastrukturanalysen von AD Gehirnen konnte weiter gezeigt werden, dass sie hauptsächlich aus Lysosomen und autophagischen Vesikeln (AV) bestehen (Benzing et al., 1993; Nixon et al., 2005). Diese histologischen Veränderung könnten entweder auf eine verstärkte lysosomale/autophagische Aktivität, eine beeinträchtigte Degradation der AVs, oder auf einer Kombination dieser Abläufe beruhen (Cataldo et al., 1991, 1995; Lee et al., 2011). Interessanter Weise kommt es nicht einfach zu einem gestörten neuritischen Transport, da Zellorganellen wie Mitochondrien bei lysosomaler Inhibition unverändert transportiert werden (Lee et al., 2011). Neuronales Gewebe könnte dabei besonders anfällig für Störungen im autophagischen/lysosomalen System sein, da das vesikuläre Netzwerk Neurone erst befähigt ihre hochspezifischen Funktionen, wie die für die neuronale Transmission essentielle Transmitterfreisetzung zu bewerkstelligen (Nixon et al., 2008). Zudem sind Neurone post-mitotisch und müssen deshalb über die Jahre geschädigte Organellen sowie fehlgefaltete oder aggregierte Proteine besonders effizient entsorgen (Wong und Cuervo, 2010). Neben der histologischen Veränderungen des autophagischen/lysosomalen Systems, sind auch molekulare Regulatoren im Zuge der Alzheimer-Pathologie verändert. Gene, die für

4.2. Der Einfluss des CB1-Rezeptors auf die Autophagie

negative Regulatoren der Autophagie kodieren, werden schwächer, wohingegen Gene, die als positive Regulatoren der autophagischen Aktivität gelten, in AD Patienten verstärkt exprimiert werden (Lipinski et al., 2010). Es bleibt jedoch festzuhalten, dass die stärkere Expression dieser Gene nicht zu einer andauernden Erhöhung der autophagischen Aktivität führt, da diese im Verlauf der Krankheit zurück geht, was zur Akkumulation von nicht-abgebauten Proteinen führt (Yu et al., 2005).

Der bekannteste physiologische Einflussfaktor auf den für die Initiation der Autophagie wichtigen mTOR-Komplex ist die kalorische Restriktion (KR), die im eigentlichen Sinne die Reduktion des Energiegehaltes der Nahrung ohne das Einschränken anderer essentieller Nahrungsbestandteile meint. KR inhibiert mTOR und steigert dadurch die autophagische Aktivität (Powers et al., 2006). Neben einer verlängerten Lebenserwartung in gesunden Menschen wurde auch ein abgemilderter Verlauf der Alzheimer'schen Krankheit in Patienten beobachtet, die sich KR unterzogen hatten. Dies könnte danach nicht nur auf Grund der reduzierten metabolischen Toxizität durch den aeroben Stoffwechsel des Menschen, sondern eventuell auch durch die mTOR-vermittelten gesteigerten autophagischen Aktivität bedingt sein (Masoro, 2003; Pasinetti et al., 2007). Die APP23/CB1^{-/-}-Mäuse könnten durch den Wegfall des CB1 und der damit verbundenen reduzierten Nahrungsaufnahme unter quasi andauernder KR leben. Eine damit verbundene Steigerung der autophagischen Aktivität könnte im genetischen Hintergrund der APP23-Tiere protektiv sein und die Tiere erst befähigen, beide grundsätzlich schädliche genetische Manipulationen zu tragen. Tiere, bei denen es nicht zu einem gesteigerten autophagischen Abbau der toxischen A β -Spezies kommt, wären demnach embryonal letal. Dies könnte zu der stark verringerten geringere Geburtenrate der doppelt-transgenen Mäuse beitragen (Stumm und Hiebel et al., 2013). Interessanter Weise beeinflusst das toxischere A β ₄₂, jedoch nicht A β ₄₀, den mTOR-Signalweg. Befunde aus zellulären Modellen, Tiermodellen und Patientengewebe ergeben hier jedoch kein einheitliches Bild, ob A β ₄₂ die mTOR-Aktivität erhöht oder erniedrigt (Caccamo et al., 2010; Lafay-Chebassier et al., 2005; Ma et al., 2010; Spilman et al., 2010). Auch die C-terminalen Fragmente des APP (APP_{CTF}) scheinen einen Einfluss auf das autophagische/lysosomale System zu haben. Bereits 1992 berichteten Haass und Kollegen drüber, dass lysosomale Abbauewege für die Prozessierung der APP_{CTF}, welche die A β -Domäne enthalten, verantwortlich sind (Haass et al., 1992). Später wurde festgestellt, dass in Modellen einer Glyco-Sphingolipid Speicher-Krankheit ein veränderter APP-Metabolismus mit einem mTOR-unabhängigen Anstieg an LC3-II einhergeht, was hier für einen gestörten autophagischen Abbau spricht (Boland et al., 2010). Spingolipide, die sich bei lysosomalen Lipid-

4.2. Der Einfluss des CB1-Rezeptors auf die Autophagie

Speicher-Krankheiten anreichern, bewirken einen reduzierten Abbau der APP_{CTF}, stimulieren die γ -Secretase und könnten so auch zur vermehrten Bildung von A β führen (Tamboli et al., 2011). Eine Verstärkung der autophagischen Aktivität durch pharmakologische Behandlung oder ein „Hungerprotokoll“ reduzierte die A β - und APP_{CTF}-Spiegel unabhängig der γ -Secretase-Aktivität (Tian et al., 2011). Zusammenfassend kann man also sagen, dass eine gesteigerte autophagische Aktivität zu reduzierten A β -Spiegel durch den vermehrten Abbau der APP_{CTF} führt. Dies spräche wiederum für eine gesteigerte Autophagie in den APP23/CB1^{-/-} gegenüber der APP23-Mäuse, da die doppelt-transgenen Tiere eine Reduktion der A β - und der APP_{CTF}-Spiegel zeigen (Stumm und Hiebel et al., 2013). Eindeutige Ergebnisse, vor allem der dynamischen Prozesse des autophagischen Abbaus, sind *in vivo* und in histologischen Untersuchungen jedoch auf molekularer Ebene nur schwer zu erlangen (Klionsky et al., 2012). Meist wird hierfür ein transgenes Mausmodell herangezogen, bei dem die Tiere ein eGFP-LC3 Fusionsprotein überexprimieren (Mizushima et al., 2004). Durch eine Verkreuzung dieser Tiere mit APP23- und CB1 Knockout-Mäusen könnte die möglichen Zusammenhänge zwischen der Autophagie, der APP-Prozessierung und der CB1-Expression *in vivo* und histologisch in zukünftigen Versuchsreihen eingehend analysiert werden.

BECLIN1, das zentrale Protein des zweiten großen Protein-Komplexes zur Regulation der autophagischen Aktivität, ist in AD-Patienten herunterreguliert. Zudem zeigen Mäuse, die mutantes APP überexprimieren und denen BECLIN1 heterozygot fehlt, eine Verstärkte Gliose und eine Akkumulation von Lysosomen im Gehirn (Pickford et al., 2008). Die Herunterregulation von BECLIN1 durch siRNA-Transfektion führte in Zellen zu einer Anreicherung des APP und seiner Prozessierungsprodukte. Umgekehrt hatte jedoch weder in Zellkultur- noch im Mausmodell die Überexpression des mutanten APP einen Einfluss auf die BECLIN1-Expression (Jaeger et al., 2010; Pickford et al., 2008). Zudem wurde kürzlich gezeigt, dass Presenilin-1 (PS1) für die autophagosomale/lysosomale Funktion wichtig ist, unabhängig von A β . PS1 scheint dabei wichtig, für den Transport zum Lysosom und den Einbau in die lysosomale Membran der V01A-Untereinheit der vakuolären ATPase, die für die Azidifizierung der Lysosomen und damit für den autophagischen Abbau essentiell ist (Lee et al., 2010).

Außerdem wurde beobachtet, dass der Autophagie-Rezeptor p62 in AD-Patienten sowie in einem Mausmodell der AD durch oxidative Schädigungen des Promotors im Zuge des Voranschreitens der AD-Pathologie verringert exprimiert wird (Du et al., 2009). In den jüngeren 2-Monate alten APP23/CB1^{-/-}-Tieren sind die kortikalen p62-Spiegel jedoch erhöht, weshalb davon auszugehen ist,

4.2. Der Einfluss des CB1-Rezeptors auf die Autophagie

dass sich die oxidative Schädigungen des Promotors erst durch die Alterung entwickelt. Die Analyse der Autophagie-assozierten Indikatoren wurde in jungen (2-Monate alten) Tieren durchgeführt, da die APP23/CB1^{-/-}-Tier ab ihrem vierten Lebensmonat eine erhöhte Sterberate aufweisen und die Tiere vor diesem kritischen Alter analysiert werden sollten (Stumm und Hiebel et al., 2013). Die Westernblot-Analyse der Autophagie-assozierten Indikatoren ergab interessanter Weise keine Unterschiede zwischen den einzelnen Genotypen im Cerebellum der APP23xCBN-Tiere. Diese Gehirnregion ist in den APP23 bei der Ausprägung Alzheimer-Pathologie auch deutlich weniger betroffen, als die kortikalen Gehirnregionen (Sturchler-Pierrat et al., 1997). Im Cortex der CB1 Knock-out Tiere kommt es neben erhöhten p62-Spiegeln auch zu erhöhten Proteinspiegeln des *heat shock proteins 72* (HSP72, die induzierbare Form des cytosolischen HSP70) und des Lysosomen-Indikators LAMP1. Die Expression des mutanten APP in den APP23/CB1^{-/-}-Mäusen verstärkt diesen Effekt, was dafür sprechen könnte das hier kompensatorische Mechanismen nicht mehr greifen, welche die einfach-transgenen APP23-Mäuse noch unauffällig erscheinen lassen. Die Konsequenz dieses Anstiegs in den Proteinspiegeln dieser Autophagie-assozierten Indikatoren lässt sich nicht eindeutig aus der Momentaufnahme dieser Gewebeanalyse bestimmen (Klionsky et al., 2012). Um diese zu beschreiben und eine Aussage über den autophagischen Flux treffen zu können, sind auch Inhibitions-Versuche notwendig, da nur dann detektiert werden kann, ob hohe p62 oder auch LC3-II-Spiegel durch eine übermäßige Induktion der Autophagie, oder durch die Störung der autophagischen Degradation auftreten. In beiden Fällen kann es zum Anlaufen der Autophagosomen-Indikatoren kommen (Klionsky et al., 2012).

Der Zusammenhang zwischen Alzheimer-Pathologie und der Autophagie ist also schon sehr gut untersucht, wohingegen der Einfluss des CB1 auf autophagische Prozesse bisher kaum beleuchtet wurde. Die bisherigen Untersuchungen beziehen sich auf die lysosomale Aktivität und nicht auf die autophagischen Prozesse, die der lysosomalen Degradation vorangehen (siehe Kapitel 1.3.). Die bisher publizierten Daten, die den Einfluss des CB1 auf die Autophagie beschreiben, begnügen sich mit der Messung der LC3-II-Spiegel und klammern die Untersuchung der dynamischen Prozesse der Autophagosomenbildung aus (Casarejos et al., 2013; Dando et al., 2013; Oh et al., 2013). Wie oben diskutiert, sind Inhibitionsexperimente allerdings unerlässlich, um Aussagen über die Dynamik des autophagischen Fluxes zu treffen.

Um zu klären, ob der CB1 einen Einfluss auf die Autophagosomen-Bildung hat und damit der Rezeptor Knock-out als „*second hit*“ im Hintergrund der Alzheimer-Pathologie der APP23-Mäuse

4.2. Der Einfluss des CB1-Rezeptors auf die Autophagie

zum stark geschädigten Phänotyp der APP23/CB1^{-/-}-Mäuse führt, sollten im Weiteren genauere Untersuchungen des Einflusses des CB1 auf die Dynamik der Autophagosomen-Bildung in einem zellulären System erfolgen. Eine Alternative dazu wären *in situ* Untersuchungen an organotypischen Gewebeschnitten, welche pharmakologisch besser zu manipulieren wären, als die Tiere selbst. Dies setzt jedoch voraus, dass man Individuen aller zu untersuchenden Genotypen in den einzelnen Experimenten zur Verfügung hat. Durch die geringe Geburtenrate der doppelt-transgenen APP23/CB1^{-/-}-Tiere und der schwankenden Zuchterfolge gerade dieses Genotyps, ist diese Möglichkeit jedoch ausgeschlossen (Stumm und Hiebel et al., 2013). Zudem sollte in der hier vorliegenden Studie zunächst geklärt werden, ob die Modulation der CB1-Expression unabhängig der Expression von mutantern APP, Veränderungen im autophagischen Netzwerk bewirkt.

4.2.1. CB1-Aktivität moduliert den autophagischen Flux

Die Zelllinie mit der die weiteren Experimente durchgeführt wurden, musste einige Kriterien erfüllen: die endogene Expression des CB1, gute Transfizierbarkeit zur genetischen Manipulation und sie sollte eine Morphologie aufweisen, die eine gute Mikroskopierbarkeit intrazellulärer Vesikel erlaubt. Diese Kriterien wurden von den *human embryonic kidney* Zellen (HEK-Zellen) erfüllt.

Die spezifische Herunterregulation des CB1 durch CB1-siRNA Transfektion von HEK-Zellen führte zu einem gesteigerten autophagischen Flux. Gleichzeitig blieb die Aktivität des UPS unverändert. Dies ist insofern bemerkenswert, da es zwischen diesen beiden Degradationssystemen über die BAG-Proteine eine molekulare Verbindung gibt. Dies kann die Zelle nutzen um kompensatorisch die Degradationssubstrate z.B. bei Blockade des UPS dem autophagischen Abbau zuzuführen (Gamerding et al., 2009). Auf der anderen Seite kommt es durch eine Blockade des autophagischen Fluxes auch zur Anreicherung von UPS-Substraten, da p62/SQSTM1 nicht mehr autophagisch abgebaut werden kann und verstärkt ubiquitinierte Proteine vernetzt, bis diese dann nicht mehr proteasomal degradiert werden können (Korolchuk et al., 2009). Das UPS in HEK-Zellen scheint also basal nicht vollständig ausgelastet zu sein, da es nach der Induktion des autophagischen Fluxes durch den verstärkten Abbau der mit p62/SQSTM1-verknüpften Substrate nicht entscheidend entlastet wird. Es war zudem überraschend, dass die Herunterregulation des CB1 zu einem gesteigerten autophagischen Flux führte, da in den kortikalen Gewebeproben der Autophagie-Rezeptor p62/SQSTM1 im Hintergrund der CB1 Knock-out Mäuse angereichert vorlag. Dies spräche eigentlich für einen gestörten autophagischen Flux, da p62/SQSTM1 auch ein

4.2. Der Einfluss des CB1-Rezeptors auf die Autophagie

Substrat der autophagischen Degradation ist (Kirkin et al., 2009). Scheinbar führt also der gesteigerte Bedarf an Autophagie-Rezeptoren zur verstärkten Expression von p62/SQSTM1 in diesen Tieren. Im Gegensatz zur Herunterregulation des CB1 durch siRNA Transfektion, führte die Überexpression des Rezeptors zu keiner Veränderung in der autophagischen Vesikelbildung. Kürzlich wurde gezeigt, dass der CB1 selbst ein Substrat des neu entdeckten BECLIN2-abhängigen autophagischen Abbaus ist (He et al., 2013). Es kommt hier also wahrscheinlich zu einer Induktion des autophagischen Fluxes durch die Überexpression eines Autophagie-Substrats, was die gesteigerte Rezeptor-Aktivität durch die Überexpression antagonisiert. Die Modulation der Rezeptor-Aktivität durch den CB1-Agonisten Win2 und den spezifischen CB1-Antagonisten Rimonabant lieferte jedoch konsistente Ergebnisse zur Herunterregulation des CB1. Die Inhibition der Rezeptor-Aktivität mittels Rimonabant stimulierte den autophagischen Flux, wohingegen die Aktivierung zu einem verminderten autophagischen Flux führte. Dabei zeigten die verwendeten HEK-Zellen keine endogene CB2-Expression. Dies war insofern wichtig, da bereits gezeigt wurde, dass eine Stimulation des CB2 durch eine hohe Konzentration an Cannabinoiden auch zu einer Stimulation der Autophagie führt (Salazar et al., 2009; Vara et al., 2011). Der in den pharmakologischen Stimulations-Experimenten verwendete CB1-Agonist Win2 ist ein spezifischer Ligand des CB1 und des CB2 und ist somit in diesen Zellen als reiner CB1-Agonist anzusehen (Felder et al., 1995; Song et al., 1999). Da die pharmakologischen Behandlungen, jedoch nicht die Überexpression des Rezeptor-Proteins, einen Einfluss auf den autophagischen Flux hat, ist davon auszugehen, dass die Rezeptor-Aktivität für die Modulation des autophagischen Fluxes ursächlich ist. Eine Protein-Protein-Interaktion zwischen dem CB1 und einer regulatorischen Komponente des autophagischen Systems ist demnach auszuschließen. Interessanter Weise blieb die lysosomale Aktivität nach der Herunterregulation des CB1 unverändert. Bisherige Publikationen brachten die intrazelluläre CB1-Aktivität mit der lysosomalen Degradations-Funktion in Verbindung (Brailoiu et al., 2011; Noonan et al., 2010; Piyanova et al., 2013). Dies konnte in dieser Studie weder durch eine Aktivitätsmessung der lysosomalen Degradation, noch durch fluoreszenzmikroskopische- und Westernblot Analyse der lysosomalen Marker bestätigt werden. Piyanova und Kollegen beschreiben dabei eine veränderte lysosomale Aktivität in CB1^{-/-} gegenüber WT-Mäusen im Zuge der Alterung, wobei Alterungseffekte der HEK-Zelllinie aufgrund ihres Tumorcharakters auszuschließen sind (Piyanova et al., 2013). In einem anderen Fall zeigte die Behandlung mit Cannabinoiden einen stabilisierenden Effekt auf die Lysosomenmembran unter Proteinstress durch A β -Peptid-Inkubation (Noonan et al., 2010). In der vorliegenden Studie wurde jedoch kein Proteinstress-Paradigma

4.2. Der Einfluss des CB1-Rezeptors auf die Autophagie

gewählt, um den möglichen Einfluss des CB1 auf den autophagischen Flux in einem nativeren Zusammenhang zu untersuchen. Dies könnte die konträren Beobachtungen in dieser Studie gegenüber den bereits publizierten Daten erklären.

Die CB1-Aktivität scheint also spezifisch den autophagischen Flux zu modulieren, ohne die Aktivität des UPS oder die nachfolgender biologischer Prozesse, wie die lysosomale Degradations-Aktivität zu beeinflussen. Durch pharmakologische Inhibition oder Herunterregulation des Rezeptors wird die Bildung autophagischer Vesikel stimuliert, wobei die vorhandenen Lysosomen augenscheinlich ausreichen, um die Menge an Autophagosomen abzubauen. Andernfalls sollte eine Störung der lysosomalen Aktivität festzustellen sein. Dabei könnte die modulatorische Wirkung der CB1-Aktivität auf die Autophagosomen-Bildung eine Komponente der Regulation der Energiehomöostase durch dem CB1 in peripheren Geweben darstellen (O'Keefe et al., 2013). Die Autophagie, als Prozess des Selbstverdaus und die Energie- und Aminosäuren-Homöostase sind zellulär eng miteinander verknüpft (Cuervo, 2008).

4.2.2. Nicht-kanonische Regulation der Autophagie durch den CB1

Als kanonische Regulation der Autophagie, bezeichnet man die induktiven Wege, bei denen die Protein-Komplexe des mTOR- und BECLIN1-Komplexes sowie das hierarchische Zusammenspiel der ATG-Proteine zur Autophagosomen-Bildung zusammenwirken (Codogno et al., 2012). In den letzten Jahren wurden verschiedene Wege beschrieben, bei denen es unabhängig von einzelnen Komponenten der kanonischen Regulation zur Stimulation der Autophagie kommt, die dann als nicht-kanonische Regulationswege der Autophagie bezeichnet werden (siehe Kapitel 1.2.3.).

Über mTOR werden eine Vielzahl von zellulären Signalen integriert, was sich in der Phosphorylierung dieser Kinase abbildet (siehe Kapitel 1.2.2.). Das Serin an Position 2448 (S2448) stellt dabei eine prominente mTOR-Phosphorylierungsstelle dar, die allgemein als Marker für die mTOR-Aktivität verwendet wird (Chiang und Abraham, 2005). Deshalb wurde auch im Zuge dieser Studie die mTOR-Phosphorylierung an S2448 mittels Westernblot-Analyse untersucht. Es wurde jedoch keine Veränderung der mTOR-Phosphorylierung nach Herunterregulation des CB1 festgestellt. Deshalb ist ein Einfluss der CB1-Aktivität über den mTOR-abhängigen Regulationsweg auf den autophagischen Flux unwahrscheinlich. Diese mTOR-abhängige Regulation der Autophagie wurde jedoch für andere G-Protein-gekoppelte Rezeptoren bereits beschrieben (Gohla et al., 2007). Da die Analyse der mTOR-Phosphorylierung jedoch nur eine

4.2. Der Einfluss des CB1-Rezeptors auf die Autophagie

grobe Einschätzung über die Aktivität des Komplexes zulässt, wäre es denkbar, dass die CB1-Aktivität dennoch zum Teil über diesen Protein-Komplex einen Einfluss auf die Bildung autophagischer Vesikel nimmt. Die Entwicklung feinerer Detektions-Methoden könnte hier Abhilfe schaffen (Klionsky et al., 2012).

Denkbar wäre auch der BECLIN1-Komplex als regulatorischer Mediator der CB1-vermittelten Modulation des autophagischen Fluxes. In der Regel stimuliert die Aktivität des BECLIN1-Komplexes die autophagische Aktivität (Fimia et al., 2007; Itakura et al., 2008; Kang et al., 2011). Binden spezifische Regulatoren, wie Bcl-2 oder Rubicon, das BECLIN1-Protein, wird dieser Protein-Komplex inhibiert (Zhong et al., 2009; Zhou et al., 2011). Dass der BECLIN1-Komplex maßgeblich an der Stimulation des autophagischen Fluxes beteiligt ist, zeigt auch die Herunterregulation des BECLIN1 als zentrales Protein dieses Komplexes, denn dabei resultieren die verringerten Spiegel des BECLIN1-Proteins in einem reduzierten autophagischen Flux der Zellen. Die gleichzeitige Inhibition der CB1-Aktivität mit dem spezifischen Antagonisten Rimonabant, stimulierte jedoch den autophagischen Flux bis zu einem Niveau, wie es in der Kontrollbedingung unter Rimonabant-Behandlung herrscht. Dies spricht gegen eine BECLIN1-vermittelte Stimulation des autophagischen Fluxes durch Inhibition der CB1-Aktivität.

Es konnte in dieser Studie also nicht abschließend geklärt werden, wie genau der CB1 den autophagischen Flux modulieren kann. Eine Regulation, die durch den mTOR- oder BECLIN1-Komplex vermittelt wird, ist anhand der hier erhobenen Daten nicht wahrscheinlich. Die Regulation des autophagischen Fluxes über die CB1-Aktivität stellt also einen neuen nicht-kanonischen Regulationsweg der Autophagie dar. Bisher wurden G-Protein-gekoppelte Rezeptoren lediglich mit einer mTOR-vermittelten Stimulation der Autophagie in Verbindung gebracht (Gohla et al., 2007). Die nicht-kanonische CB1-vermittelte Modulation der Autophagie stellt also einen alternativen Regulationsweg dieses G-Protein-gekoppelten Rezeptors zu den bisher bekannten Wegen dar. Dabei könnte CB1 über SNARE-Proteine den autophagischen Flux modulieren, da kürzlich gezeigt wurde, dass diese Proteine die Biogenese autophagischer Vesikel nicht-kanonisch induzieren können (Moreau et al., 2011; Nair et al., 2011). RAB GTPase-aktivierende Proteine (RABGAPs) scheinen die Reifung der Autophagosomen direkt durch die Interaktion mit LC3 an der äußeren Autophagosomenmembran zu stimulieren (Itoh et al., 2011; Popovic et al., 2012). Die direkte Modulation eines, oder beider dieser induktiver Wege durch die CB1-Aktivität wäre denkbar und könnte die nicht-kanonischen CB1-vermittelte Regulation des autophagischen Flux erklären.

4.2. Der Einfluss des CB1-Rezeptors auf die Autophagie

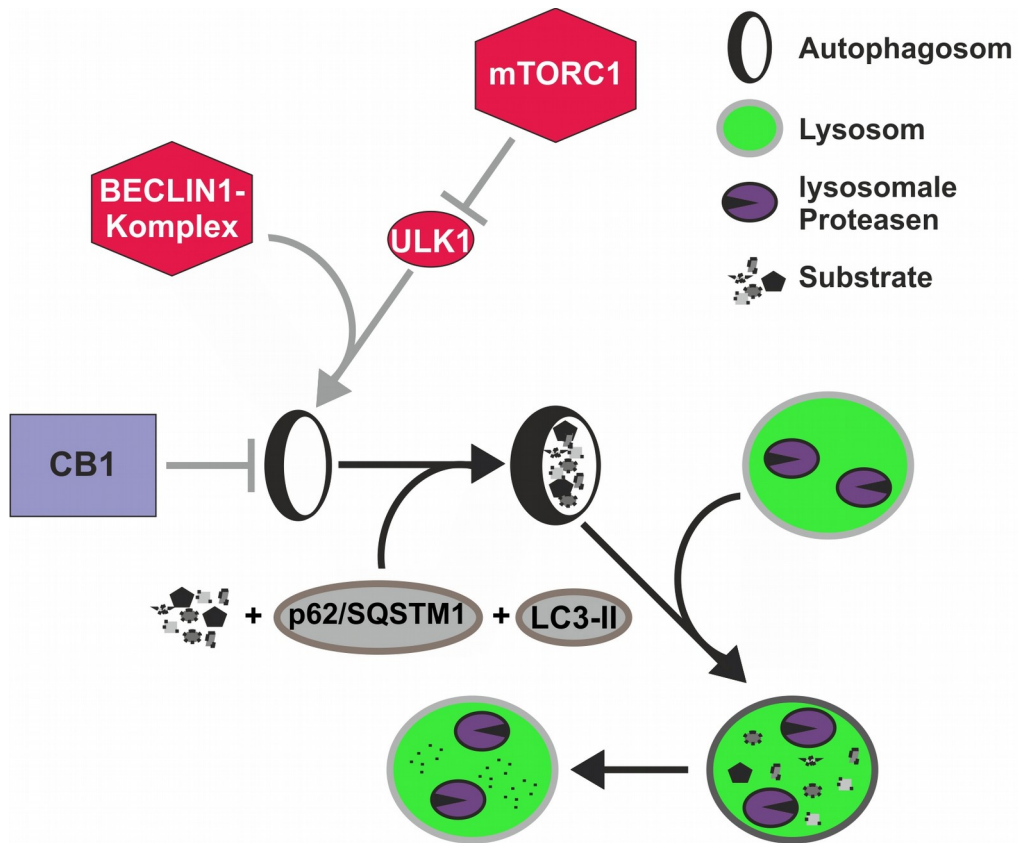


Abbildung 23: Nicht-kanonische Regulation des autophagischen Fluxes durch den CB1

Schematische Darstellung des autophagosomalen/lysosomalen Degradationsweges. Die CB1-vermittelte Regulation des autophagischen Fluxes ist dabei unabhängig der kanonischen Regulationskomplexe BECLIN1- und mTOR-Komplex 1 (mTORC1). Die der Autophagosomenbildung nachgeschaltete lysosomale Degradation bleibt unverändert.

5. Zusammenfassung (Summary)

Die bisher etablierten Therapieansätze der AD durch Acetylcholin-Esterase-Hemmer, NMDA-Antagonisten und Psychopharmaka stellen allein eine Behandlung der Symptome der Patienten dar und können den progressiven Verlauf der Krankheit nur wenig verzögern. Die zur Zeit in klinischen Studien getesteten experimentellen Therapieansätze zielen meist auf das Entfernen der potentiell krankheitsauslösenden A β -Peptide ab. Dabei lag in der Vergangenheit der Fokus der pharmazeutischen Entwicklung auf der Inhibition der an der amyloidogenen Prozessierung des APP beteiligten Proteasen. Die Weiterentwicklung dieser Therapieansätze mussten auf Grund der schweren Nebenwirkungen in Patienten jedoch vorerst abgebrochen werden. Der CB1 könnte grundsätzlich ein alternatives pharmakologisches Ziel darstellen, da die in dieser Studie erhobenen Daten zeigen, dass es bei Inhibition der Rezeptor-Aktivität zur MAPK-ERK1/2-vermittelten Reduktion der APP-Prozessierung und damit der A β -Spiegel kommt. Dabei führt die Reduktion der Gliose im Gehirn der APP23/CB1^{-/-}-Tiere und die reduzierte APP-Prozessierung schon in jungen Mäusen nicht zur verbesserten kognitiven Fähigkeiten der Tiere im Alter. Die in dieser Studie erhobenen Daten zeigen, dass die CB1-Aktivität auch die nicht-amyloidogene Prozessierung des APP inhibiert. Somit ist die Entwicklung einer Behandlungsstrategie durch die CB1-vermittelte Modulation der APP-Prozessierung kritisch zu sehen, da die als neuroprotektiv angesehene nicht-amyloidogene Prozessierung des APP durch die Inhibition der CB1-Aktivität ebenfalls reduziert wird. Folglich konnte in den APP23/CB1^{-/-}-Tieren die reduzierte amyloidogene Prozessierung des APP nicht ursächlich für den pathologischen Phänotyp sein, weshalb dafür ein alternativer Grund identifiziert werden sollte.

Die autophagische/lysosomale Degradation spielt bekanntlich eine Rolle bei der AD-Pathologie und wird zudem auch durch die CB1-Aktivität beeinflusst. Deshalb wurde in dieser Studie der Einfluss des CB1 auf den autophagischen Flux näher analysiert. In einem Zellmodell zeigte sich, dass über die Rezeptor-Aktivität die Bildung autophagischer Vesikel reguliert werden kann. Die lysosomale Aktivität bleibt dabei unbeeinflusst. Zudem ist in diesem Modell die Aktivität des UPS, als zweiter intrazellulärer Protein-Degradationsweg, nicht betroffen. Die Induktion des autophagischen Fluxes über die CB1-Aktivität scheint dabei unabhängig von den beiden kanonischen Autophagie-Regulatoren, des mTOR- und BECLIN1-Komplexes, zu sein. Der genaue Mechanismus über den diese nicht-kanonische CB1-vermittelte Stimulation des autophagischen Fluxes erfolgt bleibt unklar und muss in zukünftigen Studien aufgeklärt werden.

Summary

Established therapy strategies of Alzheimer's Disease (AD), using acetylcholine-esterase inhibitors, NMDA-antagonists and psychotropic drugs are only targeting the treatment of the patients syndromes. These treatment approaches are able to delay the progression of the disease by merely a few years. Most experimental treatment strategies, which have been evaluated in recent clinical studies are focusing on the elevated clearance of the potentially toxic A β peptides, whereby the pharmacological development has been concentrated on drugs inhibiting the proteases involved in the amyloidogenic processing of APP. All of these inhibitors, which proceeded up to phase III clinical trials failed at the end, because of severe side effects in patients. Based on the data of this study, one might argue that inhibiting CB1 could be used as an alternative treatment for AD, because the reduction of CB1 activity decreases APP processing and thereby the levels of A β peptides. However, the reduced gliosis and decreased APP processing in APP23/CB1^{-/-} animals compared to APP23 animals did not correlate with enhanced cognitive abilities, but with a decline in spacial learning. Data raised in this study show, that CB1 is also influencing the non-amyloidogenic processing of APP. Thus, a treatment strategy of AD based on CB1 activity inhibition and thereby the reduction of amyloidogenic APP-processing might be unrewarding as the neuroprotective, non-amyloidogenic processing of APP is decreased at the same time.

The reduced amyloidogenic APP-processing in APP23/CB1^{-/-} mice cannot be causative for the detrimental phenotype of those animals. A disturbance in the autophagosomal/lysosomal system might be an alternative explanation for the impact of the CB1 depletion in the genetic background of the APP23 mice. Various scientific reports show, that this degradation system is altered by the pathological changes during AD-progression and some claim that CB1 activity has an influence on lysosomal degradation. Thereby, the possible influence of the CB1 on the autophagic flux was investigated in this study. In the cellular model system utilized, CB1 activity specifically modulated the formation of autophagic vesicles, as the lysosomal activity and the activity of the ubiquitin-proteasom system (UPS) are not altered by CB1 knockdown. Interestingly, the modulation of the autophagic flux by CB1 is independent of the two canonical protein-complexes (mTOR- and BECLIN1-complex) regulating the induction of autophagic vesicle formation. Thus, CB1 modulates the autophagic flux in a non-canonical fashion, whereas the signal-pathway has not been revealed, so far. The precise molecular mechanism connecting CB1 signaling to the induction of autophagic vesicle formation, should be subjected to further investigations in the future.

6. Literaturverzeichnis

- D' Abramo, C., Massone, S., Zingg, J.-M., Pizzuti, A., Marambaud, P., Dalla Piccola, B., Azzi, A., Marinari, U.M., Pronzato, M.A., und Ricciarelli, R. (2005). Role of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in amyloid precursor protein processing and amyloid beta-mediated cell death. *Biochem. J.* 391, 693–698.
- Aguado, T., Romero, E., Monory, K., Palazuelos, J., Sendtner, M., Marsicano, G., Lutz, B., Guzmán, M., und Galve-Roperh, I. (2007). The CB1 cannabinoid receptor mediates excitotoxicity-induced neural progenitor proliferation and neurogenesis. *J. Biol. Chem.* 282, 23892–23898.
- Aisen, P.S., Cummings, J., und Schneider, L.S. (2012). Symptomatic and nonamyloid/tau based pharmacologic treatment for Alzheimer disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2, a006395.
- Alzheimer, A. (1907). Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allg. Z. Für Psychiatr. Psych.-Gerichtl. Med.* 64, 146–148.
- Andreatta, C., Nahreini, P., Hovland, A.R., Kumar, B., Edwards-Prasad, J., und Prasad, K.N. (2001). Use of short-lived green fluorescent protein for the detection of proteasome inhibition. *BioTechniques* 30, 656–660.
- Archer, H.A., Edison, P., Brooks, D.J., Barnes, J., Frost, C., Yeatman, T., Fox, N.C., und Rossor, M.N. (2006). Amyloid load and cerebral atrophy in Alzheimer's disease: an 11C-PIB positron emission tomography study. *Ann. Neurol.* 60, 145–147.
- Arévalo-Martín, A., Vela, J.M., Molina-Holgado, E., Borrell, J., und Guaza, C. (2003). Therapeutic action of cannabinoids in a murine model of multiple sclerosis. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 23, 2511–2516.
- Arias, E., und Cuervo, A.M. (2011). Chaperone-mediated autophagy in protein quality control. *Curr. Opin. Cell Biol.* 23, 184–189.
- Arndt, V., Rogon, C., und Höhfeld, J. (2007). To be, or not to be--molecular chaperones in protein degradation. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 64, 2525–2541.
- Arsov, I., Adebayo, A., Kucerova-Levisohn, M., Haye, J., MacNeil, M., Papavasiliou, F.N., Yue, Z., und Ortiz, B.D. (2011). A role for autophagic protein beclin 1 early in lymphocyte development. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 186, 2201–2209.
- Aso, E., Palomer, E., Juvés, S., Maldonado, R., Muñoz, F.J., und Ferrer, I. (2012). CB1 agonist ACEA protects neurons and reduces the cognitive impairment of A β PP/PS1 mice. *J. Alzheimers Dis. JAD* 30, 439–459.
- Atwood, B.K., Straiker, A., und Mackie, K. (2012). CB2: therapeutic target-in-waiting. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 38, 16–20.
- Beckett, C., Nalivaeva, N.N., Belyaev, N.D., und Turner, A.J. (2012). Nuclear signalling by membrane protein intracellular domains: the AICD enigma. *Cell. Signal.* 24, 402–409.
- Behl, C., Davis, J.B., Lesley, R., und Schubert, D. (1994). Hydrogen peroxide mediates amyloid

6. Literaturverzeichnis

beta protein toxicity. *Cell* 77, 817–827.

Belyaev, N.D., Kellett, K.A.B., Beckett, C., Makova, N.Z., Revett, T.J., Nalivaeva, N.N., Hooper, N.M., und Turner, A.J. (2010). The transcriptionally active amyloid precursor protein (APP) intracellular domain is preferentially produced from the 695 isoform of APP in a {beta}-secretase-dependent pathway. *J. Biol. Chem.* 285, 41443–41454.

Bénard, G., Massa, F., Puente, N., Lourenço, J., Bellocchio, L., Soria-Gómez, E., Matias, I., Delamarre, A., Metna-Laurent, M., Cannich, A., et al. (2012). Mitochondrial CB₁ receptors regulate neuronal energy metabolism. *Nat. Neurosci.* 15, 558–564.

Benito, C., Núñez, E., Tolón, R.M., Carrier, E.J., Rábano, A., Hillard, C.J., und Romero, J. (2003). Cannabinoid CB₂ receptors and fatty acid amide hydrolase are selectively overexpressed in neuritic plaque-associated glia in Alzheimer's disease brains. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 23, 11136–11141.

Benzing, W.C., Mufson, E.J., und Armstrong, D.M. (1993). Alzheimer's disease-like dystrophic neurites characteristically associated with senile plaques are not found within other neurodegenerative diseases unless amyloid beta-protein deposition is present. *Brain Res.* 606, 10–18.

Benzinou, M., Chèvre, J.-C., Ward, K.J., Lecoœur, C., Dina, C., Lobbens, S., Durand, E., Delplanque, J., Horber, F.F., Heude, B., et al. (2008). Endocannabinoid receptor 1 gene variations increase risk for obesity and modulate body mass index in European populations. *Hum. Mol. Genet.* 17, 1916–1921.

Bettens, K., Sleegers, K., und Van Broeckhoven, C. (2013). Genetic insights in Alzheimer's disease. *Lancet Neurol.* 12, 92–104.

Bilkei-Gorzo, A., Racz, I., Valverde, O., Otto, M., Michel, K., Sastre, M., Sarstre, M., und Zimmer, A. (2005). Early age-related cognitive impairment in mice lacking cannabinoid CB₁ receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 15670–15675.

Bjørkøy, G., Lamark, T., Brech, A., Outzen, H., Perander, M., Øvervatn, A., Stenmark, H., und Johansen, T. (2005). p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death. *J. Cell Biol.* 171, 603–614.

Boland, B., Smith, D.A., Mooney, D., Jung, S.S., Walsh, D.M., und Platt, F.M. (2010). Macroautophagy is not directly involved in the metabolism of amyloid precursor protein. *J. Biol. Chem.* 285, 37415–37426.

Bouaboula, M., Poinot-Chazel, C., Marchand, J., Canat, X., Bourrié, B., Rinaldi-Carmona, M., Calandra, B., Le Fur, G., und Casellas, P. (1996). Signaling pathway associated with stimulation of CB₂ peripheral cannabinoid receptor. Involvement of both mitogen-activated protein kinase and induction of Krox-24 expression. *Eur. J. Biochem. FEBS* 237, 704–711.

Bouaboula, M., Hilairt, S., Marchand, J., Fajas, L., Le Fur, G., und Casellas, P. (2005). Anandamide induced PPAR γ transcriptional activation and 3T3-L1 preadipocyte differentiation. *Eur. J. Pharmacol.* 517, 174–181.

6. Literaturverzeichnis

- Braak, H., und Braak, E. (1991). Demonstration of amyloid deposits and neurofibrillary changes in whole brain sections. *Brain Pathol. Zurich Switz.* 1, 213–216.
- Braak, H., und Braak, E. (1997). Frequency of stages of Alzheimer-related lesions in different age categories. *Neurobiol. Aging* 18, 351–357.
- Braak, H., Braak, E., Yilmazer, D., de Vos, R.A., Jansen, E.N., und Bohl, J. (1996). Pattern of brain destruction in Parkinson's and Alzheimer's diseases. *J. Neural Transm. Vienna Austria* 1996 103, 455–490.
- Brailoiu, G.C., Oprea, T.I., Zhao, P., Abood, M.E., und Brailoiu, E. (2011). Intracellular cannabinoid type 1 (CB1) receptors are activated by anandamide. *J. Biol. Chem.* 286, 29166–29174.
- Breivogel, C.S., und Childers, S.R. (1998). The functional neuroanatomy of brain cannabinoid receptors. *Neurobiol. Dis.* 5, 417–431.
- Brion, J.P., Couck, A.M., Passareiro, E., und Flament-Durand, J. (1985). Neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease: an immunohistochemical study. *J. Submicrosc. Cytol.* 17, 89–96.
- Buckley, N.E. (2008). The peripheral cannabinoid receptor knockout mice: an update. *Br. J. Pharmacol.* 153, 309–318.
- Buxbaum, J.D., Oishi, M., Chen, H.I., Pinkas-Kramarski, R., Jaffe, E.A., Gandy, S.E., und Greengard, P. (1992). Cholinergic agonists and interleukin 1 regulate processing and secretion of the Alzheimer beta/A4 amyloid protein precursor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 10075–10078.
- Caccamo, A., Majumder, S., Richardson, A., Strong, R., und Oddo, S. (2010). Molecular interplay between mammalian target of rapamycin (mTOR), amyloid-beta, and Tau: effects on cognitive impairments. *J. Biol. Chem.* 285, 13107–13120.
- Cadas, H., Gaillet, S., Beltramo, M., Venance, L., und Piomelli, D. (1996). Biosynthesis of an endogenous cannabinoid precursor in neurons and its control by calcium and cAMP. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 16, 3934–3942.
- Calhoun, M.E., Wiederhold, K.H., Abramowski, D., Phinney, A.L., Probst, A., Sturchler-Pierrat, C., Staufenbiel, M., Sommer, B., und Jucker, M. (1998). Neuron loss in APP transgenic mice. *Nature* 395, 755–756.
- Carracedo, A., Gironella, M., Lorente, M., Garcia, S., Guzmán, M., Velasco, G., und Iovanna, J.L. (2006). Cannabinoids induce apoptosis of pancreatic tumor cells via endoplasmic reticulum stress-related genes. *Cancer Res.* 66, 6748–6755.
- Casarejos, M.J., Perucho, J., Gomez, A., Muñoz, M.P., Fernandez-Estevez, M., Sagredo, O., Fernandez Ruiz, J., Guzman, M., de Yébenes, J.G., und Mena, M.A. (2013). Natural cannabinoids improve dopamine neurotransmission and tau and amyloid pathology in a mouse model of tauopathy. *J. Alzheimers Dis. JAD* 35, 525–539.
- Casas, C., Sergeant, N., Itier, J.-M., Blanchard, V., Wirths, O., van der Kolk, N., Vingtdoux, V., van de Steeg, E., Ret, G., Canton, T., et al. (2004). Massive CA1/2 neuronal loss with intraneuronal and

6. Literaturverzeichnis

- N-terminal truncated Abeta42 accumulation in a novel Alzheimer transgenic model. *Am. J. Pathol.* *165*, 1289–1300.
- Cataldo, A.M., Paskevich, P.A., Kominami, E., und Nixon, R.A. (1991). Lysosomal hydrolases of different classes are abnormally distributed in brains of patients with Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *88*, 10998–11002.
- Cataldo, A.M., Barnett, J.L., Berman, S.A., Li, J., Quarless, S., Bursztajn, S., Lippa, C., und Nixon, R.A. (1995). Gene expression and cellular content of cathepsin D in Alzheimer's disease brain: evidence for early up-regulation of the endosomal-lysosomal system. *Neuron* *14*, 671–680.
- Cell Signaling (2013). Autophagy Signaling. <http://www.cellsignal.com/pathways/autophagy-signaling.jsp>, heruntergeladen am 16.09.2013.
- Chasseigneaux, S., Dinc, L., Rose, C., Chabret, C., Couplier, F., Topilko, P., Mauger, G., und Allinquant, B. (2011). Secreted amyloid precursor protein β and secreted amyloid precursor protein α induce axon outgrowth in vitro through Egr1 signaling pathway. *PloS One* *6*, e16301.
- Chen, B., Retzlaff, M., Roos, T., und Frydman, J. (2011a). Cellular strategies of protein quality control. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *3*, a004374.
- Chen, X., Zhang, J., und Chen, C. (2011b). Endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol protects neurons against β -amyloid insults. *Neuroscience* *178*, 159–168.
- Cheong, H., Lindsten, T., Wu, J., Lu, C., und Thompson, C.B. (2011). Ammonia-induced autophagy is independent of ULK1/ULK2 kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 11121–11126.
- Chiang, G.G., und Abraham, R.T. (2005). Phosphorylation of mammalian target of rapamycin (mTOR) at Ser-2448 is mediated by p70S6 kinase. *J. Biol. Chem.* *280*, 25485–25490.
- Chorvat, R.J., Berbaum, J., Seriacki, K., und McElroy, J.F. (2012). JD-5006 and JD-5037: peripherally restricted (PR) cannabinoid-1 receptor blockers related to SLV-319 (Ibipinabant) as metabolic disorder therapeutics devoid of CNS liabilities. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* *22*, 6173–6180.
- Chu, C.T., Zhu, J., und Dagda, R. (2007). Beclin 1-independent pathway of damage-induced mitophagy and autophagic stress: implications for neurodegeneration and cell death. *Autophagy* *3*, 663–666.
- Citron, M., Westaway, D., Xia, W., Carlson, G., Diehl, T., Levesque, G., Johnson-Wood, K., Lee, M., Seubert, P., Davis, A., et al. (1997). Mutant presenilins of Alzheimer's disease increase production of 42-residue amyloid beta-protein in both transfected cells and transgenic mice. *Nat. Med.* *3*, 67–72.
- Codogno, P., Mehrpour, M., und Proikas-Cezanne, T. (2012). Canonical and non-canonical autophagy: variations on a common theme of self-eating? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *13*, 7–12.
- Corder, E.H., Saunders, A.M., Strittmatter, W.J., Schmechel, D.E., Gaskell, P.C., Small, G.W., Roses, A.D., Haines, J.L., und Pericak-Vance, M.A. (1993). Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science* *261*, 921–923.

6. Literaturverzeichnis

- Corder, E.H., Saunders, A.M., Risch, N.J., Strittmatter, W.J., Schmechel, D.E., Gaskell, P.C., Jr, Rimmler, J.B., Locke, P.A., Conneally, P.M., und Schmader, K.E. (1994). Protective effect of apolipoprotein E type 2 allele for late onset Alzheimer disease. *Nat. Genet.* 7, 180–184.
- Cordy, J.M., Hussain, I., Dingwall, C., Hooper, N.M., und Turner, A.J. (2003). Exclusively targeting beta-secretase to lipid rafts by GPI-anchor addition up-regulates beta-site processing of the amyloid precursor protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 11735–11740.
- Correa, F., Hernangómez, M., Mestre, L., Loría, F., Spagnolo, A., Docagne, F., Di Marzo, V., und Guaza, C. (2010). Anandamide enhances IL-10 production in activated microglia by targeting CB(2) receptors: roles of ERK1/2, JNK, und NF-kappaB. *Glia* 58, 135–147.
- Cota, D., Marsicano, G., Tschöp, M., Grübler, Y., Flachskamm, C., Schubert, M., Auer, D., Yassouridis, A., Thöne-Reineke, C., Ortman, S., et al. (2003). The endogenous cannabinoid system affects energy balance via central orexigenic drive and peripheral lipogenesis. *J. Clin. Invest.* 112, 423–431.
- Crews, L., und Masliah, E. (2010). Molecular mechanisms of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Hum. Mol. Genet.* 19, R12–20.
- Cuervo, A.M. (2008). Autophagy and aging: keeping that old broom working. *Trends Genet. TIG* 24, 604–612.
- Daigle, I., und Li, C. (1993). *apl-1*, a *Caenorhabditis elegans* gene encoding a protein related to the human beta-amyloid protein precursor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 12045–12049.
- Dalvi, A. (2012). Alzheimer's disease. *Dis.--Mon. DM* 58, 666–677.
- Van Dam, D., D'Hooge, R., Staufenbiel, M., Van Ginneken, C., Van Meir, F., und De Deyn, P.P. (2003). Age-dependent cognitive decline in the APP23 model precedes amyloid deposition. *Eur. J. Neurosci.* 17, 388–396.
- Dando, I., Donadelli, M., Costanzo, C., Dalla Pozza, E., D'Alessandro, A., Zolla, L., und Palmieri, M. (2013). Cannabinoids inhibit energetic metabolism and induce AMPK-dependent autophagy in pancreatic cancer cells. *Cell Death Dis.* 4, e664.
- Derkinderen, P., Valjent, E., Toutant, M., Corvol, J.-C., Enslin, H., Ledent, C., Trzaskos, J., Caboche, J., und Girault, J.-A. (2003). Regulation of extracellular signal-regulated kinase by cannabinoids in hippocampus. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 23, 2371–2382.
- Devane, W.A., Dysarz, F.A., 3rd, Johnson, M.R., Melvin, L.S., und Howlett, A.C. (1988). Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Mol. Pharmacol.* 34, 605–613.
- Devane, W.A., Hanus, L., Breuer, A., Pertwee, R.G., Stevenson, L.A., Griffin, G., Gibson, D., Mandelbaum, A., Etinger, A., und Mechoulam, R. (1992). Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science* 258, 1946–1949.
- Devlin, M.G., und Christopoulos, A. (2002). Modulation of cannabinoid agonist binding by 5-HT in the rat cerebellum. *J. Neurochem.* 80, 1095–1102.

6. Literaturverzeichnis

- Di, S., Boudaba, C., Popescu, I.R., Weng, F.-J., Harris, C., Marcheselli, V.L., Bazan, N.G., and Tasker, J.G. (2005). Activity-dependent release and actions of endocannabinoids in the rat hypothalamic supraoptic nucleus. *J. Physiol.* *569*, 751–760.
- Doody, R.S., Raman, R., Farlow, M., Iwatsubo, T., Vellas, B., Joffe, S., Kieburtz, K., He, F., Sun, X., Thomas, R.G., et al. (2013). A phase 3 trial of semagacestat for treatment of Alzheimer's disease. *N. Engl. J. Med.* *369*, 341–350.
- Du, Y., Wooten, M.C., Gearing, M., and Wooten, M.W. (2009). Age-associated oxidative damage to the p62 promoter: implications for Alzheimer disease. *Free Radic. Biol. Med.* *46*, 492–501.
- Duennwald, M.L. (2011). Polyglutamine misfolding in yeast: toxic and protective aggregation. *Prion* *5*, 285–290.
- Edbauer, D., Willem, M., Lammich, S., Steiner, H., and Haass, C. (2002). Insulin-degrading enzyme rapidly removes the beta-amyloid precursor protein intracellular domain (AICD). *J. Biol. Chem.* *277*, 13389–13393.
- Eehalt, R., Keller, P., Haass, C., Thiele, C., and Simons, K. (2003). Amyloidogenic processing of the Alzheimer beta-amyloid precursor protein depends on lipid rafts. *J. Cell Biol.* *160*, 113–123.
- Esposito, G., Scuderi, C., Valenza, M., Togna, G.I., Latina, V., De Filippis, D., Cipriano, M., Carratù, M.R., Iuvone, T., and Steardo, L. (2011). Cannabidiol reduces A β -induced neuroinflammation and promotes hippocampal neurogenesis through PPAR γ involvement. *PloS One* *6*, e28668.
- Eubanks, L.M., Rogers, C.J., Beuscher, A.E., 4th, Koob, G.F., Olson, A.J., Dickerson, T.J., and Janda, K.D. (2006). A molecular link between the active component of marijuana and Alzheimer's disease pathology. *Mol. Pharm.* *3*, 773–777.
- Fakhfour, G., Ahmadiani, A., Rahimian, R., Grolla, A.A., Moradi, F., and Haeri, A. (2012). WIN55212-2 attenuates amyloid-beta-induced neuroinflammation in rats through activation of cannabinoid receptors and PPAR- γ pathway. *Neuropharmacology* *63*, 653–666.
- Farrer, L.A., Cupples, L.A., Haines, J.L., Hyman, B., Kukull, W.A., Mayeux, R., Myers, R.H., Pericak-Vance, M.A., Risch, N., and van Duijn, C.M. (1997). Effects of age, sex, and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease. A meta-analysis. APOE and Alzheimer Disease Meta Analysis Consortium. *JAMA J. Am. Med. Assoc.* *278*, 1349–1356.
- Felder, C.C., Joyce, K.E., Briley, E.M., Mansouri, J., Mackie, K., Blond, O., Lai, Y., Ma, A.L., and Mitchell, R.L. (1995). Comparison of the pharmacology and signal transduction of the human cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Mol. Pharmacol.* *48*, 443–450.
- Ferri, C.P., Prince, M., Brayne, C., Brodaty, H., Fratiglioni, L., Ganguli, M., Hall, K., Hasegawa, K., Hendrie, H., Huang, Y., et al. (2005). Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *Lancet* *366*, 2112–2117.
- Fimia, G.M., Stoykova, A., Romagnoli, A., Giunta, L., Di Bartolomeo, S., Nardacci, R., Corazzari, M., Fuoco, C., Ucar, A., Schwartz, P., et al. (2007). Ambra1 regulates autophagy and development of the nervous system. *Nature* *447*, 1121–1125.

6. Literaturverzeichnis

- Friedhoff, P., von Bergen, M., Mandelkow, E.M., und Mandelkow, E. (2000). Structure of tau protein and assembly into paired helical filaments. *Biochim. Biophys. Acta* 1502, 122–132.
- Galiègue, S., Mary, S., Marchand, J., Dussossoy, D., Carrière, D., Carayon, P., Bouaboula, M., Shire, D., Le Fur, G., und Casellas, P. (1995). Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations. *Eur. J. Biochem. FEBS* 232, 54–61.
- Gamerding, M., Hajieva, P., Kaya, A.M., Wolfrum, U., Hartl, F.U., und Behl, C. (2009). Protein quality control during aging involves recruitment of the macroautophagy pathway by BAG3. *EMBO J.* 28, 889–901.
- Gaoni, M., und Mechoulam, R. (1964). Isolation, structure and partial synthesis of an active constituent of hashish. *J Am Chem Soc* 86, 1646–1647.
- Gazzerro, P., Caruso, M.G., Notarnicola, M., Misciagna, G., Guerra, V., Laezza, C., und Bifulco, M. (2007). Association between cannabinoid type-1 receptor polymorphism and body mass index in a southern Italian population. *Int. J. Obes.* 2005 31, 908–912.
- Goate, A., Chartier-Harlin, M.C., Mullan, M., Brown, J., Crawford, F., Fidani, L., Giuffra, L., Haynes, A., Irving, N., und James, L. (1991). Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature* 349, 704–706.
- Gohla, A., Klement, K., und Nürnberg, B. (2007). The heterotrimeric G protein G(i3) regulates hepatic autophagy downstream of the insulin receptor. *Autophagy* 3, 393–395.
- Gomez, O., Arevalo-Martin, A., Garcia-Ovejero, D., Ortega-Gutierrez, S., Cisneros, J.A., Almazan, G., Sánchez-Rodriguez, M.A., Molina-Holgado, F., und Molina-Holgado, E. (2010). The constitutive production of the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol participates in oligodendrocyte differentiation. *Glia* 58, 1913–1927.
- Götz, J., Chen, F., van Dorpe, J., und Nitsch, R.M. (2001). Formation of neurofibrillary tangles in P3011 tau transgenic mice induced by Abeta 42 fibrils. *Science* 293, 1491–1495.
- Green, R.C., Schneider, L.S., Amato, D.A., Beelen, A.P., Wilcock, G., Swabb, E.A., Zavitz, K.H., und Tarenflur bil Phase 3 Study Group (2009). Effect of tarenflur bil on cognitive decline and activities of daily living in patients with mild Alzheimer disease: a randomized controlled trial. *JAMA J. Am. Med. Assoc.* 302, 2557–2564.
- Grimm, M.O.W., Grimm, H.S., Pätzold, A.J., Zinser, E.G., Halonen, R., Duering, M., Tschäpe, J.A., De Strooper, B., Müller, U., Shen, J., et al. (2005). Regulation of cholesterol and sphingomyelin metabolism by amyloid-beta and presenilin. *Nat. Cell Biol.* 7, 1118–1123.
- Grimsey, N.L., Graham, E.S., Dragunow, M., und Glass, M. (2010). Cannabinoid Receptor 1 trafficking and the role of the intracellular pool: implications for therapeutics. *Biochem. Pharmacol.* 80, 1050–1062.
- Grishchuk, Y., Ginet, V., Truttmann, A.C., Clarke, P.G.H., und Puyal, J. (2011). Beclin 1-independent autophagy contributes to apoptosis in cortical neurons. *Autophagy* 7, 1115–1131.

6. Literaturverzeichnis

- Gunderson, E.W. (2013). Synthetic Cannabinoids: A New Frontier of Designer Drugs. *Ann. Intern. Med.*
- Haass, C., Koo, E.H., Mellon, A., Hung, A.Y., und Selkoe, D.J. (1992). Targeting of cell-surface beta-amyloid precursor protein to lysosomes: alternative processing into amyloid-bearing fragments. *Nature* 357, 500–503.
- Hardy, J., und Selkoe, D.J. (2002). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 297, 353–356.
- Häring, M., Guggenhuber, S., und Lutz, B. (2012). Neuronal populations mediating the effects of endocannabinoids on stress and emotionality. *Neuroscience* 204, 145–158.
- Harris, M.E., Hensley, K., Butterfield, D.A., Leedle, R.A., und Carney, J.M. (1995). Direct evidence of oxidative injury produced by the Alzheimer's beta-amyloid peptide (1-40) in cultured hippocampal neurons. *Exp. Neurol.* 131, 193–202.
- Hartl, F.U., Bracher, A., und Hayer-Hartl, M. (2011). Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. *Nature* 475, 324–332.
- Hayakawa, K., Mishima, K., Nozako, M., Hazekawa, M., Aoyama, Y., Ogata, A., Harada, K., Fujioka, M., Abe, K., Egashira, N., et al. (2007). High-cholesterol feeding aggravates cerebral infarction via decreasing the CB1 receptor. *Neurosci. Lett.* 414, 183–187.
- He, C., Wei, Y., Sun, K., Li, B., Dong, X., Zou, Z., Liu, Y., Kinch, L.N., Khan, S., Sinha, S., et al. (2013). Beclin 2 Functions in Autophagy, Degradation of G Protein-Coupled Receptors, and Metabolism. *Cell*.
- Hegyí, Z., Holló, K., Kis, G., Mackie, K., und Antal, M. (2012). Differential distribution of diacylglycerol lipase- α and N-acylphosphatidylethanolamine-specific phospholipase d immunoreactivity in the superficial spinal dorsal horn of rats. *Glia* 60, 1316–1329.
- Hilairét, S., Bouaboula, M., Carrière, D., Le Fur, G., und Casellas, P. (2003). Hypersensitization of the Orexin 1 receptor by the CB1 receptor: evidence for cross-talk blocked by the specific CB1 antagonist, SR141716. *J. Biol. Chem.* 278, 23731–23737.
- Hooper, N.M., und Turner, A.J. (2002). The search for alpha-secretase and its potential as a therapeutic approach to Alzheimer's disease. *Curr. Med. Chem.* 9, 1107–1119.
- Howlett, A.C. (2002). The cannabinoid receptors. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 68-69, 619–631.
- Howlett, A.C. (2005). Cannabinoid receptor signaling. *Handb. Exp. Pharmacol.* 53–79.
- Itakura, E., Kishi, C., Inoue, K., und Mizushima, N. (2008). Beclin 1 forms two distinct phosphatidylinositol 3-kinase complexes with mammalian Atg14 and UVRAG. *Mol. Biol. Cell* 19, 5360–5372.
- Itoh, T., Kanno, E., Uemura, T., Waguri, S., und Fukuda, M. (2011). OATL1, a novel autophagosome-resident Rab33B-GAP, regulates autophagosomal maturation. *J. Cell Biol.* 192,

6. Literaturverzeichnis

839–853.

Jackson, S.J., Pryce, G., Diemel, L.T., Cuzner, M.L., und Baker, D. (2005a). Cannabinoid-receptor 1 null mice are susceptible to neurofilament damage and caspase 3 activation. *Neuroscience* 134, 261–268.

Jackson, W.T., Giddings, T.H., Jr, Taylor, M.P., Mulinyawe, S., Rabinovitch, M., Kopito, R.R., und Kirkegaard, K. (2005b). Subversion of cellular autophagosomal machinery by RNA viruses. *PLoS Biol.* 3, e156.

Jacobsen, K.T., und Iverfeldt, K. (2009). Amyloid precursor protein and its homologues: a family of proteolysis-dependent receptors. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 66, 2299–2318.

Jaeger, P.A., Pickford, F., Sun, C.-H., Lucin, K.M., Masliah, E., und Wyss-Coray, T. (2010). Regulation of amyloid precursor protein processing by the Beclin 1 complex. *PLoS ONE* 5, e11102.

Jariel-Encontre, I., Bossis, G., und Piechaczyk, M. (2008). Ubiquitin-independent degradation of proteins by the proteasome. *Biochim. Biophys. Acta* 1786, 153–177.

Jefferson, T., Čaušević, M., auf dem Keller, U., Schilling, O., Isbert, S., Geyer, R., Maier, W., Tschickardt, S., Jumpertz, T., Weggen, S., et al. (2011). Metalloprotease meprin beta generates nontoxic N-terminal amyloid precursor protein fragments in vivo. *J. Biol. Chem.* 286, 27741–27750.

Jenkin, K.A., McAinch, A.J., Grinfeld, E., und Hryciw, D.H. (2010). Role for cannabinoid receptors in human proximal tubular hypertrophy. *Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 26, 879–886.

Jin, L.W., Ninomiya, H., Roch, J.M., Schubert, D., Masliah, E., Otero, D.A., und Saitoh, T. (1994). Peptides containing the RERMS sequence of amyloid beta/A4 protein precursor bind cell surface and promote neurite extension. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 14, 5461–5470.

Johnston, H., Boutin, H., und Allan, S.M. (2011). Assessing the contribution of inflammation in models of Alzheimer's disease. *Biochem. Soc. Trans.* 39, 886–890.

Josephs, K.A., Whitwell, J.L., Ahmed, Z., Shiung, M.M., Weigand, S.D., Knopman, D.S., Boeve, B.F., Parisi, J.E., Petersen, R.C., Dickson, D.W., et al. (2008). Beta-amyloid burden is not associated with rates of brain atrophy. *Ann. Neurol.* 63, 204–212.

Jung, T., und Grune, T. (2013). The proteasome and the degradation of oxidized proteins: Part I-structure of proteasomes. *Redox Biol.* 1, 178–182.

Jung, K.-M., Astarita, G., Yasar, S., Vasilevko, V., Cribbs, D.H., Head, E., Cotman, C.W., und Piomelli, D. (2012). An amyloid β 42-dependent deficit in anandamide mobilization is associated with cognitive dysfunction in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 33, 1522–1532.

Kang, R., Zeh, H.J., Lotze, M.T., und Tang, D. (2011). The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis. *Cell Death Differ.* 18, 571–580.

Kearn, C.S., Blake-Palmer, K., Daniel, E., Mackie, K., und Glass, M. (2005). Concurrent

6. Literaturverzeichnis

stimulation of cannabinoid CB1 and dopamine D2 receptors enhances heterodimer formation: a mechanism for receptor cross-talk? *Mol. Pharmacol.* 67, 1697–1704.

Kelly, P.H., Bondolfi, L., Hunziker, D., Schlecht, H.-P., Carver, K., Maguire, E., Abramowski, D., Wiederhold, K.-H., Sturchler-Pierrat, C., Jucker, M., et al. (2003). Progressive age-related impairment of cognitive behavior in APP23 transgenic mice. *Neurobiol. Aging* 24, 365–378.

Kern, A., und Behl, C. (2009). The unsolved relationship of brain aging and late-onset Alzheimer disease. *Biochim. Biophys. Acta* 1790, 1124–1132.

Kern, A., Roempp, B., Prager, K., Walter, J., und Behl, C. (2006). Down-regulation of endogenous amyloid precursor protein processing due to cellular aging. *J. Biol. Chem.* 281, 2405–2413.

Kirkin, V., McEwan, D.G., Novak, I., und Dikic, I. (2009). A role for ubiquitin in selective autophagy. *Mol. Cell* 34, 259–269.

Klionsky, D.J., Abdalla, F.C., Abeliovich, H., Abraham, R.T., Acevedo-Arozena, A., Adeli, K., Agholme, L., Agnello, M., Agostinis, P., Aguirre-Ghiso, J.A., et al. (2012). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy* 8, 445–544.

De Kloet, A.D., und Woods, S.C. (2009). Minireview: Endocannabinoids and their receptors as targets for obesity therapy. *Endocrinology* 150, 2531–2536.

Komander, D. (2009). The emerging complexity of protein ubiquitination. *Biochem. Soc. Trans.* 37, 937–953.

Koo, E.H., Sisodia, S.S., Archer, D.R., Martin, L.J., Weidemann, A., Beyreuther, K., Fischer, P., Masters, C.L., und Price, D.L. (1990). Precursor of amyloid protein in Alzheimer disease undergoes fast anterograde axonal transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87, 1561–1565.

Korolchuk, V.I., Mansilla, A., Menzies, F.M., und Rubinsztein, D.C. (2009). Autophagy inhibition compromises degradation of ubiquitin-proteasome pathway substrates. *Mol. Cell* 33, 517–527.

Kreitzer, A.C., und Regehr, W.G. (2001). Cerebellar depolarization-induced suppression of inhibition is mediated by endogenous cannabinoids. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 21, RC174.

Kuhn, P.-H., Wang, H., Dislich, B., Colombo, A., Zeitschel, U., Ellwart, J.W., Kremmer, E., Rossner, S., und Lichtenthaler, S.F. (2010). ADAM10 is the physiologically relevant, constitutive alpha-secretase of the amyloid precursor protein in primary neurons. *EMBO J.* 29, 3020–3032.

Kuperstein, I., Broersen, K., Benilova, I., Rozenski, J., Jonckheere, W., Debulpaep, M., Vandersteen, A., Segers-Nolten, I., Van Der Werf, K., Subramaniam, V., et al. (2010). Neurotoxicity of Alzheimer's disease A β peptides is induced by small changes in the A β 42 to A β 40 ratio. *EMBO J.* 29, 3408–3420.

Kuster, J.E., Stevenson, J.I., Ward, S.J., D'Ambra, T.E., und Haycock, D.A. (1993). Aminoalkylindole binding in rat cerebellum: selective displacement by natural and synthetic cannabinoids. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 264, 1352–1363.

Lafay-Chebassier, C., Paccalin, M., Page, G., Barc-Pain, S., Perault-Pochat, M.C., Gil, R., Pradier,

6. Literaturverzeichnis

- L., und Hugon, J. (2005). mTOR/p70S6k signalling alteration by Abeta exposure as well as in APP-PS1 transgenic models and in patients with Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* *94*, 215–225.
- Lalonde, R., Dumont, M., Staufenbiel, M., und Strazielle, C. (2005). Neurobehavioral characterization of APP23 transgenic mice with the SHIRPA primary screen. *Behav. Brain Res.* *157*, 91–98.
- Lammich, S., Kojro, E., Postina, R., Gilbert, S., Pfeiffer, R., Jasionowski, M., Haass, C., und Fahrenholz, F. (1999). Constitutive and regulated alpha-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *96*, 3922–3927.
- Lee, J.-H., Yu, W.H., Kumar, A., Lee, S., Mohan, P.S., Peterhoff, C.M., Wolfe, D.M., Martinez-Vicente, M., Massey, A.C., Sovak, G., et al. (2010). Lysosomal proteolysis and autophagy require presenilin 1 and are disrupted by Alzheimer-related PS1 mutations. *Cell* *141*, 1146–1158.
- Lee, R.K., Wurtman, R.J., Cox, A.J., und Nitsch, R.M. (1995). Amyloid precursor protein processing is stimulated by metabotropic glutamate receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *92*, 8083–8087.
- Lee, S., Sato, Y., und Nixon, R.A. (2011). Lysosomal proteolysis inhibition selectively disrupts axonal transport of degradative organelles and causes an Alzheimer's-like axonal dystrophy. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *31*, 7817–7830.
- Leterrier, C., Bonnard, D., Carrel, D., Rossier, J., und Lenkei, Z. (2004). Constitutive endocytic cycle of the CB1 cannabinoid receptor. *J. Biol. Chem.* *279*, 36013–36021.
- Leterrier, C., Lainé, J., Darmon, M., Boudin, H., Rossier, J., und Lenkei, Z. (2006). Constitutive activation drives compartment-selective endocytosis and axonal targeting of type 1 cannabinoid receptors. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *26*, 3141–3153.
- Lipinski, M.M., Zheng, B., Lu, T., Yan, Z., Py, B.F., Ng, A., Xavier, R.J., Li, C., Yankner, B.A., Scherzer, C.R., et al. (2010). Genome-wide analysis reveals mechanisms modulating autophagy in normal brain aging and in Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 14164–14169.
- Loewe, S. (1945). MARIHUANA ACTIVITY OF CANNABINOL. *Science* *102*, 615–616.
- Loría, F., Petrosino, S., Mestre, L., Spagnolo, A., Correa, F., Hernangómez, M., Guaza, C., Di Marzo, V., und Docagne, F. (2008). Study of the regulation of the endocannabinoid system in a virus model of multiple sclerosis reveals a therapeutic effect of palmitoylethanolamide. *Eur. J. Neurosci.* *28*, 633–641.
- Luo, Y.Q., Hirashima, N., Li, Y.H., Alkon, D.L., Sunderland, T., Etcheberrigaray, R., und Wolozin, B. (1995). Physiological levels of beta-amyloid increase tyrosine phosphorylation and cytosolic calcium. *Brain Res.* *681*, 65–74.
- Lüthi, A., Putten, H. van der, Botteri, F.M., Mansuy, I.M., Meins, M., Frey, U., Sansig, G., Portet, C., Schmutz, M., Schröder, M., et al. (1997). Endogenous Serine Protease Inhibitor Modulates Epileptic Activity and Hippocampal Long-Term Potentiation. *J. Neurosci.* *17*, 4688–4699.
- Ma, T., Hoeffler, C.A., Capetillo-Zarate, E., Yu, F., Wong, H., Lin, M.T., Tampellini, D., Klann, E.,

6. Literaturverzeichnis

- Blitzer, R.D., und Gouras, G.K. (2010). Dysregulation of the mTOR pathway mediates impairment of synaptic plasticity in a mouse model of Alzheimer's disease. *PLoS ONE* 5.
- Mackie, K., und Stella, N. (2006). Cannabinoid receptors and endocannabinoids: evidence for new players. *AAPS J.* 8, E298–306.
- Mahadevan, A., Siegel, C., Martin, B.R., Abood, M.E., Beletskaya, I., und Razdan, R.K. (2000). Novel cannabinol probes for CB1 and CB2 cannabinoid receptors. *J. Med. Chem.* 43, 3778–3785.
- Mahlapuu, R., Viht, K., Balaspiri, L., Bogdanovic, N., Saar, K., Soomets, U., Land, T., Zilmer, M., Karelson, E., und Langel, U. (2003). Amyloid precursor protein carboxy-terminal fragments modulate G-proteins and adenylate cyclase activity in Alzheimer's disease brain. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 117, 73–82.
- Mann, D.M., Yates, P.O., und Marcyniuk, B. (1984). Alzheimer's presenile dementia, senile dementia of Alzheimer type and Down's syndrome in middle age form an age related continuum of pathological changes. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 10, 185–207.
- Manthey, D., Heck, S., Engert, S., und Behl, C. (2001). Estrogen induces a rapid secretion of amyloid beta precursor protein via the mitogen-activated protein kinase pathway. *Eur. J. Biochem. FEBS* 268, 4285–4291.
- Marazzi, J., Kleyer, J., Paredes, J.M.V., und Gertsch, J. (2011). Endocannabinoid content in fetal bovine sera - unexpected effects on mononuclear cells and osteoclastogenesis. *J. Immunol. Methods* 373, 219–228.
- Marchalant, Y., Cerbai, F., Brothers, H.M., und Wenk, G.L. (2008). Cannabinoid receptor stimulation is anti-inflammatory and improves memory in old rats. *Neurobiol. Aging* 29, 1894–1901.
- Marsicano, G., Moosmann, B., Hermann, H., Lutz, B., und Behl, C. (2002a). Neuroprotective properties of cannabinoids against oxidative stress: role of the cannabinoid receptor CB1. *J. Neurochem.* 80, 448–456.
- Marsicano, G., Wotjak, C.T., Azad, S.C., Bisogno, T., Rammes, G., Cascio, M.G., Hermann, H., Tang, J., Hofmann, C., Zieglgänsberger, W., et al. (2002b). The endogenous cannabinoid system controls extinction of aversive memories. *Nature* 418, 530–534.
- Marsicano, G., Goodenough, S., Monory, K., Hermann, H., Eder, M., Cannich, A., Azad, S.C., Cascio, M.G., Gutiérrez, S.O., van der Stelt, M., et al. (2003). CB1 cannabinoid receptors and on-demand defense against excitotoxicity. *Science* 302, 84–88.
- Martín-Moreno, A.M., Brera, B., Spuch, C., Carro, E., García-García, L., Delgado, M., Pozo, M.A., Innamorato, N.G., Cuadrado, A., und de Ceballos, M.L. (2012). Prolonged oral cannabinoid administration prevents neuroinflammation, lowers β -amyloid levels and improves cognitive performance in Tg APP 2576 mice. *J. Neuroinflammation* 9, 8.
- Di Marzo, V., Fontana, A., Cadas, H., Schinelli, S., Cimino, G., Schwartz, J.C., und Piomelli, D. (1994). Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. *Nature* 372, 686–691.

6. Literaturverzeichnis

- Di Marzo, V., Bisogno, T., Melck, D., Ross, R., Brockie, H., Stevenson, L., Pertwee, R., und De Petrocellis, L. (1998). Interactions between synthetic vanilloids and the endogenous cannabinoid system. *FEBS Lett.* *436*, 449–454.
- Masoro, E.J. (2003). Subfield history: caloric restriction, slowing aging, and extending life. *Sci. Aging Knowl. Environ.* SAGE KE *2003*, RE2.
- Matsuda, L.A., Lolait, S.J., Brownstein, M.J., Young, A.C., und Bonner, T.I. (1990). Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature* *346*, 561–564.
- Matsunaga, K., Saitoh, T., Tabata, K., Omori, H., Satoh, T., Kurotori, N., Maejima, I., Shirahama-Noda, K., Ichimura, T., Isobe, T., et al. (2009). Two Beclin 1-binding proteins, Atg14L and Rubicon, reciprocally regulate autophagy at different stages. *Nat. Cell Biol.* *11*, 385–396.
- Mattson, M.P. (1997). Cellular actions of beta-amyloid precursor protein and its soluble and fibrillogenic derivatives. *Physiol. Rev.* *77*, 1081–1132.
- Mechoulam, R., Ben-Shabat, S., Hanus, L., Ligumsky, M., Kaminski, N.E., Schatz, A.R., Gopher, A., Almog, S., Martin, B.R., und Compton, D.R. (1995). Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem. Pharmacol.* *50*, 83–90.
- Mestre, M.B., Fader, C.M., Sola, C., und Colombo, M.I. (2010). Alpha-hemolysin is required for the activation of the autophagic pathway in *Staphylococcus aureus*-infected cells. *Autophagy* *6*, 110–125.
- Meyer-Luehmann, M., Stalder, M., Herzig, M.C., Kaeser, S.A., Kohler, E., Pfeifer, M., Boncristiano, S., Mathews, P.M., Mercken, M., Abramowski, D., et al. (2003). Extracellular amyloid formation and associated pathology in neural grafts. *Nat. Neurosci.* *6*, 370–377.
- Michoulam, R., und Shvo, Y. (1963). Hashish. I. The structure of cannabidiol. *Tetrahedron* *19*, 2073–2078.
- Milton, N.G.N. (2002). Anandamide and noladin ether prevent neurotoxicity of the human amyloid-beta peptide. *Neurosci. Lett.* *332*, 127–130.
- Mizushima, N., Yamamoto, A., Matsui, M., Yoshimori, T., und Ohsumi, Y. (2004). In vivo analysis of autophagy in response to nutrient starvation using transgenic mice expressing a fluorescent autophagosome marker. *Mol. Biol. Cell* *15*, 1101–1111.
- Mizushima, N., Levine, B., Cuervo, A.M., und Klionsky, D.J. (2008). Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature* *451*, 1069–1075.
- Mizushima, N., Yoshimori, T., und Ohsumi, Y. (2011). The role of Atg proteins in autophagosome formation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *27*, 107–132.
- Molina-Holgado, E., Vela, J.M., Arévalo-Martín, A., Almazán, G., Molina-Holgado, F., Borrell, J., und Guaza, C. (2002). Cannabinoids promote oligodendrocyte progenitor survival: involvement of cannabinoid receptors and phosphatidylinositol-3 kinase/Akt signaling. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *22*, 9742–9753.

6. Literaturverzeichnis

- Morawe, T., Hiebel, C., Kern, A., und Behl, C. (2012). Protein Homeostasis, Aging and Alzheimer's Disease. *Mol. Neurobiol.*
- Moreau, K., Ravikumar, B., Renna, M., Puri, C., und Rubinsztein, D.C. (2011). Autophagosome precursor maturation requires homotypic fusion. *Cell* *146*, 303–317.
- Morin, P.J., Abraham, C.R., Amaratunga, A., Johnson, R.J., Huber, G., Sandell, J.H., und Fine, R.E. (1993). Amyloid precursor protein is synthesized by retinal ganglion cells, rapidly transported to the optic nerve plasma membrane and nerve terminals, and metabolized. *J. Neurochem.* *61*, 464–473.
- Mulder, J., Zilberter, M., Pasquaré, S.J., Alpár, A., Schulte, G., Ferreira, S.G., Köfalvi, A., Martín-Moreno, A.M., Keimpema, E., Tanila, H., et al. (2011). Molecular reorganization of endocannabinoid signalling in Alzheimer's disease. *Brain J. Neurol.* *134*, 1041–1060.
- Munro, S., Thomas, K.L., und Abu-Shaar, M. (1993). Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature* *365*, 61–65.
- Nair, U., Jotwani, A., Geng, J., Gammoh, N., Richerson, D., Yen, W.-L., Griffith, J., Nag, S., Wang, K., Moss, T., et al. (2011). SNARE proteins are required for macroautophagy. *Cell* *146*, 290–302.
- Neve, R.L., und Robakis, N.K. (1998). Alzheimer's disease: a re-examination of the amyloid hypothesis. *Trends Neurosci.* *21*, 15–19.
- Ni, Y., Zhao, X., Bao, G., Zou, L., Teng, L., Wang, Z., Song, M., Xiong, J., Bai, Y., und Pei, G. (2006). Activation of beta2-adrenergic receptor stimulates gamma-secretase activity and accelerates amyloid plaque formation. *Nat. Med.* *12*, 1390–1396.
- Nikolaev, A., McLaughlin, T., O'Leary, D.D.M., und Tessier-Lavigne, M. (2009). APP binds DR6 to trigger axon pruning and neuron death via distinct caspases. *Nature* *457*, 981–989.
- Nishida, Y., Arakawa, S., Fujitani, K., Yamaguchi, H., Mizuta, T., Kanaseki, T., Komatsu, M., Otsu, K., Tsujimoto, Y., und Shimizu, S. (2009). Discovery of Atg5/Atg7-independent alternative macroautophagy. *Nature* *461*, 654–658.
- Nishimoto, I., Okamoto, T., Matsuura, Y., Takahashi, S., Okamoto, T., Murayama, Y., und Ogata, E. (1993). Alzheimer amyloid protein precursor complexes with brain GTP-binding protein G(o). *Nature* *362*, 75–79.
- Nitsch, R.M., Slack, B.E., Wurtman, R.J., und Growdon, J.H. (1992). Release of Alzheimer amyloid precursor derivatives stimulated by activation of muscarinic acetylcholine receptors. *Science* *258*, 304–307.
- Nixon, R.A., Wegiel, J., Kumar, A., Yu, W.H., Peterhoff, C., Cataldo, A., und Cuervo, A.M. (2005). Extensive involvement of autophagy in Alzheimer disease: an immuno-electron microscopy study. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* *64*, 113–122.
- Nixon, R.A., Yang, D.-S., und Lee, J.-H. (2008). Neurodegenerative lysosomal disorders: a continuum from development to late age. *Autophagy* *4*, 590–599.
- Noonan, J., Tanveer, R., Klompas, A., Gowran, A., McKiernan, J., und Campbell, V.A. (2010).

6. Literaturverzeichnis

- Endocannabinoids prevent beta-amyloid-mediated lysosomal destabilization in cultured neurons. *J. Biol. Chem.* *285*, 38543–38554.
- Nunan, J., Shearman, M.S., Checler, F., Cappai, R., Evin, G., Beyreuther, K., Masters, C.L., and Small, D.H. (2001). The C-terminal fragment of the Alzheimer's disease amyloid protein precursor is degraded by a proteasome-dependent mechanism distinct from gamma-secretase. *Eur. J. Biochem. FEBS* *268*, 5329–5336.
- Oakley, H., Cole, S.L., Logan, S., Maus, E., Shao, P., Craft, J., Guillozet-Bongaarts, A., Ohno, M., Disterhoft, J., Van Eldik, L., et al. (2006). Intraneuronal beta-amyloid aggregates, neurodegeneration, and neuron loss in transgenic mice with five familial Alzheimer's disease mutations: potential factors in amyloid plaque formation. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *26*, 10129–10140.
- Oddo, S., Billings, L., Kesslak, J.P., Cribbs, D.H., and LaFerla, F.M. (2004). Abeta immunotherapy leads to clearance of early, but not late, hyperphosphorylated tau aggregates via the proteasome. *Neuron* *43*, 321–332.
- Ofek, O., Karsak, M., Leclerc, N., Fogel, M., Frenkel, B., Wright, K., Tam, J., Attar-Namdar, M., Kram, V., Shohami, E., et al. (2006). Peripheral cannabinoid receptor, CB2, regulates bone mass. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 696–701.
- Oh, H.-A., Kwon, S., Choi, S., Shin, H., Yoon, K.H., Kim, W.J., and Lim, H.J. (2013). Uncovering a role for endocannabinoid signaling in autophagy in preimplantation mouse embryos. *Mol. Hum. Reprod.* *19*, 93–101.
- Ohno-Shosaku, T., Maejima, T., and Kano, M. (2001). Endogenous cannabinoids mediate retrograde signals from depolarized postsynaptic neurons to presynaptic terminals. *Neuron* *29*, 729–738.
- Okamoto, T., Takeda, S., Murayama, Y., Ogata, E., and Nishimoto, I. (1995). Ligand-dependent G protein coupling function of amyloid transmembrane precursor. *J. Biol. Chem.* *270*, 4205–4208.
- Okamoto, T., Takeda, S., Giambarella, U., Murayama, Y., Matsui, T., Katada, T., Matsuura, Y., and Nishimoto, I. (1996). Intrinsic signaling function of APP as a novel target of three V642 mutations linked to familial Alzheimer's disease. *EMBO J.* *15*, 3769–3777.
- O'Keefe, L., Simcocks, A.C., Hryciw, D.H., Mathai, M.L., and McAinch, A.J. (2013). The cannabinoid receptor 1 and its role in influencing peripheral metabolism. *Diabetes Obes. Metab.*
- Orgogozo, J.-M., Gilman, S., Dartigues, J.-F., Laurent, B., Puel, M., Kirby, L.C., Jouanny, P., Dubois, B., Eisner, L., Flitman, S., et al. (2003). Subacute meningoencephalitis in a subset of patients with AD after Abeta42 immunization. *Neurology* *61*, 46–54.
- O'Sullivan, S.E. (2007). Cannabinoids go nuclear: evidence for activation of peroxisome proliferator-activated receptors. *Br. J. Pharmacol.* *152*, 576–582.
- O'Sullivan, S.E., and Kendall, D.A. (2010). Cannabinoid activation of peroxisome proliferator-activated receptors: potential for modulation of inflammatory disease. *Immunobiology* *215*, 611–616.

6. Literaturverzeichnis

- Pagotto, U., Marsicano, G., Cota, D., Lutz, B., und Pasquali, R. (2006). The emerging role of the endocannabinoid system in endocrine regulation and energy balance. *Endocr. Rev.* *27*, 73–100.
- Pankiv, S., Clausen, T.H., Lamark, T., Brech, A., Bruun, J.-A., Outzen, H., Øvervatn, A., Bjørkøy, G., und Johansen, T. (2007). p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. *J. Biol. Chem.* *282*, 24131–24145.
- Parvathy, S., Hussain, I., Karran, E.H., Turner, A.J., und Hooper, N.M. (1999). Cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by alpha-secretase occurs at the surface of neuronal cells. *Biochemistry (Mosc.)* *38*, 9728–9734.
- Pasinetti, G.M., Zhao, Z., Qin, W., Ho, L., Shrishailam, Y., Macgrogan, D., Ressmann, W., Humala, N., Liu, X., Romero, C., et al. (2007). Caloric intake and Alzheimer's disease. Experimental approaches and therapeutic implications. *Interdiscip. Top. Gerontol.* *35*, 159–175.
- Peng, Y., Hu, Y., Xu, S., Feng, N., Wang, L., und Wang, X. (2011). L-3-n-butylphthalide regulates amyloid precursor protein processing by PKC and MAPK pathways in SK-N-SH cells over-expressing wild type human APP695. *Neurosci. Lett.* *487*, 211–216.
- Pertwee, R.G. (1997). Pharmacology of cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Pharmacol. Ther.* *74*, 129–180.
- Pfaffl, M.W., Horgan, G.W., und Dempfle, L. (2002). Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res.* *30*, e36.
- Pickel, V.M., Chan, J., Kash, T.L., Rodríguez, J.J., und MacKie, K. (2004). Compartment-specific localization of cannabinoid 1 (CB1) and mu-opioid receptors in rat nucleus accumbens. *Neuroscience* *127*, 101–112.
- Pickford, F., Masliah, E., Britschgi, M., Lucin, K., Narasimhan, R., Jaeger, P.A., Small, S., Spencer, B., Rockenstein, E., Levine, B., et al. (2008). The autophagy-related protein beclin 1 shows reduced expression in early Alzheimer disease and regulates amyloid beta accumulation in mice. *J. Clin. Invest.* *118*, 2190–2199.
- Pietrzik, C., und Behl, C. (2005). Concepts for the treatment of Alzheimer's disease: molecular mechanisms and clinical application. *Int. J. Exp. Pathol.* *86*, 173–185.
- Piyanova, A., Albayram, O., Rossi, C.A., Farwanah, H., Michel, K., Nicotera, P., Sandhoff, K., und Bilkei-Gorzo, A. (2013). Loss of CB1 receptors leads to decreased cathepsin D levels and accelerated lipofuscin accumulation in the hippocampus. *Mech. Ageing Dev.*
- Popovic, D., Akutsu, M., Novak, I., Harper, J.W., Behrends, C., und Dikic, I. (2012). Rab GTPase-activating proteins in autophagy: regulation of endocytic and autophagy pathways by direct binding to human ATG8 modifiers. *Mol. Cell. Biol.* *32*, 1733–1744.
- Powers, E.T., Morimoto, R.I., Dillin, A., Kelly, J.W., und Balch, W.E. (2009). Biological and chemical approaches to diseases of proteostasis deficiency. *Annu. Rev. Biochem.* *78*, 959–991.
- Powers, R.W., 3rd, Kaeberlein, M., Caldwell, S.D., Kennedy, B.K., und Fields, S. (2006). Extension

6. Literaturverzeichnis

- of chronological life span in yeast by decreased TOR pathway signaling. *Genes Dev.* *20*, 174–184.
- Price, D.A., Martinez, A.A., Seillier, A., Koek, W., Acosta, Y., Fernandez, E., Strong, R., Lutz, B., Marsicano, G., Roberts, J.L., et al. (2009). WIN55,212-2, a cannabinoid receptor agonist, protects against nigrostriatal cell loss in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson's disease. *Eur. J. Neurosci.* *29*, 2177–2186.
- Quarta, C., Mazza, R., Obici, S., Pasquali, R., and Pagotto, U. (2011). Energy balance regulation by endocannabinoids at central and peripheral levels. *Trends Mol. Med.* *17*, 518–526.
- Rabinowicz, A.L., Starkstein, S.E., Leiguarda, R.C., and Coleman, A.E. (2000). Transient epileptic amnesia in dementia: a treatable unrecognized cause of episodic amnesic wandering. *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.* *14*, 231–233.
- Ramírez, B.G., Blázquez, C., Gómez del Pulgar, T., Guzmán, M., and de Ceballos, M.L. (2005). Prevention of Alzheimer's disease pathology by cannabinoids: neuroprotection mediated by blockade of microglial activation. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *25*, 1904–1913.
- Reynolds, A., Leake, D., Boese, Q., Scaringe, S., Marshall, W.S., and Khvorova, A. (2004). Rational siRNA design for RNA interference. *Nat. Biotechnol.* *22*, 326–330.
- Riley, K.P., Snowdon, D.A., Desrosiers, M.F., and Markesbery, W.R. (2005). Early life linguistic ability, late life cognitive function, and neuropathology: findings from the Nun Study. *Neurobiol. Aging* *26*, 341–347.
- Rinaldi-Carmona, M., Barth, F., Héaulme, M., Shire, D., Calandra, B., Congy, C., Martinez, S., Maruani, J., Néliat, G., and Caput, D. (1994). SR141716A, a potent and selective antagonist of the brain cannabinoid receptor. *FEBS Lett.* *350*, 240–244.
- Rosen, D.R., Martin-Morris, L., Luo, L.Q., and White, K. (1989). A *Drosophila* gene encoding a protein resembling the human beta-amyloid protein precursor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *86*, 2478–2482.
- Salazar, M., Carracedo, A., Salanueva, I.J., Hernández-Tiedra, S., Lorente, M., Egia, A., Vázquez, P., Blázquez, C., Torres, S., García, S., et al. (2009). Cannabinoid action induces autophagy-mediated cell death through stimulation of ER stress in human glioma cells. *J. Clin. Invest.* *119*, 1359–1372.
- Sandbrink, R., Masters, C.L., and Beyreuther, K. (1996). APP gene family. Alternative splicing generates functionally related isoforms. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *777*, 281–287.
- Sannerud, R., and Annaert, W. (2009). Trafficking, a key player in regulated intramembrane proteolysis. *Semin. Cell Dev. Biol.* *20*, 183–190.
- Sarnataro, D., Grimaldi, C., Pisanti, S., Gaggero, P., Laezza, C., Zurzolo, C., and Bifulco, M. (2005). Plasma membrane and lysosomal localization of CB1 cannabinoid receptor are dependent on lipid rafts and regulated by anandamide in human breast cancer cells. *FEBS Lett.* *579*, 6343–6349.
- Sastre, M., Steiner, H., Fuchs, K., Capell, A., Multhaup, G., Condrón, M.M., Teplow, D.B., and

6. Literaturverzeichnis

- Haass, C. (2001). Presenilin-dependent gamma-secretase processing of beta-amyloid precursor protein at a site corresponding to the S3 cleavage of Notch. *EMBO Rep.* 2, 835–841.
- Sastre, M., Dewachter, I., Rossner, S., Bogdanovic, N., Rosen, E., Borghgraef, P., Evert, B.O., Dumitrescu-Ozimek, L., Thal, D.R., Landreth, G., et al. (2006). Nonsteroidal anti-inflammatory drugs repress beta-secretase gene promoter activity by the activation of PPARgamma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 443–448.
- Schellenberg, G.D., und Montine, T.J. (2012). The genetics and neuropathology of Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 124, 305–323.
- Schenk, D., Basi, G.S., und Pangalos, M.N. (2012). Treatment strategies targeting amyloid β -protein. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2, a006387.
- Selkoe, D.J. (1999). Translating cell biology into therapeutic advances in Alzheimer's disease. *Nature* 399, A23–31.
- Selkoe, D.J. (2001). Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol. Rev.* 81, 741–766.
- Selkoe, D.J., American College of Physicians, and American Physiological Society (2004). Alzheimer disease: mechanistic understanding predicts novel therapies. *Ann. Intern. Med.* 140, 627–638.
- Sennvik, K., Fastbom, J., Blomberg, M., Wahlund, L.O., Winblad, B., und Benedikz, E. (2000). Levels of alpha- and beta-secretase cleaved amyloid precursor protein in the cerebrospinal fluid of Alzheimer's disease patients. *Neurosci. Lett.* 278, 169–172.
- Shoemaker, J.L., Seely, K.A., Reed, R.L., Crow, J.P., und Prather, P.L. (2007). The CB2 cannabinoid agonist AM-1241 prolongs survival in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis when initiated at symptom onset. *J. Neurochem.* 101, 87–98.
- Van Sickle, M.D., Duncan, M., Kingsley, P.J., Mouihate, A., Urbani, P., Mackie, K., Stella, N., Makriyannis, A., Piomelli, D., Davison, J.S., et al. (2005). Identification and functional characterization of brainstem cannabinoid CB2 receptors. *Science* 310, 329–332.
- Slipetz, D.M., O'Neill, G.P., Favreau, L., Dufresne, C., Gallant, M., Gareau, Y., Guay, D., Labelle, M., und Metters, K.M. (1995). Activation of the human peripheral cannabinoid receptor results in inhibition of adenylyl cyclase. *Mol. Pharmacol.* 48, 352–361.
- Soba, P., Eggert, S., Wagner, K., Zentgraf, H., Siehl, K., Kreger, S., Löwer, A., Langer, A., Merdes, G., Paro, R., et al. (2005). Homo- and heterodimerization of APP family members promotes intercellular adhesion. *EMBO J.* 24, 3624–3634.
- Song, Z.H., Slowey, C.A., Hurst, D.P., und Reggio, P.H. (1999). The difference between the CB(1) and CB(2) cannabinoid receptors at position 5.46 is crucial for the selectivity of WIN55212-2 for CB(2). *Mol. Pharmacol.* 56, 834–840.
- Spilman, P., Podlutskaya, N., Hart, M.J., Debnath, J., Gorostiza, O., Bredesen, D., Richardson, A., Strong, R., und Galvan, V. (2010). Inhibition of mTOR by rapamycin abolishes cognitive deficits and reduces amyloid-beta levels in a mouse model of Alzheimer's disease. *PLoS ONE* 5, e9979.

6. Literaturverzeichnis

- Spires, T.L., und Hyman, B.T. (2005). Transgenic models of Alzheimer's disease: learning from animals. *NeuroRx J. Am. Soc. Exp. Neurother.* 2, 423–437.
- Steffens, S., Veillard, N.R., Arnaud, C., Pelli, G., Burger, F., Staub, C., Karsak, M., Zimmer, A., Frossard, J.-L., und Mach, F. (2005). Low dose oral cannabinoid therapy reduces progression of atherosclerosis in mice. *Nature* 434, 782–786.
- Stein, T.D., Anders, N.J., DeCarli, C., Chan, S.L., Mattson, M.P., und Johnson, J.A. (2004). Neutralization of transthyretin reverses the neuroprotective effects of secreted amyloid precursor protein (APP) in APPSW mice resulting in tau phosphorylation and loss of hippocampal neurons: support for the amyloid hypothesis. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 24, 7707–7717.
- Stella, N. (2010). Cannabinoid and cannabinoid-like receptors in microglia, astrocytes, and astrocytomas. *Glia* 58, 1017–1030.
- Van der Stelt, M., und Di Marzo, V. (2003). The endocannabinoid system in the basal ganglia and in the mesolimbic reward system: implications for neurological and psychiatric disorders. *Eur. J. Pharmacol.* 480, 133–150.
- Storey, E., Beyreuther, K., und Masters, C.L. (1996). Alzheimer's disease amyloid precursor protein on the surface of cortical neurons in primary culture co-localizes with adhesion patch components. *Brain Res.* 735, 217–231.
- Strittmatter, W.J., Saunders, A.M., Schmechel, D., Pericak-Vance, M., Enghild, J., Salvesen, G.S., und Roses, A.D. (1993). Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 1977–1981.
- De Strooper, B. (2010). Proteases and proteolysis in Alzheimer disease: a multifactorial view on the disease process. *Physiol. Rev.* 90, 465–494.
- De Strooper, B., Saftig, P., Craessaerts, K., Vanderstichele, H., Guhde, G., Annaert, W., Von Figura, K., und Van Leuven, F. (1998). Deficiency of presenilin-1 inhibits the normal cleavage of amyloid precursor protein. *Nature* 391, 387–390.
- Stumm, C. (2011). Der Einfluss des Endocannabinoidsystems auf die Alzheimer Pathologie. Univ.-Bibl. Johannes-Gutenberg Univ. Mainz *Dissertation*.
- Stumm, C., und Hiebel, C., Hanstein, R., Purrio, M., Nagel, H., Conrad, A., Lutz, B., Behl, C., und Clement, A.B. (2013). Cannabinoid receptor 1 deficiency in a mouse model of Alzheimer's disease leads to enhanced cognitive impairment despite of a reduction in amyloid deposition. *Neurobiol. Aging* 34, 2574–2584.
- Sturchler-Pierrat, C., Abramowski, D., Duke, M., Wiederhold, K.H., Mistl, C., Rothacher, S., Ledermann, B., Bürki, K., Frey, P., Paganetti, P.A., et al. (1997). Two amyloid precursor protein transgenic mouse models with Alzheimer disease-like pathology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 13287–13292.
- Su, Y., Ryder, J., und Ni, B. (2003). Inhibition of Abeta production and APP maturation by a specific PKA inhibitor. *FEBS Lett.* 546, 407–410.

6. Literaturverzeichnis

- Sugiura, T., Kondo, S., Sukagawa, A., Nakane, S., Shinoda, A., Itoh, K., Yamashita, A., und Waku, K. (1995). 2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *215*, 89–97.
- Suzuki, K., und Ohsumi, Y. (2007). Molecular machinery of autophagosome formation in yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* *581*, 2156–2161.
- Suzuki, K., und Terry, R.D. (1967). Fine structural localization of acid phosphatase in senile plaques in Alzheimer's presenile dementia. *Acta Neuropathol. (Berl.)* *8*, 276–284.
- Tamboli, I.Y., Hampel, H., Tien, N.T., Tolksdorf, K., Breiden, B., Mathews, P.M., Saftig, P., Sandhoff, K., und Walter, J. (2011). Sphingolipid storage affects autophagic metabolism of the amyloid precursor protein and promotes Abeta generation. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *31*, 1837–1849.
- Tanida, I. (2011). Autophagosome formation and molecular mechanism of autophagy. *Antioxidants Redox Signal.* *14*, 2201–2214.
- Taylor, C.J., Ireland, D.R., Ballagh, I., Bourne, K., Marechal, N.M., Turner, P.R., Bilkey, D.K., Tate, W.P., und Abraham, W.C. (2008). Endogenous secreted amyloid precursor protein-alpha regulates hippocampal NMDA receptor function, long-term potentiation and spatial memory. *Neurobiol. Dis.* *31*, 250–260.
- Teng, L., Zhao, J., Wang, F., Ma, L., und Pei, G. (2010). A GPCR/secretase complex regulates beta- and gamma-secretase specificity for Abeta production and contributes to AD pathogenesis. *Cell Res.* *20*, 138–153.
- Thathiah, A., und De Strooper, B. (2011). The role of G protein-coupled receptors in the pathology of Alzheimer's disease. *Nat. Rev. Neurosci.* *12*, 73–87.
- Thathiah, A., Spittaels, K., Hoffmann, M., Staes, M., Cohen, A., Horr , K., Vanbrabant, M., Coun, F., Baekelandt, V., Delacourte, A., et al. (2009). The orphan G protein-coupled receptor 3 modulates amyloid-beta peptide generation in neurons. *Science* *323*, 946–951.
- Tian, S., Lin, J., Jun Zhou, J., Wang, X., Li, Y., Ren, X., Yu, W., Zhong, W., Xiao, J., Sheng, F., et al. (2010). Beclin 1-independent autophagy induced by a Bcl-XL/Bcl-2 targeting compound, Z18. *Autophagy* *6*, 1032–1041.
- Tian, Y., Bustos, V., Flajolet, M., und Greengard, P. (2011). A small-molecule enhancer of autophagy decreases levels of Abeta and APP-CTF via Atg5-dependent autophagy pathway. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *25*, 1934–1942.
- Tyedmers, J., Mogk, A., und Bukau, B. (2010). Cellular strategies for controlling protein aggregation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *11*, 777–788.
- Ueda, N., Tsuboi, K., und Uyama, T. (2013). Metabolism of endocannabinoids and related N-acylethanolamines: canonical and alternative pathways. *FEBS J.* *280*, 1874–1894.
- Vara, D., Salazar, M., Olea-Herrero, N., Guzmán, M., Velasco, G., und Díaz-Laviada, I. (2011). Anti-tumoral action of cannabinoids on hepatocellular carcinoma: role of AMPK-dependent

6. Literaturverzeichnis

activation of autophagy. *Cell Death Differ.* 18, 1099–1111.

Varma, N., Carlson, G.C., Ledent, C., und Alger, B.E. (2001). Metabotropic glutamate receptors drive the endocannabinoid system in hippocampus. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 21, RC188.

Vetrivel, K.S., Cheng, H., Lin, W., Sakurai, T., Li, T., Nukina, N., Wong, P.C., Xu, H., und Thinakaran, G. (2004). Association of gamma-secretase with lipid rafts in post-Golgi and endosome membranes. *J. Biol. Chem.* 279, 44945–44954.

Vloeberghs, E., Van Dam, D., Coen, K., Staufenbiel, M., und De Deyn, P.P. (2006). Aggressive male APP23 mice modeling behavioral alterations in dementia. *Behav. Neurosci.* 120, 1380–1383.

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

Wasco, W., Bupp, K., Magendantz, M., Gusella, J.F., Tanzi, R.E., und Solomon, F. (1992). Identification of a mouse brain cDNA that encodes a protein related to the Alzheimer disease-associated amyloid beta protein precursor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 10758–10762.

Wasco, W., Gurubhagavatula, S., Paradis, M.D., Romano, D.M., Sisodia, S.S., Hyman, B.T., Neve, R.L., und Tanzi, R.E. (1993). Isolation and characterization of APLP2 encoding a homologue of the Alzheimer's associated amyloid beta protein precursor. *Nat. Genet.* 5, 95–100.

Weggen, S., Eriksen, J.L., Das, P., Sagi, S.A., Wang, R., Pietrzik, C.U., Findlay, K.A., Smith, T.E., Murphy, M.P., Bulter, T., et al. (2001). A subset of NSAIDs lower amyloidogenic Abeta42 independently of cyclooxygenase activity. *Nature* 414, 212–216.

Weidemann, A., König, G., Bunke, D., Fischer, P., Salbaum, J.M., Masters, C.L., und Beyreuther, K. (1989). Identification, biogenesis, and localization of precursors of Alzheimer's disease A4 amyloid protein. *Cell* 57, 115–126.

Weyer, S.W., Klevanski, M., Delekate, A., Voikar, V., Aydin, D., Hick, M., Filippov, M., Drost, N., Schaller, K.L., Saar, M., et al. (2011). APP and APLP2 are essential at PNS and CNS synapses for transmission, spatial learning and LTP. *EMBO J.* 30, 2266–2280.

WHO (2012). WHO | Good health adds life to years: Global brief for World Health Day 2012. World Heal. Organ.

Wilkinson, K.D., Urban, M.K., und Haas, A.L. (1980). Ubiquitin is the ATP-dependent proteolysis factor I of rabbit reticulocytes. *J. Biol. Chem.* 255, 7529–7532.

Williamson, L.L., Sholar, P.W., Mistry, R.S., Smith, S.H., und Bilbo, S.D. (2011). Microglia and memory: modulation by early-life infection. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 31, 15511–15521.

Wilson, R.I., und Nicoll, R.A. (2001). Endogenous cannabinoids mediate retrograde signalling at hippocampal synapses. *Nature* 410, 588–592.

Wirths, O., Multhaup, G., und Bayer, T.A. (2004). A modified beta-amyloid hypothesis: intraneuronal accumulation of the beta-amyloid peptide--the first step of a fatal cascade. *J.*

6. Literaturverzeichnis

Neurochem. *91*, 513–520.

Wirhth, O., Weis, J., Szczygielski, J., Multhaup, G., und Bayer, T.A. (2006). Axonopathy in an APP/PS1 transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol. (Berl.)* *111*, 312–319.

Wisniewski, K.E., Dalton, A.J., McLachlan, C., Wen, G.Y., und Wisniewski, H.M. (1985). Alzheimer's disease in Down's syndrome: clinicopathologic studies. *Neurology* *35*, 957–961.

Wolozin, B., Hirashima, N., Luo, Y., Li, Y.H., Alkon, D.L., Etcheberrigaray, R., und Sunderland, T. (1995). Transforming growth factor beta induces a beta-responsive calcium fluxes in neurons. *Neuroreport* *6*, 1429–1433.

Wong, E., und Cuervo, A.M. (2010). Autophagy gone awry in neurodegenerative diseases. *Nat. Neurosci.* *13*, 805–811.

Yamaguchi, H., Hirai, S., Morimatsu, M., Shoji, M., und Nakazato, Y. (1989). Diffuse type of senile plaques in the cerebellum of Alzheimer-type dementia demonstrated by beta protein immunostain. *Acta Neuropathol. (Berl.)* *77*, 314–319.

Yankner, B.A., Duffy, L.K., und Kirschner, D.A. (1990). Neurotrophic and neurotoxic effects of amyloid beta protein: reversal by tachykinin neuropeptides. *Science* *250*, 279–282.

Yu, C., Kim, S.H., Ikeuchi, T., Xu, H., Gasparini, L., Wang, R., und Sisodia, S.S. (2001). Characterization of a presenilin-mediated amyloid precursor protein carboxyl-terminal fragment gamma. Evidence for distinct mechanisms involved in gamma -secretase processing of the APP and Notch1 transmembrane domains. *J. Biol. Chem.* *276*, 43756–43760.

Yu, W.H., Cuervo, A.M., Kumar, A., Peterhoff, C.M., Schmidt, S.D., Lee, J.-H., Mohan, P.S., Mercken, M., Farmery, M.R., Tjernberg, L.O., et al. (2005). Macroautophagy--a novel Beta-amyloid peptide-generating pathway activated in Alzheimer's disease. *J. Cell Biol.* *171*, 87–98.

Zheng, H., und Koo, E.H. (2006). The amyloid precursor protein: beyond amyloid. *Mol. Neurodegener.* *1*, 5.

Zhong, Y., Wang, Q.J., Li, X., Yan, Y., Backer, J.M., Chait, B.T., Heintz, N., und Yue, Z. (2009). Distinct regulation of autophagic activity by Atg14L and Rubicon associated with Beclin 1-phosphatidylinositol-3-kinase complex. *Nat. Cell Biol.* *11*, 468–476.

Zhou, F., Yang, Y., und Xing, D. (2011). Bcl-2 and Bcl-xL play important roles in the crosstalk between autophagy and apoptosis. *FEBS J.* *278*, 403–413.

Zhu, J.-H., Horbinski, C., Guo, F., Watkins, S., Uchiyama, Y., und Chu, C.T. (2007). Regulation of autophagy by extracellular signal-regulated protein kinases during 1-methyl-4-phenylpyridinium-induced cell death. *Am. J. Pathol.* *170*, 75–86.

Zhu, X., Lee, H., Raina, A.K., Perry, G., und Smith, M.A. (2002). The role of mitogen-activated protein kinase pathways in Alzheimer's disease. *Neurosignals* *11*, 270–281.

Zimmer, A., Zimmer, A.M., Hohmann, A.G., Herkenham, M., und Bonner, T.I. (1999). Increased mortality, hypoactivity, and hypoalgesia in cannabinoid CB1 receptor knockout mice. *Proc. Natl.*

6. Literaturverzeichnis

Acad. Sci. U. S. A. 96, 5780–5785.

Zygmunt, P.M., Petersson, J., Andersson, D.A., Chuang, H., Sørård, M., Di Marzo, V., Julius, D., und Högestätt, E.D. (1999). Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. *Nature* 400, 452–457.

7. Anhang

7.1. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: APP-Homologe und -Isoformen.....	6
Abbildung 2: APP-Prozessierung.....	8
Abbildung 3: Formen der Autophagie und makroautophagische Regulationswege.....	13
Abbildung 4: Strukturformeln einiger Cannabinoide.....	18
Abbildung 5: Durch den CB1-Rezeptor vermittelte Signaltransduktion.....	20
Abbildung 6: Charakterisierung des APP23xCBN-Mausstamms.....	56
Abbildung 7: Reduzierte GFAP-Färbung in APP23/CB1 ^{-/-} gegenüber APP23-Tieren.....	57
Abbildung 8: Gliose in APP23/CB1 ^{-/-} und APP23-Mäusen.....	58
Abbildung 9: CB1-Überexpression erhöht die Menge an proteolytischen APP-Fragmenten.....	60
Abbildung 10: Herunterregulation des endogenen CB1 in N2A-Zellen.....	61
Abbildung 11: Pharmakologische Inhibition der CB1-Signalwege.....	63
Abbildung 12: Indikatoren des autophagischen/lysosomalen Systems in APP23xCBN-Mäusen.....	65
Abbildung 13: Herunterregulation des CB1-Rezeptors erhöht den autophagischen Flux.....	66
Abbildung 14: HEK-Zellen mit reduziertem CB1-Spiegel bilden mehr autophagische Vesikel.....	67
Abbildung 15: CB1-Herunterregulation beeinflusst nicht die proteasomale Aktivität.....	68
Abbildung 16: Überexpression des CB1-Rezeptors in HEK-Zellen.....	69
Abbildung 17: CB1-Rezeptor-Aktivität moduliert den autophagischen Flux.....	71
Abbildung 18: Unveränderte lysosomale Aktivität nach CB1-Herunterregulation.....	72
Abbildung 19: Lysosomendichte nach CB1-Herunterregulation.....	73
Abbildung 20: Modulation des autophagischen Fluxes durch CB1 unabhängig von p-mTOR.....	75
Abbildung 21: Rimonabant wirkt der BECLIN1-Herunterregulation entgegen.....	76
Abbildung 22: Regulation der APP-Prozessierung durch den CB1-Rezeptor.....	86
Abbildung 23: Nicht-kanonische Regulation des autophagischen Fluxes durch den CB1.....	95

7.2. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Gen-Produkte die im Zusammenhang mit dem Auftreten der fAD stehen.....	4
Tabelle 2: Plasmide.....	28
Tabelle 3: Primer.....	28
Tabelle 4: siRNA (Sense-Strang).....	29
Tabelle 5: Primär-Antikörper.....	29
Tabelle 6: Sekundär-Antikörper.....	30
Tabelle 7: Protein- und DNA-Größenmarker.....	30
Tabelle 8: Chemikalien und Reagenzien.....	30
Tabelle 9: Reagenzienansätze.....	32
Tabelle 10: Geräteverzeichnis.....	36
Tabelle 11: Firmenregister.....	36
Tabelle 12: Stabil-transgene Zelllinien.....	47
Tabelle 13: Genregulation nach CB1-siRNA Transfektion (normiert auf Nonesense-siRNA).....	79

7.3. Publikationen

Morawe, T., **Hiebel, C.**, Kern, A., and Behl, C.* (2012). *Protein Homeostasis, Aging and Alzheimer's Disease*. Mol. Neurobiol. *corresponding author

Stumm, C.¹, **Hiebel, C.**¹, Hanstein, R., Purrio, M., Nagel, H., Conrad, A., Lutz, B., Behl, C.* , and Clement, A.B*. (2013). *Cannabinoid receptor 1 deficiency in a mouse model of Alzheimer's disease leads to enhanced cognitive impairment despite of a reduction in amyloid deposition*. Neurobiol. Aging 34, 2574–2584. ¹equal contribution *corresponding authors

In Vorbereitung:

Hiebel, C., Kromm, T., Stark, M., and Behl, C. *Cannabinoid receptor 1 modulates autophagic activity independent of mTOR- and BECLIN1-complex*

Spang, N., Feldmann A., **Hiebel C.**, Huesmann H., Koziollek-Drechsler I., Jung J., Behrends C., Dikic I., Kern A., and Behl, C. *The RAB3GAP complex is essential for basal and Rapamycin-induced autophagy*