

Der Einfluss des Endocannabinoidsystems auf die Alzheimer Pathologie

Dissertation

zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften

dem Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz
vorgelegt von

Christoph Stumm

geboren in Mainz

Mainz, 2011

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 17.06.2011

Die vorliegende Dissertation wurde unter Anleitung und Anregung von Prof. _____
am Institut für Pathobiochemie der Universitätsmedizin an der Johannes Gutenberg-
Universität, Mainz, angefertigt.

Die wesentlichen Ergebnisse dieser Arbeit werden in einer wissenschaftlichen Publikation
veröffentlicht, die im Anhang aufgelistet ist.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Die Alzheimer Krankheit	1
1.1.1	Krankheitsbild des Morbus Alzheimer	2
1.1.2	Die Histopathologie der Alzheimer Krankheit	2
1.1.3	Genetik des Morbus Alzheimer	5
1.1.4	Das Amyloid Vorläuferprotein	6
1.1.5	Tiermodelle der Alzheimer Krankheit	11
1.2	Das Cannabinoidsystem	15
1.2.1	Cannabinoid	16
1.2.2	Biosynthese und Metabolismus endogener Cannabinoide	18
1.2.3	Signaltransduktion im endogenen Cannabinoidsystem (ECS)	18
1.2.4	Physiologische Funktion des ECS	20
1.3	Neuroprotektive Eigenschaften des ECS im ZNS	22
1.3.1	Die Interaktion des ECS in der Alzheimer Krankheit	26
1.4	Zielsetzung der Arbeit	28
2	Material und Methoden	29
2.1	Material	29
2.1.1	Chemikalien	29
2.1.2	Geräte	31
2.1.3	Puffer und Lösungen	33
2.1.4	Kulturmedien	37
2.1.5	Antikörper	38
2.1.6	Oligonukleotide	40
2.1.7	Mausstämme	41
2.1.8	Cannabinoid	42
2.2	Methoden	44
2.2.1	Klonale Zelllinien	44

2.2.2	Immunhistochemische Methoden	46
2.2.3	Molekularbiologische Methoden	48
2.2.4	Proteinbiochemische Methoden	53
2.2.5	Tierexperimente	57
2.2.6	Statistik	66
3	Ergebnisse	67
3.1	Der Einfluss von Cannabinoiden auf die APP-Prozessierung	67
3.1.1	<i>In vitro</i> Analyse der APP-Prozessierung in humanen Neuroblastoma SH-SY5Y- und murinen N2A-Swe Zellen	67
3.1.2	Biochemische Untersuchung der APP-Prozessierung in Zelllinien nach Cannabinoidbehandlung	68
3.1.3	Analyse im Western-Blot	69
3.1.4	Analyse der A β -Peptide nach Cannabinoidbehandlung	71
3.1.5	α - und β -Sekretase Aktivitätsmessungen nach Cannabinoidbehandlung	72
3.1.6	Untersuchung der α - und β -Sekretase Expression in Zelllinien nach Cannabinoidbehandlung	73
3.2	Untersuchung der Rolle des CB1-Rezeptors im APP23 Mausmodell	75
3.2.1	Charakterisierung der APP23/CBN doppelt-transgenen Mausstämme	75
3.2.2	Untersuchung der APP-Prozessierung im APP23/CBN doppelt transgenen Mausstamm	80
3.3	Der Einfluss von AAV-BRI-Aβ in CB1-Rezeptor-Knockout Mäusen	98
3.3.1	Verhaltensuntersuchung der Tiere im Morris Water-Maze	99
3.3.2	Weitere Untersuchung der Tiere	101
3.3.3	Ausblick: Der Einfluss von AAV-BRI-A β in CB1-Rezeptor-Knockout Mäusen	103
4	Diskussion	104
4.1	Der Einfluss des ECS auf das Amyloid Vorläuferprotein	105
4.1.1	APP-Prozessierung in neuronalen Zelllinien	106
4.1.2	Der Einfluss des CB1-Rezeptors im APP23 transgenen Mausmodell	110

4.2	Der Einfluss des Cannabinoidsystems in der Alzheimer Krankheit	118
4.3	Klinische Relevanz des Cannabinoidsystems in der Alzheimer Krankheit	120
5	Zusammenfassung	122
6	Literaturverzeichnis	124
7	Anhang	148
7.1	Danksagung	148
7.2	Erklärung	149
7.3	Lebenslauf	150
7.4	Publikationen	151

Abkürzungsverzeichnis

AAV	adeno-associated virus (engl.)
A β	Amyloid β Peptid
ADAM	a disintegrin and metalloprotease domain (engl.)
AEA	Anandamid
2-AG	2-Arachidonylglycerol
AICD	APP intracellular domain (engl.)
ApoE	Apolipoprotein E
APLP	APP-like protein (engl.)
APP	Amyloid-Vorläuferprotein (<i>Amyloid Precursor Protein</i>)
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäuren
BACE 1	β -site of APP cleaving enzyme (engl.)
BCA	Bicicolinsäure
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum Albumin
Cap	Virale Gene zur Synthese von Capsid Proteinen
CA-Region	Cornus Ammonis-Region
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CB1-R	Cannabinoid Rezeptor 1
CB2-R	Cannabinoid Rezeptor 2
cDNA	complementary DNA (engl.)
C-Terminus	Carboxy-Terminus eines Proteins oder Peptids
dH ₂ O	destilliertes Wasser
Da	Molekulargewicht in Dalton
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagles's medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECL	<i>Enhanced Chemiluminescence</i>

ECS	Endocannabinoidsystem
ELISA	enzyme linked immunosorbant assay (engl.)
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERK	extrazellulär regulierte Kinase
FAAH	Fettsäureaminhydrolase
FCS	Fötale Kälberserum
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase
GFAP	<i>Glial Fibrillary Acidic Protein</i>
h	Stunde (<i>hour</i>)
kb	Kilobasen
KO	Knockout
M	Molar
MAGL	Monoacylglycerinlipase
mAk	monoklonaler Antikörper
MAPK	mitogen-activated protein kinase (engl.)
min	Minute
mM	Millimolar
MPTP	1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridine
NADA	N-Arachidonyldopamin
NFT	neurofibrillary tangles (engl.)
NO	Stickstoffmonoxid
N-Terminus	Amino-Terminus eines Proteins oder Peptids
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>Phosphat Buffered Saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>Polymerase chain reaction</i>)
PEA	Palmithylethanolamin
PHF	paired helical filaments (engl.)
P13-K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PKA	Protein Kinase A
PPAR	peroxisom proliferation receptor (engl.)
PS	Presenilin
qPCR	quantitative PCR

ROS	reactive oxygen species (engl.)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
RNA	Ribonukleinsäure (<i>Ribonucleic acid</i>)
rpm	Umdrehungen pro Minute
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>Sodium dodecyl sulphate</i>)
sec	Sekunde
TBS	<i>Tris buffered saline</i>
TEMED	N',N',N',N'-Tetramethylethyldiamin
THC	Δ^9 -Tetrahydrocannabinol
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Einheit (<i>unit</i>)
V	Volt
v/v	volume/volume (engl.)
WT	Wildtyp
w/v	weight/volume (engl.)
w/w	weight/weight (engl.)
ZNS	zentrales Nervensystem

1 Einleitung

1.1 Die Alzheimer Krankheit

Die erstmals vom deutschen Arzt Alois Alzheimer im Jahr 1907 beschriebene und später nach ihm benannte Alzheimer Demenz (AD) ist eine irreversible neurodegenerative Erkrankung des zentralen Nervensystems (Alzheimer 1907). Epidemiologische Studien zeigen, dass die Anzahl der an AD erkrankten Menschen in den nächsten Jahren weltweit dramatisch ansteigen wird (Ferri et al. 2005). Die Ausprägung dieser Krankheit führt zu einem massiven Nervenzellverlust und zu einer Abnahme der Gehirnmasse. Des Weiteren ist die Bildung von amyloiden Plaques und Neurofibrillären-Bündeln zu beobachten. Bei den Betroffenen führen diese Veränderungen im Gehirn zu einer langsamen und progressiven Verringerung der Hirnleistung, was in der Endphase schließlich in dem kompletten Verlust der Persönlichkeit resultiert. In Deutschland sind heute etwa 1 Millionen Menschen von Morbus Alzheimer betroffen, weltweit ca. 24 Millionen Menschen. Es wird angenommen, dass diese Zahl sich alle 20 Jahre verdoppeln wird (Ferri et al. 2005). Der hauptsächliche Risikofaktor an sporadischen Formen der AD zu erkranken, ist die Alterung, wobei die molekularen Zusammenhänge bislang unklar sind (Kern & Behl 2009). Bei den über 65 jährigen erkrankt etwa 1 % an Morbus Alzheimer. Bei den über 85 jährigen sind jedoch schon 30 % betroffen, wobei bei Frauen das Risiko zur Erkrankung im Vergleich zu männlichen Individuen erhöht ist (Ferri et al. 2005; Lobo et al. 2000; Kalaria et al. 2008). Mit einer immer älter werdenden Gesellschaft ergeben sich somit zukünftig auch sozioökonomische Probleme (Ankri & Poupard 2003). Die Erforschung der Alzheimer Erkrankung stellt eine der größten Herausforderungen unserer alternden Gesellschaft dar. Nur durch die Entwicklung neuer Therapieansätze könnten die in den nächsten Jahren entstehenden Pflegekosten minimiert werden. Die neu erworbenen Erkenntnisse könnten den Betroffenen bessere Behandlungsmöglichkeiten bieten und damit einhergehend zu einer gesteigerten Lebensqualität führen.

1.1.1 Krankheitsbild des Morbus Alzheimer

Die Alzheimer Krankheit zeichnet sich durch einen schleichenden Verlust der Gehirnleistung aus. Zu Beginn der Krankheit leiden Betroffene an einer gestörten Merkfähigkeit von kürzlich erworbenen Informationen. Diese Störung des Kurzzeitgedächtnisses geht einher mit einer zeitlichen und örtlichen Orientierungslosigkeit. Im Vordergrund der sich schleichend entwickelnden Krankheit stehen des Weiteren Störungen der räumlichen Orientierung, Sprachstörungen, psychiatrische Störungen (Depression, Euphorie) und Wahnvorstellungen. Im späteren Verlauf der Demenz ist auch das Langzeitgedächtnis, bis hin zur Amnesie betroffen (Rabinowicz et al. 2000). Nach einem durchschnittlichen Verlauf von 6 bis 12 Jahren führt die Krankheit schließlich zum Tod des Patienten. Oft tritt der Tod von Erkrankten auch durch Sekundärschädigungen wie z.B. durch Infektionen der Lungen- und Harnwege ein.

1.1.2 Die Histopathologie der Alzheimer Krankheit

Die histologischen Veränderungen bei der Alzheimer Krankheit wurden erstmals von Alois Alzheimer an der 51-jährigen Patientin Auguste D. beschrieben (Alzheimer 1907). Zu den charakteristischen pathologischen Merkmalen gehören die Ausbildung von extrazellulären neuritischen Plaques, sowie die Bildung von intrazellulären neuritischen Bündeln. Einhergehend kommt es zu einem progressiven Verlust von Neuronen in den Gehirnregionen des Neocortex, Hippocampus und des limbischen Systems (Braak et al. 1996; Thal et al. 2005).

Die amyloiden Plaques treten im Zwischenzellraum des Gehirns, sowie im zerebralen Blutgefäßsystem auf (Selkoe 1999). Es gibt zwei Arten von extrazellulären Amyloid-Ablagerungen im Parenchym von menschlichen Gehirnen. Die neuritischen (senilen) Plaques und die nicht-neuritischen (diffusen) Plaques. Bei Alzheimer Patienten sind im Gehirn vermehrt neuritische Plaques zu beobachten, wohingegen gesund alternde Menschen sowohl senile als auch neuritische Plaques im Gehirn aufweisen (Braak & Braak 1997; Hardy & Selkoe 2002). Die amyloiden Plaques bestehen aus aggregierten Amyloid- β -Peptiden und sind ein Spaltprodukt des Amyloid-Vorläuferproteins (amyloid precursor protein, APP).

Diffuse Plaques bestehen hauptsächlich aus unstrukturiertem Amyloid und scheinen keinen Effekt auf angrenzende Gewebe auszuüben (Yamaguchi et al. 1989). Mikroskopisch

unterscheiden sich neuritische Plaques von diffusen Plaques durch einen verdichteten Kern des Amyloid-Proteins, umgeben von dystrophen Neuriten und aktivierten Mikrogliazellen und Astrozyten (Braak et al. 1996; Pike et al. 1994; Meyer-Luehmann et al. 2003).

Die neuritischen Plaques kommen im Wesentlichen in der grauen Hirnsubstanz vor. Initial wurde für die neuritischen Plaques beschrieben, dass diese in hohen Konzentrationen in den betroffenen Gehirnregionen zu einer Degeneration der Neurone führen können (Yankner et al. 1990). Aus heutiger Sicht wird der intrazellulären Akkumulation von A β -Peptiden in Neuronen eine zentralere Rolle als den extrazellulären Plaqueablagerungen zugesprochen (Wirhth et al. 2004). Nach dieser Theorie können die schädigenden A β -Oligomere eine erhöhte Phosphorylierung des Tau-Proteins initiieren, welche in der Degeneration des Neurons enden kann (siehe auch 1.1.4 und 1.1.5).

Als zweites morphologisches Merkmal treten in der Alzheimer Pathologie Neurofibrilläre Bündel (neurofibrillary tangles, NFT) auf. Diese Aggregate treten intrazellulär als Akkumulation von Filamenten des hyperphosphorylierten Proteins Tau auf (Brion et al. 1985) und sind paarweise helikal umeinander gewunden (paired helical filaments, PHF) (Goedert et al. 1996; Iqbal et al. 2005). Hauptbestandteil der PHFs ist das Mikrotubuli-assoziierte Protein Tau, welches im gesunden Organismus für die Synthese und die Stabilisierung der axonalen Mikrotubuli verantwortlich ist (Friedhoff et al. 2000). Dieser Bestandteil des neuronalen Cytoskellets wird in der Alzheimer Krankheit über Hyperphosphorylierung durch Kinasen in seiner physiologischen Funktion gestört, wodurch es zu Beeinträchtigungen im axonalen Transport und schließlich zum neuronalen Zelltod kommt.

Je nach Schwere der Erkrankung ist ein bestimmtes Muster des Krankheitsverlaufs im Gehirn von betroffenen Patienten zu beobachten, welches sich in Stadien einteilen lässt.

Im Krankheitsverlauf treten die Neurofibrillenbündel zuerst im transentorhinalen Cortex auf (Stadium I bis II) und sind später im entorhinalen Cortex, dem Ammonshorn des Hippocampus (limbisches System; Stadium III bis V), isocorticalen Assoziations-Cortex und sensorischen Cortex (Stadium V bis VI) zu finden (Braak & Braak 1997). Durch den andauernden Verlust von Neuronen wird die axonale Nervenweiterleitung zunehmend gestört, was sich in Alzheimer Patienten u.a. in einem Verfall der kognitiven Leistungen äußert. Neurofibrillenbündel sind nicht nur spezifisch für die Alzheimer Krankheit und können auch bei anderen neurodegenerativen Erkrankungen, wie der Niemann Pick Typ C Krankheit auftreten (Auer et al. 1995).

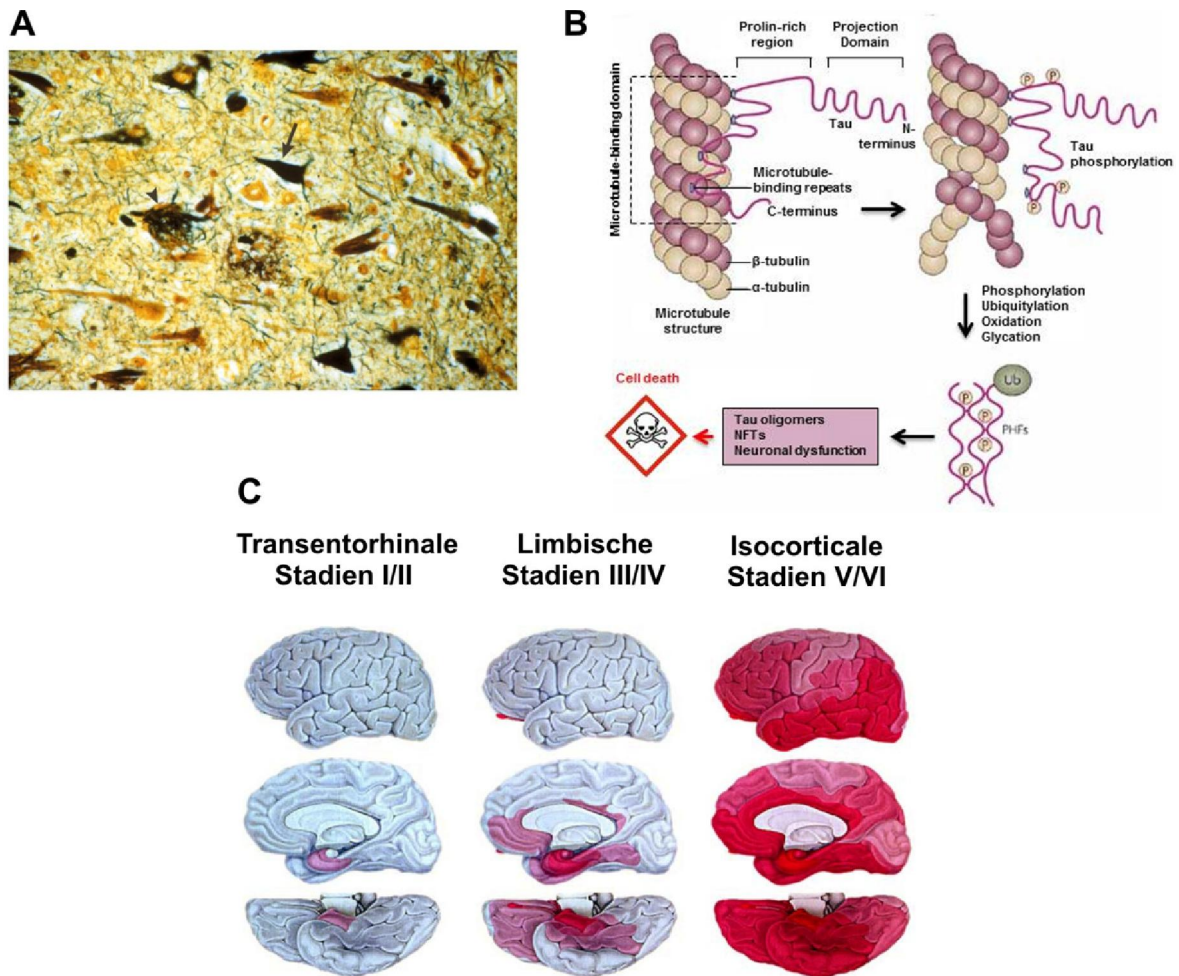


Abb. 1.1.2: Charakteristische pathologische Merkmale der Alzheimer Krankheit

(A) Ausschnitt aus dem Gehirn eines an Alzheimer verstorbenen Patienten. Es sind die für die Pathologie typischen histologischen Merkmale, die extrazellulären neuritischen Plaques (gelb) und neuritischen Bündel (schwarz) gezeigt (aus Mattson 2000).

(B) Das mikrotubuli-assoziierte Protein Tau ist Bestandteil des Cytoskeletts und für dessen Stabilität verantwortlich. Die Hyperphosphorylierung durch Kinasen führt zur Abspaltung von Tau-Proteinen aus den Mikrotubuli und zur Aggregation zu PHFs. Das Mikrotubuligerüst verliert seine Stabilität und dies führt zu einer gestörten Nervenweiterleitung, die im neuronalen Zelltod endet (Mazanetz & Fischer 2007).

(C) Auftreten von Neurofibrillenbündeln während des Krankheitsverlaufs von Morbus Alzheimer. Nach Braak et al. lässt sich der Verlauf der Krankheit in 6 Stadien einteilen: In der frühen Phase der Alzheimer Krankheit ist der transentorhinale Cortex betroffen (Stadien I bis II). In den späteren Stadien breiten sich die Neurofibrillenbündel auf den Hippocampus und das limbische System aus (Stadien III bis V). Im Endstadium sind die NFTs im isocorticalen Assoziations-Cortex und sensorischen Cortex (Stadium V bis VI) zu finden (modifiziert nach Arendt 2003).

1.1.3 Genetik des Morbus Alzheimer

Im Fokus der Alzheimer Forschung stehen die Untersuchung des Tau-Proteins, dessen Phosphorylierung zu den Neurofibrillenbündeln (siehe 1.1.2) führt, und die Erforschung des Amyloid-Vorläuferproteins (amyloid precursor protein, APP), welches die hydrophoben und toxischen Amyloid Peptide bildet. Die toxischen Hauptkomponenten der Plaques sind die 40 und 42 Aminosäuren langen Amyloid β 40 (A β 40) und Amyloid β 42 (A β 42) Peptide, die durch proteolytische Prozessierung des APP-Proteins entstehen (Selkoe 2001; Pietrzik & Behl 2005).

In der Alzheimer Krankheit können sowohl sporadische (late-onset) als auch familiäre (early-onset) Fälle auftreten. Die im Vergleich zu sporadischen Fällen (ca. 90 %) selten auftretenden und autosomal-dominant vererbten familiären Fälle (familiar Alzheimer disease, FAD) unterscheiden sich im Zeitpunkt des Auftretens der für die Alzheimer Krankheit typischen Symptome. Bei Patienten mit FAD kann die Krankheit bereits vor dem Erreichen des 65. Lebensjahr auftreten (Blennow et al. 2006), wohingegen Betroffene in sporadischen Fällen erst im späteren Alter erkranken. Die Entstehung der sporadischen Fälle ist bis zum heutigen Zeitpunkt weitgehend ungeklärt (Rocchi et al. 2003). Neben dem Hauptrisiko des Alterns in sporadischen Fällen begünstigen weitere Faktoren, wie ein erhöhter Cholesterinspiegel, hoher Blutdruck und Übergewicht das Risiko an Morbus Alzheimer zu erkranken (Kivipelto et al. 2002). Auf genetischer Ebene konnten auch Faktoren identifiziert werden, die mit einem erhöhten Risiko zur Erkrankung an Morbus Alzheimer in Verbindung stehen.

Die am häufigsten in sporadischen Fällen beschriebene genetische Anfälligkeit ist ein genetischer Polymorphismus in dem Apolipoprotein E (ApoE) Gen. Dabei ist die Expression der Isoform 4 (ApoE- ϵ 4-Allel) mit einem verstärkten Risiko zur Erkrankung an Alzheimer assoziiert (Corder et al. 1993; Saunders et al. 1993). Der Großteil der Bevölkerung trägt die Isoform 3. Das ApoE-Gen ist auf Chromosom 19 lokalisiert und ist hauptsächlich für den Cholesterin-Transport im Körper zuständig (Lin-Lee et al. 1985; Paik et al. 1985; Mahley 1988).

Für die familiären Formen der Alzheimer Pathologie wurden mehrere Gene identifiziert, an denen unter Hochdruck geforscht wird. Das Amyloid-Vorläuferprotein ist auf Chromosom 21 lokalisiert und Mutationen in diesem Gen wurden schon früh mit der FAD in Verbindung gebracht (Goate et al. 1991). Die Mutationen im APP Gen führen zu einer verstärkten

Generierung von A β -Peptiden und zu einem Beginn der Alzheimer Pathologie im mittleren Lebensabschnitt (Hardy & Selkoe 2002). Bis heute wurden weit mehr als eine Mutation auf dem APP-Gen gefunden, welche zu einer veränderten proteolytischen Prozessierung des APP-Gens führen (Haass et al. 1994). Menschen die unter dem Down Syndrom (Trisomie 21) leiden besitzen eine weitere Kopie des Chromosoms 21. Aufgrund der Tatsache, dass das APP-Gen auf diesem Chromosom codiert ist, bilden Patienten mit Down-Syndrom verstärkt amyloide Peptide und erkranken in einem Alter von etwa 40 Jahren an Alzheimer (Wisniewski et al. 1985; Lemere et al. 1996).

Als weitere autosomal dominant vererbte Mutationen wurden Gendefekte in den Presenilin 1 (PS1) und Presenilin 2 (PS2) Genen identifiziert (Sherrington et al. 1995; Barinaga 1995). Die Preseniline sind an der γ -Sekretasespaltung des APP-Proteins beteiligt. Das PS1-Gen wird auf dem Chromosom 14 und das PS2-Gen auf Chromosom 1 codiert. Beide bilden das katalytische Zentrum der γ -Sekretase (De Strooper et al. 1998; Verdile et al. 2007) und Mutationen in den Genen werden mit einer erhöhten Produktion von A β 42 in Verbindung gebracht (Suzuki et al. 1994; De Strooper 2007). Einen weiteren genetischen Risikofaktor stellt das α -2-Makroglobulin-Gen (A2M) auf Chromosom 12 dar (Blacker et al. 1998).

1.1.4 Das Amyloid Vorläuferprotein

Mutationen im APP Gen und damit einhergehende toxische A β -Ablagerungen im Gehirn von Alzheimer Patienten scheinen eine entscheidende Rolle bei der Entstehung der Alzheimer Krankheit zu spielen. Die Befürworter der amyloiden Hypothese gehen von einer zentralen Rolle des A β -Peptids in der pathologischen Kaskade von Morbus Alzheimer aus, der weitere Veränderungen wie die Bildung von Neurofibrillenbündeln, oxidativer Stress und inflammatorische Reaktionen nachgeschaltet sind (Behl et al. 1994; Hardy 1999). Die Folge ist eine Dysfunktion von Nervenzellen und Synapsen, welche durch die Phosphorylierung des Tau-Proteins verstärkt wird und im neuronalen Zelltod endet. Heute wird aufgrund von Erkenntnissen, die zum größten Teil auf Experimenten in transgenen Mausmodellen der Alzheimer Pathologie beruhen, eine modifizierte Amyloid-Hypothese vorgeschlagen. In dieser modifizierten Version wird der intrazellulären Akkumulation von Amyloid β -Peptiden in Neuronen eine zentralere Rolle als den extrazellulären Plaqueablagerungen zugesprochen (Wirhth et al. 2004). Vor der Ablagerung von extrazellulären Plaques treten bereits intrazellulär Amyloid β -Peptide auf. Diese toxischen Peptide akkumulieren in der Zelle und

können dort zu einer neuronalen und synaptischen Dysfunktion führen. In einem transgenen Mausmodell, indem APP als auch Presenilin überexprimiert wird, konnte diese modifizierte Version bestätigt werden (Christensen et al. 2008). Die intrazelluläre Akkumulation der toxischen Amyloid β -Peptide führte in diesem Mausmodell zur synaptischen Instabilität, einem Neuronenverlust und zu einer Beeinträchtigung des Lernverhaltens (Bayer & Wirths 2008).

1.1.4.1 Struktur und Aufbau des Amyloid Vorläuferproteins

Das Amyloid Vorläuferprotein (APP) ist ein Typ1-Transmembranglycoprotein, bestehend aus einer großen N-terminalen Ektodomäne, einer Transmembrandomäne und einer kleinen zytoplasmatischen Domäne (Kang et al. 1987). Ein typisches Merkmal von Typ1-Transmembranproteinen ist die Eigenschaft, dass die Mitglieder dieser Familie einen extrazellulären N-Terminus besitzen und die Zellmembran nur einmal durchquert wird (Coulson et al. 2000). APP ist ein ubiquitär exprimiertes Protein, dessen Expression nicht auf das Gehirn beschränkt ist.

Die Amyloid β -Peptide entstehen durch proteolytische Spaltung des APP-Proteins. APP ist Teil einer in Säugetieren evolutionär konservierten Familie, die das „APP-like protein 1“ (APLP1) und das „APP-like protein 2“ (APLP2) umfasst. Als N- und O-glykosyliertes Protein weist es Merkmale eines Zelloberflächenrezeptors auf (Kang et al. 1987, Weidemann et al. 1989). In unterschiedlichen Geweben können durch alternatives Spleißen des 19 Exon umfassenden Gens verschiedene Isoformen mit einer Länge von 695, 770 und 751 Aminosäuren auftreten (Selkoe 2001). In neuronalen Zellen wird fast ausschließlich die 695 Aminosäuren umfassende Isoform exprimiert. Im Gegensatz zu dieser kurzen Isoform werden die 751 bzw. 770 Aminosäuren langen Isoformen in Gliazellen und weiteren nicht-neuronalen Zelltypen exprimiert (Small et al. 1999; Wilson et al. 1999). Beide Isoformen besitzen N-Terminal eine Domäne, die eine Homologie zu der Kunitz-Familie von Serinproteasen (KPI) aufweist (Tanzi et al. 1988; Sinha & Lieberburg 1999). APP wird im Endoplasmatischen Retikulum (ER) synthetisiert und über die Golgivesikel zur Zellmembran transportiert.

1.1.4.2 Amyloide und nicht amyloide APP-Prozessierung

An der Prozessierung des APP-Proteins (APP full length; APP_{fl}) sind drei unterschiedliche Enzyme beteiligt, die als α -, β -, und γ -Sekretase bezeichnet werden (Selkoe 2001). Das APP-

Protein kann über zwei Wege, den amyloiden- und nicht-amyloiden Weg proteolytisch gespalten werden.

Zum größten Teil wird APP auf nicht-amyloidem Weg (siehe Abb. 1.1.4.2) prozessiert. Auf diesem Weg wird das membrangebundene APP über die α -Sekretase, einem Mitglied der ADAM-Proteinfamilie (A disintegrin and metalloprotease domain, ADAM), zwischen Lysin 16 und Leucin 17 der A β -Domäne extrazellulär gespalten und damit die Bildung von A β -Peptiden verhindert. Durch die Spaltung entstehen das lösliche Fragment sAPP α mit einer Größe von ca. 90 kD und das membrangebundene C-terminale Fragment (CTF) C83 mit einer Größe von ca. 10 kD. Dem extrazellulären sAPP α -Fragment wurden unter Anderem neuroprotektive Eigenschaften zugesprochen (Guo et al. 1998; Turner et al. 2003) sowie verbesserte Gedächtnisleistungen im Tiermodell nachgewiesen (Meziane et al. 1998). Über die intracerebroventriculäre Administration von sAPP α konnte in Kurz- und Langzeit-Gedächtnistests in einem Mausmodell der Amnestie eine gesteigerte Lernleistung der Tiere beobachtet werden. Somit scheint sAPP α eine wichtige Funktion in Lernprozessen einzunehmen.

In klinischen Studien konnte darüber hinaus im Plasma und in der Cerebrospinalflüssigkeit gezeigt werden, dass Alzheimer Patienten eine reduzierte Menge des neuroprotektiven sAPP α aufweisen (Sennvik et al. 2000). Das verbleibende membrangebundene C83 wird anschließend über den γ -Sekretase-Komplex (bestehend aus Präsenilin 1 und Präsenilin 2) zu dem kleinen, nicht toxischen p3 Peptid (Haass et al. 1994) und der intrazellulären APP-Domäne AICD (APP intracellular domain) gespalten.

Im amyloiden Weg (Abb.1.1.4.2) der APP-Prozessierung entstehen die toxischen Amyloid β -Peptide, die Hauptbestandteile der amyloiden Plaques darstellen. Auf diesem Weg wird APP über die β -Sekretase (β -site of APP cleaving enzyme, BACE1), eine Aspartyl-Protease, am N-Terminus der A β -Domäne gespalten (Marlow et al. 2003), wodurch das C-terminale Fragment C99 und das lösliche Fragment sAPP β entstehen. Das membrangebundene Fragment C99 wird anschließend über den γ -Sekretase-Komplex an den Positionen Valin 636 oder Alanin 638 gespalten, wodurch die toxischen A β 40- und A β 42-Fragmente und das AICD entstehen. Diese A β -Fragmente können nicht weiter prozessiert werden und diffundieren in den extrazellulären Raum, wo sie durch Akkumulation die amyloiden Plaques bilden. Im gesunden Organismus liegt das Verhältnis von A β 40 zu A β 42 bei etwa eins zu zehn. In autosomal bedingten Fällen der Alzheimer Krankheit wurde eine Verschiebung zu dem

stärker hydrophoben und toxischen A β 42 beobachtet (Selkoe 2004). Ebenfalls sind die toxischen amyloiden Peptide in der Lage, die Ablagerung von hyperphosphoryliertem Tau (Götz et al. 2001; Oddo et al. 2004) und die Entstehung von freien Radikalen (Behl et al. 1994; Harris et al. 1995) zu induzieren. Des Weiteren wurde eine Störung des Calcium-Metabolismus beobachtet (Luo et al. 1995; Wolozin et al. 1995).

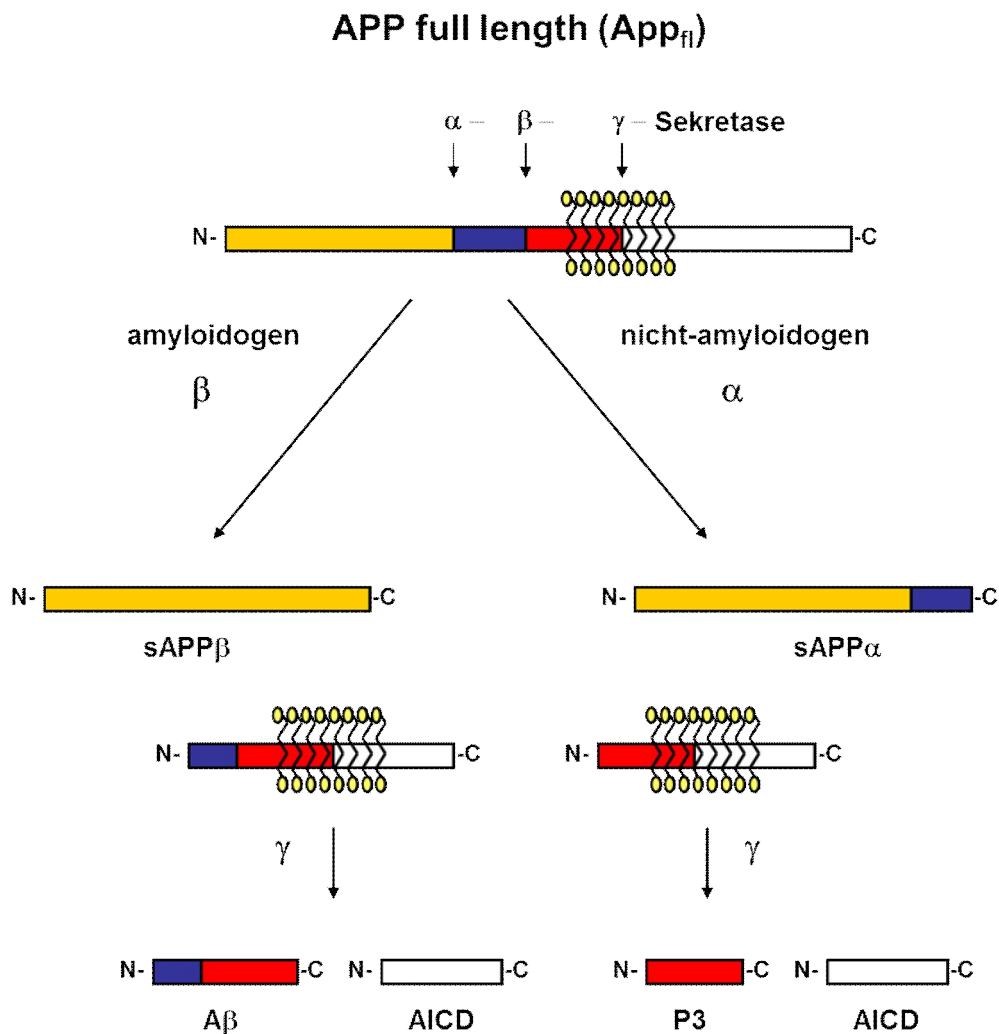


Abb. 1.1.4.2: APP-Prozessierung auf dem nicht-amyloiden und amyloiden Weg

Das APP-Protein (APP_n) wird durch drei verschiedene Sekretasen prozessiert (α -, β -, und γ -Sekretase). Auf dem nicht-amyloiden Weg wird APP durch die α -Sekretase zu dem löslichen Fragment sAPP α und einem membrangebundenen C-terminalen Fragment C83 gespalten. Die weitere Prozessierung erfolgt über die γ -Sekretase und es entstehen das nicht-toxische p3-Fragment und das AICD. Auf dem amyloiden Weg wird APP extrazellulär durch die β -Sekretase geschnitten. Es entstehen das lösliche sAPP β und das membrangebundene C-terminale Fragment C99. Die anschließende Prozessierung des C99-Fragments über die γ -Sekretase führt zu den toxischen A β 40- und A β 42-Fragmenten sowie zu dem AICD (modifiziert nach Tian et al. 2010).

1.1.4.3 Die physiologische Funktion von APP

Bis heute ist trotz der intensiven Grundlagenforschung an der Alzheimer Krankheit wenig über die physiologische Funktion von APP bekannt. Es werden jedoch einige potentielle Mechanismen vorgeschlagen, die APP eine Funktion bei der Entwicklung des Nervensystems, bei physiologischen Funktionen wie Zelladhäsion und Signaltransduktion zuschreiben (Schubert & Behl 1993; Senechal et al. 2006; Zheng & Koo 2006).

APP agiert möglicherweise als Zelloberflächenrezeptor und bindet an Substrate wie Laminin, Heparin und Kollagen, wodurch ihm eine wichtige Rolle bei der intrazellulären Zelladhäsion zugeschrieben wird (Storey et al. 1996; Soba et al. 2005).

Ebenfalls wurde in der zytoplasmatischen Domäne des APP-Proteins eine konservierte G-Protein-Bindungssequenz gefunden, womit APP auch als G-Protein-gekoppelter Rezeptor agieren kann (Mahlapuu et al. 2003). In adulten Neuronen konnte gezeigt werden, dass das lösliche Fragment sAPP α neuroprotektive und neurotrophe Eigenschaften besitzt (Stein et al. 2004; Gralle & Ferreira 2007). Stein et al. konnten zeigen, dass durch sAPP α die Expressions-Spiegel von neuroprotektiven Genen gesteigert werden. In organotypischen hippocampalen Zellkulturexperimenten konnte sAPP α vor Amyloid β induzierter Toxizität schützen (Stein et al. 2004). Des Weiteren wird dem sAPP-Protein eine bedeutende Rolle bei elektrophysiologischen Prozessen im Gehirn zugeschrieben (Sánchez-Alavez et al. 2007). Durch Tier- und Zellmodell-Experimente wurde APP ebenfalls als wichtiges Protein beim axonalen Transport beschrieben (Koo et al. 1990; Morin et al. 1993) und dem APP-Protein wird eine wichtige Funktion beim Auswachsen von Neuriten zugeschrieben (Jin et al. 1994; Mattson 1997). Des Weiteren ist Amyloid β an der Regulation des Metabolismus von Cholesterin und Sphingomyelin beteiligt (Grimm et al. 2005). Der AICD-Domäne des APP-Proteins werden u.a. Funktionen bei der Zell-Migration, der Signalübertragung zwischen Zellen, der Apoptose und im axonalen Transport zugeschrieben (Zheng & Koo 2006).

1.1.5 Tiermodelle der Alzheimer Krankheit

Die ersten Erkenntnisse zur Beeinflussung der Alzheimer Pathologie durch APP konnten über die autosomal vererbten Formen des APP-Proteins gewonnen werden. Durch Klonierungstechniken wurde es möglich in weiteren Schritten erste Alzheimer Tiermodelle zu entwickeln. Diese Tiermodelle, zu denen vor allem transgene Mauslinien zählen, ermöglichten die intensive Untersuchung von krankheitsrelevanten molekularen und proteinbiochemischen Prozessen sowie die Durchführung bestimmter Verhaltensversuche am lebenden Tier. Eine Übersicht über transgene Nagermodelle der Alzheimer Krankheit und dessen pathologische Merkmale liefert die Veröffentlichung von Spires und Hyman (Spires & Hyman 2005).

Die einzelnen APP-überexprimierenden Mausmodelle unterscheiden sich u.a. in den Mutationen des APP-Moleküls und in der Höhe der Expressionsspiegel. Ebenfalls unterscheiden sich die transgenen Mäuse in den Promotoren, die für die Überexpression des jeweiligen Gens verantwortlich sind. Darüber hinaus wurden Modelle generiert, die das mutante humane Presenilin-Gen allein oder in Kombination mit APP überexprimieren. Bei allen Tieren, die die humane APP-Isoformen überexprimieren, kann die Pathobiochemie der Alzheimer Krankheit anhand der Entstehung von extrazellulären Plaques nachvollzogen werden. Unterschiede ergeben sich jedoch im Alter und in der Anzahl der amyloiden Plaques in den einzelnen transgenen Maussystemen. Mit dem Auftreten der amyloiden Plaques sind darüber hinaus Entzündungsreaktionen durch aktivierte Mikroglia- und Astroglia-Zellen, meist direkt um den Entstehungsherd der Plaques, zu beobachten. Durch Verhaltensanalysen konnten für einige der transgenen Mausmodelle auch Gedächtnis-Defizite aufgezeigt werden. Ein für die Alzheimer Krankheit charakteristischer Nervenzellverlust konnte jedoch bisher nur in sehr wenigen transgenen Mausmodellen beschrieben werden (Spires & Hyman 2005).

In der APP23 transgenen Maus, einem der am bisher intensivsten untersuchten Mausmodelle, wurde eine Degeneration von Synapsen nur im Zentrum amyloider Plaques beschrieben (Boncristiano et al. 2005).

Eine Abnahme bzw. strukturelle Veränderung pyramidaler Neurone wurde ausschließlich lokal für die CA1-Region des Hippocampus beschrieben und ist hauptsächlich in Bereichen amyloider Plaques zu sehen (Calhoun et al. 1998). Die Reduktion an pyramidalen Neuronen konnte jedoch nicht in der Cortex-Region beobachtet werden. Die 1995 generierte PDAPP-Mauslinie zeigt eine 10fache APP-Überexpression, die zur Ausbildung von extrazellulären

diffusen und neuritischen Plaques führt (Spires & Hyman 2005). Dystrophe Neurite und eine Gliose wurden ebenfalls für diese Mauslinie aufgezeigt. Ein Neuronenverlust hingegen konnte nicht gezeigt werden, obwohl in diesem transgenen Mausmodell ein Verlust der Synapsendichte zu erkennen war (Games et al. 1995; Masliah et al. 1996).

Weitere Mausmodelle der Alzheimer Krankheit wurden auf Grundlage der APP prozessierenden Enzyme (BACE1, Presenilin 1 und Presenilin 2, Apolipoprotein E) generiert. Allerdings zeigten die Presenilin überexprimierenden Mausmodelle nur in Kombination mit einer Coexpression von APP die für die Alzheimer Krankheit typischen Symptome (Spires & Hyman 2005). In einem Mausmodell, in der humanes ADAM10, eine der α -Sekretasen, überexprimiert wurde, konnte eine Verbesserung der für die Alzheimer Krankheit typischen Merkmale sowie eine bessere Lernleistung beobachtet werden (Postina et al. 2004). Des Weiteren war in diesem Tiermodell die Auswirkung von Kainat induziertem exzitotoxischen Stress reduziert (Clement et al. 2008).

Mit der modifizierten Amyloid Hypothese, in der die intrazellulären A β Peptide als weitaus toxischere Komponente im Vergleich zu den extrazellulären Plaques eingestuft werden, mussten auch neue Alzheimer Mausmodelle generiert werden. In diesen Mausmodellen geht die intraneuronale Akkumulation von A β -Peptiden einer extrazellulären Plaque-Pathologie voraus (Casas et al. 2004; Oakley et al. 2006; Wirths et al. 2006; Wirths et al. 2007; Wirths et al. 2008). Diese Mausmodelle zeigen eine deutliche A β Peptid-Akkumulation in den kortikalen Regionen des Gehirns, in Bereichen des Subicullums und der CA1-Region des Hippocampus. Im Vergleich zu den zuvor generierten transgenen Mäusen, die vor allem extrazelluläre Plaques als Pathologie-Merkmal aufwiesen, zeigten alle zusätzlich einen Nervenzellverlust. In einem Mausmodell, das sowohl mutantes humanes APP und mutantes Presenilin überexprimiert, konnten „multi vesicular bodies“ eine Fusion aus Endosomen und Lysosomen, detektiert werden. Zusätzlich wurde ein altersabhängiger Nervenzellverlust im Alter von 17 Monaten von etwa 25 % beobachtet, welcher im Bereich der CA1-Region des Hippocampus auftritt. In einer anderen transgenen Mauslinie konnte sogar schon nach 6 Monaten ein Nervenzellverlust von ca. 30 % in der CA1 Region des Hippocampus detektiert werden und es wurden zusätzlich Verhaltensdefizite, sowie Defizite in der synaptischen Übertragung in Form von gestörter Langzeitpotenzierung nachgewiesen (Casas et al. 2004; Breyhan et al. 2009). In beiden Modellen war die Anzahl an extrazellulären amyloiden Plaques zu gering, so dass diese nicht alleine als toxische Komponente gesehen werden können.

Inzwischen sind weitere APP-Fragmente wie die AICD-Domäne in den Fokus der aktuellen Forschung gerückt. So wurden AICD transgene Mäuse generiert, welche die für die Alzheimer Krankheit typischen Symptome wie die Hyperphosphorylierung des Tau-Proteins, eine Degeneration von Neuronen und Lerndefizite aufweisen. Diese Symptome treten in diesem Tiermodell ohne Veränderung der Amyloid Mengen auf. Dies verdeutlicht, dass die AICD Domäne zusätzlich mit Amyloid β zur Generierung der bei Alzheimer typischen Krankheitsmerkmale führt (Ghosal et al. 2009; Ghosal et al. 2010; Ghosal & Pimplikar 2010). Neben den transgenen Mauslinien konnte auch in einem Rattenmodell über einen viral-vermittelten Gentransfer (AAV, siehe 1.4) ein Alzheimer Pathologie Modell generiert werden. Diese Ratten zeigten u.a. einen erhöhten A β -Spiegel in hippocampalen Gewebe und Lerndefizite im Morris Water-Maze Experiment (Lawlor et al. 2007).

Auch Invertebraten-Modelle eignen sich hervorragend zur Untersuchung einzelner Teilaspekte der Alzheimer Pathologie. In *Drosophila*- und *Caenorhabditis elegans* Modellen konnte durch die Überexpression von humanen APP, Amyloid β sowie humanem Tau zelluläre Apoptose und eine Zelldegeneration nachgewiesen werden (Link 1995; Gunawardena & Goldstein 2001; Wittmann et al. 2001; Jackson et al. 2002; Kraemer et al. 2003). Bei anderen Invertebraten wie *Petromyzon marinus* (Meerneunauge) wurde ebenfalls durch Überexpression von humanem Tau eine Neurodegeneration beschrieben (Hall et al. 2002).

Transgene Tiermodelle in Verbindung mit Zellkultursystemen zählen heute zu einem unverzichtbaren Werkzeug, um wichtige Grundlagen der Alzheimer Krankheit zu erforschen. Trotzdem ist es bisher nicht gelungen ein Tiermodell zu entwickeln, welches alle Aspekte der humanen Alzheimer Krankheit aufweist.

1.1.5.1 APP23-Mausmodell der Alzheimer Krankheit

Die 1997 von der Firma Novartis entwickelte APP23-Mauslinie ist eines der bekanntesten und am besten erforschten Alzheimer Mausmodelle (Sturchler-Pierrat et al. 1997). Diese Mauslinie wurde auf dem Hintergrund der C57Bl/6 Maus generiert. Die APP23-Maus exprimiert das humane APP₇₅₁ Protein unter der Kontrolle des neuronenspezifischen Thy1-Promotors in einem sieben fach erhöhten Spiegel zum endogenen APP. Genauere Angaben zur Herstellung der Mauslinie und zur Expressionskarte sind in Punkt 2.1.7 beschrieben.

Pathologisch können im Alter von 6 Monaten amyloide Plaques im Gehirn der APP23-Mauslinie nachgewiesen werden, die altersspezifisch weiter zunehmen. Im Vergleich zur humanen Pathologie kommt es ebenfalls zu inflammatorischen Prozessen, zur Degeneration von Synapsen im Zentrum der Plaques, einem lokalen Neuronenverlust in Bereichen amyloider Plaques in der CA1-Region des Hippocampus und zu einer Beeinträchtigung des Lernverhaltens (Bornemann & Staufenbiel 2000; Sturchler-Pierrat & Staufenbiel 2000; Schwab et al. 2004; Boncristiano et al. 2005; Vloeberghs et al. 2006; Van Dijck et al. 2008). Interessanterweise zeigen APP23-Mäuse in einem frühen Alter von 3 Monaten, also vor dem Auftreten von extrazellulären amyloiden Plaques, Defizite im Lernverhalten (Van Dam et al. 2003; Kelly et al. 2003). Somit wird in diesem Mausmodell erneut verdeutlicht, dass die amyloiden Plaques nicht die initiale toxische Komponente für die Alzheimer Krankheit darstellen.

Neben dem Auftreten amyloider Plaques im Neocortex und Hippocampus zeigen APP23 transgene Tiere im Zuge des Alterns eine erhöhte Menge an hyperphosphoryliertem Tau, welche in deformierten Neuriten in direkter Umgebung zu den Plaques zu finden sind (Sturchler-Pierrat et al. 1997). Wichtig ist dabei, dass die Entstehung von hyperphosphoryliertem Tau unmittelbar mit der Entstehung der amyloiden Plaques auftritt. Deshalb könnte es sein, dass das Auftreten von A β einen direkten Einfluss auf die Phosphorylierung des Tau-Proteins nimmt. Die durch Hyperphosphorylierung des Tau-Proteins in der Alzheimer Krankheit entstehenden Neurofibrillenbündel konnten jedoch in der APP23 transgenen Maus nicht beobachtet werden (Spires & Hyman 2005). In den Plaque-assoziierten Hirnregionen wie dem Hippocampus und Cortex ist im späten Alter zusätzlich eine Entzündungsreaktion in Form von aktivierten Astrozyten und Mikrogliazellen zu beobachten. Die APP23 transgene Maus ist eines der am besten charakterisierten *in vivo* Mausmodelle der AD, da dieses Tiermodell eine Vielzahl der Merkmale der Alzheimer Krankheit darstellt. Im Vergleich zu anderen meist mehrfach transgenen Tiermodellen ist in der APP23 transgenen Maus lediglich die siebenfache Überexpression der APP „Swedish“ Doppelmutation unter einem neuronalen Promotor notwendig.

1.2 Das Cannabinoidsystem

Die Hanfpflanze *Cannabis sativa* wurde schon sehr früh als Heilpflanze u.a. wegen ihrer euphorisierenden Wirkung in der chinesischen und indianischen Medizin beschrieben (Mechoulam 1986). Obwohl die Pflanze damit zu einer der ältesten Kulturpflanzen zählt, wurden die chemische Struktur und die physiologische Wirkung der Cannabispflanze und weiterer ähnlich wirkenden Substanzen erst in den letzten Jahrzehnten aufgeklärt. Die chemische Struktur der psychoaktiven Komponente Δ^9 -Tetrahydrocannabinol (THC) wurde im Jahre 1964 durch Yechiel Gaoni (Gaoni 1964) beschrieben. Neben der psychoaktiven Substanz, wodurch *Cannabis sativa* heute auch als Rauschmittel Verwendung findet, konnten weitere sog. Phytocannabinoide aus der Pflanze extrahiert werden. 1988 ist es Wissenschaftlern gelungen, einen für die Cannabinoid-Wirkung zuständigen Rezeptor im Gehirn der Ratte zu identifizieren (Devane et al. 1988). Die codierende Sequenz und die sich daraus ergebene Proteinstruktur dieses G-Protein-gekoppelten Rezeptors konnte 1990 durch die Arbeitsgruppe von Matsuda aufgeklärt werden (Matsuda et al. 1990) und wird heute unter dem Namen Cannabinoid Rezeptor 1 (CB1) geführt. Kurze Zeit später wurde die molekulare Struktur eines weiteren Rezeptors, des Cannabinoid-Rezeptors 2 (CB2) aufgeklärt (Munro et al. 1993). Beide Rezeptoren gehören zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren vom $G_{i/o}$ -Typ. Im chemischen Aufbau sind sie sich sehr ähnlich und ihre einzelnen Domänen sind siebenfach in der Zellmembran verankert. Der CB1-Rezeptor wird vermehrt in Nervenzellen des ZNS exprimiert, wohingegen der CB2-Rezeptor eher auf Zellen des Immunsystems oder Organen wie der Milz oder den Rachen-Mandeln exprimiert wird (Pertwee 1997; Breivogel & Childers 1998). Somit scheinen CB2-Rezeptoren eher eine regulatorische Rolle für Immunfunktionen einzunehmen (Howlett et al. 2002). Der CB2-Rezeptor wird auch auf den hirnständigen Immunzellen, den Mikroglia, exprimiert.

Inzwischen konnten Hinweise für die Existenz weiterer Cannabinoid-Rezeptoren gesammelt werden, bei denen vor allem der Orphan-G-gekoppelte Rezeptor GPR55 im Fokus der aktuellen Forschung steht (Baker et al. 2006; Mackie & Stella 2006). Durch die Identifizierung von Cannabinoidrezeptoren wurden auch endogene Liganden für die Rezeptoren gefunden. Diese Liganden werden als Endocannabinoide bezeichnet und führen im Gehirn neuromodulatorische Funktionen aus. Die ersten identifizierten Liganden waren N-Arachidonylethanolamid (Anandamid, AEA) (Devane et al. 1992) und 2-Arachidonylglycerol (2-AG) (Mechoulam et al. 1995; Sugiura et al. 1995). Beide Endocannabinoide entstehen aus Phospholipidvorläufern und werden nur bei Bedarf an der

Zellmembran synthetisiert (Piomelli 2003). Zusätzlich konnten weitere Endocannabinoide gefunden werden, die zusammen mit ihren Liganden das komplexe Endocannabinoidsystem (ECS) bilden. Endocannabinoide können ebenfalls Interaktionen mit Rezeptoren wie dem Vanilloid- (TRPV 1) oder den „peroxisom proliferation receptor“ (PPAR-Rezeptor) eingehen (Di Marzo et al. 1998; Zygmunt et al. 1999; Bouaboula et al. 2005).

Das ECS hat Einfluss auf viele Mechanismen im Körper. Es spielt u.a. eine Rolle bei neuroinflammatorischen Reaktionen im Gehirn, nimmt Einfluss auf emotionale Zustände wie Angst und Euphorie und es spielt eine wichtige Rolle bei der Wahrnehmung von „Appetit“. Deshalb könnte eine Modulation des ECS neue therapeutische Möglichkeiten zur Behandlung einer Vielzahl von Erkrankungen eröffnen, darunter auch neurodegenerative Krankheiten wie Multiple-Sklerose oder die Alzheimer Krankheit.

1.2.1 Cannabinoide

Nach heutiger Sicht wird die Stoffgruppe der Cannabinoide in drei Subklassen unterteilt. Das aus der Pflanze *Cannabis sativa* beschriebene THC und alle weiteren natürlichen Pflanzenwirkstoffe werden als Phytocannabinoide bezeichnet.

Die Phytocannabinoide sind Sauerstoff enthaltende aromatische Kohlenwasserstoff-Verbindungen, die im Gegensatz zu den Alkaloiden keinen Stickstoff in ihren chemischen Gruppen besitzen. In der Hanfpflanze konnten mehr als 70 Cannabinoide identifiziert werden, die in die Subklassen Cannabigerol, Cannabidiol, Cannabinol, Cannabichromene, THC (Δ^9 -THC, Δ^8 -THC) und Cannabicyclol eingeteilt werden (Elsohly & Slade 2005). Cannabinoide weisen eine unterschiedliche Affinität zu den Cannabinoidrezeptoren auf. Δ^9 -THC kann sowohl mit gleicher Affinität an CB1- als auch CB2-Rezeptoren binden.

Zur zweiten Klasse von Cannabinoiden gehört das Anandamid. Die dieser Klasse zugehörigen Stoffe werden als Endocannabinoide bezeichnet. Endocannabinoide sind körpereigene Stoffe, die als Liganden an die Cannabinoid-Rezeptoren binden und im Gehirn der Neuromodulation dienen. Das AEA wurde erstmals 1992 beschrieben (Devane et al. 1992) und gehört zur Gruppe der Eicosamide. AEA kann als Ligand an den CB1- und den CB2-Rezeptor binden, wobei die Affinität für den CB1-Rezeptor erhöht ist (Howlett 2002). Es wurde auch gezeigt, dass AEA, wie das Capsaizin (ein Bestandteil der Pfefferschote), zusätzlich an den Vanilloid-Rezeptor bindet und diesen aktiviert (Zygmunt et al. 1999). Die Konzentration von 2-AG

(einem weiteren Eicosamid) im Gehirn ist um ein vielfaches höher als die von AEA (Sugiura et al. 1995). Im Gegensatz zu AEA ist 2-AG ein Vollagonist für beide Cannabinoid-Rezeptoren. Bisher wurden weitere Endocannabinoide wie das O-Arachidonylethanolamin (Virodhamin), das Palmithylethanolamin (PEA) oder das N-Arachidonoyldopamin (NADA) gefunden, auf die in dieser Arbeit nicht näher eingegangen wird. Die Strukturformel der endogenen Liganden ist in Abb. 1.2.1 gezeigt.

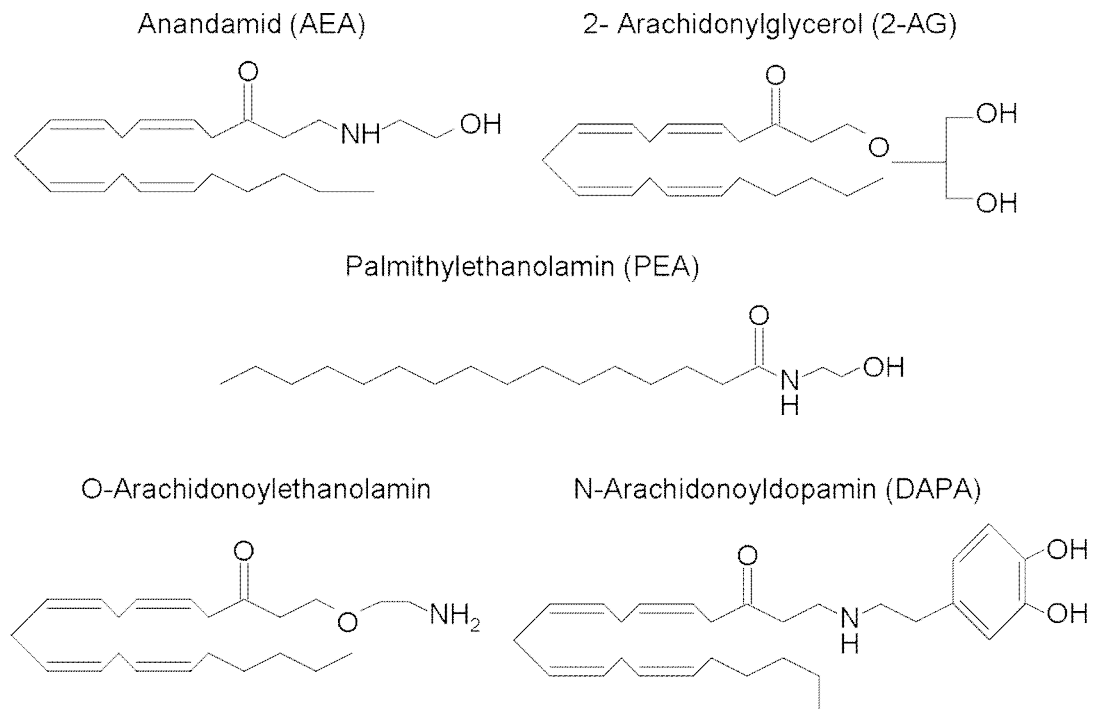


Abb. 1.2.1.: Chemische Formeln der endogenen Cannabinoidrezeptorliganden

Eine dritte Klasse von Cannabinoid-Rezeptor bindenden Liganden stellen die synthetisch hergestellten Cannabinoide dar. Eines dieser synthetisch hergestellten Cannabinoide ist das Win-55, 212-2 (Win2) ein Aminoalkylindol-Derivat. Es bindet sowohl an den CB1- als auch an den CB2-Rezeptor, zeigt aber eine höhere Affinität zum CB1-Rezeptor als das Δ^9 -THC (Kuster et al. 1993). Das Struktur analogon Win-55, 212-3 (Win3) ist ein Stereoisomer und kann an den CB1-Rezeptor binden, diesen jedoch nicht aktivieren. Der erste Antagonist für den CB1-Rezeptor ist das von Rinaldi-Carmona (Rinaldi-Carmona et al. 1994) synthetisierte SR 141716 (Rimonabant). Rimonabant wurde ursprünglich zur Behandlung von Adipositas in der Medizin eingesetzt, aufgrund von psychoaktiven Nebenwirkungen jedoch nicht als Arzneimittel in Europa und den USA zugelassen. Pharmokologisch greift Rimonabant in das körpereigene Cannabinoidsystem ein und entfaltet seine Wirkung durch Hemmung des CB1-

Rezeptors. Mittlerweile wurde eine Vielzahl von synthetischen Agonisten und Antagonisten für die CB-Rezeptoren hergestellt, die in einem Übersichtsartikel von Szabo aufgeführt sind (Szabo et al. 2008).

1.2.2 Biosynthese und Metabolismus endogener Cannabinoide

Aufgrund ihrer lipophilen Eigenschaften werden Endocannabinoide nicht wie andere chemische Signalsubstanzen im Gehirn produziert und in sekretorischen Vesikeln gespeichert sondern nur „auf Abruf“, aus membranständigen Vorstufen produziert (Di Marzo et al. 1994). Nach der Freisetzung in den synaptischen Spalt werden sie durch Aufnahme in die Zellen schnell deaktiviert und anschließend metabolisiert. Die Biosynthese der Endocannabinoide wird durch einen Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration und des zyklischen Adenosinmonophosphat (cAMP) kontrolliert (Cadas et al. 1996; Di et al. 2005). Eine Stimulation kann aber auch unabhängig von der Konzentration an Calcium-Ionen durch metabotrophe Glutamat-Rezeptoren erfolgen (Varma et al. 2001). Endocannabinoide werden aus Phospholipvorläufern synthetisiert.

Das AEA wird durch eine Ca^{2+} -abhängige Aktivierung der N-Acyltransferase aus N-Arachidonyl-Phosphatidylethanolamin generiert und durch das Enzym Phospholipase D zum AEA umgesetzt. Die AEA-Synthese erfolgt in Zellen des Gehirns, des Immunsystems (Makrophagen, Thrombozyten) sowie in Endothelzellen.

Im Falle des 2-AG führt ein intrazellulärer Ca^{2+} -Anstieg zur Aktivierung der Phospholipase C und in einem weiteren Schritt erfolgt die Synthese durch die Diacylglycerinlipase.

Die enzymatische Degradation beider Endocannabinoide erfolgt intrazellulär über die Enzyme Fettsäureaminhydrolase (FAAH) (Cravatt et al. 1996) oder die Monoacylglycerinlipase (MAGL). Durch Hydrolyse entstehen im Falle von AEA die Abbauprodukte Ethanolamin und Arachidonsäure und bei 2-AG die Abbauprodukte Glycerin und Arachidonsäure (Piomelli 2003).

1.2.3 Signaltransduktion im endogenen Cannabinoidsystem (ECS)

Der CB1-Rezeptor ist direkt an inhibitorische Proteine des $G_{i/o}$ -Typs gekoppelt und wird vermehrt im Cortex, Hippocampus, Cerebellum und den Basalganglien exprimiert (Childers 2006). Über die Bindung von Agonisten an den Cannabinoid-Rezeptor können diverse

Signaltransduktionswege wie der Protein Kinase A (PKA) und der Mitogen aktivierbare Proteinkinase (MAPK)- Signalweg moduliert werden (Pagotto et al. 2006).

Die Wirkung der Endocannabinoide am synaptischen Spalt erfolgt nach heutiger Sicht als sog. „retrograde messenger“ (Wilson & Nicoll 2001). Endocannabinoide wie das AEA werden an der Postsynapse synthetisiert und anschließend in den synaptischen Spalt freigesetzt. Dort bindet AEA retrograd an die an der Präsynapse lokalisierten CB1-Rezeptoren.

Die Stimulation des CB1-Rezeptors führt zu einer Schließung von spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanälen und zur Öffnung von Kaliumkanälen (K_A^+ -Typ). Über das inhibitorische $\text{G}_{i/o}$ -Protein wird die Adenylatcyclase-Aktivität gehemmt. Die Inhibition der Adenylatcyclase führt zu einer Reduktion der cAMP-Produktion. Die Modulation dieser Ionenströme und die Schließung der Ca^{2+} -Kanäle führt schließlich zu einer verringerten Freisetzung von Neurotransmittern in den synaptischen Spalt (Ameri 1999). Durch die Aktivierung des $\text{G}_{i/o}$ -Proteins können auch direkt Kaliumkanäle (K_{ir}^+ -Typ) aktiviert werden woraus ein einwärtsgerichteter Kaliumtransport resultiert. Unter Kontrolle der Proteinkinase C (PKC) können $\text{G}_{i/o}$ -Proteine durch direkte Inhibition von Ca^{2+} -Kanälen (vom N- und P/Q-Typ) einen einwärtsgerichteten Kaliumtransport aktivieren.

Über den CB1-Rezeptor können des Weiteren Kinasen wie die extrazellulär regulierte Kinase (ERK) und die Focal Adhäsion Kinase (FAK) aktiviert werden. Dies wurde in hippocampalen Schnittkulturen nach Behandlung mit AEA, 2-AG und Δ^9 -THC gezeigt (Derkinderen et al. 2003). Auch die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3-K) und Kinasen des MAPK-Signalwegs können durch CB1 aktiviert werden (Howlett 2005).

Zusätzlich wurden Interaktionen des CB1-Rezeptors mit Rezeptoren aus klassischen Neurotransmitter-Signalwegen (Serotonin 5-HT-, Dopamin 2-, Typ1-Orexin Rezeptor) nachgewiesen (Devlin & Christopoulos 2002; Hilairret et al. 2003; Kearn et al. 2005). In Abbildung 1.2.3 ist der CB1-vermittelte Signaltransduktionsweg detailliert aufgezeigt

Die Aktivierung des CB2-Rezeptors durch Endocannabinoide erfolgt primär auf Zellen des Immunsystems. Im Gegensatz zum CB1-Rezeptor hat der CB2-Rezeptor keinen Einfluss auf spannungsabhängig Ca^{2+} -Kanäle oder die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration (Ameri 1999). Dies konnte unter anderen in Zelllinien, die den CB2-Rezeptor exprimieren, gezeigt werden (Felder et al. 1995).

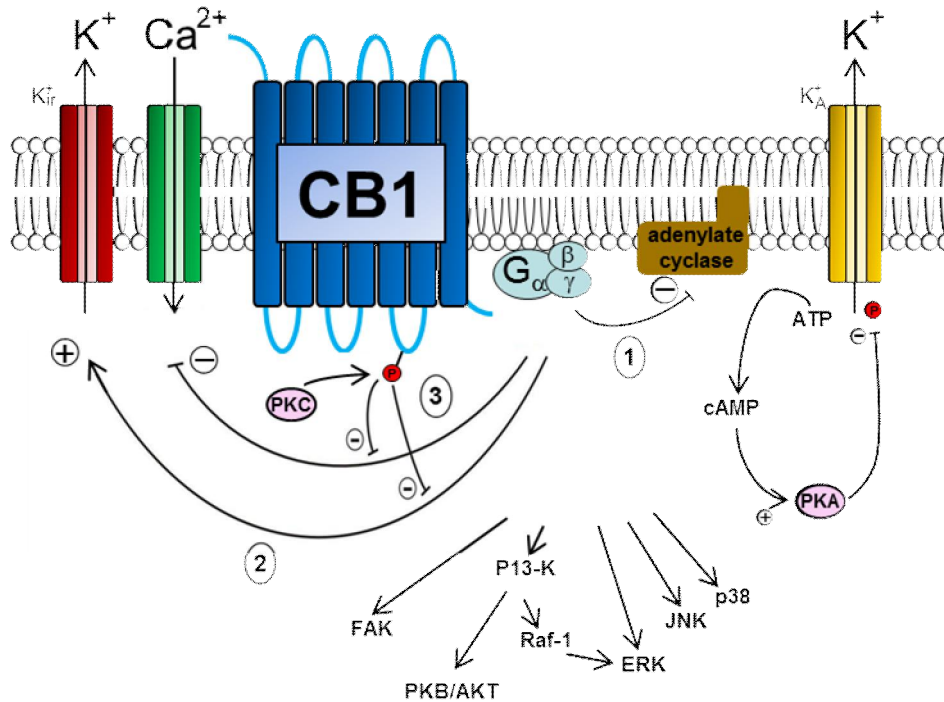


Abbildung 1.2.3: Schematische Darstellung des CB1-vermittelten Signaltransduktionswegs

1) Die Bindung von endogenen Liganden an den CB1-Rezeptor führen zur Aktivierung des $G_{i/o}$ -Proteins. Durch Inhibition des Adenylatcyclase wird die Ausschüttung von cAMP verhindert u Kaliumkanäle (K_A^+ -Typ) aktiviert. 2) Durch das $G_{i/o}$ -Proteins können Kaliumkanäle (K_{ir}^+ -Typ) direkt aktiviert werden, was in einem einwärtsgerichteten Kaliumtransport resultiert. 3) Durch direkte Inhibition von Ca^{2+} -Kanälen des N- und P/Q-Typs können $G_{i/o}$ -Proteine unter Kontrolle der Proteinkinase C einen einwärtsgerichteten Kaliumtransport aktivieren. Durch direkte Aktivierung des CB1-Rezeptors können Kinasen, die Signaltransduktionswege einleiten, aktiviert werden (modifiziert nach Pagotto et al. 2006).

Die Signaltransduktion erfolgt ähnlich wie die des CB1-Rezeptors $G_{i/o}$ -Protein vermittelt. Einer Reduktion des cAMPs führt zur Inaktivierung der Adenylatcyclase (Slipetz et al. 1995). Über den CB2-Rezeptor kann u.a. der MAPK-Signalweg aktiviert werden.

1.2.4 Physiologische Funktion des ECS

Das ECS ist im Körper an weitreichenden physiologischen Prozessen beteiligt. Durch Aktivierung von CB2-Rezeptoren ist es in Entzündungsreaktionen involviert und nimmt an der Steuerung von Immunprozessen teil. Über den CB1-Rezeptor ist das ECS vor allem in die neuromodulatorische Steuerung im ZNS involviert. In Regionen, die eine hohe Dichte an CB1-Rezeptoren aufweisen, wie das Cerebellum und die Basalganglien des Gehirns, sind Endocannabinoide an der dopaminergen Neurotransmission beteiligt und nehmen somit Einfluss auf die Koordination der Bewegungen und Körperhaltung des Menschen (van der

Stelt & Di Marzo 2003). Außerdem ist das ECS im gesunden Organismus an kognitiven und emotionalen Prozessen wie Stress beteiligt und hat Einfluss auf die Regulation der synaptischen Plastizität (Wotjak 2005). Weiterhin ist das ECS in die Regulation von gastrointestinalen- und kardiovaskularen Funktionen involviert (Randall et al. 2002; Di Carlo & Izzo 2003). So können Cannabinoide über eine Aktivierung des CB1-Rezeptors die Nahrungsaufnahme stimulieren (Berry & Mechoulam 2002). Werden CB1-Rezeptor Knockout Mäuse einer kalorischen Restriktion ausgesetzt, so erhöht sich die Expression an striatalen CB1-Rezeptoren im Vergleich zu Kontrollmäusen. Ein gegenläufiger Effekt ist jedoch nach einer „high fat diet“ zu beobachten (Hayakawa et al. 2007).

In einem CB1-Knockout-Mausmodell konnte gezeigt werden, dass der CB1-Rezeptor darüber hinaus an vielen Verhaltensreaktionen wie der Fortbewegungsfähigkeit, an Angstzuständen und an Lernprozessen beteiligt ist (Zimmer et al. 1999; Bilkei-Gorzo et al. 2005). Das Cannabinoidsystem zeigt auch eine Protektion bei der Bekämpfung von Hirntumoren. Durch die Verabreichung von Δ^9 -THC oder Win2, die an beide Cannabinoidrezeptoren binden, konnte eine Rückbildung von Hirntumoren in Ratten und Mäusen beobachtet werden (Guzmán 2003). Auch wurde durch den CB1-Antagonisten Rimonabant eine starke Verringerung der Proliferation von humanen Brustkrebszellen beschrieben (Sarnataro et al. 2006).

Durch die Beteiligung von CB2-Rezeptoren an inflammatorischen Entzündungsprozessen werden Endocannabinoiden auch immunsuppressive und anti-inflammatorische Funktionen zugeschrieben (Klein 2005). Durch CB2-Rezeptor Knockout-Mausmodelle konnte u.a. ein Einfluss des ECS auf die Regulation der Knochendichte, der Proliferation von Lymphozyten, der Sekretion von inflammatorischen Zytokinen und der Aktivität von Makrophagen (Ofek et al. 2006; Buckley et al. 2006) nachgewiesen werden. Durch orale Administration von Endocannabinoiden in Mäusen konnte eine anti-atherosklerotische Wirkung des ECS aufgezeigt werden (Steffens et al. 2005). Durch Endocannabinoiden aktivierte CB2-Rezeptoren können einen direkten Einfluss auf geschädigte Neurone ausüben. Marsicano et. al. konnte zeigen, dass die CB1-Rezeptor-abhängige Aktivierung des ECS eine schnelle Antwort gegen Exzitotoxizität in adulten Mäusegehirnen darstellt (Marsicano et al. 2003).

1.3 Neuroprotektive Eigenschaften des ECS im ZNS

Eine veränderte Aktivität des ECS ist bei pathologischen Prozessen des Gehirns zu beobachten. Es konnte gezeigt werden, dass Cannabinoide protektive Eigenschaften bei unterschiedlichen neuronalen Schädigungen haben. Dazu zählen neurodegenerative Erkrankungen wie Multiple Sklerose, Parkinson, sowie die Alzheimer Krankheit.

Zu den schützenden Effekten des ECS zählen anti-inflammatorische und antioxidative Eigenschaften. In einem Nagermodell konnte durch das synthetische Cannabinoid Win2 eine Protektion nach LPS induzierter Inflammation gezeigt werden, bei der eine reduzierte Aktivierung von Mikrogliazellen beobachtet wurde (Marchalant et al. 2007). Die Phytocannabinoide Cannabidiol und Δ^9 -THC wirken zudem neuroprotektiv aufgrund ihrer antioxidativen Eigenschaften (Hampson et al. 1998; Marsicano et al. 2002). Cannabinoide scheinen ebenfalls vor einer NMDA-induzierten Exzitotoxizität durch Aktivieren des CB1-Rezeptors, Inhibition des PKA-Signalweges und durch eine Inhibition von toxischem NO zu schützen (Gilbert et al. 2007; Kreutz et al. 2007). Eine direkt über Cannabinoide gesteuerte Modulation der glutamatergen Neurone bietet ebenfalls eine Möglichkeit, neuronale Störungen mit einer exzessiven exzitotoxischen Aktivität zu behandeln (Monory et al. 2006). Cannabinoide können auch anti-inflammatorische Effekte über die „peroxisom proliferation receptors“ (PPARs) ausüben. O’Sullivan et al. konnte zeigen, dass AEA, 2-AG oder PEA über die Aktivierung von PPAR α - und PPAR γ neuroprotektive Eigenschaften ausüben und diese schützende Funktion unabhängig von der Aktivierung der Cannabinoidrezeptoren ist (O’Sullivan 2007; O’Sullivan & Kendall 2010).

Zusätzlich wurde eine protektive Eigenschaft von Cannabinoiden nach einem Schlaganfall beschrieben. Die *in vivo* Applikation von Win2 nach einer cerebralen Ischämie führte dabei zu einem verringerten Infarkt-Risiko (Nagayama et al. 1999). Eine höhere Sensitivität zur Ausprägung einer Ischämie konnte in CB1-Rezeptor Knockout-Mäusen gezeigt werden. Diese Sensitivität ist in CB1-Rezeptor Nullmutanten, bei denen beide Allele deletiert sind, im Vergleich zu heterozygoten- und Wildtypmäusen verstärkt (Parmentier-Batteur et al. 2002). Des Weiteren wurden Veränderungen des ECS in Tiermodellen der Parkinson Krankheit, bei Multipler Sklerose, bei der Huntington-Krankheit, sowie bei der amyotrophen Lateralsklerose beobachtet. In einem Parkinson-Rattenmodell wurde die Pathogenese der Krankheit durch die Gabe von Cannabinoiden verzögert, was auf eine antioxidative Eigenschaft zurückgeführt

werden konnte. Dieser protektive Effekt auf Neurone scheint durch eine Rezeptor-unabhängige Hochregulation der Cu/Zn Dismutase erreicht zu werden (García-Arencibia et al. 2007). In einem Mausmodell der Multiplen Sklerose konnte durch PEA eine Verbesserung der Motorik und anti-inflammatorische Effekte beobachtet werden (Loría et al. 2008). In der SOD^{93A}-Maus, einem Modell der amyotrophen Lateralsklerose, sowie in CREAE-Mäusen, einem Multiple Sklerose Modell, wurden ebenfalls zeit- und regionspezifische Veränderungen des CB1-Rezeptorspiegels im Gehirn gezeigt (Cabranes et al. 2006; Zhao et al. 2008). Ein massiver Verlust von CB1-Rezeptoren in einem frühen Stadium der Huntington Krankheit konnte schon 1993 beschrieben werden (Glass et al. 1993; Glass et al. 2000). Zwölf Wochen nach Ausprägung der Symptome konnte in einem Huntington Mausmodell ein Verlust an CB1-Rezeptoren einhergehend mit Veränderungen der motorischen Funktionen beobachtet werden (Dowie et al. 2009).

Aus klinischen Studien ist bisher wenig über die endogenen Cannabinoidkonzentrationen nach einer Schädigung des Gehirns bekannt. Bei Schlaganfall- und Parkinson-Patienten konnte jedoch ein Anstieg von AEA in der cerebrospinalen Flüssigkeit gemessen werden (Schäbitz et al. 2002; Pisani et al. 2005). In Gehirngeweben von Patienten, die an Multipler Sklerose verstorben sind, konnten erhöhte AEA-Spiegel in den inflammatorischen Regionen nachgewiesen werden (Eljaschewitsch et al. 2006).

Wichtige Forschungsergebnisse wurden auch durch die Generierung von unterschiedlichen transgenen Cannabinoid-Mausmodellen gewonnen. In den letzten Jahren konnten konventionelle oder konditionale Cannabinoid-Rezeptor Knockout-Mausmodelle etabliert werden. Durch diese ist es möglich, die Aktivität des ECS am lebenden Tier zu erforschen.

Der Anlass zur Etablierung neuer Tiermodelle war u.a. die Erkenntnis, dass das ECS bei neurodegenerativen Krankheiten beeinflusst wird. Die Deletion des CB1-Rezeptors zeigt zahlreiche Symptome, welche in neurodegenerativen Krankheiten beobachtet werden. Die Mäuse zeigen eine erhöhte Sensivität für Exzitotoxizität und eine geringere Regeneration nach einer inneren Hirnverletzung (Parmentier-Batteur et al. 2002; Panikashvili et al. 2001).

In einem Modell zur Exzitotoxizität konnten Marsicano et al. in einem konditionalen CB1-Rezeptor Mausmodell zeigen, dass die Kainat-induzierte Exzitotoxizität zu erhöhten AEA-Spiegeln führt, was jedoch nur in Wildtypmäusen eine Neuroprotektion zur Folge hatte (Marsicano et al. 2003). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Caspase 3-Aktivität in CB1-Rezeptor-Knockout Mäusen erhöht ist (Jackson et al. 2005), was für verstärkten

neuronalen Zelltod in CB1-Rezeptor Knockout-Mäusen spricht, da Caspase 3 ein Regulator des neuronalen Zelltods ist. CB1-Rezeptor-Knockout Mäuse zeigen auch eine verringerte Zahl von Neuronen in der CA1- und CA3-Region des Hippocampus. Die CB1-Rezeptoren scheinen des Weiteren in der Entwicklung des Gehirns eine wichtige Rolle zu spielen. Es konnte gezeigt werden, dass CB1-Rezeptor Knockout Mäuse anatomische Veränderungen in den „barrel maps“ des Gehirns aufweisen, was darauf hindeutet, dass CB1-Rezeptoren eine wichtige Rolle bei der postnatalen Entwicklung der sensorischen Karten im Gehirn spielen (Deshmukh et al. 2007). Neben diesen physiologischen Veränderungen zeigen sich auch Verhaltensdefizite bei CB1-Knockout-Mäusen, welche ein altersabhängiges verschlechtertes Abschneiden in verschiedenen Lernversuchen im Vergleich zu Wildtypmäusen (Zimmer et al. 1999; Bilkei-Gorzo et al. 2005; Varvel et al. 2005) aufweisen.

Neurodegenerativen Erkrankungen sind von starken inflammatorischen Reaktionen begleitet. Sie sind durch erhöhte Zytokin-Level, der Aktivierung von Astroglia- und Mikrogliazellen und dem späteren Eintritt von Leukozyten in das Gehirn durch eine Beschädigung der Blut-Hirnschranke gekennzeichnet (Dirnagl et al. 1999; Block & Hong 2005; Centonze et al. 2007; Zlokovic 2008). Aufgrund dieser Symptomatik sind CB2-Rezeptoren, welche auf Zellen des Immunsystems und auf Gliazellen exprimiert werden in den näheren Fokus der Forschung geraten, da auch die Modulation des CB2-Rezeptors neuroprotektive Eigenschaften aufweisen könnte (Ashton & Glass 2007). Eine Aktivierung von CB2-Rezeptoren konnte bei Patienten mit Multipler Sklerose in Bereichen der Demyelinisierung beschrieben werden (Benito et al. 2007). In Mausmodellen der Ischämie wurde im Gehirn eine erhöhte CB2-Rezeptor Expression bei der Proliferation von Mikrogliazellen beobachtet (Ashton et al. 2007). In CB2-Rezeptor Knockout Mäusen konnte nach der Infusion des dopaminergen Neurotoxins MPTP ein vorzeitiges Ableben der Tiere, im Vergleich zu den Wildtyptieren, welche die Behandlung überlebten, gezeigt werden (Price et al. 2009). Durch Administration von CB2-Rezeptor Agonisten konnten Erfolge bei Rückenmarksverletzungen, der Huntington-Krankheit, der Parkinson-Krankheit und der amyotrophen Lateralsklerose im Tiermodell beschrieben werden (Shoemaker et al. 2007; Baty et al. 2008; Price et al. 2009; Sagredo et al. 2009). Eine Aktivierung des CB2-Rezeptors durch AEA kann zu einer erhöhten Interleukin-10 Produktion führen. Somit nimmt das ECS Einfluss auf das Zytokin-Netzwerk im ZNS, und eine Modulation der Immunantwort durch eine Administration von AEA wäre ein möglicher Therapieansatz (Correa et al. 2010).

Bisher ist wenig über die Mechanismen bekannt, durch welche die Cannabinoide und die zugehörigen Rezeptoren die Neuroprotektion ausüben. In einem *in vivo* Modell zur Exzitotoxizität konnte gezeigt werden, dass CB1-Rezeptoren an der Produktion von neurotrophen Faktoren wie dem BDNF und bFGF beteiligt sind (Marsicano et al. 2003; Khaspekov et al. 2004; Aguado et al. 2007). Die Inhibition der Glutamat-Sekretion wird als eine weitere elementare Eigenschaft des ECS zur Neuroprotektion diskutiert.

Abgesehen von diesen neuroprotektiven Eigenschaften weisen Cannabinoide, wie AEA und Δ^9 -THC, in hohen Konzentrationen auch neurotoxische Effekte auf. *In vitro* Studien zeigten, dass die Behandlung mit beiden Cannabinoiden toxisch auf primäre Neurone wirkt. Allerdings waren die eingesetzten Cannabinoid-Konzentrationen in diesen Studien weit über denen, welche für eine rezeptor-vermittelte Aktivierung von Cannabinoid-Rezeptoren notwendig sind (Chan et al. 1998; Movsesyan et al. 2004).

1.3.1 Die Interaktion des ECS in der Alzheimer Krankheit

Das Cannabinoidsystem zeigt eine Aktivität in vielen neurodegenerativen Erkrankungen. Die Hauptaufgabe der Endocannabinoide besteht vor allem darin, die Funktion der präsynaptischen Neurotransmitterfreisetzung im Gehirn zu regulieren. Durch Veränderungen in der Menge an freigesetzten Endocannabinoiden, Cannabinoidrezeptoren und abbauenden Enzymen können Störungen in der synaptischen Aktivität herbeigeführt werden. Im Gehirn von an Alzheimer verstorbenen Patienten wurde eine Abnahme von Cannabinoidrezeptoren vor allem in Bereichen mit einer hohen Dichte an amyloiden Aggregaten und aktivierten Mikrogliazellen beschrieben. Im Rattenmodell konnte durch die intracerebroventrikuläre Administration von CB1-Rezeptoragonisten, welche durch injizierte A β -Peptide toxische Effekte wie Mikrogliaaktivierung, CB1-Rezeptorverlust, das Absterben von Nervenzellen und kognitive Defizite ausübten, verhindert werden (Ramírez et al. 2005). Eine reduzierte Mikroglia-Aktivierung konnte auch in einer Alterungsstudie im Rattenmodell nach einer täglichen Dosis des synthetischen Cannabinoids Win2 beobachtet werden (Marchalant et al. 2008).

Andere Studien zeigten keine Verbindung zu Veränderungen der CB1-Rezeptoren in Alzheimer-Gehirnen (Westlake et al. 1994) und es konnte keine Abnahme der CB1-Expression in Bereichen der amyloiden Plaques beobachtet werden (Benito et al. 2003). Des Weiteren wurde gezeigt, dass das AEA abbauende Enzym FAAH in Bereichen der senilen Plaques hochreguliert ist (Benito et al. 2003). Somit wäre der durch AEA induzierte Schutz vor Exzitotoxizität reduziert. Ein Nagermodell der Alzheimer Krankheit zeigte, dass die Gabe eines selektiven CB2-Rezeptoragonisten die Aktivierung von Mikrogliazellen komplett verhinderte (Ashton & Glass 2007). Eine *in vitro* Studie zeigte einen über den CB1-Rezeptor vermittelten neuroprotektiven Effekt von Endocannabinoiden gegen einen durch A β -Peptid induzierten Zelltod. Dieser Effekt konnte durch einen CB1-Antagonisten, sowie durch einen MAPK-Signalweg-Inhibitor unterdrückt werden (Milton 2002). Somit bietet die Aktivierung des MAPK-Signalwegs eine Möglichkeit, die durch amyloide Peptide induzierte Neurodegeneration zu verhindern. Reduzierte Acetylcholinpiegel liegen in der Alzheimer Krankheit vor, welche bisher mit Acetylcholinesterase-Inhibitoren und Modulatoren wie Donepezil oder Galantamin therapeutisch anvisiert wurden. Eubanks et al. konnte 2006 zeigen, dass die Administration von Δ^9 -THC kompetitiv die Acetylcholinesterase-Aktivität inhibiert und eine Acetylcholin-induzierte Aggregation von amyloiden Peptiden verhindert (Eubanks et al. 2006). Cannabidiol, die nicht psychoaktive Substanz aus *Cannabis sativa*,

kann einen neuroprotektiven Effekt auf PC12-Zellen nach Amyloid- β induzierter Toxizität ausüben. Die Gabe von Cannabidiol führte dabei zu einer signifikanten Reduktion der ROS Produktion, der Lipidoxidation, der Caspase 3-Level und zu einem verbesserten Überleben der Zellen (Iuvone et al. 2004). Die therapeutische Administration von Cannabidiol könnte sich somit als neuroprotektiv, anti-oxidativ und anti-apoptotisch erweisen.

Der Einsatz von Cannabinoiden als Therapeutikum ist jedoch umstritten, da neuere klinische Alzheimer-Studien keine Unterschiede an Endocannabinoid-Mengen im Plasma von Alzheimer-Patienten und gesunden Kontrollgruppen feststellen konnten (Koppel et al. 2009).

Endocannabinoide werden nur bei Bedarf produziert und unterliegen einer schnellen Degradation. Die Manipulation des ECS stellt eine neue Möglichkeit dar, die Nebenwirkungen, welche oft durch die Administration von exogenen Cannabinoiden oder von Pharmazeutika hervorgerufen werden, zu verhindern.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Basierend auf den Erkenntnissen, dass das ECS neuroprotektive Eigenschaften hat, sollte in dieser Arbeit der Einfluss von Endocannabinoiden und des Cannabinoid 1-Rezeptors (CB1) in der Alzheimer Krankheit untersucht werden. In verschiedenen Studien konnte durch Stimulierung von unterschiedlichen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren eine Prozessierung des amyloiden Vorläuferproteins zugunsten des als neuroprotektiv postulierten sAPP α erreicht werden (Lezoualc'h et al. 2000; Kojro et al. 2006).

Da es sich bei dem CB1-Rezeptor um einen G_{i/o}-Protein gekoppelter Rezeptor handelt, könnte die pharmakologische Manipulation dieses Rezeptors mit Cannabinoiden ebenfalls zu einer veränderten APP-Prozessierung und dadurch zu einer verminderten Amyloid- β -Toxizität führen. Zur Beantwortung dieser Hypothese sollte deshalb die APP-Prozessierung in verschiedenen Zellkulturmodellen proteinbiochemisch durch Western-Blot und Amyloid- β ELISA untersucht werden. Zusätzlich sollte die Expression der APP schneidenden Enzyme und die Aktivität der Gene nach Cannabinoid-Behandlung untersucht werden.

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte der Einfluss des CB1-Rezeptors in einem etablierten Alzheimer-Mausmodell (APP23-Mäuse) untersucht werden. Hierzu wurden vor Beginn der Arbeit in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Beat Lutz (Institut für Physiologische Chemie, Universitätsmedizin Mainz), APP23 transgene Mäuse mit CB1-defizienten Mäusen gekreuzt. Diese Mäuse sollten im ersten Schritt zu verschiedenen Alterszeitpunkten in Lernversuchen analysiert werden, um mögliche kognitive Unterschiede zwischen APP23 transgenen und APP23/CB1-defizienten Mäusen zu untersuchen. Ein weiteres Ziel der Arbeit war die Entwicklung von amyloiden Plaques und die damit einhergehende Entzündungsreaktion im Verlauf der Alterung histopathologisch zu untersuchen. Die APP-Prozessierung in diesem Mausmodell sollte biochemisch, in von der Alzheimer Pathologie betroffenen Gehirnregionen, mittels Western-Blot und amyloid β ELISA analysiert werden. Mit Hilfe des viralen-vermittelten Gentransfers sollte in einem zweiten Mausmodell der Einfluss von Amyloid β -Peptiden in CB1-defizienten Mäusen durch AAV-Injektion mit den oben genannten Methoden untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Zellkultur	Firma
B27-Supplement	Invitrogen
Dimethylformamid	Fluka
DMEM-Medium, steril	Gibco
Fötales Kälberserum (fetal bovine serum, FBS), steril	Gibco
Gentamicin	Gibco
Kulturschalen	Nunc
Natriumpyrophosphat	Gibco
Phosphate buffered saline (PBS), steril	Gibco
Penicillin/Streptomycin	Gibco
Glutamin, Glutamax	Gibco
Sucrose	Sigma
Trypsin	Invitrogen

Molekularbiologie	Firma
Absolutely RNA reverse transcription-PCR miniprep Kit	Stratagene
NucleoSpin [®] RNA II Total RNA Isolation Kit	Macherey-Nagel
Agarose	Biozym
Bromphenolblau	Sigma
Diethyl-Pyrocbonat (DEPC)	Sigma
DNA-Marker	Fermentas
DNase	Stratagene
Ethanol	Roth
Ethidiumbromid	Sigma
β-Mercaptoethanol	Fluka
Omniscript reverse transcriptase kit	Qiagen
dNTP	peqLab
Primer	MWG

RNase-Inhibitor	Promega
SYBR Green Supermix	Biorad
Taq-Polymerase	Invitrogen
Proteinbiochemie	Firma
Ammoniumpersulfat (APS)	Serva
BCA-Reagenz	Bio-Rad
Blotpapier	Whatman
Bovine Albumin Serum (BSA)	Serva
Bromphenolblau	Sigma
ChemiLucent ECL Detection System	Millipore
DAPCO	Sigma
DAPI (4', 6-Diamidin-2'-phenylindoldihydrochlorid)	Roche
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma
Glycin	Roth
Glycerin	Merck
Isopropanol	Roth
Methanol	Roth
Natriumacetat	Fluka
Natriumazid	Sigma
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma
Natriumhydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄)	Sigma
Natriumfluorid	Sigma
Nitrozellulosemembran	Bio-Rad
Phosphatpuffer (+Salze; PBS)	Sigma
Ponceau	Sigma
Phosphatase Inhibitor Cocktail	Roche
Protease Inhibitor Cocktail	Sigma, Roche
Proteinmarker	peqLab, Biorad
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Fluca
TEMED (Tetramethyldiamin)	Sigma
Tris Base	Roth
Tris-HCl	Roth

Magermilchpulver	AppliChem
Tween20	Roth
Triton-X-100	Roth
sonstige Stoffe und Materialien	Firma
Anandamid	Cayman Chemicals
Diamantstift	Fisher Scientific
DAPI	Höchst
Forene	Abbott
Hämatoxylin	Fluka Biochemica
Halothan	Hoechst
Kanülen, 0,45 mm	Braun
Kongorot	Sigma
Paraformaldehyd	Sigma
Poly-L-ornithin	Sigma
Präparierbesteck (steril)	Fine Science Tools
t-Octylphenoxypolyethoxyethanol (Triton X-100)	Merck
Spritzen	Braun
SR-141716 (Rimonabant)	AG Lutz
SUPERFROST®Plus Objektträger	Hartenstein
Tissue Freezing Medium	Jung
Tomatolectin FITC-conjugated	Sigma
Win-55, 212-2	Cayman Chemicals
Win-55, 212-3	Cayman Chemicals

2.1.2 Geräte

Zellbiologie	Firma
Inkubatoren	Binder
Sterilbänke	Heraeus
Absaug-System „Vacusafe“	Integra
McIlwain tissue chopper	Campden Instruments

Molekularbiologie

iQ Real-Time-PCR Thermozykler
 PCR DNA Thermozykler
 Sub-CellGT Agarose Gel Elektrophorese System
 NanoDrop® ND-1000-System

Firma

BioRad
 Biometra
 BioRad
 PeqLab

Proteinbiochemie

Mikrotiterplatten-Lesegerät
 Brutschränke
 Heizblock
 Mini Protean III, Western Blotting System
 Trans-Blot
 Fuji LAS-3000 intelligent dark box

Firma

Thermo Labsystems
 Binder
 Eppendorf
 BioRad
 BioRad
 Fuji

Injektion von AAV in Hippocampus

Microsyringe (10µl) Nanofil
 Microsyringe Pump Controller Micro4
 Pump UMP-2
 Small animal Stereotaxic Model 900
 Syringe pump PHD 2000 infusion
 V clamp for UMP3

Firma

World Precision Instruments
 World Precision Instruments
 World Precision Instruments
 Kopf Instruments
 Harvard apparatus
 World Precision Instruments

Mikroskope

Axiovert 200 Fluoreszenz-Mikroskop
 CCD Kamera
 IX81 Fluoreszenz-Mikroskop
 Cell^R-Imaging-Station

Firma

Zeiss
 Visitron Systems
 Olympus
 Olympus

Allgemeines

Dampfsterilisator „Varioclav“
 Spektrophotometer
 pH-Meter
 Zentrifuge Universal 32 R
 Mikrowelle Discover 1

Firma

H+P
 Beckmann
 inoLab
 Hettich
 CEM

Wasserbad
Kryostat CM1900

P-D Industriegesellschaft
Leica

Zum Zubereiten bestimmter Medien wurden weitere Reagenzien und Chemikalien (Säuren, Basen und Salze) der Firmen Merck (Darmstadt), Sigma-Aldrich (Schnellendorf), Invitrogen (Karlsruhe), New England Biolabs (Frankfurt/Main), Peqlab (Erlangen) und Carl Roth (Karlsruhe) jeweils nach Angaben des Herstellers verwendet. Die Chemikalien der einzelnen Methoden sind, wenn oben nicht aufgeführt, dem jeweiligen Text der Methode zu entnehmen.

2.1.3 Puffer und Lösungen

Zur Herstellung von Puffern und Lösungen wurde bidestilliertes Wasser (bidest.-H₂O) verwendet und die Lösungen anschließend gegebenenfalls autoklaviert.

Allgemeine Puffer

1 x PBS	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 10 mM Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O 1,8 mM K ₂ HPO ₄ pH 7,4 mit HCl
1 x TBS	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 25 mM Tris-Base pH 7,4 mit HCl
1 x TBE	89 mM Tris-Base 89 mM Borsäure 2 mM EDTA pH 8,3 mit HCl

Puffer für die Agarose-Gelelektrophorese

1 x TAE	5 mM Tris 5 mM Borsäure 1 mM EDTA pH 7,5
6 x DNA-Probenpuffer	0,006 % (w/v) Bromphenolblau 50 % (v/v) Ficoll 10 mM Tris-HCl pH 8,0
Orange-G-Auftragspuffer	0,25 % Acid Orange 10 45 % (v/v) Glycerol in 1 x TBE 1 mM EDTA pH 8,0

Western-Blot Puffer

4 x Sammelgelpuffer	0,6 M Tris-Base 0,4 % (w/v) SDS in bidest.-H ₂ O, pH 6,8
4 x Trenngelpuffer	1,5 mM Tris-Base 0,4 % (w/v) SDS in bidest.-H ₂ O, pH 8,8
1 x SDS-Laufpuffer	25 mM Tris-HCl, pH 8,3 192 mM Glycin 0,1 % (w/v) SDS

1 x Transferpuffer	25 mM Tris-HCl, pH 8,3 192 mM Glycin 0,1 % (w/v) SDS 20 % (v/v) Methanol
4 x Probenpuffer	100 mM Tris-HCl, pH 6,8 4 % (w/v) SDS 24 % (v/v) Glycerin 20 mM Bromphenolblau 1,4 M β -Mercaptoethanol
1 x PonceauS-Lösung	0,02 % (w/v) PonceauS 0,3 % (w/v) Trichloressigsäure 0,3 % (w/v) Sulphosalicylsäure
Blockierungspuffer	4 % (w/v) Trockenmilchpulver in TBS/Tween 20
Sonstige Puffer und Lösungen	
TBS/Tween 20	1 x TBS 0,1 % (v/v) Tween 20
3 x Protein-Lysispuffer	150 mM Tris-HCl 6 % (w/v) SDS 30 % (w/v) Saccharose
DNA-Lysepuffer	100 mM Tris-HCl, pH 8,0 5mM EDTA 200 mM NaCl 0,2 % SDS In 500 ml H ₂ O und autoklavieren

DNA-Elutionspuffer	1M Tris, pH 8,0 0,5 M EDTA In H ₂ O lösen und autoklavieren
30 % Saccharose	30 % (w/v) Saccharose in 1 x PBS
4 % Paraformaldehyd	4 % PFA in 1 x PBS pH 7,2 (HCl)

Medien/Lösungen/Puffer für die Immunhistochemie

Einbettmedium	10 % (w/v) Polyvinylalkohol 70 % (w/v) PBS unter Rühren bei 60°C lösen 30 % (v/v) Glycerin 0,1 % (w/v) p-Phenylendiamin unter Rühren auf pH 8,0 einstellen bei -80°C unter Lichtausschluss lagern
Mowiol Einbettmedium	0,1 M Tris-HCl, pH 8,5 10 % (w/v) Mowiol 4-88 20 % (v/v) Glycerin 2,5 % (w/v) DABCO
Blockierungspuffer	1 x PBS 3 % (v/v) BSA
Primär-Antikörperlösung	Antikörper 1:100 bis 1:200 in 1 x PBS 0,1 % (v/v) Triton-X-100

2.1.4 Kulturmedien

Medien für die Kultur von Zelllinien

SH-SY5Y

DMEM (#41965) Medium mit:
10 % (v/v) inaktives FCS
1 mM Na-Pyruvat
1 % (v/v) Antibiotika/Antimycotika-Mix

N2A-Swe

DMEM (#41965) Medium mit:
10 % (v/v) aktives FCS
1 mM Na-Pyruvat
1 % (v/v) Antibiotika/Antimycotika-Mix

Einfriermedium

90 % DMEM (#41965) Medium mit:
10 % (v/v) FCS
10 % (v/v) DMSO

2.1.5 Antikörper

Antikörper	Spezies	Verdünnung	Bezugsquelle
Primärantikörper für die Immunhistochemie			
6E10	Maus	1:100	Covance
GFAP	Kaninchen	1:100	Dako
NeuN	Maus	1:100	Chemicon
Myelin basic protein	Maus	1:100	AG Trotter*
Anti-Synaptophysin 1	Ratte	1:200	Synaptic Systems
Primärantikörper für Immunoblots			
Aktin	Kaninchen	1:1000	Sigma
CB1	Kaninchen	1:200	Cayman Chemical
6E10	Maus	1:1000	Covance
A8717	Kaninchen	1:1000	Sigma
PHF-1	Maus	1:1000	Biosource
Tubulin	Maus	1:1000	Sigma
GFAP	Kaninchen	1:1000	Dako
NeuN	Maus	1:1000	Chemicon
Myelin basic protein	Ratte	1:1000	AG Trotter*
Anti-Synaptophysin 1	Maus	1:1000	Synaptic Systems
Presenilin-1	Kaninchen	1:1000	ZYMED® Laboratories
PSD95	Maus	1:1000	AG Trotter*
CNP	Maus	1:1000	AG Trotter*
MOG	Maus	1:1000	AG Trotter*
Sekundärantikörper für Immunhistochemie			
Cy3-anti-Maus	Ziege	1:200	Jackson
Cy3-anti-Ratte	Ziege	1:200	Jackson
Cy2-anti-Maus	Ziege	1:200	Jackson
Sekundärantikörper für Immunoblots			
Anti-Maus-HRP	Esel	1:10000	Jackson
Anti-Kaninchen-HRP	Esel	1:10000	Jackson
Anti-Ratte-HRP	Esel	1:10000	Jackson

*AG Trotter, Molekulare Zellbiologie, Bentzelweg 3, 55099 Mainz

2.1.6 Oligonukleotide

Folgende Primer wurden für die Genotypisierung der APP23/CBN-Mäuse und zur Untersuchung der APP-Expression verwendet.

Primer	Sequenz	T _A °C
APPCT-1F	5'-GAATTCGACATGACTCAGG-3'	58
APPCT-1R	5'-GTTCTGCTGCATCTTGGACA-3'	58
APP-F	5'-GTGCCGAGCAATGATCTCCC-3'	60
APP-R	5'-GGTTCCTGGGTAGTCTTGAGT-3'	60
GAPDH-F	5'-GCACCACCAACTGCTTAGCAC-3'	60
GAPDH-R	5'-CACCACCTTCTTGATGTCATC-3'	60
CB1-F	5'-GCTGTCTCTGGTCCTCTTAAA-3'	60
CB1-R	5'-AGACAAAAGTCTCCACTGTGG-3'	60
CB1-Neo-Null	5'-TTCGATTAAGATGGCCCATCC-3'	60

Folgende Primer wurden für die Untersuchung der Expression der α - und β -Sekretase in N2A-Swe Zellen und zum Nachweis des CB1-Rezeptors in SH-SY5Y-Zellen verwendet.

Primer	Sequenz	T _A °C
ADAM10-F	5'-GTGCCAGTACAGGCTCTTTGC-3'	60
ADAM10-R	5'-CACAGTAGCCTCTGAAGTCATTACATG-3'	60
BACE1-F	5'-GAGTGGGACCACCAACCTTC-3'	60
BACE1-R	5'-GCTGCCTTGATGGACTTGAC-3'	60
Aktin-F	5'-CTACAATGAGCTGCGTGTGGC-3'	60
Aktin-R	5'-CAGGTCCAGACGCAGGATGGC-3'	60
murine CB1-F	5'-GGGCACCTTCACGGTTCT-3'	60
murine CB1-R	5'-GTGGAAGTCAACAAAGCTGTAGA-3'	60
human CB1-F	5'-AAGGTGACATGGCATCCAAAT-3'	60
human CB1-R	5'-AGGACGAGAGAGACTTGTTGTAA-5'	60

2.1.7 Mausstämme

Alle in dieser Arbeit verwendeten Mauslinien wurden nach den Richtlinien der „Nutzordnung für die Tierhaltung“ der Zentralen Versuchstier-Einrichtung (ZVTE) Mainz in der Tierhaltung des Instituts für Pathobiochemie gehalten. Zeitlebens waren die Mäuse einem 12h:12h Hell:Dunkel-Zyklus unterworfen und hatten jederzeit Zugang zu Futter und Wasser.

Als Alzheimer-Mausmodell wurden die ursprünglich von der Novartis AG (Basel) erhaltenen transgenen APP23-C57/B6-Tiere im institutseigenen Tierstall über mehrere Einkreuzungszyklen verpaart. Bei diesem Mausmodell wird unter der Kontrolle des murinen Thy-1,2-Promotors die humane APP₇₅₁ cDNA, die an Position 670/671 (KM→NL) die schwedische Doppelmutation trägt, neuronenspezifisch siebenfach überexprimiert (Lüthi et al. 1997). Durch diese Überexpression des humanen amyloiden Vorläuferproteins (APP) kommt es bereits im Alter von 6 Monaten im Gehirn von APP23-Mäusen zur Formation von senilen Plaques (Sturchler-Pierrat et al. 1997).

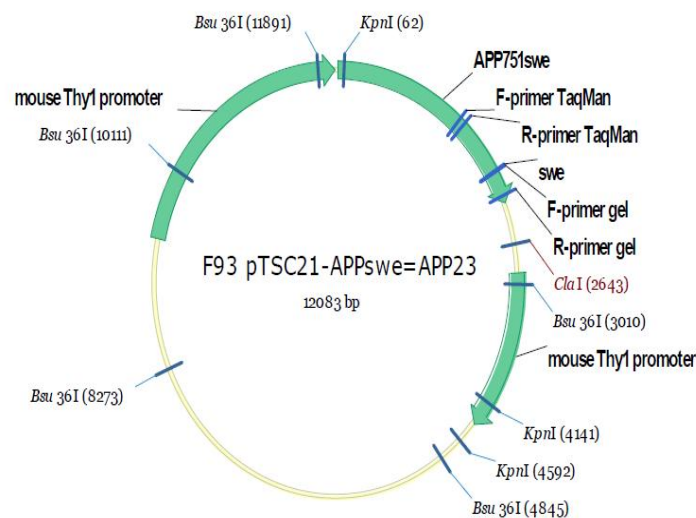


Abb. 2.1.7: Expressionskarte der APP23-Maus

In der Abbildung ist der 12083 Basenpaar große Expressionsvektor zur Herstellung der transgenen Mauslinie APP23 (Novartis AG, Basel) dargestellt.

Um den Einfluss des CB1-R in der Alzheimer Demenz zu untersuchen, wurden unserer Arbeitsgruppe CB1-R knockout Mäuse (CB1-R-KO) der Arbeitsgruppe von Prof. Beat Lutz (Institut für Physiologische Chemie, Universitätsmedizin Mainz, Duesbergweg 6, 55099 Mainz) zur Verfügung gestellt. Bei diesen Mäusen handelt es sich um einen konventionellen CB1-R-KO, so dass die Tiere von Geburt an keine funktionellen CB1-R exprimieren (Marsicano et al. 2002). Für unsere Untersuchungen wurden anfangs APP23/CB1^{+/-} Tiere mit

CB1^{+/-} gekreuzt, die geschlechtsreifen F1-Generationen mittels PCR auf den APP- sowie CB1-Genotyp analysiert und die transgenen Individuen bezüglich ihres Genotyps und Geschlechts selektiert. Um eine höhere Effizienz an Geburten in den einzelnen APP- und CB1-Genotypen zu erhalten wurden im späteren Verlauf unterschiedliche Zuchtpaare angesetzt. Im Allgemeinen wird diese neu gezüchtete Mauslinie in dieser Arbeit als APP23/CBN geführt.

2.1.8 Cannabinoide

Anandamid (Arachidonylethanolamid)

Cayman Chemicals

(Stammlösung: 10 mM in Ethanol)

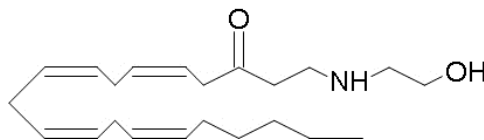


Abb. 2.1.8 A: Strukturformel von Anandamide

Win-55, 212-2 (Win2)/Win-55, 212-3 (Win3)

Cayman Chemicals

(Stammlösung: 10 mM in DMSO)

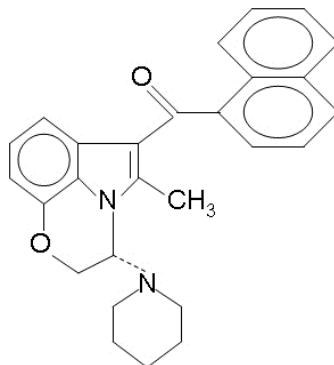


Abb. 2.1.8 B: Strukturformel von Win-55,212-2, Win-55,212-3

Struktur und Wirkung:

Win3 ist ein Stereoisomer zu Win2 und fungiert als inverser Agonist des CB1-R, wodurch dieser nicht aktiviert wird.

SR 141716 (Rimonabant)

AG Lutz

(Stammlösung: 10mM in DMSO)

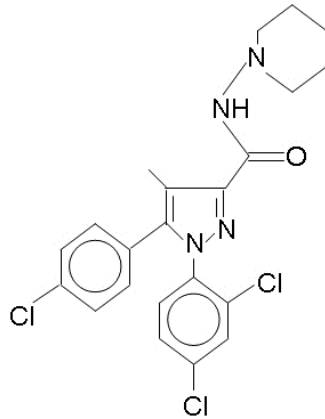


Abb. 2.1.8 C: Strukturformel von SR141716A (Rimonabant)

2-Arachidonylglycerol (2-AG)

Cayman Chemicals

(Stammlösung: 10mM in Ethanol)

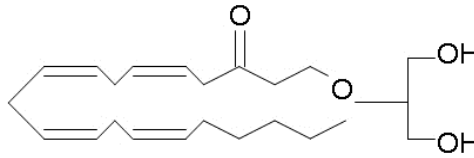


Abb. 2.1.8 D: Strukturformel von 2-Arachidonylglycerol (2-AG)

2.2 Methoden

2.2.1 Klonale Zelllinien

2.2.1.1 Kultivierung von SH-SY5Y- und N2A-Swe Zellen

Für *in vitro* Experimente wurden adhärente Zellen der humanen Neuroblastom-Zelllinie SH-SY5Y (Biedler et al. 1973) und die murine Neuroblastoma Zelllinie N2A-Swe (Thinakaran et al. 1996) verwendet, welche stabil die cDNA der humanen APP₆₉₅ Mutante überexprimiert. Die Zelllinien wurden in DMEM mit 10% inaktivem FCS (SH-SY5Y) oder 10% aktivem FCS (N2A-Swe), 1 mM Na-Pyruvat und einer 1% Streptomycin/Penicillin-Lösung, bei 37 °C, 95% Luftfeuchtigkeit und einer CO₂-Konzentration von 5%, kultiviert. Zwei mal wöchentlich wurden die Zellen bei einer Konfluenz von ca. 60-70% auf 6 cm bzw. 10 cm Kulturschalen ausplattiert. Für das Ablösen und Passagieren der Zellen wurde eine 0,1%ige (w/v) Trypsin-Lösung mit 0,2% EDTA verwendet.

2.2.1.2 Kryokonservierung von klonalen Zelllinien

Zur langfristigen Erhaltung wurden die Zelllinien in flüssigen Stickstofftanks aufbewahrt. Dazu wurden die Zellen bei einer Konfluenz von 70 % trypsinisiert und 4 min bei 1200 rpm und RT zentrifugiert. Die Zellen wurden in 1 ml Einfriermedium (siehe 2.1.2) aufgenommen und in ein Kryogefäß (Nunc Intermed GmbH) transferiert. Zur kontrollierten Senkung der Temperatur um -1 °C pro Minute wurden die Zellen für zwei Tage in einer Kryobox (Nalgene Labware) mit Isopropanol bei -80 °C gelagert und anschließend in flüssigen Stickstoff überführt.

2.2.1.3 Behandlung von *in vitro* Kulturen mit Cannabinoiden

Zur Untersuchung der APP-Prozessierung nach Cannabinoidbehandlung der Zelllinien wurden die in 2.1.8 beschriebenen CB1-Agonisten- und Antagonisten verwendet.

Bei einer Konfluenz von ca. 70 % wurden SH-SY5Y und N2A-Swe-Zellen mit Cannabinoiden behandelt. Im ersten Schritt wurde das verbrauchte Medium aus den Kulturschalen entfernt und die Zellen mit 1 x PBS gewaschen. Anschließend wurde je 5 ml frisches FCS-freies Kulturmedium auf die Zellen gegeben und die Kulturschalen bis zur

Cannabinoidbehandlung bei 37°C im Brutschrank aufbewahrt. AEA wurde in 100 % EtOH, Win2, Win3 und Rimonabant wurden in 100 % DMSO gelöst. Die eingesetzten Cannabinoidkonzentrationen betragen final 10 nM für AEA, Win2, 2-AG und Rimonabant. Die Substanzen wurden unter leichtem Schütteln im Medium verteilt. Anschließend erfolgte die Inkubation im Brutschrank für 24 h oder in einer Zeitkinetik von 4, 6 und 8 h. Alle Zellen, welche sowohl mit AEA/Win2 sowie mit Rimonabant behandelt werden sollten, wurden zuvor für 20 min mit Rimonabant vorinkubiert. Nach 24 h wurden je 1 ml des Zellkulturüberstandes der behandelten Schale in 1,5ml Eppendorfgefäße überführt und auf Eis gestellt. Der restliche Überstand wurde von dem Zellrasen abgesaugt und die adhärennten Zellen mit eisgekühltem PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit je 1 ml eiskaltem PBS mechanisch von den Zellkulturschalen gelöst und bei 4 °C und 3000 rpm für 8 min zentrifugiert. Die Zellen wurden dann auf Eis gelagert mit anschließender Proteinextraktion nach Punkt 2.2.4.1.

2.2.2 Immunhistochemische Methoden

2.2.2.1 Anfertigung und Kryokonservierung von Mausgehirnschnitten

Zur Anfertigung von Gehirnschnitten wurde jeweils die linke Gehirnhälfte sofort nach der Präparation in einer 4 % PFA-Lösung für 24 h bei 4°C fixiert. Anschließend wurden die Gehirnhälften in einer 30 % Saccharose-Lösung inkubiert und danach in Aluminiumfolietaschen gegeben. Die Taschen wurden mit Einbettmedium gefüllt, die Gehirne in Trockeneis/EtOH eingebettet und die Schnittblöcke zur Lagerung bei -80 °C aufbewahrt.

Die einzelnen Gehirnblöcke wurden dann in einem Kryostat von Leica eingespannt und koronale Schnitte in einer Dicke von 10 µm angefertigt. Die Schnitte wurden direkt auf Glasobjektträger überführt, die mit einem positiven Ladungsträger beschichtet waren. Die Schnitte wurden auf einem Heizblock getrocknet und bei -20 °C gelagert.

2.2.2.2 Histologische Analyse der Gehirne über Hämatoxylin/Kongorot-Färbung

Zur Analyse der amyloiden Plaques wurden die Schnitte der PFA-fixierten APP23/CBN-Mausgehirne mit dem Farbstoff Kongorot gefärbt. Im ersten Schritt wurden die Schnitte für 20 min in einer Hämatoxylin-Lösung nach Mayer (Sigma-Aldrich) vorgefärbt, um die Neuronenmorphologie sichtbar zu machen. Anschließend wurden die Schnitte für ca. 20 min in Leitungswasser bis zur gewünschten Blaufärbung gewaschen. Danach erfolgte eine Inkubation von 30 min in 80% EtOH/3% NaCl/3% NaOH bei RT. Die anschließende Kongorot-Färbung (0,2% in 80% EtOH) wurde für 30 min bei RT durchgeführt. Im letzten Schritt wurden die Schnitte in 80% EtOH gewaschen und an der Luft getrocknet.

Die Gehirnschnitte wurden dann mit Mowiol-Einbettmedium (siehe 2.1.1) überschichtet, mit einem Deckglas überzogen und mit Nagellack abgedichtet. Durch das Einbetten der Schnitte in Mowiol, welches das Antifadereagenz „1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan“ (DABCO) enthält, wird das Ausbleichen von Fluoreszenzfarbstoffen nach erfolgter Anregung mit Licht verringert. Nach Trocknung des Nagellacks wurden die Schnitte unter dem Mikroskop auf das Vorhandensein von amyloiden Plaques untersucht.

2.2.2.3 Indirekte Immunfluoreszenz in Mausgehirnschnitten

Für den Nachweis von amyloiden Plaques und der Aktivierung von Mikroglia- und Astrogliazellen in Mausgehirnschnitten wurde die indirekte Immunfluoreszenzfärbung angewendet. Dazu wurden die Schnitte im ersten Schritt für 20 min in 4% PFA-Lösung nachfixiert. Die PFA-Lösung wurde entfernt und die Schnitte in 1 x PBS gewaschen. Danach erfolgte eine zweistündige Permeabilisierung der Schnitte mit 3 % BSA in 0,1 % Triton-X-100/1 x PBS.

Danach wurden die Proben entweder mit dem 6E10 Antikörper (1:100 in 1 x PBS/0,1 % Triton-X-100), welcher ein Epitop (Aminosäuren 1-16) innerhalb des A β -Peptids erkennt und somit amyloide Plaques detektiert, oder mit dem anti-GFAP Antikörper (1:200 in 1 x PBS/0,1 % Triton-X-100), welcher aktivierte Astrogliazellen markiert, bei 4 °C über Nacht inkubiert. Für die Detektion von Mikrogliazellen wurde zusätzlich das FITC-konjugierte Tomato-Lectin verwendet. Die Detektion erfolgte über Nacht bei 4°C im Dunkeln. Nach dreimaligem Waschen mit PBS für jeweils 10 min wurden die Schnitte bei RT für 1 h mit den sekundären, Fluoreszenzfarbstoff (Cy3)- oder (Cy2)-gekoppelten Antikörpern (1:200 in PBS/0,1 % Triton-X-100) inkubiert. Weiterhin wurden die Schnitte für max. 10 min mit DAPI (1:100 in PBS) zur Detektion der Zellkerne inkubiert. Die ungebundenen sekundären Antikörper wurden durch dreimaliges Waschen für 10 min mit PBS entfernt. Um die Präparate vor dem Ausbleichen des Fluoreszenzfarbstoffs durch Lichteinfall zu schützen, wurden diese mit dem unter 1.1.3 aufgeführten Einbettmedium eingebettet und ein Deckglas mit Nagellack auf den Objekten fixiert. Die Schnitte wurden mit Hilfe eines Axiovert-200 Fluoreszenz-Mikroskops ausgewertet.

2.2.3 Molekularbiologische Methoden

2.2.3.1 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von DNA und RNA wurde spektrophotometrisch mit Hilfe eines NanoDrop® ND-1000-Systems bestimmt. Die optische Dichte (OD) wurde mit 1 µl der Probe bei den Wellenlängen 260/280 nm gegen Wasser oder dem Elutionspuffer aus dem jeweiligen RNA-Aufreinigungs-Kit gemessen. Die Ergebnisse der Messungen können Informationen über Reinheit, sowie eventuelle Kontaminationen bei der Aufreinigung der Probe geben. Bei einem Quotienten von 1,8 bis 2,0 ist die Probe weitestgehend frei von Proteinkontaminationen.

2.2.3.2 Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellen und Geweben

Die Aufreinigung von Gesamt-RNA aus Zellen erfolgte durch Anwendung des RNA-RT-Miniprep-Kit der Firma Stratagene, sowie die Aufreinigung von Gehirngewebe mit dem Total RNA Isolation Kit der Firma Macherey-Nagel.

Im Gegensatz zur DNA ist RNA für eine spontane enzymatisch katalysierte Hydrolyse anfällig, wodurch zur RNA-Isolierung Diethylpyrocarbonat (DEPC)-behandeltes bidestilliertes Wasser verwendet wurde. Im ersten Schritt der Aufreinigung wurden die Zellen oder das Gewebe durch Zugabe von Lysepuffer aufgeschlossen. Die Homogenisierung erfolgte mit Hilfe von Aufreinigungssäulen aus den jeweiligen Kits. Bei Gehirngewebe erfolgte der Aufschluss und die Homogenisierung zusammen durch Sonifizieren unter möglichst sterilen Bedingungen. Die weiteren Präparationsschritte wurden nach Vorschrift des Herstellers durchgeführt. Zusätzlich wurde optional ein DNase-Verdau für 30 min bei 37 °C durchgeführt, um eine Kontamination der isolierten RNA mit DNA zu vermeiden. Die Elution der RNA erfolgte mit RNase-freiem Wasser.

Die Konzentrationsbestimmung der RNA wurde wie unter 2.2.3.1 beschrieben durchgeführt und die RNA anschließend bei -80 °C gelagert.

2.2.3.3 Präparation genomischer DNA zur Genotypisierung der APP23/CBN-Mäuse

Für die Genotypisierung der APP23/CBN-Mäuse wurde von jedem Tier die DNA aus den Schwanzspitzen unter Verwendung des unter 2.1.3 aufgeführten Lysispuffers aufgereinigt.

Vor der Entnahme der Schwanzspitzen wurde der DNA-Lysepuffer zusätzlich mit einer frisch aufgetauten 10 mg/ml Proteinase K-Lösung gemischt. Bei jedem Tier wurden etwa 0,5-1 cm Schwanzspitze entnommen, in 500 µl DNA-Lysepuffer überführt und über Nacht bei 56°C unter Schütteln auf einem Thermomixer inkubiert. Anschließend wurden die Proben für 10 min bei RT und 13.000 rpm zentrifugiert. 450-500 µl des Überstandes wurden in 500 µl Isopropanol aufgenommen und durch Invertieren gemischt, wodurch die DNA präzipitiert. Nun erfolgt ein erneuter Zentrifugationsschritt für 5-10 min bei RT und 13.000 rpm. Der Überstand wurde anschließend vorsichtig durch eine Pipette entfernt und das entstandene Pellet mit 200-400 µl 70% EtOH durch Inversion gewaschen. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet zum Trocknen für 30-60 min bei 37-50 °C auf einem Thermomixer inkubiert. Anschließend wurde das Pellet in 200 µl DNA-Elutionspuffer (siehe 2.1.1) aufgenommen, mehrmals unter Vortexen gemischt und bei 37 °C und 900 rpm auf einem Thermomixer über Nacht inkubiert. Die Konzentration der gelösten DNA wurde wie unter 2.2.3.1 beschrieben photometrisch bestimmt. Die Lagerung der DNA erfolgte bei 4°C.

2.2.3.4 cDNA-Synthese

Das Enzym Reverse Transkriptase kann mRNA in cDNA umschreiben. Dabei nutzt man die Polyadenylierung der mRNA aus, wodurch bei der Synthese Oligo-dT-Primer spezifisch an den poly-A⁺-Schwanz der mRNA binden. Für einen Ansatz wurden 0,5-1 µg Gesamt-RNA eingesetzt. Die RNA wurde mit DEPC-Wasser auf 10 µl aufgefüllt und 5 min bei 65°C im Thermocycler inkubiert, um Sekundärstrukturen der RNA zu denaturieren. Die weitere Synthese erfolgte nach Angaben des Herstellers mit dem Omniscript[®] Reverse Transkription Kit der Firma Qiagen (Hilden) in einem Volumen von 20 µl. Die hier eingesetzten RNase-Inhibitoren wurden von der Firma Promega (Mannheim) bezogen. Bei jedem Ansatz wurde eine Kontrolle, die keine Reverse Transkriptase enthielt (Mock), zum Nachweis auf Kontamination mit DNA mitgeführt. Die Lagerung der cDNA erfolgte bei -20 °C.

2.2.3.5 Polymerase-Kettenreaktion

Durch die Etablierung der *Polymerase chain reaction* (PCR) im Jahre 1987 wurde es möglich jedes DNA-Fragment in beliebiger Menge zu amplifizieren (Mullis & Faloona 1987). Bei der Reaktion werden zwei kurze Oligonukleotide (Primer) gewählt, die eine entgegengesetzte Orientierung besitzen und jeweils komplementär zu dem Matrizenstrang sind. Jeder Zyklus

der PCR erfolgt in drei Schritten: Bei der Denaturierung (95 °C) erfolgt die Trennung der doppelsträngigen DNA. Durch das Erhitzen werden die Wasserstoffbrückenbindungen, welche die beiden DNA-Stränge zusammenhalten, aufgebrochen. Anschließend folgt der Schritt der Primerhybridisierung („*Annealing*“). Die Temperatur wird gesenkt und die Primer lagern sich an beide DNA-Stränge an. Danach erfolgt der Schritt der Elongation („*Extension*“) und mit Hilfe der DNA-Polymerase (Saiki et al. 1988) eine komplementäre Neusynthese der DNA. Durch mehrfache Wiederholung dieser Schritte kann die DNA beliebig oft vervielfältigt werden.

Die PCR mit den spezifischen Primern für APP, CB1 und Aktin wurden mit einer Hybridisierungstemperatur von 58-60 °C durchgeführt.

2.2.3.6 Nachweis der APP23/CBN-Genotypen durch PCR

Zur Analyse der APP23/CBN-Genotypen wurde eine Taq-DNA-Polymerase verwendet. Es wurde von jeder Probe 1 µl DNA in den PCR-Mix eingesetzt. Zum Nachweis von endogenem oder überexprimierenden APP, sowie zum Nachweis der jeweiligen CB1-Genotypen wurden die in 2.1.4 aufgeführten sense- und antisense-Primer verwendet. Ein PCR Ansatz setzte sich wie folgt zusammen:

PCR-Ansatz: 1 µl cDNA
 jeweils 10 pmol/µl *sense* sowie *antisense* Primer
 5 µl 15 x PCR-Puffer ohne MgCl₂
 2,5 µl MgCl₂
 1 µl 5 mM dNTPs
 0,125 µl *Taq*-Polymerase

Der Ansatz wurde mit bidestilliertem Wasser auf 25 µl aufgefüllt.

Die Amplifikation der DNA erfolgte mit Hilfe eines Thermocyclers von Biometra. Im ersten Schritt des PCR-Programmes erfolgte eine Denaturierung von 5 min bei 95 °C, dann folgen 30 Zyklen mit jeweils 45 sec Denaturierung bei 95 °C, Annealing für 45 sec bei 55 °C und Extension für 45 sec bei 72 °C. Danach erfolgte ein weiterer Extensionsschritt (3 min bei 72 °C), sowie die Amplifikation und ein Abkühlen auf 4 °C.

2.2.3.7 Agarosegelelektrophorese zur Analyse von genomischer DNA

Nukleinsäuren besitzen eine negativ geladene Phosphatgruppe an ihrem Zuckerphosphatrückgrat. Durch diese negative Ladung wird die Auftrennung der DNA mittels Gelelektrophorese nach Molekulargröße möglich.

Agarosegele wurden in dieser Arbeit zur Analyse von DNA der verschiedenen APP23/CBN-Genotypen angefertigt. Für die Analyse wurden Gele in einer Konzentration von 1 % nach folgendem Schema verwendet:

Herstellung eines Agarosegels

Zur Herstellung der Agarosegele wurde die gewünschte Menge Agarose (w/v) in einem Erlenmeyerkolben durch Aufkochen in 1 x TAE Puffer gelöst und 1 Tropfen Ethidiumbromid-Stammlösung (1 mg/ml) hinzugegeben. Durch die Zugabe von Ethidiumbromid als DNA-interkalierender Fluoreszenz-Farbstoff wird eine spätere Visualisierung der DNA nach Anregung im UV-Licht ermöglicht.

Nach der Fertigstellung der Gele wurden die Proben jeweils mit 1 x DNA-Probenpuffer oder mit Orange-G-Auftragspuffer versetzt. Bei jeder Elektrophorese wurde zur Größenbestimmung der DNA-Fragmente ein DNA-Längenstandard (Fermentas) im Gel mitgeführt. Die angelegte Spannung betrug 5 bis 10 V/cm Gel. Nach der Elektrophorese wurde die aufgetrennte DNA unter UV-Licht (254-366 nm) sichtbar gemacht und mit einer digitalen Kamera fotografiert. Zur besseren Kontrastierung von schwächeren Banden wurden die Schwarzweiß-Aufnahmen invertiert.

2.2.3.8 Real-time PCR

Eine Methode der Quantifizierung von Nukleinsäuren ist die Real-time quantitative PCR (qPCR). Durch diese Methode wurde es möglich die wachsende DNA-Menge während der Amplifikation zu verfolgen. Der hier verwendete iCycler der Firma BioRad erlaubt eine quantitative und qualitative Real-time PCR mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes SYBR Green I. Dieser interkaliert spezifisch in die kleine Furche der DNA-Doppelhelix und fluoresziert nur, wenn er an den Doppelstrang gebunden ist. Steigt nun während einer Amplifikation die Menge des Produkts an, so erhöht sich als Folge ebenfalls das Fluoreszenzsignal von SYBR

Green I. Nach abgelaufener PCR erlaubt das SYBR Green I eine Schmelzkurvenanalyse, anhand derer man die Produktqualität und dadurch die Spezifität der Reaktion bestimmen kann.

Die Real-time PCR-Analyse wurde zur Quantifizierung der Genexpression von APP auf Transkriptionsebene in APP23/CBN-Mäusen und für die Untersuchung der Expression von α - und β -Sekretase nach Cannabinoidbehandlung durchgeführt.

Das Endvolumen der qPCR betrug 25 μ l und enthielt neben der zu untersuchenden cDNA 12,5 μ l PCR SYBR Green Supermix sowie 100 pmol der sense- und antisense-Primer. Als Kontrolle wurden bei jeder Reaktion die Mock-cDNA und als Negativkontrolle eine Probe mit 1 μ l bidest.-H₂O mitgeführt. Durch die Mock-Kontrollen können Hinweise auf eine mögliche DNA-Kontamination bei der Analyse der Schmelzkurve geliefert werden. Die Bedingungen der qPCR stimmten mit denen der konventionellen PCR überein. Es wurde der sog. „threshold cycle“ (C_T-Wert) im PCR-Zyklus bestimmt, nach dem die Amplifikation des PCR-Produktes in die exponentielle Phase übergeht. Die Bildung spezifischer PCR-Produkte wurde über die Analyse der Schmelzkurve überprüft.

Die relative Expression (= R) der α - und β -Sekretase in N2A-Swe Zellen wurde unter Kontrollbedingungen (nur EtOH oder DMSO) und nach Behandlung mit AEA oder Win2 (10 nM) für 24 h oder in einer Zeitkinetik (4 h, 6 h und 8 h) untersucht und mit Hilfe des relativen Expressionssoftware tool (REST) bestimmt (Pfaffl et al. 2002). Mit folgender Formel konnte die relative Expression berechnet werden:

$$R = \frac{(E_{\text{Zielgen}})^{\Delta C_{\text{PZielgen}} (\text{Kontrolle} - \text{Probe})}}{(E_{\text{Referenzgen}})^{\Delta C_{\text{PReferenzgen}} (\text{Kontrolle} - \text{Probe})}}$$

Bei jedem Versuchsdurchgang wurde die Expression eines Referenzgens (Aktin oder RPL19) für jede Probe mitgeführt.

Die Analyse der relativen APP-Expression in APP23/CB1^{+/-} und APP23/CB1^{-/-}-Mäusen erfolgte nach dem gleichen Prinzip. Als Referenz dienten bei dieser Untersuchung die C_T-Werte der APP23/CB1^{+/+}-Mäuse.

2.2.4 Proteinbiochemische Methoden

2.2.4.1 Proteinpräparation aus Zellen

Das Ernten der Zellen erfolgte wie unter Punkt 2.2.1.4 beschrieben. Nach dem Zentrifugieren wurde das Pellet in je 200 µl 1 x Proteinlysispuffer aufgenommen. Zum Schutz der Proteine vor proteolytischem Abbau wurde der Puffer zusätzlich mit 1 x Protease- und Phosphatase-Inhibitoren (Roche) versetzt. Anschließend wurden die Zellysate 3 x 10 sec sonifiziert und je nach Proteinextraktion zusätzlich für 5 min bei 95 °C aufgeköcht. Die Homogenisate wurden bei -20 °C gelagert.

2.2.4.2 Proteinpräparation aus Geweben

Zur Isolation von Protein aus Geweben von APP23/CBN-Mäusen wurden die Organe Milz, Niere, Leber und Herz direkt nach dem Töten der Tiere entnommen. Die Fein-Präparation des Gehirns in Hippocampus, Cerebellum, vorderer Cortex, Rückenmark sowie den verbleibenden Rest des Gehirns erfolgte in PBS. Alle Gewebe und Gehirnabschnitte wurden nach der Entnahme sofort in flüssigem N₂ schockgefroren und anschließend bei -80 °C gelagert, um eine Proteindegradation zu reduzieren.

Im ersten Schritt der Proteinisolation wurden die Gewebe in je 400 µl eiskaltem 20 mM Tris-Puffer, der zusätzlich mit 1 x Protease- und Phosphatase-Inhibitoren versetzt wurde, aufgenommen. Die Homogenisierung der Gewebe erfolgte auf Eis mit Hilfe eines sterilen Mörtelstabs. Nach der Homogenisierung wurden die Gewebelysate in einer Ultrazentrifuge mit dem Rotor TLA 120.2 für 45 min bei 50.000 rpm und 4 °C abzentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand, der alle zytosolischen Proteine (S1) beinhaltet, vom Pellet entfernt und in separaten 1,5 ml Eppendorfgefäßen auf Eis gelagert. Das Gewebepellet, in dem alle Membranproteine (S2) enthalten sind, wurde in 400 µl 3 x Proteinlysispuffer (1:1 mit 20 mM Tris-Puffer und 1 x Protease- und Phosphatase-Inhibitoren versetzt) resuspendiert. Die weitere Proteinaufreinigung erfolgte wie unter 2.2.4.1 beschrieben und die Lysate wurden bis zur biochemischen Analyse bei -80 °C gelagert.

2.2.4.3 Protein-Quantifizierung

Die Quantifizierung der Proteinkonzentration erfolgte nach der BCA-Methode mittels des BCA-Kits der Firma Pierce. Zur Ermittlung der Proteinkonzentration wurde eine Standardreihe mit Serumalbumin angesetzt und die Homogenisate in Doppelbestimmungen gemessen. Die Standards und die Proteinproben wurden mit dem BCA-Reagenz versetzt und für 25 min bei 60 °C inkubiert. Die photometrische Messung erfolgte bei 562 nm in einem Mikrotiterplatten-Lesegerät.

2.2.4.4 α - und β -Sekretase Aktivitätsmessungen

An der Spaltung des amyloiden Vorläuferproteins (APP) sind 3 Proteasen beteiligt (α , β und γ -Sekretase). Die Spaltung durch die Sekretasen spielt eine entscheidende Rolle in der Alzheimer Pathologie. Um die Aktivitäten der α und β -Sekretase zu messen, wurden SH-SY5Y-Zellen wie unter 2.2.1.4 beschrieben mit Cannabinoiden behandelt. Zur Aktivitätsmessung wurden die kommerziellen Kits der Firma R & D Systems verwendet. Die Zellpellets wurden in je 100 μ l Extraktionspuffer resuspendiert und 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Proben für 1 min bei 10.000 g und 0 °C abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und das Pellet verworfen. Es erfolgte eine Proteinbestimmung nach Punkt 2.2.4.3. Die weitere Aufreinigung erfolgte nach den Angaben des Herstellerprotokolls. Die enzymatische Reaktion der Sekretase-Aktivität wurde in Mikrotiterplatten in einem Fluorimeter bei 495-510 nm gemessen. Zu jedem Versuch wurden zwei Negativkontrollen (ohne Zelllysate und ohne Reaktionssubstrat) mitgeführt.

2.2.4.5 Human Beta Amyloid Colorimetric ELISA

Zur Quantifizierung der Proteinmengen an Amyloid β 40 und Amyloid β 42 wurden die kommerziellen ELISA-Kits der Firma Merck (Merck, Darmstadt) verwendet. Alle Proteinproben aus Zellen und Geweben wurden wie unter 2.2.4.1 und 2.2.4.2 beschrieben aufgereinigt und die Proteinkonzentration der Proben nach 2.2.4.3 bestimmt.

Alle Proben wurden in einer 1:10 Verdünnung und in Doppelbestimmungen in den ELISA eingesetzt. Durch die Verdünnung der Proben sollte eine mögliche Übersättigung der OD im Photometer vermieden werden. Zu jedem Experiment wurde eine Standardreihe für Amyloid

β 40 und Amyloid β 42 angesetzt, anhand derer eine Auswertung der Mengen in den untersuchten Proteinproben ermöglicht wurde. Die Versuchsdurchführung wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Messung der ELISA-Platten erfolgte in einem Photometer bei einer OD von 450 nm.

2.2.4.6 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung der Proteinproben nach ihrem Molekulargewicht erfolgte mit Hilfe der von Laemmli beschriebenen denaturierenden SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Laemmli 1970).

Die Auftrennung der Proben erfolgte unter Verwendung von Miniblot-Kammern (BioRad). Zur Analyse von Proteinen mit großem und kleinem Molekulargewicht wurde das kommerzielle NuPAGE System (Invitrogen) mit vorgegossenen 4-12%igen Gradientengelen verwendet.

Die Zusammenstellung selbstgegossener Polyacrylamidgele erfolgte nach folgendem Pipettierschema:

Lösung	Trenngel (8%)	Trenngel (10%)	Sammelgel (4,5%)
40% Acrylamid/Bisacrylamid (29:1)	2 ml	2,5 ml	0,75 ml
1,5 M Tris-HCl (pH 8,8), 0,4% SDS	2,5 ml	2,5 ml	-
dH ₂ O	5,5 ml	5 ml	6,5 ml
0,6 M Tris-HCl (pH 6,8), 0,4% SDS	-	-	2,5 ml
10% APS	100 μ l	100 μ l	100 μ l
TEMED	10 μ l	10 μ l	10 μ l

Bis zur vollständigen Polymerisation des Trenngels wurde das Gel zunächst mit Isopropanol überschichtet. Anschließend wurde das Isopropanol entfernt und das Trenngel mit dem Sammelgel überschichtet. Die hier angegebenen Volumina entsprechen zwei 1,5 mm dicken Gelen.

Vor dem Auftragen auf die Gele wurden die Proteine mit 4 x Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 95 °C erhitzt. Als Größenstandard diente der Prestained Marker IV (Peqlab). Die Proben wurden zunächst bei 70 V in das Sammelgel einlaufen gelassen und dann bei 150 V getrennt. Als Laufpuffer diente 1 x SDS-Laufpuffer bei den selbstgegossenen Gelen. Für die NuPAGE-Gradientengele wurde 1 x MES Puffer (Invitrogen) verwendet und die elektrophoretische Auftrennung erfolgte zwischen 150 und 180 V.

2.2.4.7 Western-Blot

Nach der Größen-Auftrennung mittels SDS-PAGE erfolgte der Übertrag der Proteine mittels Western-Blot auf eine Nitrocellulosemembran. Hierfür wurde das Wetblot-System der „Mini Trans-Blot[®] Electrophoretic Transfer Cell“-Apparatur (Biorad) verwendet. Nach beendeter Elektrophorese wurde das Gel wie vom Hersteller vorgesehen zusammen mit der Membran, Schaumstoff und Filterpapier in eine Transfereinheit gespannt. Zuvor wurden alle Komponenten in 1 x Transferpuffer äquilibriert. Die Transfereinheit wurde in eine Tankblot-Kammer eingesetzt und die Kammer mit kaltem 1x Transferpuffer gefüllt. Das Blotten erfolgte bei 40 V für 2 h oder bei 30 V über Nacht.

Um die Qualität des Transfers zu überprüfen, wurden die transferierten Proteine mittels Ponceau S-Färbung reversibel angefärbt. Die Entfärbung des Hintergrundes erfolgte mit dH₂O, wodurch rote Proteinbanden sichtbar wurden.

2.2.4.8 Immunologischer Nachweis der Proteine

Nach dem Transfer der Proteine auf eine Nitrocellulosemembran erfolgte zunächst eine einstündige Inkubation der Membran in Blockierungspuffer um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Im Anschluss erfolgte die Inkubation mit einer geeigneten Verdünnung des primären Antikörpers in 1 x TBS/Tween 20 für 2 h bei RT oder bei 4 °C über Nacht. Zur Entfernung von überschüssigem ungebundenem Antikörper erfolgte ein dreimaliger Waschschrift für jeweils 10 min in 1 x TBS/Tween 20. Es erfolgte die Inkubation der Membran für 1-2 h mit sekundären, Peroxidase-konjugierten Antikörpern bei RT mit anschließenden drei weiteren Waschschriften in 1 x TBS/Tween 20. Zur Darstellung der Antikörperbindung wurde die Membran mit HRP-Substrat-Lösung „Immobilon“ (Millipore) benetzt und der sekundäre Antikörper konnte mittels der digitalen Entwicklermaschine „LAS 3000“ (Fuji) detektiert und photographisch festgehalten werden. Die Messung der Signalintensität (optische Dichte, OD) erfolgte mit der Aida Image Analyzer version 3.28 Software (Ray-test) oder mit der frei zugänglichen ImageJ-Software. Die OD einer Zielprotein-Bande wurde zu der OD eines Referenzproteins oder zu einem Coomassie-Gel normalisiert.

2.2.5 Tierexperimente

2.2.5.1 Morris Water-Maze Test

Allgemeines Konzept:

Der im Jahr 1982 von R.G. Morris beschriebene *Morris Water-Maze* Test (MWM) ist ein Verhaltensversuch bei dem Nager in einem Schwimmbecken eine unter der Wasseroberfläche versteckte Plattform als Zielpunkt finden müssen. Der Test dient dazu das räumliche Lernen von Tieren zu überprüfen. Nagetiere eignen sich hervorragend zur Durchführung dieses Experimentes, da sie über ein gutes Schwimm- und Navigationsvermögen verfügen. Gegenüber herkömmlicher Lernexperimente hat der MWM den Vorteil, dass die Tiere nicht zusätzlich motiviert werden müssen, da die alleinige „Heimkehrmotivation“ (Koehler & Dinger 1953) ausreicht und sie dazu bewegt einen Fluchtweg aus dem Wasserbecken zu finden. In dem MWM müssen die Tiere zu einer ortskonstanten Plattform schwimmen, wodurch Rückschlüsse des Experimentators auf komplexe Lernvorgänge möglich sind.

In dem hier aufgeführten MWM Test soll die Gedächtnisleistung von Mäusen getestet werden, indem sie wiederholt zu einer unter der Wasseroberfläche verborgenen Plattform schwimmen und auf dieser für eine bestimmte Zeit verweilen. Die Orientierung in dem Schwimmbecken ist mit Hilfe von Landmarken, welche sich an den Positionen Nord, Ost, Süd und West befinden, möglich. Die Landmarken dienen somit den Mäusen als Referenzpunkte zur Lokalisation im Schwimmbecken. Durch die Wiederholung dieser Versuchsabläufe können die Tiere mit der Zeit eine Orientierungskarte im Hippocampus des Gehirns, welcher für die Speicherung von räumlichen Informationen zuständig ist, abspeichern. Unterschiede im räumlichen Lernverhalten bei verschiedenen Mausgenotypen zeigen somit Beeinträchtigungen oder Schädigungen dieses Gehirnareals an.

Durch die Speicherung der Ortsinformation (der verborgenen Plattform) sollten die Mäuse in der Lage sein, von jedem beliebigen Punkt des Schwimmbeckens direkt, also zielgerichtet, zur verborgenen Zielplattform zu schwimmen. Um den Erfolg der Tiere in den Lernversuchen zu dokumentieren, wird die sog. Latenzzeit bis zum Erreichen der Plattform in den Versuchsdurchgängen gemessen. In den Trainingsläufen werden die Tiere von vier unterschiedlichen Einsetzpositionen und beim entscheidenden „Probe trail“ von einer ihnen bis dahin unbekannt Position in das Schwimmbecken gesetzt. Mit dieser Maßnahme soll

verhindert werden, dass die Tiere einen bereits bekannten Weg abspeichern und nur durch Abspeicherung der Ortsinformation erfolgreich das Ziel (Plattform) erreichen können.

2.2.5.2 Morris Water-Maze Test mit APP23/CBN-Mäusen

Durch das Morris Water-Maze Experiment sollte die räumliche Lernleistung von APP23/CBN-Mäusen untersucht werden. Der Aufbau und das Protokoll wurden nach den Erfahrungen von Dr. Ullrich Schmitt vom Institut für Psychiatrie der Universitätsmedizin Mainz optimiert.

Versuchsaufbau:

Das Testbecken hatte einen Durchmesser von 97,1 cm und wurde so lange mit Wasser befüllt, bis die Plattform 1,5 cm unter der Wasseroberfläche lag. Die Zielplattform hatte einen Durchmesser von 10 cm und befand sich immer an einer festen Position im Nordosten des Beckens. Die Plattform bestand aus durchsichtigem Plastik und konnte somit nicht von den Mäusen im Becken gesichtet werden. Dies wurde auch in Vorversuchen getestet, da viele Mäuse in direkter Plattform-Nähe an dieser vorbei geschwommen sind. Eine Sichtung der Plattform im Versuchsablauf konnte somit ausgeschlossen werden. Die Wassertemperatur wurde jeden Tag auf etwa 23-24 °C eingestellt. Eine Einfärbung des Beckens mit Lebensmittelfarbe war nicht nötig, da das Testbecken komplett in Weiß angestrichen wurde und die Zielplattform aus transparentem Plastik bestand. Auch die Wände, sowie die Decke des Versuchsraumes waren einheitlich weiß. Dies verminderte das Risiko der Detektion von nicht kontrollierbaren visuellen Landmarken. Die Landmarken für die Positionen Nord, Ost, Süd und West bestanden aus aufgedruckten schwarz/weiß Mustern und wurden im DinA4-Format angefertigt. Es wurden kontrastreiche Muster gewählt, da bei Mäusen unscharfes Sehen in größerer Entfernung zu beobachten ist (Artal et al. 1998). Die Landmarken wurden in einer Höhe und einem Abstand zum Beckenrand befestigt, so dass die Mäuse diese gut erkennen konnten. Abbildung 2.2.5.2 A zeigt den schematischen Aufbau eines Morris Water-Maze und den realen Aufbau des durchgeführten Experimentes.

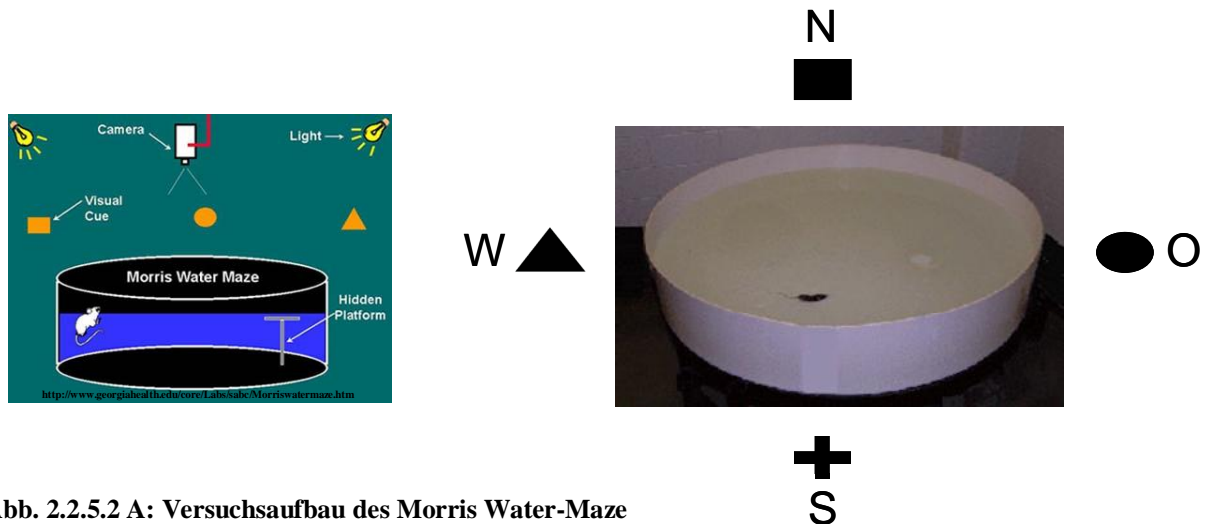


Abb. 2.2.5.2 A: Versuchsaufbau des Morris Water-Maze

Die Abbildung links zeigt schematisch den Aufbau des Morris Water-Maze (aus www.mcg.edu). Die Zielplattform, die sich 1,5 cm unter der Wasseroberfläche befindet ist im Becken eingezeichnet. Die Belichtung des Raumes erfolgt indirekt. Eine Kamera zur optischen Visualisierung der Schwimmbewegungen ist zentral über dem Schwimmbecken an der Decke befestigt. Die Abbildung rechts zeigt die Landmarken welche die hypothetischen Himmelsrichtungen (N, O, S, W) markieren und verdeutlicht, dass eine optische Orientierung möglich ist.

Eine Kamera zur Visualisierung der Schwimmbläufe wurde zentral über dem Becken an der Decke befestigt und mit einem Computer verbunden, welcher sich hinter einer weißen Trennwand befand. Durch eine Trennung zum direkten Versuchsraum sollte eine mögliche akustische oder olfaktorische Störung der Mäuse minimiert werden.

Versuchsdurchführung:

An jedem Tag wurden die Tiere mindestens 30 min vor Versuchsbeginn aus dem Haltungsraum in den angrenzenden Versuchsraum transportiert. Alle Tiere wurden für die Durchführung des Morris Water-Maze eine Woche vor Versuchsbeginn in separaten Käfigen gehalten. Vor dem Beginn der Trainingsläufe wurde jedes Tier für 3 min zur Akklimatisierung in das Becken gegeben. Dadurch konnten die Tiere die neue Umgebung kennenlernen und eine mögliche kontraproduktive Auseinandersetzung mit dem kalten Wasser wurde vor Beginn der Trainingsläufe minimiert. Nach Versuchsdurchführung durften sich die Tiere für 2 bis 3 min in einem mit Papier gefüllten Käfig, welcher zusätzlich mit einer Wärmelampe bestrahlt wurde, erholen. In den Trainingsläufen von Tag 1 bis Tag 4 wurden die Mäuse von vier verschiedenen Startpositionen des Beckenrandes in einer täglich variierenden Reihenfolge gesetzt. In jedem Testlauf hatte das Tier maximal 60 sec Zeit um die unter der Wasseroberfläche verborgene Plattform zu finden. Während der Trainingsläufe (Lernphase) war der Schwimmlauf des Tieres beendet, sobald dieses auf die Plattform geschwommen war und dort verweilte. War dies binnen 60 sec nicht der Fall, so wurde die Maus für 15 sec auf die Plattform gesetzt und erst dann in den Käfig zur Erholung gesetzt. In diesen 15 sec wurde den Tieren eine Orientierung auf der Plattform ermöglicht und somit eine Einprägung der Position der Plattform möglich. Zwischen allen Trainingsläufen der Lernphase hatten die Tiere eine Erholungsphase von etwa 2 bis 3 min. Um den Lernerfolg der Tiere und eine mögliche neu erworbene räumliche Strategie zu untersuchen, wurden die Daten wie folgt analysiert:

- An jedem Tag wurde die Latenz bis zum Erreichen der Plattform gemessen und der Verlauf der Latenzkurve über die 4 Trainingsläufe (Testphase) aufgetragen. Dabei lässt die Abnahme der Latenz über die Zeit auf einen Lernerfolg deuten.

An Tag 5 erfolgte nach Beendigung der Testphase, der „Probe trail“ (Testlauf). Für diesen Testlauf wurde die Zielplattform aus dem Becken entfernt und die Tiere an einer neuen Startposition in das Becken gesetzt. Durch das Einsetzen der Tiere an einer neuen Stelle im Schwimmbecken sollte verhindert werden, dass die Tiere einen bereits bekannten Weg zur Position des Ziels abschwimmen. Die Tiere hatten wie in den Trainingsläufen maximal 60 sec Zeit um die Position der vorher vorhandenen Plattform zu finden. Die Daten der Testläufe wurden wie folgt ausgewertet:

- Die Latenz bis zum Erreichen der Position der entfernten Plattform wurde gemessen.
- Die maximale Anzahl an Kreuzungen zur Position der vorher vorhandenen Plattform wurde ermittelt.

Abbildung 2.2.5.2 B verdeutlicht in einer Grafik die genaue Versuchsdurchführung des Morris Water-Maze Experiments.

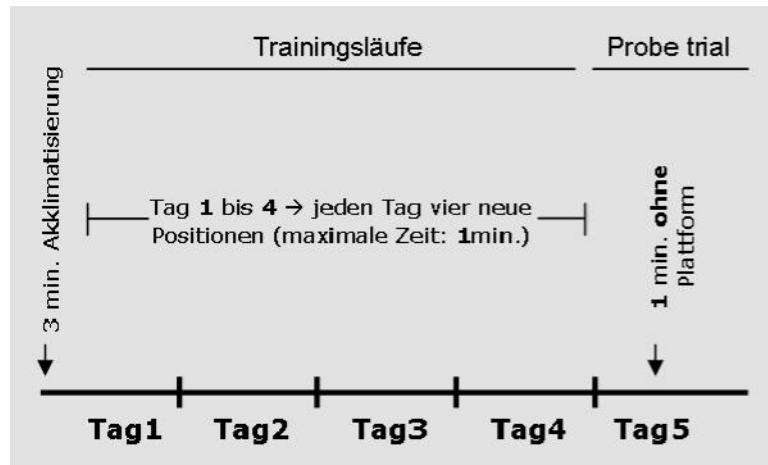


Abb. 2.2.5.2 B: Versuchsdurchführung des Morris Water-Maze

Durchführung der Trainingsläufe und des „Probe trails“ (Testlauf). An Tag 1 erfolgt eine 3 min Akklimatisierung der Tiere an das Becken. Von Tag 1 bis 4 wurden die Trainingsläufe durchgeführt. Jedes Tier wurde an jedem Tag von 4 unterschiedlichen Positionen in das Becken gegeben und musste in maximal 60 sec die unter der Wasseroberfläche verborgene Plattform finden. An Tag 5 wurde der Testlauf, bei dem die Plattform aus dem Becken entfernt wurde, durchgeführt. Es wurde jeweils die Latenz bis zum Erreichen des Ziels und an Tag 5 die maximalen Kreuzungen an der Position der entfernten Plattform gemessen.

Zur Auswertung des Morris Water-Maze wurde die von Panlab entwickelte Verhaltens-Software Smart verwendet.

2.2.5.3 Der virale-vermittelte Gentransfer ins ZNS

Grundlagen des Gentransfers ins ZNS über virale Vektoren:

Virale Vektoren eignen sich besonders gut für gentechnische Manipulationen des zentralen Nervensystems und eröffnen somit neue wissenschaftliche Perspektiven in der Grundlagenforschung als auch in der Klinik bei der therapeutischen Applikation.

Zur Transduktion eines viralen Vektors in Zielzellen, kloniert man vorerst die benötigte DNA-Sequenz in das Virengenom. Damit die Viren sich nicht mehr replizieren können, werden in den meisten Fällen DNA-Bereiche des viralen Genoms ersetzt, welche für die Enzyme zur Ausbildung der Hüllmembranproteine (Kapsid) verantwortlich sind. Die Fähigkeit dieser Replikationsinkompetenten Vektoren liegt darin, dass sie sich nicht unkontrolliert in der Zielzelle vermehren können.

Zu den einfachsten Virentypen zählen der Adenovirus oder der Adeno-assoziierte Virus. Diese Viren bestehen aus einem genetischen Material, welches ausschließlich von einer schützenden Hülle, dem Kapsid, ummantelt ist. Im Gegensatz zu diesen Virentypen bestehen höher entwickelte Viren wie der Retrovirus und der Herpes simplex Virus aus einem Kapsid, welches zusätzlich von einer Lipid-Doppelschicht umhüllt ist. Alle Virentypen unterscheiden sich aber in ihrem genetischen Material, in der Größe und in der Spezifität zu den Zielzellen.

Adeno-assoziiertes Virus (AAV):

Der wildtypische AAV ist ein nicht-pathogenes Virus aus der Familie der *Dependoviridae* (lat. *parvus*: klein). Alle Mitglieder dieser Familie verfügen über ein lineares einsträngiges DNA-Genom und eine sehr starke Resistenz gegenüber Detergenzien und pH-Veränderungen. Das Genom hat eine Größe von 4,7 kb und wird von zwei palindromischen Hairpin-Sequenzen den sog. „inverted terminal repeats (ITRs)“ umgeben. Das kleine Genom ist in der Lage, vier Replikations- und drei Kapsid-Proteine zu exprimieren. Das virale Genom wird von einem 20 nm dicken Kapsid umgeben, welches eine ikosaedrische Struktur ausbildet. AAV haben gegenüber Lentiviren den Vorteil, dass sie ihr Genom nicht in die Zielzelle integrieren und keine Replikation während der Zellteilung aufweisen. Deshalb werden AAV häufig in der Gentherapie für eine kurzzeitige Expression eines Genes eingesetzt.

Die AAV werden in verschiedene Serotypen in der Familie der *Dependoviridae* unterteilt. Heute werden die AAV in die Klassen der AAV1-5 und der AAV7-9 unterteilt. In den letzten

fünf Jahren ist es gelungen, mehr als einhundert verschiedene AAV Varianten aus humanem- und primaten-Gewebe zu isolieren (Katano et al. 2004). Der AAV2 ist der erste infektiöse Klon, welcher in die Laborforschung eingeführt wurde (Samulski et al. 1982) und zählt heute zu den am Besten untersuchten und meist benutzten Vektoren. Der rekombinante AAV (rAAV) wurde als erster Vektor zum Gentransfer ins Gehirn verwendet und das Muster der Transduktion ist fast vollständig charakterisiert (Burger et al. 2005).

Bei den rekombinanten AAV-Vektoren fehlen alle viralen Kodierungssequenzen. Dabei werden die Kodierungssequenzen für die Replikation und die der Kapsid-Struktur durch eine Expressionskassette mit dem zu untersuchenden Gen ersetzt (Abb. 2.2.5.3). Die ITRs, welche das Genom des wtAAV an der 5' und 3' Seite flankieren, müssen im rAAV erhalten bleiben, da sie entscheidend beim Prozess des Ausschneidens in der Anwesenheit eines Helfer-Virus sind.

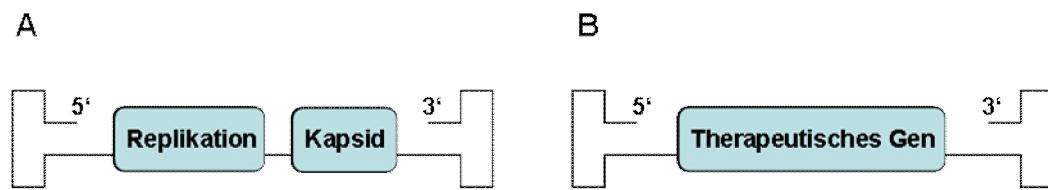


Abb. 2.2.5.3: Genomstruktur von Wildtyp (A) und Rekombinanter AAV (B)

Mit der Überprüfung des sicheren und effizienten Gentransfers durch AAV2-Vektoren durch Kaplitt und seinen Kollegen (Kaplitt et al. 1994), wurden rekombinante AAV Vektoren schnell zu einem populären Werkzeug für den Gentransfer ins ZNS. Die Vorteile der rAAV liegen in der nicht vorhandenen Pathogenität, dem Neurotropismus und in der Fähigkeit der anhaltenden Transgenexpression, ohne das Genom der Wirtszelle zu befallen. Die AAV Injektion wurde schon erfolgreich in einem EAE-Tiermodell der multiplen Sklerose angewendet (Guy et al. 1998). In in einem Alzheimer-Mausmodell wurde der AAV-Transfer zur Einschleusung von Antikörpern verwendet, welche sich gegen Amyloid β 2 richten. Über den Transfer konnte in den injizierten Regionen eine Erneuerung von Oligodendrozyten und des Myelingerüsts beobachtet werden (Desai et al. 2010).

2.2.5.3.1 Stereotaktische Injektion von AAV-BRI-A β in CB1-KO Mäuse

Die stereotaktische Operation ermöglicht eine effiziente Injektion in jede Region des Gehirns. CB1-Wt und CB1-KO-Mäuse, welche von der AG Lutz zur Verfügung gestellt wurden, wurden im ersten Schritt intraperitoneal mit einer Lösung bestehend aus Fentanyl (0,005 mg/kg), Domitor (0,15 mg/kg) und Dormicum (2,0 mg/kg) anästhetisiert. Die Mäuse wurden in einer stereotaxischen Apparatur (Kopf Instruments) fixiert und die Kopfhaut mit einem Skalpell durch einen Schnitt in rostrocaudaler Richtung entfernt. Anschließend wurde das Bregma (Punkt an dem Kranznaht und Pfeilnaht an der Schädeldecke zusammentreffen) auf der geöffneten Schädeldecke gesucht und als Nullpunkt definiert.

Die Adeno-assoziierten viralen Vektoren, welche BRI-A β 40 und BRI-A β 42 cDNA beinhalten, wurden unserer Arbeitsgruppe im Rahmen einer Kooperation zur Verfügung gestellt (Lawlor et al. 2007). Für die Experimente wurden ausschließlich männliche Tiere verwendet. Jeweils 5 CB1-Wildtyp- und 5 CB1-KO-Mäuse wurden im Alter von 3 Monaten bilateral mit einem Volumen von 1 μ l, bestehend aus AAV1-BRI-A β 40 (Titer: $0,95 \times 10^9$ Vireng Genome mit A β 40) und AAV1- BRI-A β 42 (Titer: $1,1 \times 10^9$ Vireng Genome mit A β 42), in den Hippocampus injiziert. Die gleiche Anzahl an Mäusen wurde mit je 1 μ l eines leeren AAV-Kontrollvektors (Titer: 1×10^{12} Vireng Genome) nach dem beschriebenen Protokoll behandelt. Die Injektion in den Hippocampus erfolgte 2,0 mm posterior zum Bregma, 2,0 mm lateral von der Mittellinie und 2,0 mm unter der Oberfläche des Schädels durch eine 34 Gauge-Kanüle (World Precision Instruments, USA). Die Vektoren wurden in einer Fließgeschwindigkeit von 200 nl/min mit Hilfe des Microsyringe Pump Controller Micro4 (World Precision Instruments) in den Hippocampus injiziert. Nach der Injektion wurde die Schädeldecke und die Kopfhaut mit sterilem Nähmaterial geschlossen und die Anästhesie der Mäuse mit einer Lösung bestehend aus Narcanti (0,12 mg/kg), Antisedan (0,75 mg/kg) und Anexate (0,2 mg/kg) beendet.

Die phänotypische Untersuchung erfolgte drei und sechs Monate nach Injektion mit Hilfe des MWM. Anschließend wurden die Tiere für die histologischen und proteinbiochemischen Untersuchungen getötet.

2.2.6 Statistik

Die Durchführung jedes Experimentes erfolgte unabhängig drei- bis fünfmal. Die Behandlungen mit verschiedenen Cannabinoiden erfolgten immer in doppelten Ansätzen. In allen Graphiken wurden das arithmetische Mittel und die Standardabweichung aus den Mittelwerten aller Experimente (SEM) angegeben. Zur Analyse der Daten aus den proteinbiochemischen, molekularbiologischen und tierexperimentellen Untersuchungen wurde der Students t-Test verwendet. Mittelwertsvergleiche mit einem * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ und *** $P < 0,005$ wurden als statistisch signifikant eingestuft. Für die statistische Auswertung der Trainingsläufe im Morris Water-Maze wurde ein two Way ANOVA mit Hilfe der Prism 4 Software (Graph Pad) durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Der Einfluss von Cannabinoiden auf die APP-Prozessierung

3.1.1 *In vitro* Analyse der APP-Prozessierung in humanen Neuroblastoma SH-SY5Y- und murinen N2A-Swe Zellen

Die Prozessierung des APP-Proteins erfolgt durch die Enzyme α -, β -, und γ -Sekretase (Selkoe 2001) prinzipiell über zwei Wege, den amyloiden- und nicht-amyloiden Weg. Zum größten Teil wird das APP-Protein im nicht-amyloiden Weg prozessiert (siehe Abb. 1.1.4.2). Durch die α -Sekretase kann das potentiell neuroprotektiv wirkende sAPP α entstehen (Guo et al. 1998; Meziane et al. 1998; Turner et al. 2003). Das verbleibende membrangebundene C83 wird anschließend über den γ -Sekretase-Komplex zu dem nicht toxischen p3 Peptid (Haass et al. 1994) und der intrazellulären APP-Domäne AICD (APP intracellular domain) gespalten. Im amyloiden Weg (Abb.1.1.4.2) der APP-Prozessierung entstehen die toxischen Amyloid β -Peptide, die Hauptbestandteile der amyloiden Plaques darstellen.

Um den Einfluss des ECS in Zellkulturen zu untersuchen, musste die Expression des CB1-Rezeptors in den verwendeten Zelllinien gewährleistet sein. Für diese Arbeit wurde deshalb die humane Neuroblastoma Zelllinie SH-SY5Y verwendet (Biedler et al. 1973). Diese Zelllinie verfügt über endogenes APP und weist eine hohe mRNA Expression des CB1-Rezeptors auf (siehe Abb. 3.1.1). Als zweite Linie wurde die murine Neuroblastoma Zelllinie N2A-Swe verwendet (Thinakaran et al. 1996). Diese Zelllinie wurde zusätzlich gewählt, da sie die humane APP₆₉₅ Mutante stabil überexprimiert und detailliertere Analysen der APP-Prozessierung, sowie die Bestimmung der A β Mengen möglich sind. Die Expression des humanen und murinen CB1-Rezeptors in SH-SY5Y- und N2A-Swe-Zellen wurde mittels RT-PCR bestätigt (Abb. 3.1.1).

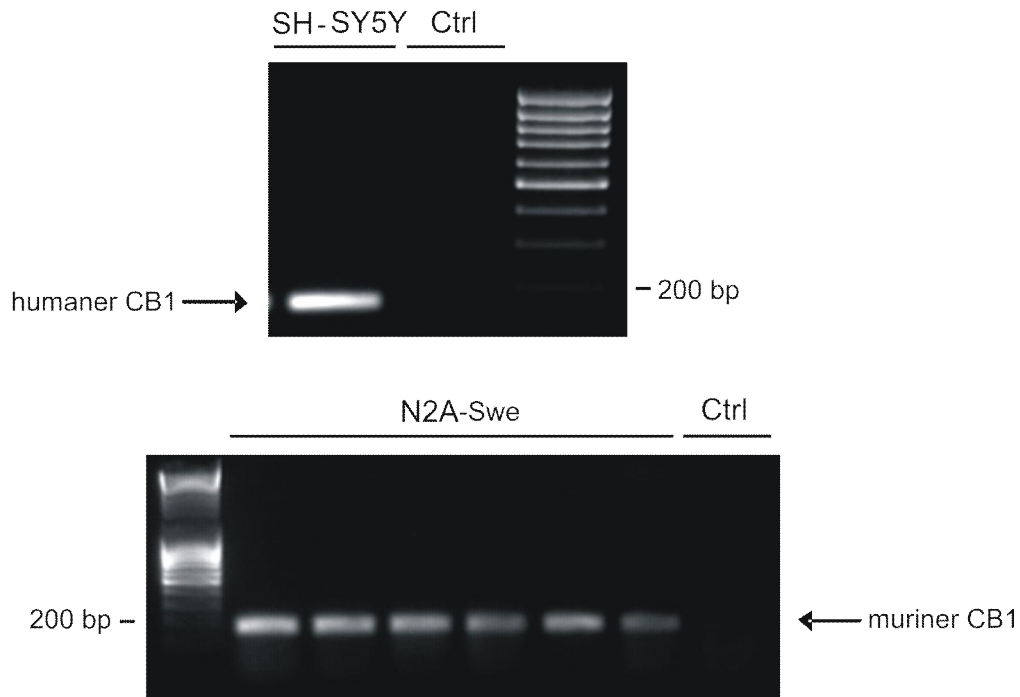


Abb.: 3.1.1 Expression des humanen und murinen CB1-Rezeptors in Zelllinien

Nachweis des CB1-Rezeptors in humanen SH-SY5Y- und in murinen N2A-Swe-Zellen über eine 35 Zyklen Sättigungs-RT-PCR. Es wurden jeweils 2 μ g RNA in die cDNA Synthese eingesetzt. Die mRNA beider Rezeptoren besitzt eine Größe von etwa 1400 bp. Der CB1-Rezeptor wird in beiden Zelllinien exprimiert. Zum Nachweis des humanen und murinen CB1-Rezeptors wurden Primerpaare verwendet, die ein Konstrukt in einer Größe von 157 und 165 bp amplifizieren. Als Kontrolle wurde jeweils RNA von SH-SY5Y- und N2A-Swe-Zellen ohne das RT-Enzym in die cDNA Synthese eingesetzt. Die Kontrollen (Ctrl) zeigten kein amplifiziertes Konstrukt.

3.1.2 Biochemische Untersuchung der APP-Prozessierung in Zelllinien nach Cannabinoidbehandlung

Zur Untersuchung der APP-Prozessierung wurden die Zelllinien wie in Punkt 2.2.1.4 beschrieben mit endogenen und synthetischen Cannabinoiden behandelt. Alle Cannabinoide wurden in nM Konzentrationen eingesetzt. Diese niedrigen Konzentrationen ermöglichen Rezeptor-vermittelte Effekte zu untersuchen. Die Aufreinigung der Zellen erfolgte wie unter 2.2.4.1 beschrieben. Anschließend wurden die Überstände (ÜB) und die Pellet-Proteinproben über eine Gelelektrophorese nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt (2.2.4.6) und durch einen Western-Blot (2.2.4.7) auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Die Membranen mit den Überstands-Proben, in denen alle extrazellulären Proteine enthalten sind wurden mit dem 6E10 Antikörper zur Detektion von sAPP α inkubiert. In den Pelletproben (Pellet) befinden sich alle membranständigen Proteine. Der Nachweis des APP „full length“ (APP_{fl})-Proteins

aus dem Pellet, erfolgte mit dem A8717 Antikörper. Die genauen Epitop-Bindungsstellen beider Antikörper sind in Abb. 2.1.5 gezeigt. Des Weiteren erfolgte als Protein-Ladekontrolle eine Inkubation mit einem Tubulin-Antikörper. Der immunologische Nachweis der Proteine wurde wie unter 2.2.4.8 beschrieben durchgeführt.

3.1.3 Analyse im Western-Blot

Die Inkubation der SH-SY5Y Zellen mit den CB1-Agonisten AEA und Win2 führte 24 h nach Behandlung zu einem Anstieg der sAPP α -Spiegel im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen (Abb. 3.1.3 A). Das inaktive Enantiomer Win3, hatte keinen Einfluss auf die Generierung von sAPP α . Die statistische Auswertung zeigt einen signifikanten Anstieg der sAPP α -Spiegel von 41 Prozent nach Behandlung mit AEA und Win2.

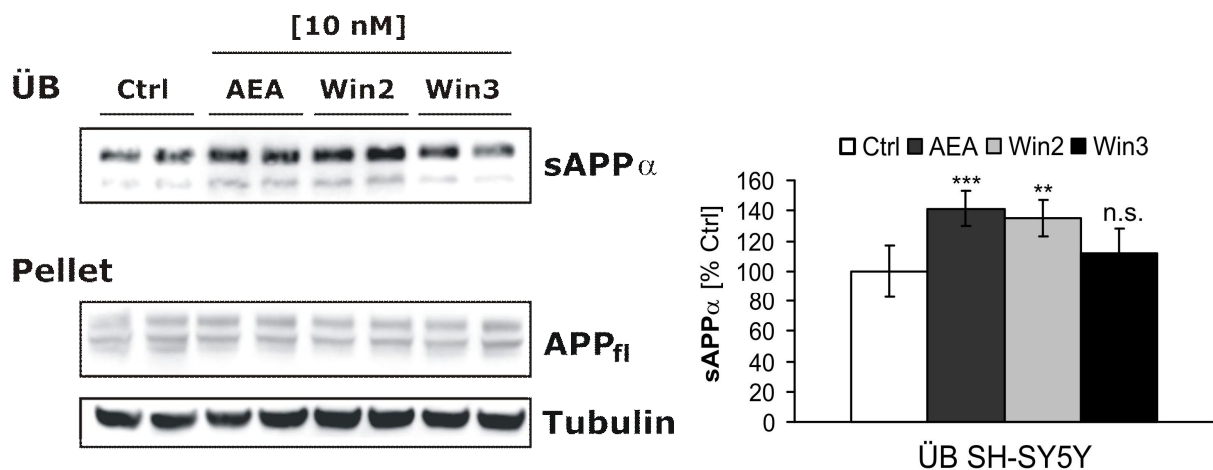


Abb. 3.1.3 A: Western-Blot Analyse von sAPP α und APP $_{fl}$ in SH-SY5Y Zellen nach Cannabinoid-behandlung

SH-SY5Y Zellen wurden für 24 Stunden mit AEA, Win2 und Win3 behandelt. Die Zellen wurden geerntet und proteinbiochemisch aufgereinigt. Von jeder Probe wurden 30 μ g Gesamtprotein auf einem 4-12 % NuPAGE-Gradientengel aufgetrennt. Die Zellüberstände wurden an die Gesamtmenge der Proteinprobe angepasst und jeweils 20 μ l über SDS-PAGE aufgetrennt. Die Detektion von sAPP α erfolgte mit dem 6E10-Antikörper. Zum Nachweis von APP $_{fl}$ wurde der A8717 Antikörper verwendet und als Ladekontrolle diente Tubulin. Die graphische Auswertung erfolgte nach Auswertung der optischen Bandenintensitäten mit der Aida Image Analyzer v.3.28 Software und ist dargestellt als prozentuale Veränderung zur unbehandelten Kontrolle (n=8). Die Behandlung der Zellen mit 10 nM AEA (***) ($p \leq 0,001$) und Win2 (** $p \leq 0,01$) führt zu einem Anstieg der sAPP α Expression im Vergleich zur Kontrolle.

In weiteren Versuchsansätzen sollte untersucht werden, ob der Einfluss der Cannabinoide (AEA und Win2) auf die APP-Prozessierung ein CB1-vermittelter Prozess ist. Dazu wurden SH-SY5Y Zellen mit dem CB1-Rezeptor-Antagonisten Rimonabant (SR) 20 min vorinkubiert und anschließend 10 nM AEA hinzu gegeben. Nach 24 h wurden die Zellen geerntet und die APP-Prozessierung über Western-Blot analysiert.

Die gleichzeitige Inkubation der Zellen mit AEA und SR führte zu keinem Anstieg der sAPP α -Spiegel (Abb. 3.1.3 B), wie sie durch alleinige Inkubation mit AEA zu sehen waren.

Die alleinige Gabe von SR hatte keinen Effekt auf die APP-Prozessierung. Die Ergebnisse deuten auf einen CB1-vermittelten Effekt auf die APP-Prozessierung hin.

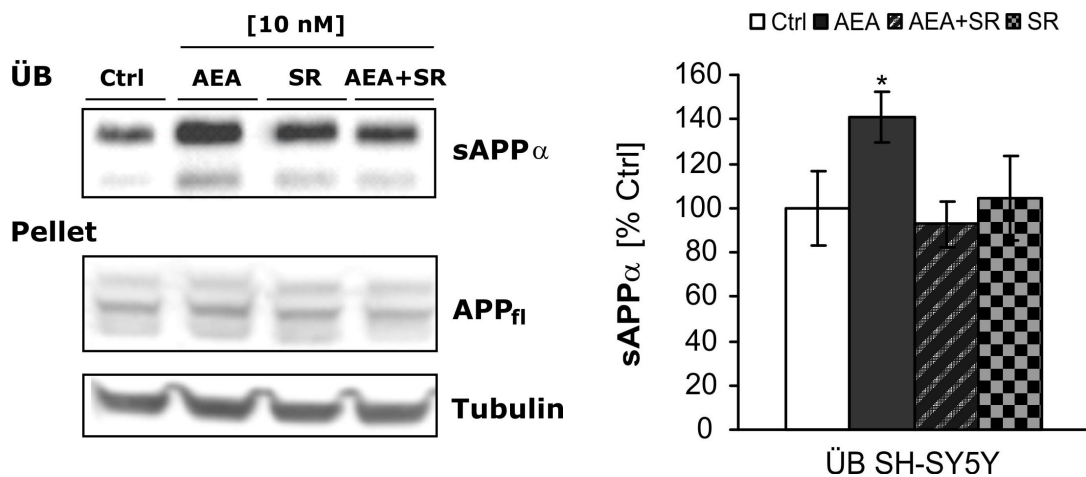


Abb. 3.1.3 B: Western-Blot Analyse von sAPP α und APP $_{fl}$ in SH-SY5Y Zellen nach Inkubation mit SR

SH-SY5Y Zellen wurden für 24 Stunden mit AEA und SR behandelt. Bei gleichzeitiger Gabe von AEA und SR erfolgte eine Vorinkubation mit SR von 20 min. Die Detektion von sAPP α erfolgte mit dem 6E10-Antikörper. Zum Nachweis von APP $_{fl}$ wurde der A8717 Antikörper verwendet und als Ladekontrolle diente Tubulin. Die graphische Auswertung erfolgte nach Auswertung der optischen Bandenintensitäten mit der Aida Image Analyzer v.3.28 Software und ist dargestellt als prozentuale Veränderung zur unbehandelten Kontrolle (n=8). Die Inkubation mit SR bei gleichzeitiger Gabe von AEA (n=3) führte zu einer Reduktion der sAPP α -Spiegel (* p \leq 0,05).

Zur Untersuchung der APP-Prozessierung wurde weiterhin die murine N2A-Swe Zelllinie verwendet. Die Behandlung der Zellen mit AEA und Win2 erfolgte wie oben beschrieben. Die Inkubation mit AEA und Win2 führte um 20-40 % verstärkte sAPP α -Spiegel in N2A-Swe Zellen (Abb. 3.1.3 C). Signifikante Unterschiede zur Kontrolle konnten allerdings nur nach Behandlung mit AEA ermittelt werden. Die Cannabinoidbehandlung führte in keinem der Versuchsdurchgänge zu einer Veränderung der APP $_{fl}$ -Proteinmengen.

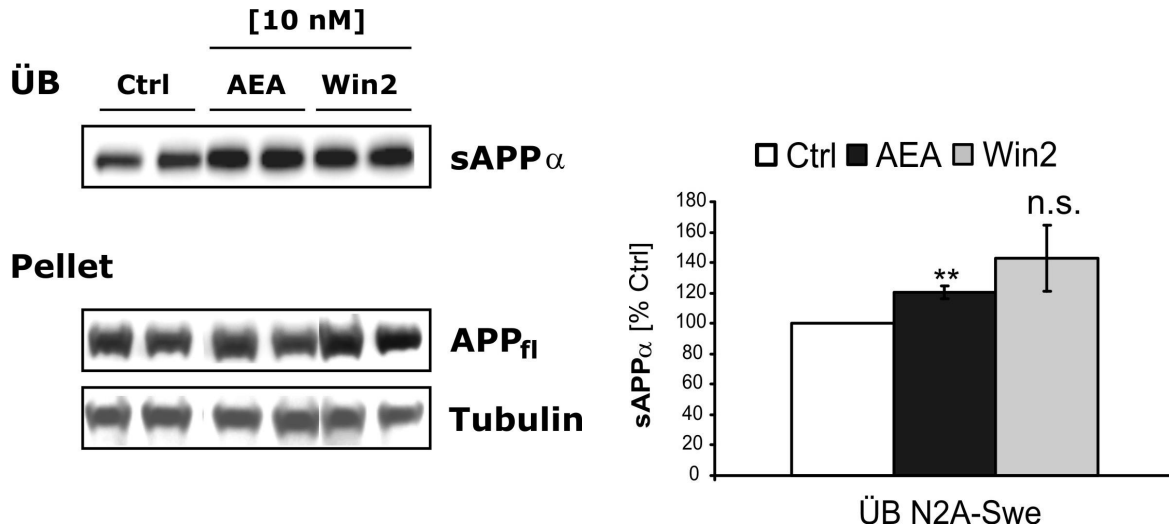


Abb. 3.1.3 C: Western-Blot Analyse von sAPP α und APP_{f1} in N2A-Swe Zellen

N2A-Swe Zellen wurden für 24 Stunden mit AEA und Win2 behandelt. Die Detektion von sAPP α erfolgte mit dem 6E10-Antikörper. Zum Nachweis von APP_{f1} wurde der A8717 Antikörper verwendet und als Ladekontrolle diente Tubulin. Die graphische Auswertung erfolgte nach Auswertung der optischen Bandenintensitäten mit der Aida Image Analyzer v.3.28 Software und ist dargestellt als prozentuale Veränderung zur unbehandelten Kontrolle. Die Inkubation mit AEA (** p < 0,01) und Win2 führte zu erhöhten sAPP α -Spiegeln (n=3).

In den hier untersuchten Zelllinien konnten nach Cannabinoidbehandlung erhöhte sAPP α -Spiegel ermittelt werden. Die Menge des APP_{f1}-Proteins blieb jeweils konstant. Damit konnte gezeigt werden, dass die erhöhten sAPP α -Spiegel nicht durch einen Anstieg in der Expression des APP-Moleküls verursacht werden.

Der CB1-Rezeptor ist über die Membran direkt an inhibitorische Proteine des G_{i/o}-Typs gekoppelt. Über eine Aktivierung des Rezeptors durch CB1-Agonisten konnten die Proteinspiegel des neuroprotektiven sAPP α erhöht werden.

3.1.4 Analyse der A β -Peptide nach Cannabinoidbehandlung

Die Überexpression von APP in N2A-Swe Zellen ermöglicht die Untersuchung der Amyloid β -Peptidmengen nach Cannabinoidbehandlung mit Hilfe eines kolorimetrischen ELISA. Dazu wurden die Zellen mit 10 nM AEA und Win2 behandelt und proteinbiochemisch aufgereinigt. Die Zellüberstände mit den löslichen A β -Peptiden wurden an die gemessenen Proteinproben der Pellet-Fraktion angepasst. Anschließend wurden die Amyloid β Mengen im ELISA nach 2.2.4.5 bestimmt. Aufgrund der sehr geringen Gesamtmenge an A β 42-Peptiden in den Zellüberständen war es nur möglich die Proteinmenge von A β 40 zu bestimmen.

Die Behandlung mit AEA bzw. Win2 führte jeweils zu einer signifikanten Reduktion der A β 40 Mengen (Abb. 3.1.4). Durch die Behandlung mit Win2 wurde A β 40 um 33 % reduziert. AEA führte zu einer Reduktion von über 50 %.

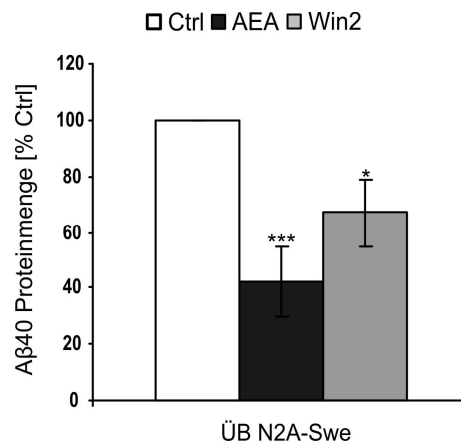


Abb.3.1.4: A β 40-ELISA im N2A-Swe Zell-Überstand 24h nach Cannabinoidbehandlung

Quantifizierung der im ELISA gemessenen A β 40-Proteinmengen in N2A-Swe Zellen. Die Zellen wurden für 24h mit AEA und Win2 in einer Konzentration von 10 nM behandelt. Die Menge an A β 40 wurde anhand einer Standardreihe ermittelt und zur Quantifizierung in Prozent umgerechnet und auf die Kontrolle normiert. Die Behandlung mit AEA (***) $p \leq 0,001$) und Win2 (* $p \leq 0,05$) führte zu signifikant reduzierten A β 40-Proteinmengen (n=4).

3.1.5 α - und β -Sekretase Aktivitätsmessungen nach Cannabinoidbehandlung

Die Cannabinoidbehandlung in den hier verwendeten Zelllinien führte zu veränderten sAPP α -Spiegeln, sowie zur Reduktion der A β Mengen. Im nächsten Schritt der Untersuchungen sollte deshalb die Aktivität der APP-schneidenden Enzyme untersucht werden. Dazu wurden SH-SY5Y Zellen für 24 h mit AEA, Win2 und 2-AG in einer Endkonzentration von 10 nM behandelt. Die Aktivitätsmessungen der α - und β -Sekretase wurden wie unter 2.2.4.4 beschrieben durchgeführt.

Die Cannabinoidbehandlung führte in vier unabhängigen Experimenten zu keiner Veränderung der α - oder β -Sekretase Aktivität.

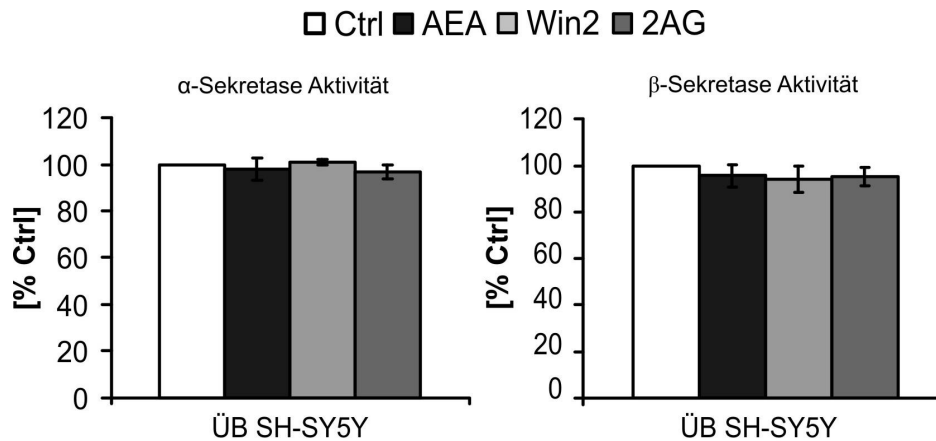


Abb. 3.1.5: Aktivitätsmessung der α - und β -Sekretase in SH-SY5Y Zellen nach Cannabinoidbehandlung
SH-SY5Y-Zellen wurden für 24 h mit AEA, Win2 und 2-AG in einer Konzentration von 10 nM behandelt. Die Zellen wurden biochemisch aufgereinigt und die Aktivität nach Angaben des Herstellers mit den Kits der Firma R & D Systems bestimmt. Zur Quantifizierung wurden die gemessenen Werte in Prozent umgerechnet und auf die Kontrolle normiert. Die Behandlung mit Cannabinoiden führte zu keiner Veränderung in der Aktivität von der α - oder β -Sekretase.

3.1.6 Untersuchung der α - und β -Sekretase Expression in Zelllinien nach Cannabinoidbehandlung

Ein möglicher Effekt der Cannabinoidbehandlung auf die Expression der Sekretasen sollte mittels Real-time PCR untersucht werden. Die Analyse erfolgte in N2A-Swe Zellen. Die Zellen wurden in einer Zeitreihe von vier, sechs, acht und 24 Stunden mit AEA und Win2 behandelt. Anschließend wurde RNA aus der Zelle isoliert und die gewonnene cDNA in der PCR analysiert.

In der Zeitreihe konnte sechs Stunden nach Inkubation der Zellen ein Anstieg in der Expression der α - und β -Sekretase nach AEA und Win2 Behandlung beobachtet werden (Abb. 3.1.6). Die Expression der β -Sekretase war dabei signifikant erhöht im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Die Behandlung der Zellen mit AEA und Win2 zeigte 24 Stunden nach Inkubation keinen Einfluss auf die Expression der β -Sekretase. Trotz eines leichten Anstiegs der α -Sekretase Expression nach Win2- oder AEA-Behandlung gab es keine signifikanten Unterschiede in der Expression zur unbehandelten Kontrolle.

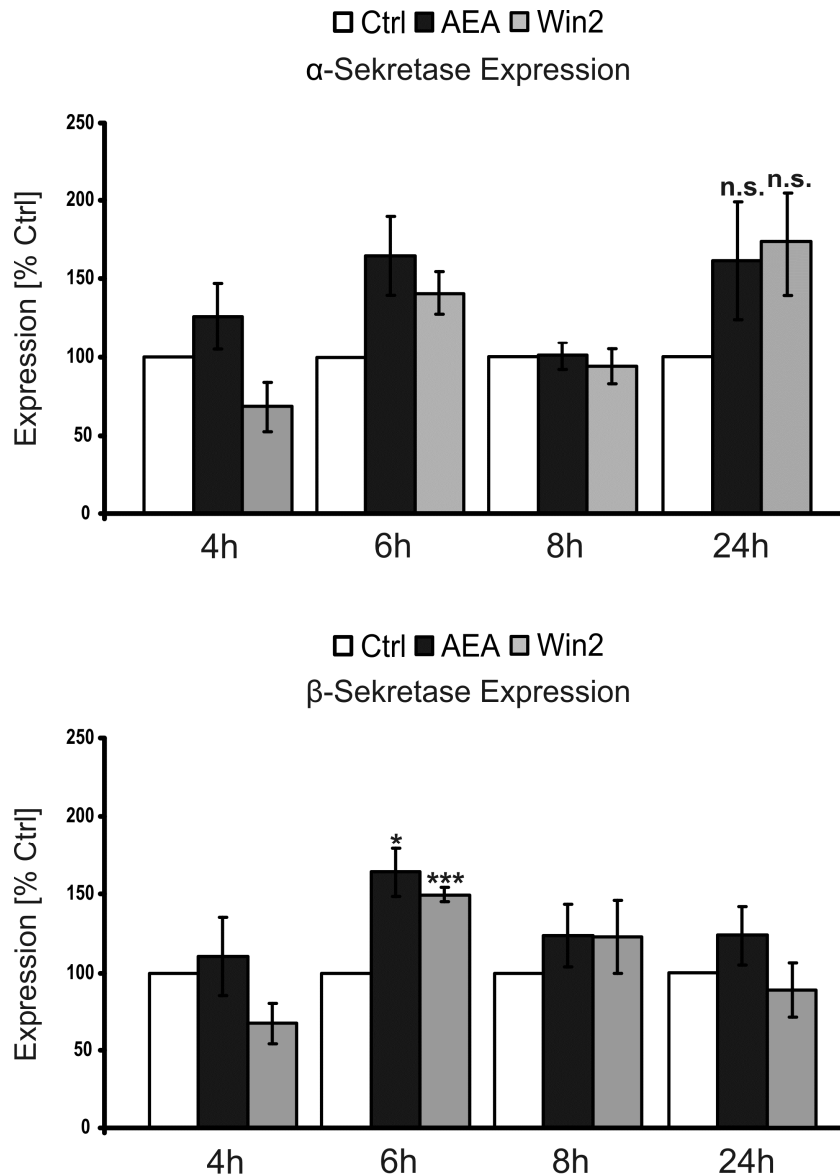


Abb. 3.1.6: α- und β-Sekretase Expression in N2A-Swe Zellen nach Cannabinoidbehandlung

N2A-Swe Zellen wurden mit 10 nM AEA und Win2 behandelt und in einer Zeitreihe von 4, 6, 8 und 24 h geerntet. Die RNA wurde aus den Zellen isoliert und die cDNA in einer Real-time PCR auf die Expression der α- und β-Sekretase analysiert. Zur Quantifizierung wurden die gemessenen Werte in Prozent umgerechnet und auf die Kontrolle normiert. In der Zeitreihe ist ein Anstieg der α- und β-Sekretase-Expression 6 h nach Inkubation mit AEA und Win2 zu beobachten (n=3). 24 h nach der Inkubation mit AEA und Win2 ist ein Anstieg in der Expression der α-Sekretase zu beobachten (n=4). Die Expression der β-Sekretase blieb konstant (n=4). Unterschiede zur Kontrolle (Ctrl) wurden mit einem * $p \leq 0,05$ und *** $p \leq 0,001$ als signifikant eingestuft.

3.2 Untersuchung der Rolle des CB1-Rezeptors im APP23 Mausmodell

3.2.1 Charakterisierung der APP23/CBN doppelt-transgenen Mausstämme

3.2.1.1 *In vivo* Untersuchung des APP23/CBN Mausstamms

Um die Auswirkungen des CB1-Rezeptor-Knockouts in transgenen APP23 Mäusen zu analysieren, wurden zu Beginn der Untersuchungen APP23/CB1^{+/-} mit CB1^{+/-}-Mäusen wie in 2.1.7 beschrieben gekreuzt. Durch die Verpaarung war es möglich folgende Genotypen im APP23/CBN-Stamm zu erhalten: APP23/CB1^{+/+}, APP23/CB1^{+/-}, APP23/CB1^{-/-}, CB1^{+/+}, CB1^{+/-}, CB1^{-/-}. Damit die Effizienz an Geburten gesteigert werden konnte und vermehrt Mäuse mit einem bestimmten Genotyp geboren werden, wurden unterschiedliche Zuchtpaare angesetzt, die in Tabelle 3.2.1.2 A aufgeführt sind. Direkt nach der Geburt und nach der Präparation wurde der Genotyp der Tiere des APP23/CBN-Mausstamms überprüft.

3.2.1.2 APP23/CBN Kreuzungen und Analyse der Überlebensrate

Zur Ermittlung der Überlebensrate und zur Analyse der Nachkommensverteilung der APP23/CBN Genotypen, wurden zunächst alle Nachkommen unabhängig von der Verpaarung und dem Geschlecht ausgezählt.

Um die Geburteneffizienz des APP23/CB1^{-/-}-Genotyps zu erhöhen wurden unterschiedliche Zuchtpaare angesetzt die in Tabelle 3.2.1.2 aufgeführt sind:

Tabelle 3.2.1.2

Wt/CB1^{-/-} (♂) verpaart mit APP23/CB1^{+/-} (♀)

APP23/CBN Genotypen	F1 Nachkommen	Nachkommen in %	Prozentverteilung nach Mendel	Mortalität in %	Geburtenrate* in %
APP23/CB1 ^{+/+}	0	0	0	0	-
APP23/CB1 ^{+/-}	104	36,24	25 %	13,46	-
APP23/CB1 ^{-/-}	45	15,68	25 %	37,78	62
CB1 ^{+/+}	0	0	0	0	-
CB1 ^{+/-}	32	11,15	25 %	9,38	-
CB1 ^{-/-}	106	36,94	25 %	11,32	-

* Geburtenrate (Anteil der erwarteten Mendelschen Verteilung in Prozent)

Wt/CB1^{+/-} (♂) verpaart mit APP23/CB1^{+/-} (♀)

APP23/CBN Genotypen	F1 Nachkommen	Nachkommen in %	Prozentverteilung nach Mendel	Mortalität in %	Geburtenrate* in %
APP23/CB1 ^{+/+}	27	23,28	12,50 %	18,52	-
APP23/CB1 ^{+/-}	26	22,41	25 %	19,23	-
APP23/CB1 ^{-/-}	10	8,62	12,50 %	30	80
CB1 ^{+/+}	6	5,17	12,50 %	16,67	-
CB1 ^{+/-}	23	19,83	25 %	8,7	-
CB1 ^{-/-}	24	20,63	12,50 %	12,5	-

Wt/CB1^{+/-} (♀) verpaart mit APP23/CB1^{+/-} (♂)

APP23/CBN Genotypen	F1 Nachkommen	Nachkommen in %	Prozentverteilung nach Mendel	Mortalität in %	Geburtenrate* in %
APP23/CB1 ^{+/+}	26	15,38	12,50 %	15,38	-
APP23/CB1 ^{+/-}	42	24,85	25 %	14,29	-
APP23/CB1 ^{-/-}	6	3,55	12,50 %	33,33	28
CB1 ^{+/+}	13	7,69	12,50 %	7,69	-
CB1 ^{+/-}	60	35,5	25 %	10	-
CB1 ^{-/-}	22	13,02	12,50 %	13,64	-

Alle in dieser Arbeit verwendeten Zuchtpaare zeigten eine erhöhte Mortalitätsrate für den APP23/CB1^{-/-}-Genotyp. Wurden männliche CB1^{-/-} mit weiblichen APP23/CB1^{+/-}-Mäusen verpaart, lag die Sterberate für den APP23/CB1^{-/-}-Genotyp bei 37,78 % und die Geburtenrate bei 62 %. Bei der Verpaarung von männlichen CB1^{+/-} mit weiblichen APP23/CB1^{+/-}-Mäusen lag die Sterberate bei 30 % und die Geburtenrate bei 80 %. Über die Kreuzung von männlichen APP23/CB1^{+/-} mit weiblichen CB1^{+/-}-Mäusen wurde in den F1-Nachkommen eine Sterberate von 33,3 % und eine Geburtenrate von 28 % erreicht. In keiner der Kreuzungskombinationen konnte eine 100%ige Geburtenrate des APP23/CB1^{-/-}-Genotyps wie sie nach Mendel zu erwarten gewesen wäre, erreicht werden. Die größte Anzahl an Nachkommen entstand durch die Verpaarung von männlichen APP23/CB1^{+/-} mit weiblichen CB1^{+/-}-Mäusen.

Für die Untersuchung des APP23/CBN-Mausstamms wurden ausschließlich männliche Tiere verwendet. Insgesamt sind 251 Tiere in die einzelnen Experimente eingegangen. Für alle Genotypen wurde die Überlebensrate bestimmt und prozentual in einer Überlebenskurve dargestellt (Abb. 3.2.1.2). Dabei gingen alle Tiere in die Auswertung ein, die nicht vorzeitig (<20 Monate) für die biochemischen oder histologischen Untersuchungen präpariert wurden.

Für den APP23/CB1^{-/-}-Genotyp wurde eine sehr niedrige Überlebensrate (46 %), gefolgt vom APP23/CB1^{+/+}-Genotyp (72 %), APP23/CB1^{+/-}-Genotyp (78 %), CB1^{-/-}-Genotyp (82 %),

CB1^{+/+}-Genotyp (89 %) und dem CB1^{+/-}-Genotyp (91 %) ermittelt. Durch die Überlebenskurve wird das sehr frühe Versterben der Tiere des APP23/CB1^{-/-}-Genotyps verdeutlicht.

Die Sterberate des APP23/CB1^{+/-}- und CB1^{-/-}-Genotyps war im Vergleich zum Wildtyp (CB1^{+/+}-Genotyp) erhöht. Ein frühzeitiges Versterben von CB1 transgenen- und APP23 transgenen-Tieren wurde bereits beobachtet (Zimmer et al. 1999; Ittner et al. 2010a) und konnte hier zumindest für den APP23/CB1^{+/-}-Genotyp bestätigt werden. Die Überexpression von APP in CB1-Knockout Tieren scheint diesen Effekt nochmals zu erhöhen.

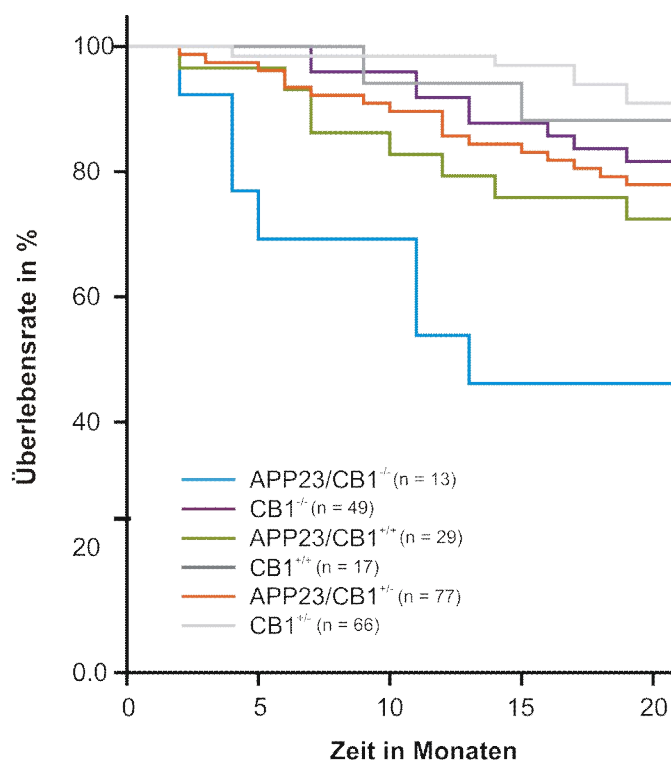


Abb. 3.2.1.2: Analyse der Überlebensrate im APP23/CBN-Mausstamm

Ermittlung der Überlebenskurve im APP23/CBN-Mausstamm aus insgesamt 251 männlichen Tieren. Eingeflossen sind die Tiere, die nicht vor dem 20. Monat für anderweitige Analysen präpariert wurden. Folgende Überlebensraten zum Zeitpunkt 20 Monaten wurden ermittelt: APP23/CB1^{-/-}: 46 % (n=13), CB1^{-/-}: 82 % (n=49), APP23/CB1^{+/+}: 72 % (n=29), CB1^{+/+}: 89 % (n=17), APP23/CB1^{+/-}: 78 % (n=77), CB1^{+/-}: 91 % (n=66). Anhand der Überlebenskurve wird ersichtlich, dass die Tiere des APP23/CB1^{-/-}-Genotyps vermehrt in einem Alter von etwa 2 bis 6 Monaten versterben.

3.2.1.3 Durchschnittsgewicht des APP23/CBN Mausstamms

Nach der Untersuchung der Überlebensrate sollte das Gewicht aller Genotypen des APP23/CBN-Mausstammes ermittelt werden. Abbildung 3.2.1.3 zeigt das Durchschnittsgewicht von 20 Monate alten APP23/CBN-Genotypen.

APP23/CB1^{-/-}-Mäuse zeigten das geringste Durchschnittsgewicht (28,06 g), gefolgt vom CB1^{-/-}-Genotyp (32,06 g), APP23/CB1^{+/+}-Genotyp (32,52 g), APP23/CB1^{+/-}-Genotyp (33,73 g), CB1^{+/-}-Genotyp (35,54 g) und dem CB1^{+/+}-Genotyp (38,22 g). Im Durchschnitt besitzen die CB1^{+/+}-Tiere ein signifikant höheres Gewicht als alle anderen Genotypen des APP23/CBN-Mausstammes mit Ausnahme des CB1^{+/-}-Genotyps. Des Weiteren besitzen die APP23/CB1^{-/-}-Mäuse ein signifikant geringeres Gewicht im Vergleich mit den CB1^{-/-}-, APP23/CB1^{+/+}- und APP23/CB1^{+/-}-Tieren.

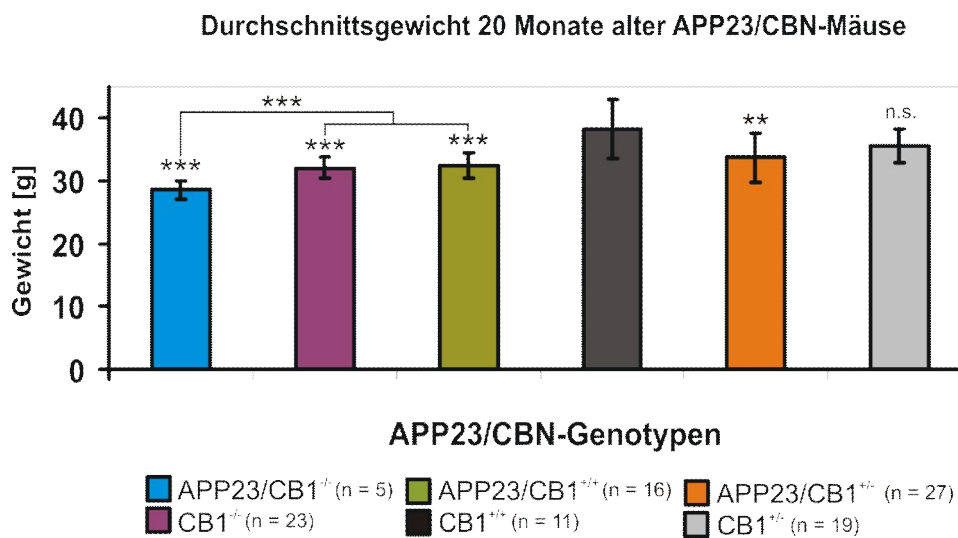


Abb. 3.2.1.3: Durchschnittsgewicht von 20 Monate alten Tieren des APP23/CBN-Mausstammes

Das Durchschnittsgewicht wurde für alle gemessenen Tiere aus einem Genotyp gemittelt, die Standardabweichung berechnet und die Werte aller Genotypen statistisch gegen den CB1^{+/+}-Genotyp (Kontrollgruppe) ausgewertet. Unterschiede zur Kontrolle wurden mit einem * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ und *** $p \leq 0,001$ als statistisch signifikant eingestuft. Alle Genotypen mit Ausnahme des CB1^{+/-}-Genotyps besitzen ein signifikant geringeres Gewicht. Im Vergleich zur den CB1^{-/-}-, APP23/CB1^{+/+}- und APP23/CB1^{+/-}-Tieren sind APP23/CB1^{-/-}-Mäuse signifikant leichter.

Im Vergleich zu den Kontrolltieren wurde für das APP23 transgene Mausmodell ein signifikant geringeres Gewicht publiziert (Lalonde et al. 2005), was mit den hier gewonnenen Ergebnissen in etwa übereinstimmt. Ebenfalls für die von der Arbeitsgruppe Lutz verwendete $CB1^{-/-}$ -Maus wurde eine signifikante Gewichtsabnahme beobachtet (Cota et al. 2003). Der in dieser Arbeit für den $CB1^{-/-}$ -Genotyp ermittelte signifikante Gewichtsverlust konnte von Zimmer et al. jedoch nicht bestätigt werden (Zimmer et al. 1999).

Generell ist aber beobachtet worden, dass genetisch manipulierte Tiere über ein geringeres Gewicht im Vergleich zu den Kontrollen verfügen (Thullier et al. 1997).

3.2.2 Untersuchung der APP-Prozessierung im APP23/CBN doppelt transgenen Mausstamm

3.2.2.1 Histologische Untersuchungen der Plaquerbelastung

Zur Analyse der Plaquerbelastung im APP23/CBN-Mausstamm wurden coronale Schnitte der linken Gehirnhälfte angefertigt und diese zur Detektion von senilen Plaques wie unter 2.2.2.2 beschrieben mit dem Amyloid-bindenden Farbstoff Kongorot gefärbt. Zur Abgrenzung der Zellkerne wurde parallel eine Hämatoxylin Färbung durchgeführt. Die einzelnen Schnitte wurden anschließend unter einem Mikroskop im Hellfeld analysiert. Im APP23 transgenen Mausstamm ist eine Detektion von Plaques frühestens im Alter von 6 Monaten beschrieben worden (Sturchler-Pierrat et al. 1997). Abbildung 3.2.2.1 (A) zeigt Gehirnausschnitte von 4, 14 und 20 Monate alten APP23/CB1^{+/+}-Mäusen.

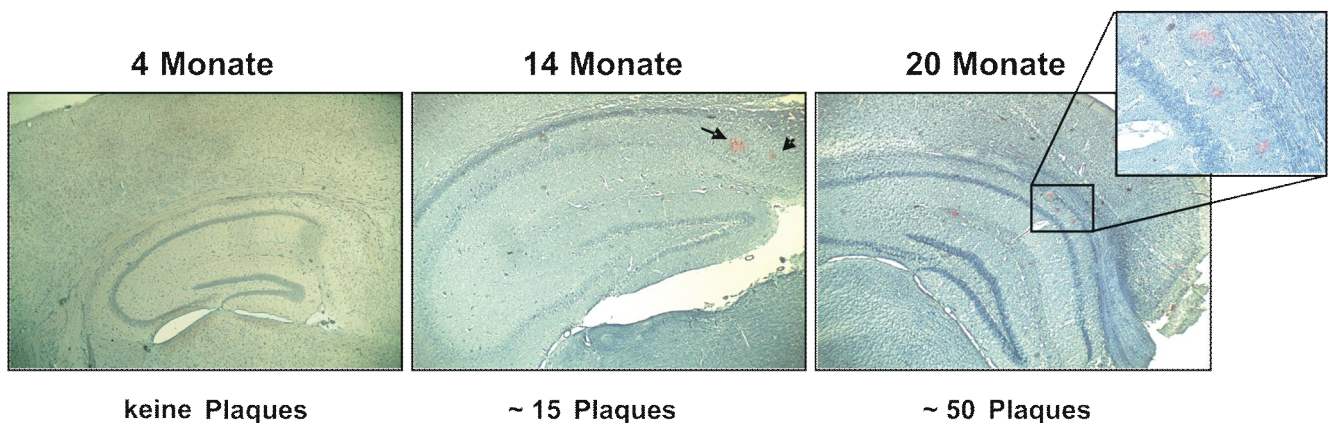


Abb.: 3.2.2.1 A: Plaquerbelastung in APP23/CB1^{+/+}-Mäusen

Detektion von kongorot-gefärbten amyloiden Plaques in APP23/CB1^{+/+}-Mäusen. Im Alter von 4 Monaten können keine Plaques in den Tieren nachgewiesen werden. In 14 Monate alten APP23/CB1^{+/+}-Mäusen sind im Mittel ca. 15 Plaques im Gesamthirn zu detektieren. Nach 20 Monaten weisen die Tiere etwa 50 Plaques auf, die verstärkt in der CA1-Region des Hippocampus auftreten (siehe Vergrößerung).

Zu Beginn der histologischen Untersuchungen wurden APP23/CB1^{+/+}-Mäuse im Alter von 4 Monaten auf eine Plaquerbelastung analysiert. Bei keinem Tier konnten amyloide Plaques gefunden werden. Erst in den Hirnschnitten 14 Monate alter APP23/CB1^{+/+}-Mäuse konnten durch Kongorot gefärbte amyloide Plaques detektiert werden. Die Menge an Kongorot-positiven Plaques im Gesamtgehirn variierte in den Tieren und lag im Mittel bei ca. 15 Plaques pro untersuchtem Tier. Aufgrund der noch sehr geringen Gesamtanzahl wurden die

Tiere im Alter von 20 Monaten auf amyloide Plaques untersucht und im Mittel konnten etwa 50 Plaques pro Gehirnschnitt ausgezählt werden. In 20 Monate alten Mäusen treten vermehrt Plaques in Bereichen oberhalb der CA1-Region des Hippocampus auf (siehe Abb. 3.2.2.1 A Vergrößerung). Die detektierten Plaques variierten in ihrer Größe. Viele Plaques waren gemäß der Einteilung nach Stalder et al. von mittlerer Größe (Stalder et al. 1999). Vereinzelt traten aber auch größere Plaques, meist im Bereich des Subicullums, auf. Die senilen Plaques sind kreisförmig von Zellkernen umgeben, die den Mikrogliazellen zuzuordnen sind. Durch die Färbung mit Hämatoxylin war es möglich die Zellkerne von Neuronen im Bereich des Hippocampus zu detektieren. In direkter Nähe zu den senilen Plaques ist ein Verlust der Neurone zu beobachten (siehe Abb. 3.2.2.1 A Vergrößerung). Eine Abnahme bzw. strukturelle Veränderung pyramidalen Neurone wurde auch in der Literatur für das APP23 transgene Mausmodell lokal für die CA1-Region des Hippocampus beschrieben und ist auf die Bereiche mit amyloiden Plaques konzentriert (Calhoun et al. 1998).

Die Quantifizierung der amyloiden Plaques in 20 Monate alten Tieren erfolgte in den APP23/CB1^{+/+}-, APP23/CB1^{+/-} und APP23/CB1^{-/-}-Mäusen mit Hilfe der Kongorot-Färbungen. Zur Analyse der Plaquebelastung wurden pro Tier jeweils 3 Schnitte im Bereich von Bregma -2,70 mm, -2,46 mm und -1,70 mm bezüglich der Plaqueanzahl ausgezählt. Die Regionen Hippocampus und Cortex wurden getrennt ausgezählt und die Gesamtanzahl von Plaques im Gehirn berechnet.

Abbildung 3.2.2.1 B zeigt die Plaquebelastung in APP23/CB1^{-/-}, APP23/CB1^{+/+} und APP23/CB1^{+/-}-Mäusen.

Die Quantifizierung der Plaque-Anzahl im Hippocampus, Cortex und im Gesamtgehirn in 20 Monate alten APP23/CBN-Mäusen ergab signifikante Unterschiede in den untersuchten Genotypen. APP23/CB1^{+/+}-Mäuse weisen eine signifikant höhere Anzahl an amyloiden Plaques im Hippocampus ($p \leq 0,01$), Cortex ($p \leq 0,01$) und im Gesamtgehirn ($p \leq 0,01$) im Vergleich zu APP23/CB1^{+/-}-Mäuse auf. Der APP23/CB1^{-/-}-Genotyp zeigt ebenfalls signifikante Unterschiede in der Plaqueanzahl ($p \leq 0,05$) zum APP23/CB1^{+/+}-Genotyp mit Ausnahme der Cortexregion ($p \leq 0,07$).

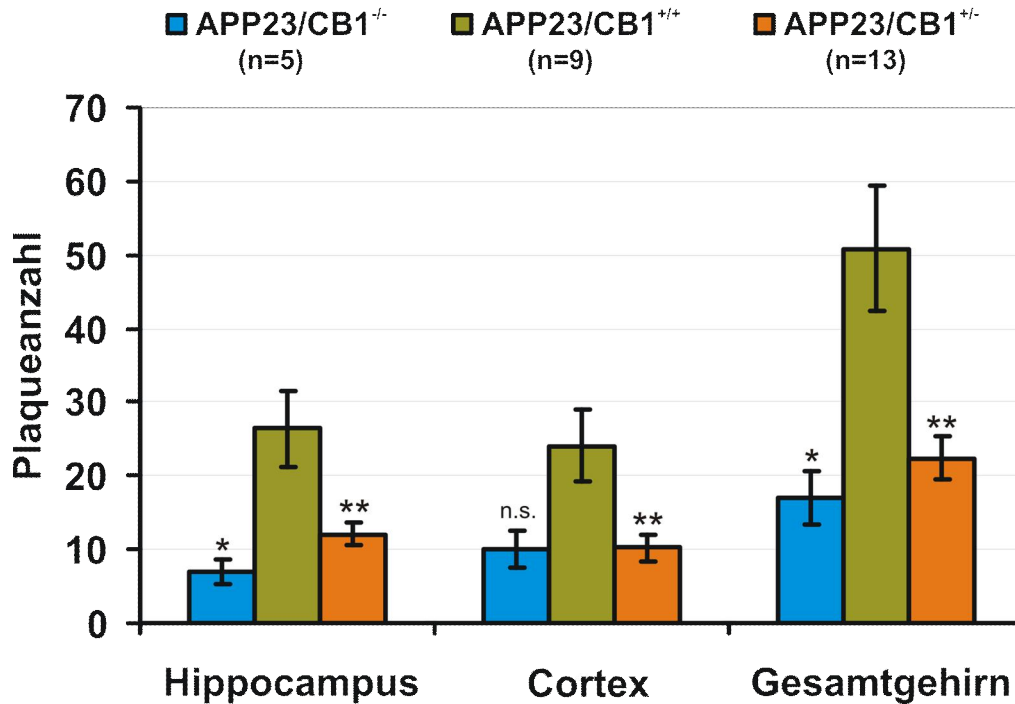


Abb.: 3.2.2.1 B: Quantifizierung der Plaquebelastung im APP23/CBN-Mausstamm

Quantifizierung der durch kongorot-gefärbten Plaques in APP23/CB1^{-/-} (n=5), APP23/CB1^{+/+} (n=9) und APP23/CB1^{+/-}-Mäusen (n=13) im Alter von 20 Monaten. Pro Tier wurden die Plaques in 3 Hirnschnitten in den Bereichen Bregma -2,70 mm, -2,46 mm und -1,70 mm ausgezählt. Die ausgezählten Werte aus den einzelnen Genotypen wurden gemittelt und für alle der SEM berechnet. Die Plaquebelastung zwischen den Genotypen wurde für die Regionen Hippocampus, Cortex und das Gesamtgehirn ermittelt. In allen Regionen und im Gesamtgehirn, mit Ausnahme des Cortex im APP23/CB1^{-/-}-Genotyp ($p \leq 0,07$), zeigen APP23/CB1^{+/+}-Mäuse und APP23/CB1^{-/-}-Mäuse eine statistisch geringere Anzahl an Plaques verglichen mit APP23/CB1^{+/+}-Mäusen (* $p \leq 0,05$, (** $p \leq 0,01$)).

Zur besseren visuellen Darstellung der amyloiden Plaques wurden Fluoreszenzfärbungen der Gehirne von 20 Monate alten Mäusen angefertigt. Die indirekte Immunfluoreszenzfärbung der Gehirnschnitte erfolgte wie unter 2.2.2.3 beschrieben. Amyloid Plaques wurden mit dem monoklonalen 6E10-Antikörper (Cy3; rot), welcher an APP bindet, gefärbt und die Zellkerne über eine DAPI-Färbung (blau) visualisiert. Ein deutlicher Unterschied in der Plaqueanzahl in den Bereichen des Subicullums und der CA1-Region des Hippocampus zwischen dem APP23/CB1^{+/+}-Genotyp im Vergleich zur APP23/CB1^{+/-} und APP23/CB1^{-/-}-Maus konnte mittels Immunfluoreszenz ermittelt werden (Abb. 3.2.2.1 C).

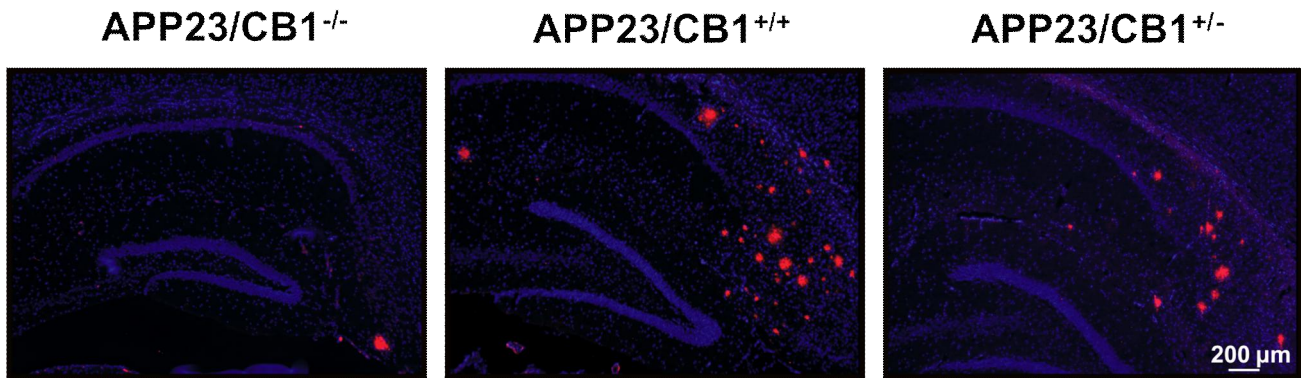


Abb. 3.2.2.1 C: Detektion von Amyloid Plaques mittels Immunfluoreszenz

Zur Detektion von Amyloid Plaques über die Immunfluoreszenz wurden Schnitte von 20 Monate alten Tieren mit dem 6E10-Antikörper behandelt und über einen Cy3-gekoppelten Zweitantikörper die Plaques im Rotkanal sichtbar gemacht. Die Zellkerne wurden über eine DAPI-Färbung (blau) visualisiert. Der APP23/CB1^{+/+}-Genotyp zeigt eine deutlich höhere Anzahl an Plaques in Bereichen der CA1-Region des Hippocampus und im Subicullum im Vergleich zu den APP23/CB1^{+/-} und APP23/CB1^{-/-}-Genotypen.

Im Cerebellum der hier untersuchten Genotypen konnten zu keinem Zeitpunkt (4, 12, 20 Monate) senile Plaques über eine Kongorot- oder Immunfluoreszenzfärbung detektiert werden.

3.2.2.2 Analyse der Neuroinflammation

In der Alzheimer Demenz ist nach Ausbruch der Krankheit eine starke Neuroinflammation zu beobachten (Wee Yong 2010). Mit dem Auftreten der amyloiden Plaques kommt es zu einer verstärkten Aktivierung von Mikroglia- und Astrogliazellen. Diese erhöhte Neuroinflammation wurde bereits in der APP23 transgenen Maus beschrieben (Bornemann & Staufenbiel 2000).

Im APP23/CBN-Mausstamm sollte eine mögliche Aktivierung von neuroinflammatorischen Markern untersucht werden. Dazu wurden die angefertigten coronalen Gehirnschnitte von 20 Monate alten APP23/CB1^{-/-} und APP23/CB1^{+/+}-Mäusen mit Antikörpern gegen Astrogliazellen (GFAP) und Mikrogliazellen (Tomatolektin) gefärbt und zur Detektion der amyloiden Plaques mit Antikörpern gegen APP gegengefärbt.

In Abbildung 3.2.2.2 sind die Fluoreszenzaufnahmen von 20 Monate alten Tieren dargestellt. Eine über die GFAP- und Tomatolektin-Färbung visualisierte Astroglia- und

Mikrogliaaktivierung war in beiden Genotypen fast nur im Bereich der Amyloid Plaques zu beobachten. Die aktivierten Mikrogliazellen kreisen die Plaques in direkter Nähe ein. APP23/CB1^{+/+}-Mäuse zeigen eine wesentlich stärkere Neuroinflammation im Vergleich zu APP23/CB1^{-/-}-Mäusen. Die aktivierten Astroglia- und Mikrogliazellen treten im Cortex, Subicullum und der CA1-Region, den Bereichen hoher Plaque-Dichte, auf.

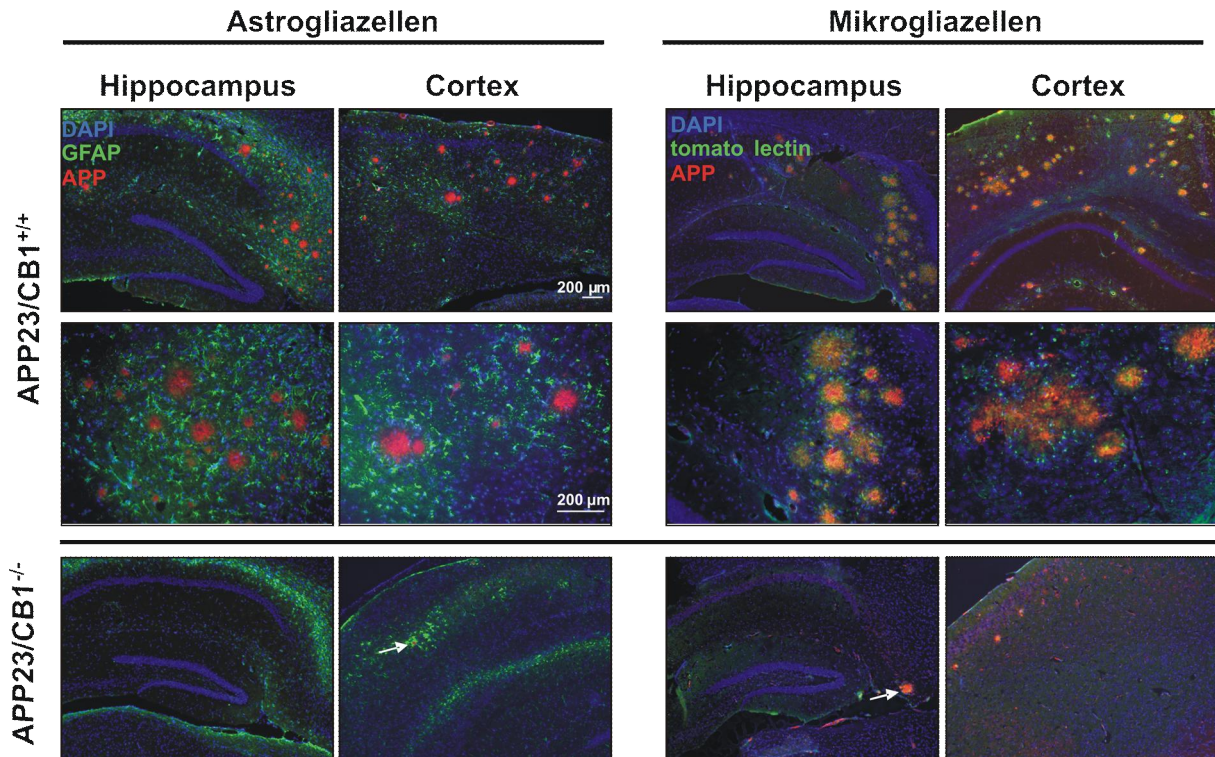


Abb. 3.2.2.2: Neuroinflammation in APP23/CB1^{+/+} und APP23/CB1^{-/-}-Tieren

Neuroinflammation in Form von aktivierten Astroglia- und Mikrogliazellen in 20 Monate alten APP23/CB1^{+/+} und APP23/CB1^{-/-}-Tieren. In Bereichen der Plaques sind vermehrt aktivierte Astroglia- und Mikrogliazellen zu sehen. Die Mikrogliazellen ordnen sich in einer kreisförmigen Struktur direkt um die amyloiden Plaques an. Die Menge an aktivierten Astro- und Mikrogliazellen ist in APP23/CB1^{+/+}-Tieren im Vergleich zum APP23/CB1^{-/-}-Genotyp erhöht.

3.2.2.3 Analyse der Neuronendichte im Hippocampus und Cortex

In der APP23 transgenen Maus wird ein regionenspezifischer Verlust von Neuronen beschrieben (Calhoun et al. 1998). Ein signifikanter Verlust von pyramidalen Neuronen konnte ausschließlich in der CA1-Region des Hippocampus beschrieben werden. Im Neocortex hingegen konnten keine Unterschiede im Vergleich zu den Kontrolltieren festgestellt werden. Der Neuronenverlust korrelierte mit der Plaque-Menge und es wurde eine zerrissene neuronale Zytoarchitektur beobachtet. In CB1-Rezeptor-Knockout Mäusen wurde ebenfalls eine Abnahme an pyramidalen Neuronen in der CA1- und CA3-Region des Hippocampus beschrieben (Bilkei-Gorzo et al. 2005). Beide Tiermodelle weisen ein schlechtes Lernverhalten auf, das sehr wahrscheinlich auf den Neuronenverlust in den CA1- und CA3-Regionen zurückzuführen ist, da in diesen Regionen die Langzeitpotenzierung von Informationen im Gehirn verankert sind (Izquierdo et al. 2008).

Ein möglicher Neuronenverlust im Gehirn sollte deshalb mit Hilfe der Immunfluoreszenz in APP23/CB1^{+/+}-, APP23/CB1^{+/-} und APP23/CB1^{-/-}-Mäusen untersucht werden. In keinem der APP transgenen Genotypen konnte ein offensichtlicher Verlust an Neuronen in 4 und 20 Monate alten Mäusen im Hippocampus beobachtet werden.

In Gehirnregionen in denen verstärkt Amyloid Plaques auftreten, wurde ein Verlust von Neuronen in direkter Nähe zu den senilen Plaques im APP23 transgenen Mausmodell beschrieben (Calhoun et al. 1998). Dieser Neuronenverlust in unmittelbarer Nähe zu den Plaques konnte auch in dieser Arbeit bei APP23/CB1^{+/+}-Mäusen in Bereichen hoher Plaquedichte festgestellt werden. In Abbildung 3.2.2.3 ist die Cortexregion einer APP23/CB1^{+/+}-Maus dargestellt. Die Zellkerne wurden über DAPI, Neurone mit dem NeuN-Antikörper (Cy3) und aktivierte Mikrogliazellen, die sich um amyloide Plaques sammeln, durch FITC-gekoppeltes Tomato-Lektin visualisiert.

Die Färbung mit dem Neuronenmarker NeuN zeigt kein Fluoreszenzsignal in direkter Nähe zu den Plaques. Im Plaque-Bereich können keinerlei Zellkerne detektiert werden (DAPI). In den Bereichen der Amyloid Plaques findet somit eine Degeneration von Neuronen statt.

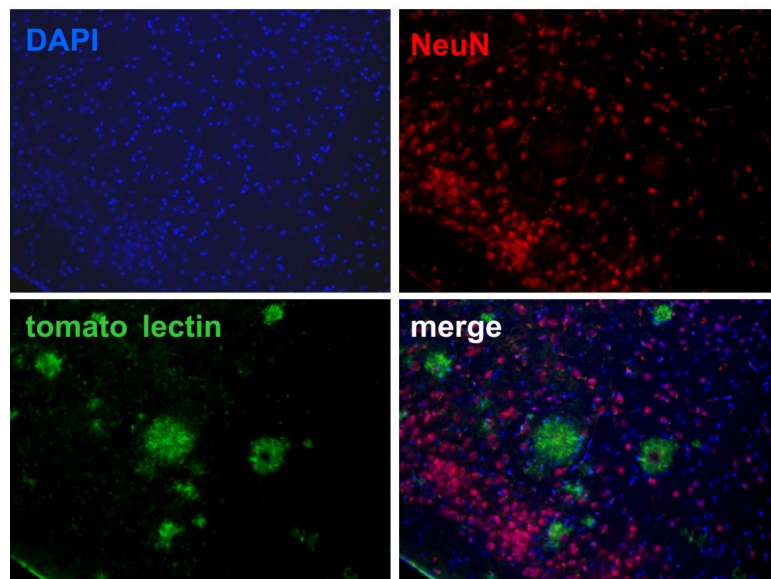


Abb. 3.2.2.3: Neuronenverlust im Cortex in direkter Umgebung zu Amyloid Plaques

Ausschnitt aus der Cortexregion einer APP23/CB1^{+/+}-Maus. Die Zellkerne wurden mit DAPI, Neurone und Mikrogliazellen durch NeuN (Cy3) bzw. FITC-gekoppeltes Tomato-Lektin visualisiert. In unmittelbarer Umgebung zu den amyloiden Plaques ist kein NeuN-Signal zu sehen, was auf eine Degeneration der Neurone in dieser Region hinweist.

3.2.2.4 Biochemische Analyse der APP-Prozessierung im APP23/CBN Mausstamm

Die Prozessierung des APP-Moleküls im amyloiden Weg führt zur erhöhten Bildung der toxischen A β 40- und A β 42-Peptide. Diese können im Extrazellularraum zu höher molekularen Fibrillen und letztendlich zu Amyloid Plaques aggregieren. In der APP23 transgenen Maus wurde durch die erhöhte Prozessierung im amyloiden Weg die Ausbildung und das Auftreten von senilen Plaques beschrieben (Sturchler-Pierrat et al. 1997).

Die biochemische Prozessierung des APP-Proteins sollte deshalb im APP23/CBN-Mausstamm durch Western Blot und ELISA untersucht werden. Die Expression von mutantern humanem APP im APP23/CBN-Mausstamm erfolgt unter der Kontrolle des Thy1-Promotors. Zusätzlich zu den biochemischen Analysen wurden APP23/CB1^{+/+}-, APP23/CB1^{+/-} und APP23/CB1^{-/-}-Mäuse hinsichtlich der APP Expressionspiegel über eine Real-time PCR untersucht.

3.2.2.5 APP-Prozessierung im APP23/CBN Mausstamm

Für die Untersuchung der APP-Prozessierung wurde Hippocampus-Gewebe nach 2.2.4.2 aufgereinigt. Je 20 μ g der Proteinproben wurden über eine SDS-PAGE aufgereinigt und durch Western-Blot auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Es wurden jeweils die lösliche Fraktion (S1), die alle zytosolischen Proteine beinhaltet und die unlösliche Fraktion (S2), die alle Membranproteine beinhaltet, separat auf Gele aufgetragen. Die Detektion des löslichen sAPP α erfolgte mit dem 6E10-Antikörper und APP π sowie die C-terminalen Fragmente (CTFs) wurden mit dem A8717-Antikörper nachgewiesen. Eine mögliche Neuroinflammation wurde in den Tieren mit dem GFAP-Antikörper untersucht, der CB1-Rezeptor wurde mit dem kommerziellen CB1-Antikörper der Firma Cayman nachgewiesen. Als Referenzprotein wurde in vier Monate alten Tieren das Aktin-Protein verwendet. In 20 Monate alten Tieren konnte kein Referenzprotein gefunden werden, dass in allen Genotypen gleich stark exprimiert wurde. Deshalb wurde für jedes Gel als Referenz eine Coomassie-Färbung zur Detektion der Proteinbanden durchgeführt und diese auch zur Quantifizierung verwendet.

Zu Beginn der biochemischen Untersuchungen wurden im APP23/CBN-Mausstamm nur Tiere mit dem APP23/CB1^{+/+}, APP23/CB1^{-/-}, CB1^{+/+}, CB1^{-/-}-Genotyp analysiert. Aufgrund der sehr hohen Mortalitätsrate der APP23/CB1^{-/-}-Mäuse wurden für weitere Untersuchungen auch die heterozygoten Tiere in die Untersuchungen integriert.

In vier Monate alten APP transgenen Tieren konnten veränderte APP-Spiegel beobachtet werden (Abb. 3.2.2.5. A). APP23/CB1^{-/-}-Mäuse zeigten um etwa 15 % verringerte Menge des APP_{fl}-Proteins, verglichen zum APP23/CB1^{+/+}-Genotyp. Des Weiteren werden in APP23/CB1^{-/-}-Tieren signifikant weniger sAPP α (38 %) und CTFs (49 %) gebildet. Eine Veränderung der endogenen APP_{fl}-Mengen zwischen CB1^{+/+}- und CB1^{-/-}-Mäusen (Abb. 3.2.2.5 A) konnte in weiteren Analysen nicht bestätigt werden.

Eine Entzündung in Form einer Neuroinflammation konnte in vier Monate alten APP überexprimierenden Tieren nicht nachgewiesen werden, da alle Genotypen etwa gleich starke GFAP-Spiegel aufwiesen.

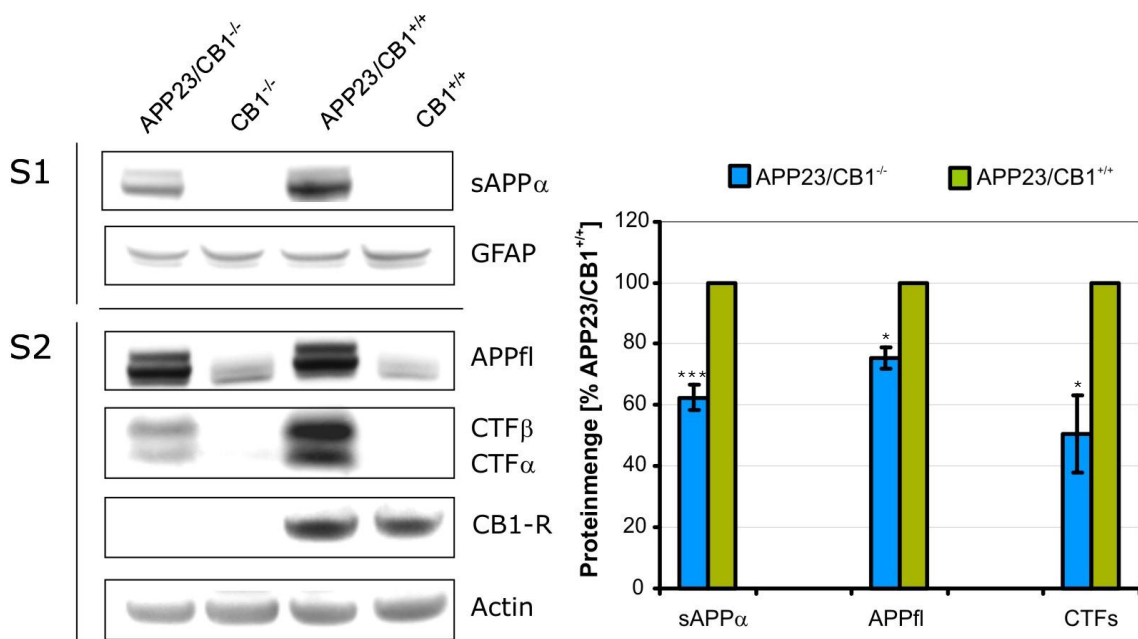


Abb. 3.2.2.5 A: APP-Prozessierung in 4 Monate alten Tieren des APP23/CBN-Mausstamms

20 μ g Hippocampi-Gesamtprotein wurden auf einem 4-12% NuPAGE-Gradientengel aufgetrennt und über Western-Blot auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Das APP_{fl}-Protein und die CTFs wurden mit dem A8717-Antikörper, sAPP α mit dem 6E10-Antikörper, Aktin, GFAP und CB1 mit den jeweils spezifischen monoklonalen Antikörpern detektiert. Es wurden die lösliche (S1) und die Membranfraktion (S2) aufgetragen. Als Ladekontrolle diente Aktin. Die graphische Auswertung erfolgte nach Auswertung der optischen Bandenintensitäten mit dem ImageJ-Programm und ist dargestellt als prozentuale Veränderung zum APP23/CB1^{+/+}-Genotyp. APP23/CB1^{-/-}-Mäuse zeigen eine signifikante Abnahme der APP_{fl}-Expression (n=5, p \leq 0,01), sowie in der Prozessierung von sAPP α - (n=10, p \leq 0,001) und der CTFs (n=5, p \leq 0,05).

Die biochemische Untersuchung der APP-Expression in 20 Monate alten Tieren zeigte eine ähnliche Prozessierung verglichen mit den vier Monate alten Tieren. Die APP Menge (App_{fl}) in APP23/CB1^{-/-}-Mäusen ist signifikant um 17 % reduziert im Vergleich zum APP23/CB1^{+/+}-Genotyp (Abb. 3.2.2.5 B). Auch die Bildung von sAPP α und den CTFs ist in den Genotypen

unterschiedlich. Im Mittel wurde in APP23/CB1^{-/-}-Mäusen 32 % weniger sAPP α und 35 % weniger CTFs im Vergleich zum APP23/CB1^{+/+}-Genotyp gebildet.

APP23/CB1^{+/-}-Tiere zeigen keine Unterschiede in der APP_{fl}-Expression und nur die Prozessierung von sAPP α ist signifikant um 23 % reduziert. Somit scheint die heterozygote Expression des CB1-Rezeptors in APP transgenen Mäusen einen weniger starken Effekt auf die APP-Prozessierung auszuüben. In allen Genotypen, die APP überexprimieren, ist eine verstärkte Neuroinflammation in Form einer erhöhten GFAP-Expression zu beobachten.

In allen 20 Monate alten APP transgenen Genotypen wurde das Verhältnis von β - zu α -CTFs ermittelt. Dabei wurden die Proteinmengen der α - und β -CTFs gemessen und jeweils auf die CTF-Gesamtmenge (α - und β -CTFs) normiert. Anschließend wurde das Verhältnis von β -CTFs zu α -CTFs ermittelt. APP23/CB1^{-/-}-Mäuse bilden signifikant mehr CTF α als CTF β im Vergleich zu den APP23/CB1^{+/+}- und APP23/CB1^{+/-}-Genotypen. Somit scheinen APP23/CB1^{-/-}- verglichen mit APP23/CB1^{+/+}-Tieren APP stärker im nicht-amyloiden Weg zu prozessieren.

Die hier beschriebene Prozessierung des APP-Proteins wurde auch in 5 Monate alten Tieren des APP23/CBN-Mausstamms beobachtet. Die veränderte Prozessierung des APP-Proteins zeigte sich auch in Gehirngeweben wie dem vorderen Cortex und dem Cerebellum (Daten nicht gezeigt). Die endogenen APP-Spiegel in den CB1^{+/+}-, CB1^{+/-} und CB1^{-/-}-Tieren waren in allen Genotypen gleich und es konnte keine Veränderung in der Prozessierung beobachtet werden.

Des Weiteren wurden in dieser Arbeit im APP23/CBN-Mausstamm über Western-Blot die APP-prozessierenden Enzyme BACE1, ADAM10 oder Presenilin1 in APP überexprimierenden Genotypen untersucht. Die Expression der Sekretasen war in allen Genotypen gleich (Daten nicht gezeigt). Des Weiteren wurde mit Hilfe des PHF-1-Antikörpers, welcher an phosphoryliertes Tau-Protein bindet, die Expression des Proteins im APP23/CBN-Mausstamm durch Immunoblot untersucht. Es konnten keine Unterschiede in den Proteinmengen in den untersuchten Genotypen festgestellt werden und zwischen den Gruppen traten immer wieder Schwankungen auf, die kein einheitliches Bild erkennen lassen (Daten nicht gezeigt).

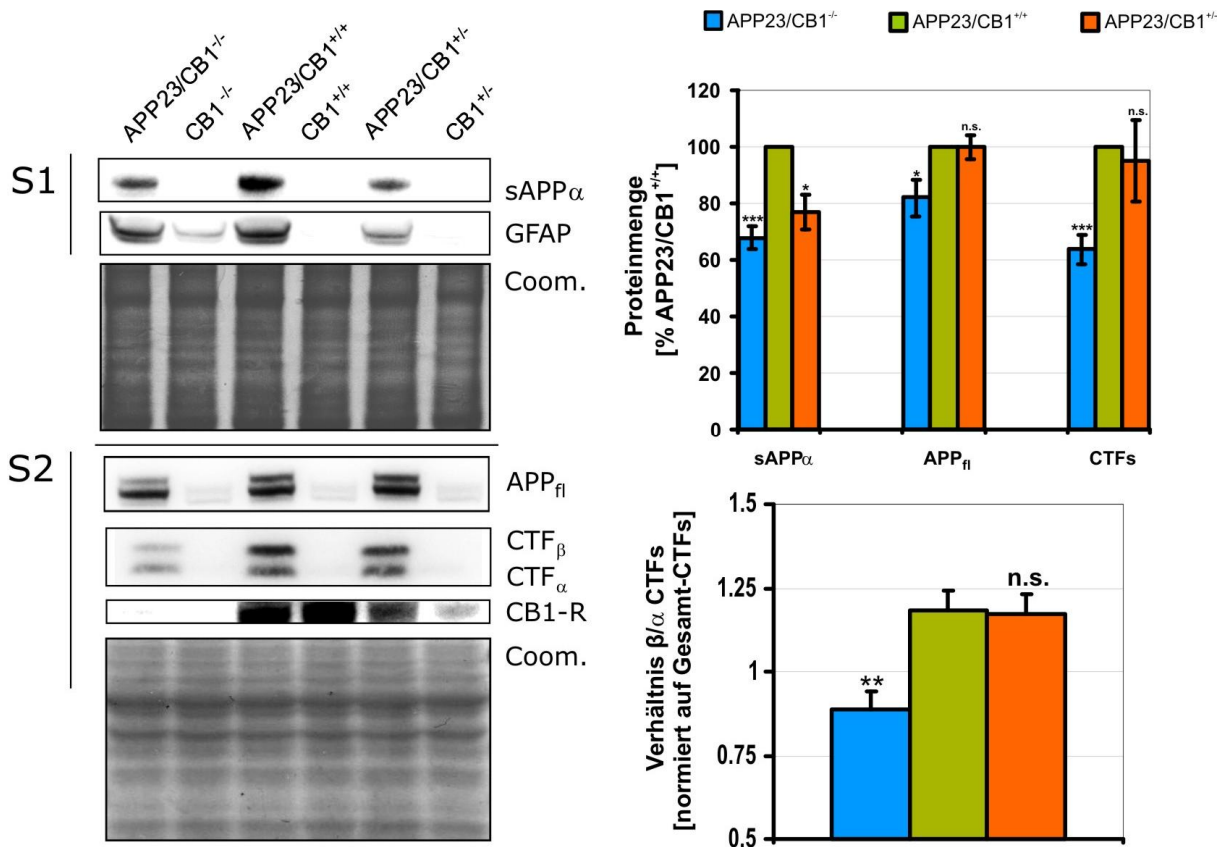


Abb. 3.2.2.5 B: APP-Prozessierung in 20 Monate alten Tieren des APP23/CBN-Mausstamm

20 μ g Hippocampi-Gesamtprotein wurden auf einem 4-12% NuPAGE-Gradientengel aufgetrennt und über Western-Blot auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Das APP $_{fl}$ -Protein und die CTFs wurden mit dem A8717-Antikörper, sAPP α mit dem 6E10-Antikörper, GFAP und CB1 mit den jeweils spezifischen monoklonalen Antikörpern detektiert. Es wurden die lösliche (S1) und die Membranfraktion (S2) aufgetragen. Als Ladekontrolle dienten die jeweiligen Coomassie-Gele (Coom.). Die graphische Auswertung erfolgte nach Auswertung der optischen Bandenintensitäten mit dem ImageJ-Programm und ist dargestellt als prozentuale Veränderung zum APP23/CB1^{+/+}-Genotyp. APP23/CB1^{-/-}-Mäuse zeigen eine signifikante Abnahme der APP $_{fl}$ -Expression (n=9, p \leq 0,05), sowie in der Prozessierung von sAPP α - (n=7, p \leq 0,001) und der CTFs (n=9, p \leq 0,001). Im APP23/CB1^{+/-}-Genotyp konnte eine signifikante Abnahme nur in der Prozessierung von sAPP α (n=7, p \leq 0,05) ermittelt werden. Die Proteinmengen der α - und β -CTFs wurden gemessen und jeweils auf die CTF-Gesamt mengen normiert. APP23/CB1^{-/-}- (n=4, p \leq 0,01) bilden signifikant mehr CTF $_{\alpha}$ als CTF $_{\beta}$ verglichen mit APP23/CB1^{+/+}- (n=7) und APP23/CB1^{+/-}-Mäusen (n=7).

3.2.2.6 Expression von APP im APP23/CBN-Mausstamm

Zur Untersuchung der APP-Expression im APP23/CBN-Tiermodell musste ein Gehirngewebe untersucht werden, in dem der Thy1-Promotor stark exprimiert wird. Die höchste Expression des Promotors wird für das Striatum, gefolgt von Hippocampus, Cerebellum und dem Rückenmark beschrieben (Sturchler-Pierrat & Staufenbiel 2000). Der Hippocampus spielt

eine entscheidende Rolle bei der Informationsspeicherung vom Kurzzeit- ins Langzeitgedächtnis und ist an der Informationsspeicherung von räumlichen Eindrücken beteiligt (Sharma et al. 2010). Deshalb sollten alle Hippocampi-Gewebe in die biochemischen Untersuchungen eingehen. Für die molekularbiologischen Untersuchungen wurde Kleingehirngewebe von 20 Monate alten Tieren verwendet. Die Expression des Thy1-Promotors im Cerebellum ist ähnlich stark wie im Hippocampus und sollte somit vergleichbare Analysedaten zur APP-Expression ermöglichen. Des Weiteren weisen die biochemischen Daten (3.2.2.5) darauf hin, dass die Spiegel an APP und den APP-Fragmenten in beiden Geweben ähnlich verändert sind.

Aus den Geweben wurde RNA gewonnen, diese über eine Reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben und APP mit spezifischen Primern in einer Real-time PCR nachgewiesen.

Die Analyse der relativen APP-Expression in APP23/CB1^{+/-} und APP23/CB1^{-/-}-Mäusen erfolgte wie in 2.2.3.8 beschrieben. Als Referenz dienten bei dieser Untersuchung die C_T-Werte der APP23/CB1^{+/+}-Mäuse. Die relative Genexpression von APP wurde in jeweils vier Tieren eines Genotyps untersucht und auf die APP23/CB1^{+/+}-Mäuse genormt (Abb. 3.2.2.6). In keinem der Genotypen wurde eine verstärkte Hoch- bzw. Herabregulation des APP-Gens beobachtet. Somit wirkt sich der entsprechende CB1-Genotyp nicht auf die Expression von APP aus.

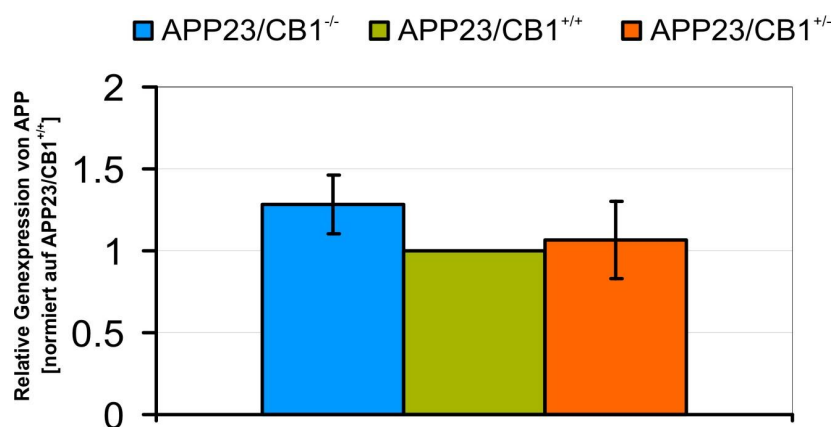


Abb. 3.2.2.6: Relative Genexpression von APP im APP23/CBN-Mausstamm

Jeweils vier 20 Monate alte APP23/CB1^{+/+}-, APP23/CB1^{+/-} und APP23/CB1^{-/-}-Mäuse wurden hinsichtlich der APP-Expression durch Real-time PCR untersucht. Die RNA wurde aus dem Cerebellum gewonnen und je 500 ng für die cDNA Synthese eingesetzt. Die Analyse erfolgte wie unter 2.2.3.8 beschrieben und die C_T-Werte der APP23/CB1^{+/+} und APP23/CB1^{-/-}-Tiere wurden auf den APP23/CB1^{+/+}-Genotyp genormt. Es gibt keine Veränderung des APP-Gens hinsichtlich der Expression zwischen den Genotypen.

3.2.2.7 Analyse der Amyloid β Mengen im APP23/CBN-Mausstamm

Die Menge der extrazellulären A β 40- und A β 42 Peptide sollte im APP23/CBN-Mausstamm mittels eines spezifischen colorimetrischen ELISAs nachgewiesen werden. Die Durchführung erfolgte wie unter 2.2.4.5 beschrieben. Es wurden jeweils die S1-Fractionen von 4 und 20 Monate alten APP23/CB1^{+/-}-, APP23/CB1^{+/-} und APP23/CB1^{-/-}-Tieren im ELISA gemessen und die A β 40- und A β 42-Proteinmengen anhand einer Standardreihe bestimmt.

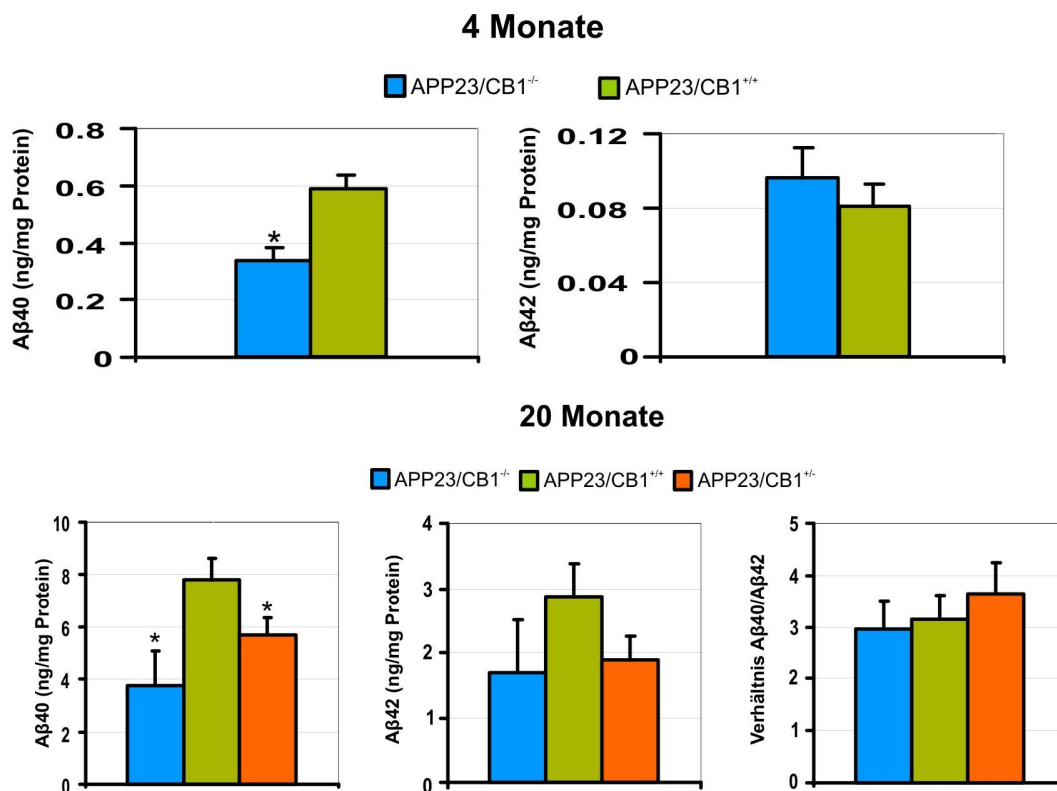


Abb. 3.2.2.7: A β -ELISA in 4 und 20 Monate alten Tieren des APP23/CBN-Mausstamms

Quantifizierung der im ELISA gemessenen A β 40- und A β 42-Proteinmengen in 4 und 20 Monate alten Tieren. Im Vergleich zur APP23/CB1^{+/-}-Maus (n=10) wird in den APP23/CB1^{-/-}-Genotypen (n=7) signifikant weniger (ca. 50%) A β 40 prozessiert ($p \leq 0,05$). In den A β 42-Proteinmengen gibt es keine Unterschiede. In 20 Monate alten APP23/CB1^{-/-}- und APP23/CB1^{+/-}-Tieren wird ebenfalls signifikant weniger A β 40 prozessiert ($p \leq 0,05$). In den untersuchten Genotypen treten keine Unterschiede in den A β 42-Peptidmengen auf. Setzt man die Mengen von A β 40 und A β 42 ins Verhältnis so ergeben sich keine Unterschiede in den Genotypen.

Abbildung 3.2.2.7 zeigt die graphische Auswertung der im ELISA gemessenen Werte. Die A β 40-Menge war in den APP23/CB1^{-/-}- im Vergleich zu APP23/CB1^{+/-}-Tieren signifikant reduziert. Dieser Befund korreliert mit den Ergebnissen der APP-Prozessierung (siehe Abb. 3.2.2.5 A).

Die Anzahl an A β 42 ist in beiden Genotypen in etwa gleich (zwischen 0,08 und 0,09 ng/mg) und es konnte nur eine sehr geringe A β 42-Proteinmenge detektiert werden.

Die A β 40-Spiegel in 20 Monate alten Tieren sind in der Gesamtmenge wesentlich höher. Die reduzierten A β 40-Proteinmengen in APP23/CB1^{-/-} (n=4) und APP23/CB1^{+/-}-Mäusen (n=7) korrelieren mit der im Western Blot beobachteten reduzierten Menge an CTF β (siehe Abb. 3.2.2.5 B). Die A β 40-Proteinmengen in den APP23/CB1^{-/-} (n=4) und APP23/CB1^{+/-}-Mäusen (n=7) liegen bei 4 ng/mg und 6 ng/mg im Vergleich zu 8 ng/mg in den APP23/CB1^{+/+}-Tieren (n=7). Die im ELISA gemessenen A β 42-Proteinmengen sind in den beiden Genotypen im Vergleich zum APP23/CB1^{+/+}-Genotyp reduziert. Da die A β 42-Mengen generell sehr niedrig sind und sich an der Detektionsgrenze des ELISA-Kits befinden, konnten keine signifikanten Unterschiede in den einzelnen Gruppen gemessen werden. Wertet man das Verhältniss zwischen A β 40 und A β 42 aus, zeigen sich keine Unterschiede.

3.2.2.8 Verhaltensuntersuchungen im Morris Wasserlabyrinth

Die Gehirnregion des Hippocampus ist vor allem für die Verarbeitung von räumlichen Eindrücken verantwortlich. Eine Degeneration von Neuronen in der CA1- oder CA3-Region des Hippocampus einhergehend mit einer altersabhängigen Verschlechterung des Lernverhaltens konnte in APP23 transgenen- und CB1-Rezeptor-Knockout-Mäusen beschrieben werden (Zimmer et al. 1999; Sturchler-Pierrat & Staufenbiel 2000; Bilkei-Gorzo et al. 2005; Vloeberghs et al. 2006).

Das Morris Water-Maze Experiment ist ein Verhaltensversuch in dem das räumliche Lernen in Tiermodellen untersucht werden kann. Aufgrund der vorher beschriebenen Symptome in dem APP23/CBN-Mausstamm sollten die Tiere deshalb im Alter von 20 Monaten auf Lerndefizite mit Hilfe des Morris Water-Maze analysiert werden. Die einzelnen Versuchsreihen wurden wie unter 2.2.5.2 beschrieben durchgeführt. Es wurden alle Genotypen des APP23/CBN-Mausstamms im Morris Water-Maze untersucht. Tiere, die ein kränkliches äußeres Erscheinungsbild oder Probleme in den Schwimmbewegungen aufzeigten, wurden nicht im Lernversuch getestet.

In Abbildung 3.2.2.8 sind die Ergebnisse aus allen Messungen graphisch dargestellt. An jedem Tag wurde die Latenzzeit bis zum Erreichen der Plattform gemessen und der Verlauf der Latenzkurve über die vier Trainingsläufe (Testphase) für jeden Genotyp aufgetragen. In allen Genotypen konnte eine Abnahme der Latenz über die Zeit gemessen werden. Somit

wurde in allen Tieren ein Lernerfolg in den 4 Trainingstagen erreicht. An Tag 5 wurde der Testlauf (probe trail), bei dem die Plattform aus dem Becken entfernt wird, durchgeführt. Es wurde die Latenzzeit bis zum Erreichen der vorherigen Position der Plattform und die maximalen Kreuzungen dieser Position ausgewertet.

In den Trainingsläufen benötigten APP23/CB1^{-/-}-Mäuse eine signifikant längere Zeit im Vergleich zu allen anderen Genotypen um die Plattform zu finden. Die Mäuse konnten dabei ihr räumliches Lernverhalten von Tag 1 bis Tag 4 um maximal 15 sec verbessern. APP23/CB1^{+/+}-, APP23/CB1^{+/-}- und CB1^{-/-}-Mäuse benötigten eine signifikant längere Zeit zum Erreichen der Plattform im Vergleich zur CB1^{+/+}-Kontrollmaus, was auf eine reduzierte Lernleistung hinweist.

Die in dieser Arbeit verwendeten doppeltransgenen Tiere (APP23/CB1^{-/-}) zeigten im Vergleich zu den oben genannten einfach transgenen Tieren im Morris Water-Maze eine nochmals verringerte Lernleistung. Dieser Befund wurde auch im Testlauf (probe trail) bestätigt. APP23/CB1^{-/-}-Mäuse benötigten im Mittel 54 sec um die ursprüngliche Position der Plattform zu finden und kreuzten diese Position maximal einmal. Im Vergleich zu allen anderen Genotypen benötigten die APP23/CB1^{-/-}-Mäuse eine signifikant längere Zeit zum Erreichen der Zielposition. Alle Genotypen, mit Ausnahme des APP23/CB1^{+/-} und CB1^{-/-}-Genotyps kreuzten die Zielposition signifikant häufiger.

Die APP23/CB1^{+/-}-Tiere zeigten im Morris Water-Maze eine vergleichbare Lernleistung wie die APP23/CB1^{+/+}-Tiere. Ebenso zeigten die CB1^{+/+}- und CB1^{+/-}-Tiere keine Unterschiede. Somit führte die heterozygote Expression des CB1-Rezeptors zu keiner Abnahme der Lernleistung im Morris Water-Maze.

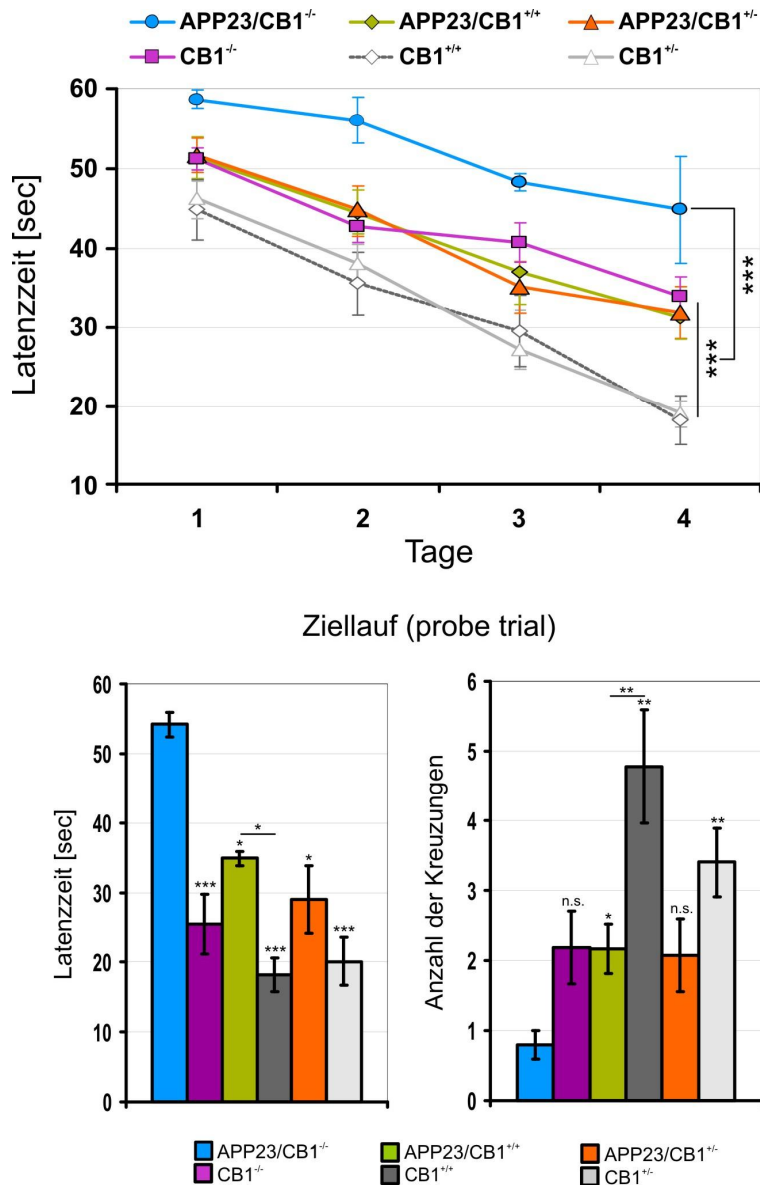


Abb. 3.2.2.8: Lernverhalten des APP23/CBN-Mausstamms im Morris Water-Maze

Das räumliche Lernen der Tiere des APP23/CBN-Mausstamms wurde im Morris Water-Maze analysiert. In den Trainingläufen wurde die Latenzzeit (sec) bis zum Erreichen der Plattform während vier Tagen untersucht. Am Tag fünf wurde der Testlauf (probe trail), an dem die Plattform aus dem Becken entfernt wird, durchgeführt. Die Latenzzeit bis zum Erreichen der vorherigen Position der Plattform und die maximalen Kreuzungen dieser Position innerhalb von 60 sec wurden ausgewertet.

Für jeden Testtag ist der \pm S.E.M angegeben. Signifikanzen wurden in den Trainingläufen durch einen Two-Way-Anova ermittelt (***) $p \leq 0,001$). Signifikanzen im Testlauf wurden durch den ttest bestimmt (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$). Folgende Genotypen wurden untersucht: APP23/CB1^{-/-} (n=5), CB1^{-/-} (n=20), APP23/CB1^{+/+} (n=14), CB1^{+/+} (n=10), APP23/CB1^{+/-} (n=21) und CB1^{+/-} (n=28). APP23/CB1^{-/-}-Mäuse zeigten signifikant stärkere Defizite in den Trainingläufen und im Testlauf verglichen mit den APP23/CB1^{+/+}-Tieren.

3.2.2.9 Analyse von Synapsen- und Myelin-Markern

Die Untersuchung des APP23/CB1^{-/-}-Genotyps im Morris Water-Maze zeigte eine reduzierte Lernleistung im Vergleich zu allen weiteren Genotypen des APP23/CBN-Mausstamms. Die geringe Anzahl an Amyloid-Plaques in den APP23/CB1^{-/-}-Mäusen weist darauf hin, dass extrazelluläres Amyloid-Protein nicht die alleinige toxische Komponente in den APP-transgenen Tieren darstellt.

Für die APP23-transgene Maus ist ein Verlust von Synapsen beschrieben, der mit dem Auftreten von amyloiden Plaques einhergeht (Sturchler-Pierrat & Staufenbiel 2000).

Aufgrund dieses Befundes sollten im APP23/CBN-Mausstamm spezifische Synapsenmarker untersucht werden. Als Synapsenmarker wurden Antikörper gegen Synaptophysin und PSD95 (postsynaptic density protein) verwendet. Das PSD95 Protein wird u.a. für die synaptische Plastizität benötigt. Synaptophysin ist ein synaptisches Vesikel-Glykoprotein und eignet sich hervorragend zur Quantifizierung von Synapsen (Calhoun et al. 1996). Als Neuronenmarker wurde ein Antikörper gegen das NeuN-Protein (neuron specific nuclear protein) verwendet, welches erstmals von Mullen als spezifischer Marker für Neurone in Vertebraten beschrieben wurde (Mullen et al. 1992).

Im APP23/CBN-Tiermodell wurden die aus 20 Monate alten Tieren gewonnenen Hippocampi biochemisch im Immunoblot mit Hilfe der oben beschriebenen Marker auf eine mögliche Veränderung von Synapsen untersucht. Eine Degeneration von Synapsen oder Neuronen konnte in keinen der bisher untersuchten Genotypen festgestellt werden (Abb. 3.2.2.9).

Des Weiteren wurde für das ECS System beschrieben, dass eine Aktivierung des CB1- oder CB2-Rezeptors zu einer verstärkten Expression des „Myelin basic proteins (MBP)“ führt (Arévalo-Martín et al. 2007). Dieses Protein ist wichtig für den Aufbau von Oligodendrozyten und am Aufbau der Myelin-Struktur, welche die Nervenstränge umgibt, beteiligt. Durch eine Beschädigung der Myelinschicht wird die Weiterleitung von Nervenimpulsen im Gehirn gestört. Dies kann zu einer Beeinträchtigung des Lernverhaltens führen. Des Weiteren konnte die Arbeitsgruppe um Molina-Holgado zeigen, dass der CB1-Rezeptor auf Oligodendrozyten exprimiert wird (Molina-Holgado et al. 2009). Der Knockout des CB1-Rezeptors könnte somit auch die Myelin-Bildung beeinflussen.

Zur Charakterisierung einer möglichen biochemischen Veränderung der Myelinstruktur im APP23/CBN-Mausstamm wurden der MBP- (myelin basic protein) und der CNP- (2'3'zyklische-Nukleotid-3'-Phosphohydrolase) Antikörper verwendet. Beide Proteine sind Bestandteile der Myelinschicht. Etwa 30 % der Gesamtmenge des Myelinproteins bestehen aus dem MBP-Protein und MBP ist essentiell für den Aufbau der Myelinschicht im ZNS (Boggs 2006).

Deshalb wurden im APP23/CBN-Tiermodell Hippocampi aus 20 Monate alten Tieren zusätzlich biochemisch im Immunoblot auf eine mögliche Veränderung der Myelinscheide untersucht. Eine Reduktion an MBP und CNP konnte in einigen der APP23/CB1^{-/-}-Mäuse (3 von insgesamt 5 Tieren) im Vergleich zum APP23/CB1^{+/+}-Genotyp festgestellt werden. Die CB1^{+/+}-Tiere (Kontrollen) zeigten die stärksten Signale. Dies sind erste Hinweise auf eine mögliche Degeneration der Myelinschicht im APP23/CB1^{-/-}-Genotyp. Aufgrund der geringen Menge an untersuchten Tieren und leichter Schwankungen soll dieser Befund in weiteren Studien genauer analysiert werden.

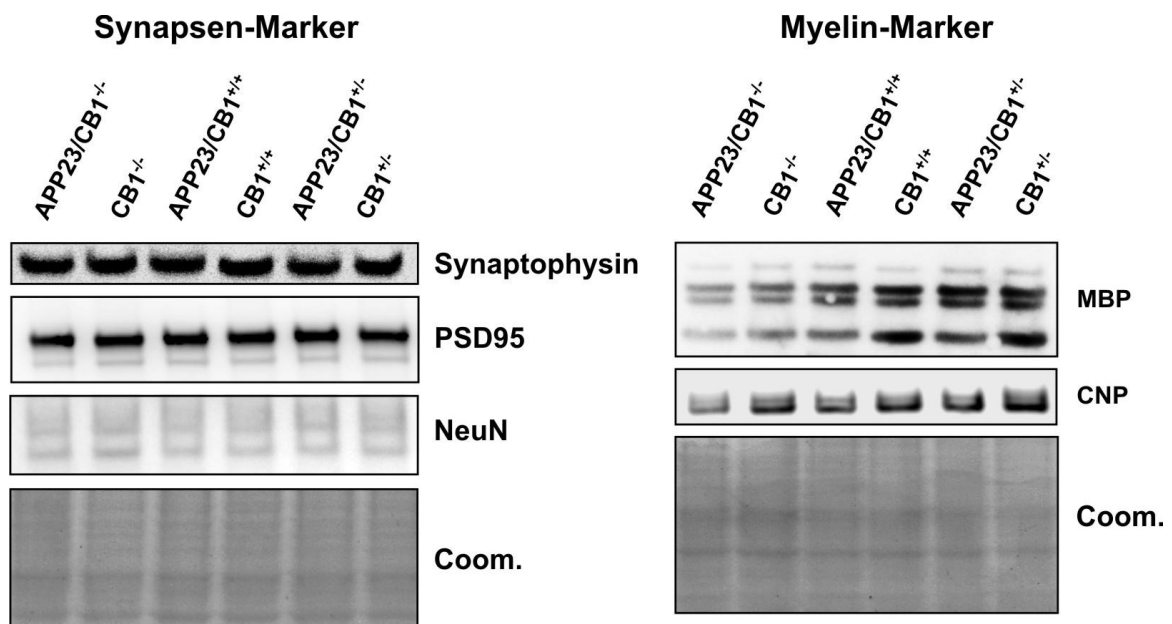


Abb. 3.2.2.9: Synapsen- und Myelinmarker im APP23/CBN-Mausstamm

Je 20µg Hippocampi-Gesamtprotein wurden auf einem 4-12% NuPAGE-Gradientengel aufgetrennt und über Western-Blot auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Als Synapsenmarker diente der Synaptophysin- und der PSD95-Antikörper. Der NeuN-Antikörper diente als Neuronenmarker, MBP- und CNP dienen als Myelinmarker. Es wurde die Membranfraktion (S2) aufgetragen. Als Ladekontrolle dienten die jeweiligen Coomassie-Gele (Coom.). Die Menge der Synapsenmarker ist in allen Genotypen gleich. APP23/CB1^{-/-}-Mäuse zeigen einen Abfall in der Menge des MBP- und CNP-Proteins im Vergleich zu APP23/CB1^{+/+}- und CB1^{+/+}-Tieren.

3.3 Der Einfluss von AAV-BRI-A β in CB1-Rezeptor-Knockout Mäusen

Rekombinante AAV Vektoren sind ein populäres Werkzeug für den Gentransfer ins ZNS. Die Injektion dieser rekombinanten Viren in das Gehirn wird durch die in 2.2.5.3 beschriebene stereotaktische Operation ermöglicht. Über den AAV vermittelten Gentransfer konnten Vektoren, die BRI-A β cDNA beinhalten, in den Hippocampus von Ratten erfolgreich injiziert werden (Lawlor et al. 2007). Dies führte zu einer gesteigerten Expression dieser Peptide in der Gyrus dentatus- und in der CA1-Region des Hippocampus. Die gleichzeitige Gabe von BRI-A β 40- und BRI-A β 42 cDNA führte 3 Monate nach der Injektion zu Defiziten im räumlichen Lernverhalten (Morris Water-Maze) im Vergleich zu den Kontrolltieren.

In der vorliegenden Arbeit sollte mit Hilfe des viral-vermittelten Gentransfers in einem zweiten Mausmodell der mögliche toxische Einfluss von Amyloid β -Peptiden in CB1-defizienten Mäusen durch AAV-Injektion mit den oben genannten Methoden untersucht werden. Ein Vorteil dieses Mausmodells besteht darin, die möglichen toxischen Effekte von Amyloid Peptiden direkt im Hippocampus und zeitspezifisch untersuchen zu können. Die hier untersuchten männlichen Tiere wurden im Alter von drei Monaten bilateral mit AAV-BRI-A β 40- und BRI-A β 42 cDNA injiziert, da in dieser Kombination die stärksten Effekte im Rattenmodell ermittelt wurden. Die Kontrolltiere wurden mit einem AAV-Leervektor ohne rekombinante DNA in den Hippocampus injiziert.

Die Tiere wurden drei und sechs Monate nach Injektion im Morris Water-Maze auf mögliche Lerndefizite untersucht und anschließend biochemisch und histologisch analysiert.

Die mit BRI-A β cDNA behandelten Gruppen zeigten unabhängig vom Alter und Genotyp keine Unterschiede im Gewicht.

3.3.1 Verhaltensuntersuchung der Tiere im Morris Water-Maze

Drei und sechs Monate post Injektion wurden die Tiere im Morris Water-Maze auf räumliches Lernen untersucht (Abb. 3 3.1).

Drei Monate nach Injektion zeigten alle Gruppen einen Lernerfolg in den Trainingsläufen, da sich die Latenzzeit während der Trainingstage verkürzte. Unabhängig von der Behandlung benötigten $CB1^{-/-}$ -Mäuse eine längere Zeit die Plattform zu finden als die $CB1^{+/+}$ -Mäuse. Am vierten Tag der Trainingsläufe lernten die $CB1^{-/-}$ -Kontrollmäuse signifikant schlechter als die $CB1^{+/+}$ -Kontrollmäuse. Im Testlauf benötigten die $CB1^{-/-}$ -Kontrolltiere (Leervektor) eine signifikant längere Zeit als die $CB1^{+/+}$ -Kontrolltiere und die $CB1^{+/+}$ -Genotypen, die mit AAV-BRI-A β 40- und BRI-A β 42 cDNA injiziert wurden. Sechs Monate nach Injektion benötigten alle Tiere mit Ausnahme der $CB1^{+/+}$ -Kontrolltiere eine ähnliche Zeit in den Trainingsläufen und zeigten ein signifikantes Lernverhalten. Am Tag vier der Trainingsläufe zeigten die $CB1^{+/+}$ -Kontrolltiere das beste Lernverhalten. Signifikante Unterschiede im Testlauf zeigten sich 6 Monate nach Injektion nur zwischen den Kontrollgruppen beider Genotypen.

Im Morris Water-Maze konnte kein Einfluss der AAV-BRI-A β 40- und BRI-A β 42-Proteine auf das Lernverhalten festgestellt werden. Vielmehr wurde das für CB1-defiziente Mäuse beschriebene Lerndefizit in dieser Testreihe bestätigt (Zimmer et al. 1999; Bilkei-Gorzo et al. 2005).

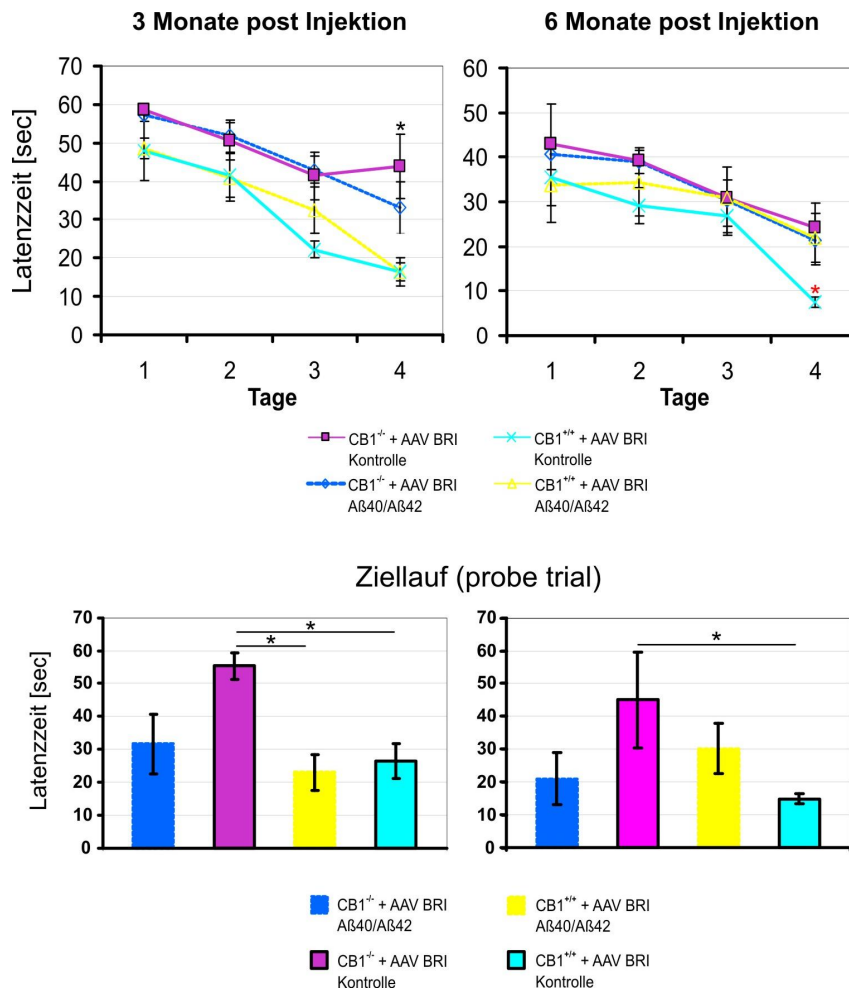


Abb. 3 3.1: Verhaltensanalyse im Morris Water-Maze

Das räumliche Lernen der mit AAV-BRI-A β 40- und BRI-A β 42 cDNA injizierten Tiere sowie die jeweiligen Kontrolltiere (leerer AAV-Vektor) wurden im Morris Water-Maze untersucht. In den Trainingsläufen wurde die Latenzzeit (sec) bis zum Erreichen der Plattform innerhalb von vier Tagen untersucht. An Tag fünf wurde der Testlauf (probe trail), an dem die Plattform aus dem Becken entfernt wird, durchgeführt. Die Latenzzeit bis zum Erreichen der vorherigen Position der Plattform innerhalb von 60 sec wurde ausgewertet. Signifikanzen wurden in den Trainingsläufen durch einen Two-Way-Anova ermittelt (***) $p \leq 0,001$). Signifikanzen im Testlauf wurden durch den ttest bestimmt (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$). Folgende Genotypen wurden untersucht: CB1 $^{-/-}$ - und CB1 $^{+/+}$ -Tiere. Die einzelnen Gruppen setzten sich aus jeweils fünf Tieren zusammen. 3 Monate nach Injektion der AAV-BRI-A β 40- und BRI-A β 42 cDNA oder des Leervektors, benötigten die CB1 $^{-/-}$ -Genotypen in den Trainingsläufen unabhängig von der Behandlung eine längere Latenzzeit verglichen mit den CB1 $^{+/+}$ -Tieren. Eine Signifikanz ergab sich an Tag vier zwischen den CB1 $^{-/-}$ -Kontrolltieren und den CB1 $^{+/+}$ -Kontrolltieren (* $p \leq 0,05$). Im Testlauf benötigten die CB1 $^{-/-}$ -Kontrolltiere (Leervektor) eine signifikant längere Zeit als die CB1 $^{+/+}$ -Kontrolltiere und die CB1 $^{+/+}$ -Genotypen die mit AAV-BRI-A β 40- und BRI-A β 42 cDNA injiziert wurden. 6 Monate nach Injektion benötigten alle Gruppen mit Ausnahme der CB1 $^{+/+}$ -Kontrolltiere eine ähnliche Latenzzeit in den Trainingsläufen. An Tag vier zeigten sich signifikante Unterschiede in der Latenzzeit zwischen den CB1 $^{+/+}$ -Kontrolltieren und allen anderen Gruppen (ttest, * $p \leq 0,05$). Signifikante Unterschiede im Testlauf zeigten sich 6 Monate nach Injektion nur zwischen den Kontrollgruppen beider Genotypen.

3.3.2 Weitere Untersuchung der Tiere

Nach Beendigung der Lernexperimente wurden alle Tiere für die Gewebeanalyse geopfert und die linke Gehirnhälfte für histologische Untersuchungen verwendet. Es wurden die Organe entnommen und die Hippocampi biochemisch aufgereinigt. Alle $CB1^{-/-}$ - und $CB1^{+/-}$ -Tiere zeigten unabhängig von der Behandlung im Immunoblot keine Veränderungen in der Expression des APP-Proteins oder von Myelin-Markern. Histologisch wurden die Gehirnschnitte mit dem 6E10 Antikörper und einem fluoreszierenden Zweitantikörper behandelt (2.2.2.3). Dieser monoklonale Antikörper bindet an die $A\beta$ -Peptide und kann somit Hinweise auf einen möglichen Erfolg oder Misserfolg der durchgeführten Injektionen mit AAV-BRI- $A\beta40$ - und BRI- $A\beta42$ -cDNA in den einzelnen Tieren geben. In keinem der mit AAV-BRI- $A\beta40$ - und BRI- $A\beta42$ -cDNA injizierten Tiere (unabhängig vom Genotyp) konnte ein komplettes 6E10-Signal im gesamten Hippocampus detektiert werden. Im Gegensatz zu den Kontrollen konnte ein verstärktes Signal in der CA1-, der CA3-Region, sowie im Gyrus dentatus bei unterschiedlichen Tieren gesehen werden.

Abbildung 3.3.2 zeigt den Bereich des Gyrus dentatus von zwei $CB1^{+/-}$ -Tieren. Es konnte ein 6E10-Signal nach Injektion von AAV-BRI- $A\beta40$ - und BRI- $A\beta42$ -cDNA detektiert werden. Im Kontrolltier hingegen konnte kein Amyloid β -Signal detektiert werden. Eine Aktivierung von Mikrogliazellen konnte über die Tomato-Lektin Färbung nicht beobachtet werden.

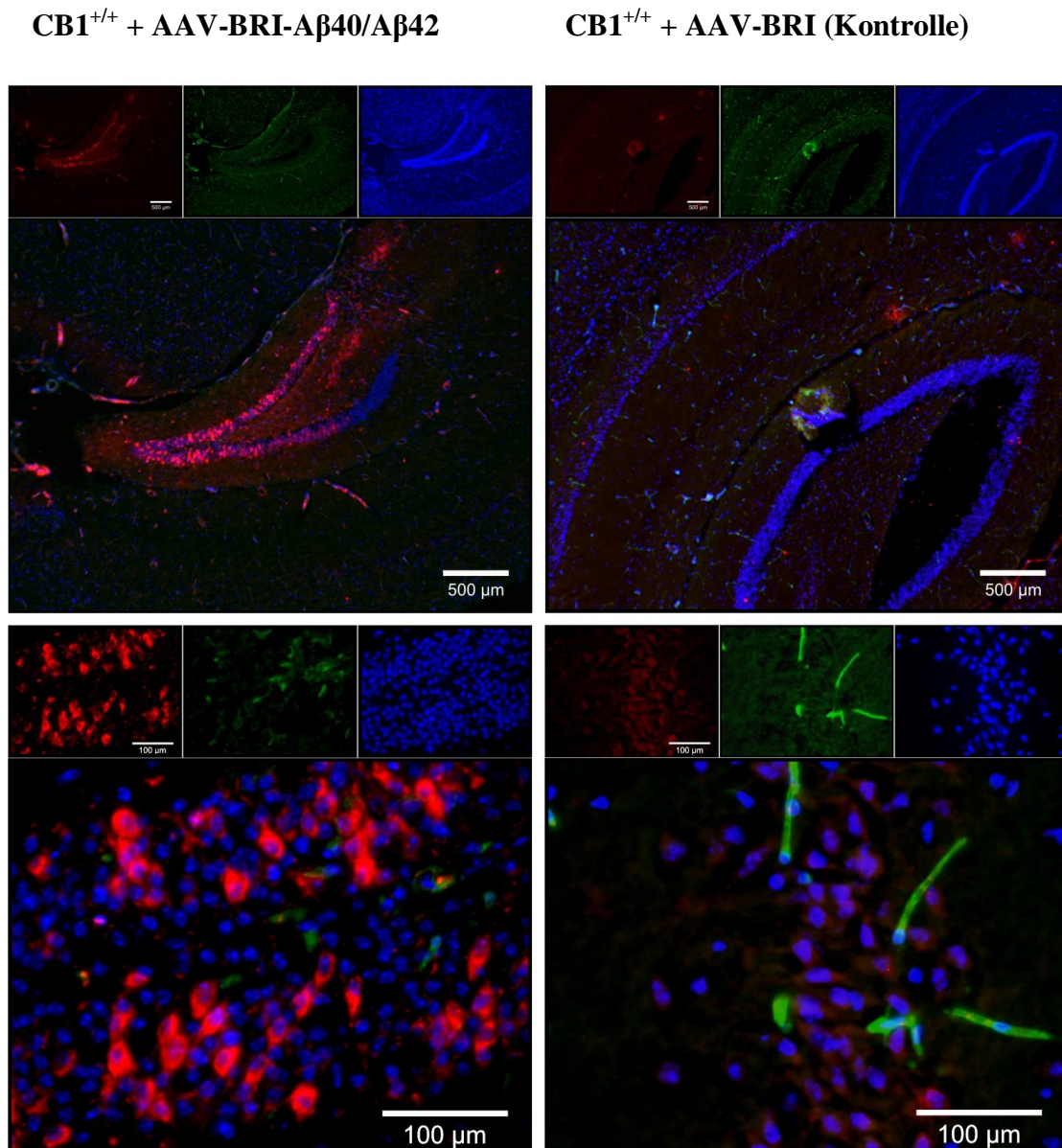


Abb. 3.3.2: Detektion von Amyloid β in $CB1^{+/+}$ -Mäusen nach Injektion von AAV

6 Monate nach Injektion mit AAV-BRI- $A\beta40$ - und BRI- $A\beta42$ -cDNA oder dem AAV-Kontrollvektor wurden die Tiere histologisch untersucht. Zur Detektion von Amyloid β wurde der 6E10-Antikörper an einen Cy3-gekoppelten Zweitantikörper gebunden. Zur Darstellung von aktivierten Mikrogliazellen wurde das FITC-gekoppelte Tomato-Lektin verwendet. Die Zellkerne wurden mit DAPI visualisiert. Dargestellt ist der Bereich des Gyrus dentatus. Die mit AAV-BRI- $A\beta40$ - und BRI- $A\beta42$ -cDNA injizierte Maus zeigt ein 6E10-Signal. Im Kontrolltier konnte kein 6E10 Signal detektiert werden.

3.3.3 Ausblick: Der Einfluss von AAV-BRI-A β in CB1-Rezeptor-Knockout Mäusen

Die Methode des Transfers von Genen in das zentrale Nervensystem über virale Vektoren ermöglicht neue wissenschaftliche Ansätze in der Grundlagenforschung und in der Klinik bei der therapeutischen Applikation. Beispielsweise wurde in einem Alzheimer-Mausmodell der AAV-Transfer zur Einschleusung von Antikörpern gegen das Amyloid β 42-Peptid verwendet. Durch den Transfer konnte in den injizierten Regionen eine Erneuerung von Oligodendrozyten und des Myelingerüsts beobachtet werden (Desai et al. 2010).

Mit Hilfe des viral-vermittelten Gentransfers wurde in dieser Arbeit in einem Mausmodell der Einfluss von Amyloid β -Peptiden in CB1-defizienten Tieren untersucht. Injiziert wurden AAV-Vektoren zur Hippocampus-spezifischen Expression von A β 40 und A β 42. Die mit BRI-A β cDNA behandelten Gruppen zeigten unabhängig vom Alter und vom Genotyp keine Unterschiede im Gewicht. Die biochemischen Untersuchungen zeigten keine Unterschiede in der APP-Expression und Prozessierung, sowie von Myelin-Markern. Mit Hilfe der histologischen Analyse konnte Amyloid β in der CA3- und CA1-Region des Hippocampus mittels Fluoreszenzfärbung (6E10) in den mit BRI-A β cDNA behandelten Gruppen nachgewiesen werden. Die Behandlung der Tiere mit AAV-BRI-A β 40- und BRI-A β 42-cDNA hatte keinen Einfluss auf das Lernverhalten im Morris Water-Maze.

In einem neuen Versuchsansatz müssten unterschiedliche Virentiter verwendet werden. Dadurch wäre es möglich, eine gleichmäßige Expression von A β 40 und A β 42 im Hippocampus zu erhalten. Bisher zeigten die Tiere in den Verhaltensversuchen unabhängig von der Behandlung keine Unterschiede. Dies kann daran liegen, dass die in dieser Arbeit angewendete Methode noch nicht ausgereift ist. Eine genaue Interpretation der Verhaltensergebnisse ist deshalb erst nach der Modifikation dieser Methode möglich.

Der AAV-Transfer in CB1-defizienten Mäusen erweist sich als eine alternative Methode zur Untersuchung einer möglichen Toxizität von Amyloid β -Peptiden. Der Vorteil dieses Mausmodells besteht darin, die möglichen schädigenden Effekte von A β gewebe- und zeitspezifisch zu untersuchen.

4 Diskussion

Die Alzheimer Krankheit ist eine irreversible neurodegenerative Erkrankung des zentralen Nervensystems und ist durch eine veränderte neuronale Homöostase geprägt. Bei Betroffenen kommt es im Gehirn zur Bildung von amyloiden Plaques, neurofibrillären Bündeln, zu oxidativem Stress und zu erhöhter Neuroinflammation. Die Ausprägung der Krankheit führt zu einem massiven Nervenzellverlust, zur Abnahme der Gehirnmasse, zur fortschreitenden Verringerung der Hirnleistung und resultiert klinisch in dem kompletten Verlust der Persönlichkeit mit nachfolgendem Tod.

Die Aktivität des ECS im Gehirn ist bei pathologischen Prozessen verändert. Endocannabinoide nehmen eine wichtige Funktion bei der präsynaptischen Neurotransmitterfreisetzung im Gehirn ein. Die Veränderung in der Menge an freigesetzten Endocannabinoiden, Cannabinoidrezeptoren und der abbauenden Enzyme können zu Störungen in der synaptischen Aktivität führen. Für das ECS wurde beschrieben, dass es protektive Eigenschaften bei unterschiedlichen neuronalen Erkrankungen ausüben kann (siehe Abschnitt 1.3).

In dieser Arbeit wurde der Einfluss des ECS in der Alzheimer Krankheit *in vitro* und *in vivo* untersucht. In Zellkultursystemen wurde die Wirkung von Endocannabinoiden und synthetischen Cannabinoiden auf die Prozessierung des Amyloid Vorläuferproteins überprüft. In einem APP23-transgenen Alzheimer Mausmodell wurde durch Generierung einer APP23/CB1^{-/-}-Maus der Einfluss des CB1-Rezeptors auf die APP-Prozessierung untersucht und durch AAV-Injektion der mögliche toxische Einfluss von A β -Peptiden in CB1-Rezeptor-Knockout Mäusen überprüft.

4.1 Der Einfluss des ECS auf das Amyloid Vorläuferprotein

Bei der Prozessierung des Amyloid-Vorläuferproteins werden im amyloiden Weg Amyloid β -Peptide erzeugt, welche in der Zelle zu einer neuronalen und synaptischen Dysfunktion führen können. Über die Stimulierung von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren kann die APP-Prozessierung zugunsten des nicht-amyloiden Wegs verändert werden, was in einer erhöhten Menge des als neuroprotektiv beschriebenen sAPP α resultiert (Lezoualc'h et al. 2000; Kojro et al. 2006).

Die Manipulation der APP-Prozessierung auf dem nicht amyloiden Weg ermöglicht die durch Amyloid β verursachten Schäden in der Zelle zu vermeiden. Für das sAPP α -Protein konnten zahlreiche neuroprotektive und neurotrophe Eigenschaften gefunden werden (Mattson 1997). Dazu gehört die Verbesserung der Langzeitpotenzierung in hippocampalen Schnittkulturen, Gedächtnisverbesserung in normalen Mäusen und Mäusen mit Amnesie, Verminderung der gestörten Langzeitpotenzierung sowie der kognitiven Defizite in ADAM10- und APP doppelt-transgenen Mäusen, Stimulierung der Neuritenbildung, sowie der Schutz hippocampaler und corticaler Neurone gegen durch Amyloid β - oder Glutamat induzierte Toxizität (Schubert & Behl 1993; Small et al. 1994; Furukawa et al. 1996; Ishida et al. 1997; Meziane et al. 1998; Postina et al. 2004).

Über die pharmakologische Manipulation des CB1-Rezeptors als G_{i/o}-Protein gekoppeltem Rezeptor könnte die APP-Prozessierung zugunsten des nicht-amyloiden Wegs verschoben werden. Zur Untersuchung dieser Hypothese wurde die APP-Prozessierung *in vitro* in neuronalen Zelllinien, sowie *in vivo* in einem APP transgenen Mausmodell mit zusätzlichem CB1-Rezeptor Knockout untersucht. In beiden Modellen wurde eine Modifikation der APP-Prozessierung mit unterschiedlichen Auswirkungen beobachtet. In humanen Zelllinien wurde durch Inkubation mit Cannabinoiden ein signifikanter Anstieg der sAPP α - bei gleichzeitiger Abnahme der Amyloid β 40-Menge erreicht. *In vivo* konnte eine verringerte Expression des APP_{fl}-Proteins und eine reduzierte Prozessierung, sowie daraus resultierend, geringere Amyloid β -Mengen in APP23/CB1^{-/-} und APP23/CB1^{+/-}-Mäusen im Vergleich zu APP23/CB1^{+/+}-Tieren beobachtet werden (siehe Abschnitt 3.2.2.6 und Abschnitt 3.2.2.7). Die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse verdeutlichen, dass es einen direkten Zusammenhang zwischen dem CB1-Rezeptor, dessen Aktivierung und dem Amyloid Vorläuferprotein geben muss.

4.1.1 APP-Prozessierung in neuronalen Zelllinien

In den untersuchten Zelllinien konnte durch Inkubation mit AEA und Win2 im Zellüberstand auf Proteinebene ein signifikanter Anstieg der sAPP α -Menge im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Abb. 3.1.3 A, C) beobachtet werden. Durch die zusätzliche Behandlung der Zellen mit Rimonabant, einem CB1-Rezeptor Antagonist, konnte dieser modulierende Effekt auf die APP-Prozessierung blockiert werden (Abb. 3.1.3 B). Somit wurde gezeigt, dass der durch die Cannabinoide stimulierende Effekt auf die sAPP α - Spiegel tatsächlich über die Aktivierung des CB1-Rezeptors generiert wird.

Die Cannabinoidbehandlung zeigte einen Einfluss auf die sAPP α -Prozessierung, wohingegen die Menge des APP_{fl} Proteins in allen Versuchsdurchgängen konstant blieb. Dadurch konnte gezeigt werden, dass die erhöhte sAPP α -Expression nicht durch einen Anstieg in der Expression des APP Holoproteins verursacht wird. Zusätzlich wurde in dieser Arbeit der Einfluss von Cannabinoiden auf die Generierung von Amyloid β -Peptiden untersucht, welche zu einem Induktor von oxidativen Stress zählen. Diese lösen in der Zelle eine erhöhte H₂O₂-Produktion und eine Oxidation von Lipiden aus, wodurch es zur Lyse der Zellmembran kommen kann (Behl et al. 1994; Behl 1997). Im Zellkultursystem konnte eine signifikante Reduktion von A β 40 nach Cannabinoidbehandlung erreicht werden (Abb. 3.1.4). Die Behandlung mit Cannabinoiden hatte keinen Einfluss auf die Aktivität der APP-schneidenden Enzyme (Abb. 3.1.5) und ein Anstieg in der Expression der α - und β -Sekretase wurde nur kurzzeitig beobachtet (Abb. 3.1.6). Somit scheinen die erhöhten sAPP α -Spiegel und die geringere A β -Produktion nicht durch eine erhöhte Expression der α -Sekretase, sowie einer erniedrigten Expression der β -Sekretase generiert zu werden.

Durch die Behandlung neuronaler Zelllinien mit Cannabinoiden wurde auf Proteinebene eine Veränderung der APP-Prozessierung zugunsten von sAPP α bei gleichzeitiger Reduktion von Amyloid β erreicht. Bisher ist jedoch noch offen wie genau Cannabinoide die Prozessierung auf dem nicht-amyloiden Weg einleiten könnten. Über die Aktivierung des CB1-Rezeptors können verschiedene Signaltransduktionswege wie der PKA- oder MAPK-Weg angeschaltet werden (Pagotto et al. 2006). Die Aktivierung dieser Signalwege könnte mit einer erhöhten Sekretion des sAPP α -Proteins in Verbindung stehen. Zur Gruppe der MAPK gehören unter anderem die p38 Kinase, die c-Jun N-terminale Kinase (JNK) und die extrazellulär regulierte Kinase 1/2 (ERK 1/2). In Studien konnte gezeigt werden, dass der ERK 1/2 Signalweg an der

APP-Prozessierung beteiligt ist (Camden et al. 2005; Ma et al. 2005).

Einen weiteren Hinweis für diese Hypothese konnte u.a. von Goodenough et al. geliefert werden. Durch die Stimulierung von Zelllinien mit Östrogen und Testosteron konnte eine erhöhte Sekretion von sAPP α gezeigt werden. Über die Phosphorylierung von ERK 1/2 durch Estradiol konnte dabei die Aktivierung des MAPK-Signalwegs eingeleitet werden, was zu einer erhöhten Sekretion von sAPP α führte (Goodenough et al. 2000; Manthey et al. 2001; Goodenough et al. 2003).

In Alzheimer Patienten wurde darüber hinaus eine erhöhte Aktivität des MAPK-Signalwegs in vulnerablen Neuronen beschrieben (Zhu et al. 2002). Somit scheint die Aktivierung des MAPK-Signaltransduktionswegs durch ERK 1/2 mit großer Wahrscheinlichkeit an der durch Cannabinoide induzierten verstärkten Bildung von sAPP α beteiligt zu sein.

Eine Überprüfung dieser Hypothese wäre durch die Inkubation von Zelllinien mit Cannabinoiden bei zusätzlicher Gabe eines MAPK-Inhibitors möglich. Eine Regulation der APP-Prozessierung zugunsten von sAPP α konnte auch in der Neuroblastoma-Zelllinie SK-N-SH, welche humanes APP695 überexprimiert, durch Aktivierung des MAPK-Signalwegs über ERK 1/2 bestätigt werden (Peng et al. 2007). Durch die Inkubation der Zellen mit Huperzine A, einem Acetylcholinesterase Inhibitor wurde vermehrt sAPP α sekretiert. Die erhöhte Bildung von sAPP α konnte durch Inkubation mit dem MAPK-Inhibitor UO126 verhindert werden, wodurch die Beteiligung der MAPK an der Generierung von sAPP α bestätigt wird. Eine Veränderung der A β Mengen durch Inkubation mit Huperzine A konnte in dieser Studie nicht festgestellt werden.

Des Weiteren zeigte eine *in vitro* Studie einen durch den CB1-Rezeptor vermittelten neuroprotektiven Effekt von Endocannabinoiden gegen einen durch Amyloid β induzierten Zelltod. Dieser Effekt konnte durch einen CB1-Antagonisten, sowie durch einen MAPK-Signalweg-Inhibitor unterdrückt werden (Milton 2002). Eine weitere Studie zeigte, dass auch der Protein Kinase C (PKC) Weg die erhöhte Sekretion von sAPP α in SH-SY5Y-Zellen einleiten kann (Cedazo-Minguez et al. 1999). Über die Administration von Nicergoline, einem Antidementivum, konnte 30 min und zwei Stunden nach Inkubation der Zellen ein Anstieg der sAPP α -Menge von bis zu 200 Prozent erreicht werden und über die Gabe von spezifischen Inhibitoren konnte eine Beteiligung spezieller PKC-Isoformen an der erhöhten sAPP α -Sekretion nachgewiesen werden. Eine Modulation des PKC-Weges durch einen spezifischen Aktivator (TPPB) in PC12- und SH-SY5Y^{APP695}-Zellen wurde auch von Yang et al. gezeigt (Yang et al. 2007). Die Behandlung der Zellen mit TPPB führte dabei zu einer

erhöhten α -Sekretase Aktivität bei gleichzeitiger Reduktion von Amyloid β im Zellmedium. In einem Alzheimer-Mausmodell konnte darüber hinaus bestätigt werden, dass sowohl die Aktivierung von ERK 1/2 sowie des PKC Signalwegs zur APP-Prozessierung im nicht-amyloiden Weg führen kann (Caccamo et al. 2006).

Die Bindung von Cannabinoiden an den Cannabinoid 1 Rezeptor führt zur Aktivierung des $G_{i/o}$ -Proteins, wodurch Signaltransduktionswege wie der MAPK- oder PKC-Weg aktiviert werden können. Diese Signalwege könnten eine Veränderung der APP-Prozessierung zugunsten von sAPP α einleiten. Deshalb sollte in weiteren Studien die Aktivität des MAPK-Signaltransduktionswegs sowie eine mögliche Beteiligung des PKC-Wegs genauer überprüft werden.

Die bisherigen Hinweise in den Zellstudien zeigen einen direkten Einfluss des CB1-Rezeptors auf die Prozessierung des APP-Proteins. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass weitere Rezeptoren an der Signaltransduktion beteiligt sein könnten. Endocannabinoide können u.a. an Rezeptoren wie dem Vanilloid- (TRPV 1) oder den „peroxisom proliferation receptors“ (PPAR-Rezeptor) binden (Di Marzo et al. 1998; Zygmunt et al. 1999; Bouaboula et al. 2005; Sun et al. 2006). Die Stimulierung von PPAR-Rezeptoren scheint ebenfalls zu neuroprotektiven Effekten in der Zelle zu führen. Durch Aktivierung des PPAR γ -Rezeptors mit dem Partialagonisten Telmisartan wurde ein verbessertes Lernverhalten in einem Alzheimer-Mausmodell nach vorheriger A β 40-Injektion und eine Abnahme der A β 40-Konzentration im Gehirn beschrieben (Mogi et al. 2008; Tsukuda et al. 2009). Des Weiteren wurde ein protektiver Effekt der PPAR γ Aktivierung nach Acetaldehyd-induzierter Toxizität in SH-SY5Y-Zellen gezeigt (Jung et al. 2006) und eine Stimulation des Rezeptors scheint das Ausreifen von Neuronen positiv zu beeinflussen (Miglio et al. 2009). Das Endocannabinoid AEA kann u.a. den PPAR γ -Rezeptor aktivieren (Sun et al. 2006). Deshalb wäre es durchaus möglich, dass der CB1-vermittelte Effekt auf die APP-Prozessierung zusätzlich durch eine Aktivierung des PPAR γ -Rezeptors erhöht wird. In weiteren Zellstudien wäre es deshalb interessant die Signalwege und Rezeptoren, welche die Prozessierung des APP-Proteins im nicht-amyloiden Weg einleiten, genauer zu untersuchen. Die Expression und die enzymatische Aktivität der β -Sekretase ist in Alzheimer-Patienten erhöht. Ein wichtiger Hinweis, dass der PPAR γ -Rezeptor an der APP-Prozessierung beteiligt sein könnte wurde von Sastre und Kollegen geliefert (Sastre et al. 2006). Maus Fibroblasten mit einer PPAR γ -Rezeptor Defizienz zeigten eine erhöhte Promotor Aktivität der β -Sekretase. Dies weist auf

eine mögliche Repressor-Funktion von PPAR γ auf die β -Sekretase hin. Eine Übersicht zur transkriptionellen und translationellen Regulation der β -Sekretase durch den PPAR γ -Rezeptor gibt der Artikel von Roßner et al. (Rossner et al. 2006).

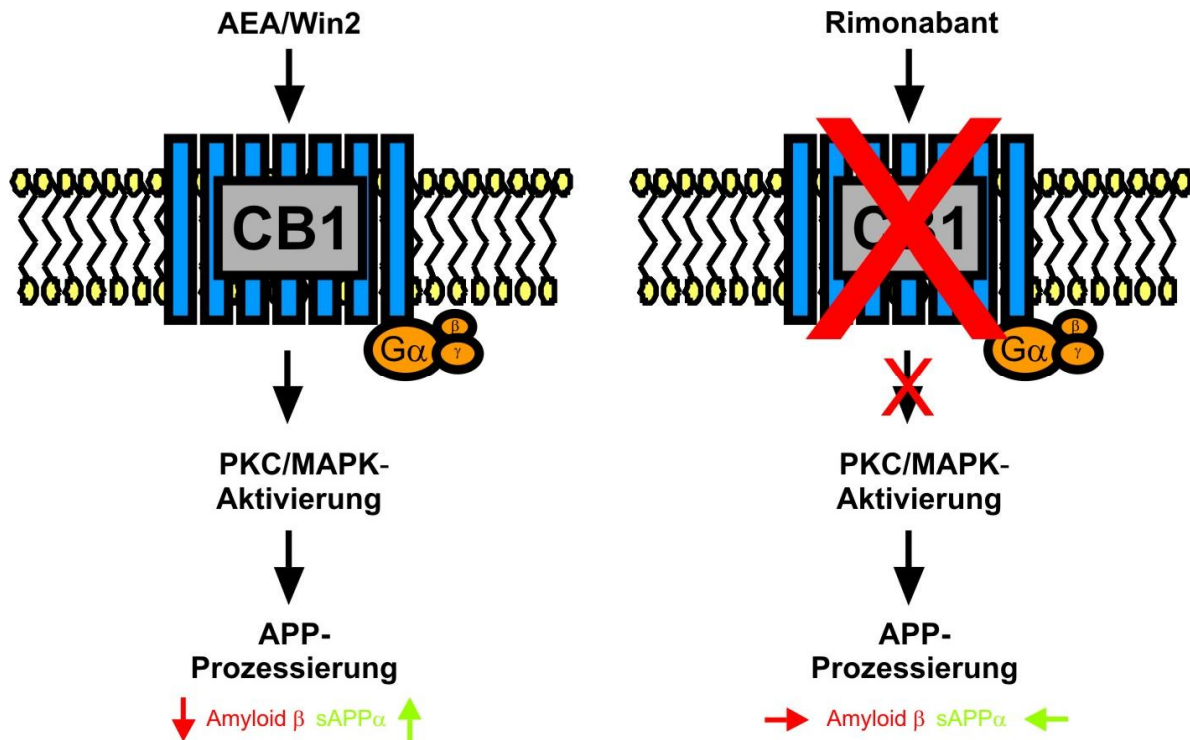


Abb. 4.1.1: Hypothetische protektive Wirkung des CB1-Rezeptors auf die APP-Prozessierung

Die Bindung von Liganden (AEA/Win2) an den CB1-Rezeptor führen zur Aktivierung des G $_{i/o}$ -Proteins. Dadurch könnten die MAPK- oder PKC-Signaltransduktionswege die APP-Prozessierung auf dem nicht-amyloiden Weg einleiten, was in einer gesteigerten Expression von sAPP α bei gleichzeitiger Reduktion des zellschädigenden Amyloid β resultiert. Durch Blockierung des CB1-Rezeptors könnte dieser protektive Effekt inhibiert werden.

In dieser Zellstudie konnte die APP-Prozessierung durch die Aktivierung des CB1-Rezeptors zugunsten des nicht-amyloiden Wegs moduliert werden. Die Manipulation des APP-Proteins über Endocannabinoide stellt somit eine Möglichkeit dar, die Prozessierung zugunsten von sAPP α zu lenken (Abb. 4.1.1). Die Vorteile dieser körpereigenen Substanzen liegen darin, dass sie einer schnellen Degradation unterliegen und somit die oft durch Pharmazeutika hervorgerufenen Nebenwirkungen vermieden werden könnten.

4.1.2 Der Einfluss des CB1-Rezeptors im APP23 transgenen Mausmodell

In Alzheimer-Patienten wurde eine Abnahme von Cannabinoidrezeptoren vor allem in Bereichen mit einer hohen Dichte an amyloiden Plaques und aktivierten Mikogliazellen beschrieben. Im Rattenmodell konnte durch die intracerebroventrikuläre Administration von CB1-Rezeptoragonisten, die durch injiziertes Amyloid β schädlichen Effekte (Mikrogliaaktivierung, CB1-Rezeptorverlust, Absterben von Nervenzellen, kognitive Defizite), verhindert werden (Ramírez et al. 2005).

Der Einfluss des CB1-Rezeptors wurde bisher in keinem Alzheimer-Mausmodell untersucht. Durch die Verpaarung von APP23 transgenen- und CB1-KO-Mäusen wurde somit erstmals ein Mausmodell generiert in dem das ECS *in vivo* analysiert werden konnte.

Der zusätzliche Knockout des CB1-Rezeptors im APP23 transgenen Hintergrund führte zu weitreichenden Veränderungen. APP23/CB1^{-/-}-Tiere zeigten eine erhöhte Mortalität, biochemische Veränderungen in der Gesamtmenge und Prozessierung des APP-Proteins, sowie ein verschlechtertes räumliches Lernen.

APP23 transgene- und CB1-defiziente Tiere wurden in unterschiedlichen Kreuzungskombinationen miteinander verpaart und in allen Kreuzungsvarianten wurde eine erhöhte Mortalitätsrate für den APP23/CB1^{-/-}- und den APP23/CB1^{+/+}-Genotyp erhalten. Eine erhöhte Sterberate in APP23 transgenen Mäusen wurde auch durch Ittner et al. beschrieben (Ittner et al. 2010b). Im Alter von zwölf und fünf Monaten zeigten die Mäuse im Vergleich zum Wildtyp eine signifikant erhöhte Mortalität von etwa 35 Prozent. Damit werden die von Ittner et al. beschriebenen Ergebnisse durch diese Arbeit bestätigt. Die heterozygote Expression des CB1-Rezeptors führte zu keiner erhöhten Mortalität verglichen mit APP23/CB1^{+/+}-Tieren. Somit scheint die heterozygote Expression des CB1-Rezeptors keinen negativen Einfluss auf das Überleben im APP23 transgenen Hintergrund auszuüben. Für die CB1^{-/-}-Mäuse ist in der Literatur eine erhöhte Mortalität von etwa 30 Prozent beschrieben, welche in dieser Arbeit nicht bestätigt werden konnte (Zimmer et al. 1999). Die in dieser Arbeit verwendete CB1^{-/-}-Maus (Marsicano et al. 2002) hat einen unterschiedlichen genetischen Hintergrund zu der von Zimmer et al. verwendeten Maus und deshalb sind diese Mausstämme nur bedingt miteinander vergleichbar.

Der CB1-Rezeptor Knockout in APP23 transgenen Tieren führt zu einer gesteigerten Mortalität. Auffällig ist der frühere Tod der Tiere im Alter von zwei bis sechs Monaten. In weiteren Studien müssten deshalb Tiere in diesem Alter im Detail analysiert werden, da in diesem Zeitabschnitt mögliche biochemische Veränderungen ein frühes Versterben der Tiere einleiten könnten.

Alle Genotypen des APP23/CBN-Mausstamms mit Ausnahme der CB1^{+/-} Tiere zeigten eine Reduktion des Durchschnittsgewichts im Vergleich zu den CB1^{+/+} Kontrolltieren (Abb. 3.2.1.3) und die Kreuzung von APP23 transgenen- mit CB1-defizienten Tieren führte zu einer weiteren Reduktion des Körpergewichts. Trotz dieser hohen Gewichtsabnahme zeigten die Tiere aber keine sichtbaren phänotypischen Einschränkungen. Aufgrund des reduzierten Gewichtes könnten die Tiere aber über eine verminderte körperliche Fitness verfügen, und dadurch in der Hierarchie bei der Käfighaltung der Tiere im Vergleich zu den anderen Genotypen benachteiligt sein.

Dass der CB1-Rezeptor eine Funktion in der Regulation des Gewichts einnimmt wurde durch den CB1-Antagonisten Rimonabant gezeigt (Idelevich et al. 2009). Durch die Blockade des Rezeptors konnte eine Gewichtsabnahme in Tiermodellen und bei Patienten mit Fettleibigkeit beobachtet werden. Deshalb ist es auch nicht verwunderlich, dass ein Knockout des CB1-Rezeptors zu einer Gewichtsabnahme in APP23/CB1^{-/-}- und CB1^{-/-}-Tieren führte. Im CB2-Rezeptor Knockout-Mausmodell wurde u.a. ein Einfluss des ECS auf die Regulation der Knochendichte geschildert (Ofek et al. 2006). Somit könnte die Abnahme des Körpergewichts auf eine eventuelle Reduktion der Knochendichte in den in dieser Arbeit untersuchten APP23/CB1^{-/-}- und CB1^{-/-}-Genotypen zurückgeführt werden. Des Weiteren nimmt der CB1-Rezeptor Einfluss auf die Nahrungsaufnahme und die Sättigung im Körper (Cota et al. 2003). Deshalb könnte es auch sein, dass die Tiere durch den Knockout des CB1-Rezeptors weniger Appetit verspüren, was als Folge zu einer Reduktion des Körpergewichts führt. Die Veröffentlichung von Van Gaal et al. unterstützt diese Annahme (Van Gaal et al. 2005). In dieser klinischen Studie wurde eine Gewichtsabnahme in Patienten mit Adipositas durch Applikation des CB1-Rezeptor Antagonisten Rimonabant erreicht.

Zusätzlich zu den eben beschriebenen Veränderungen führte der Knockout des CB1-Rezeptors in APP23 transgenen Tieren zu biochemischen Veränderungen in der Gesamtmenge an APP sowie bei dessen Prozessierung. In 20 Monate alten APP23/CB1^{-/-}- und APP23/CB1^{+/-}-Mäusen war die Plaque-Anzahl um mehr als 50 Prozent reduziert,

verglichen mit APP23/CB1^{+/+}-Tieren (Abb.3.2.2.1 B). Des Weiteren wurde in APP23/CB1^{-/-}-Mäusen eine reduzierte Neuroinflammation (Abb. 3.2.2.2) ermittelt. Ein offensichtlicher Neuronenverlust wurde im APP23/CBN-Mausstamm nur in direkter Umgebung zu den Plaques gezeigt (Abb. 3.2.2.3). CB1^{-/-}-Mäuse wurden nicht auf eine Abnahme von Neuronen untersucht. Eine Neuronen-Degeneration in der CA1- und CA3-Region des Hippocampus wurde in einer Studie in jungen-, adulten- und alten CB1-Knockout Mäusen gezeigt (Bilkei-Gorzo et al. 2005). In der APP23 transgenen Maus (14 und 18 Monate) wurde ein Verlust von pyramidalen Neuronen in der CA1-Region des Hippocampus beschrieben (Calhoun et al. 1998). Interessanterweise verfügen APP23 transgene Tiere vor der Detektion amyloider Plaques über eine erhöhte Neuronen-Anzahl, im Vergleich zu Wildtyptieren (Bondolfi et al. 2002) und ein Neuronenverlust tritt erst nach der Plaque-Pathologie auf.

In der biochemischen Analyse wurde in den APP23/CB1^{-/-}- und APP23/CB1^{+/-}-Genotypen eine verringerte Expression des APP_{fl}-Proteins und seiner Fragmente beobachtet. Für keinen der APP überexprimierenden Genotypen des APP23/CBN-Mausstamms wurden Unterschiede in der Genexpression ermittelt. Dieser Befund zeigt, dass die geringen APP-Mengen auf Proteinebene in APP23/CB1^{-/-}- und APP23/CB1^{+/-}-Mäusen nicht durch eine geringere APP-Expression auf RNA-Ebene bedingt sind und somit andere Mechanismen wie z.B. der Proteintransport vom Golgi-Apparat zur Zellmembran zur veränderten APP-Menge führen könnten. Eine veränderte APP-Prozessierung im Zuge der Alterung wurde von Kern et al. in Fibroblasten beschrieben (Kern et al. 2006). Im APP23/CBN-Mausstamm wurde eine geringere Menge an APP und dessen Fragmenten sowohl in vier- und zwanzig Monate alten APP23/CB1^{-/-}- und APP23/CB1^{+/-}-Mäusen beobachtet. Diese Veränderungen der APP-Mengen treten somit nicht im Zuge des Alterns ein.

Sowohl APP als auch der CB1-Rezeptor sind in der Zellmembran verankert. Die Ergebnisse aus den biochemischen Untersuchungen zeigen, dass der CB1-Rezeptor einen möglichen regulatorischen Einfluss auf die Gesamtmenge und Prozessierung von APP ausübt. Diese Hypothese kann zusätzlich durch die Annahme gestützt werden, dass das APP-Protein eine konservierte G-Protein-Bindungssequenz besitzt, womit APP wie der CB1-Rezeptor als G-Protein-gekoppelter Rezeptor agieren kann (Mahlapuu et al. 2003). Eine gegenseitige Regulation dieser beiden Proteine sollte deshalb aufgrund dieser Gemeinsamkeiten durchaus möglich sein. Eine verringerte Sekretion und Prozessierung des APP-Proteins wurde für den APP23/CB1^{-/-}-Genotyp erstmals beschrieben. In weiteren Studien wäre es deshalb interessant

die regulatorische Funktion des CB1-Rezeptors auf APP in Zellkulturstudien im Detail zu analysieren.

Anhand des Morris Water-Maze Verhaltensexperimentes sollte das räumliche Lernen der Tiere des APP23/CBN-Mausstamms überprüft werden. Der Morris Water-Maze Test bietet einen Vorteil gegenüber anderen Lernversuchen, da die Tiere in diesem Experiment nicht zusätzlich durch Futter motiviert werden müssen. Des Weiteren ist der CB1-Rezeptor an der Regulation der Nahrungsaufnahme beteiligt. Die Lernversuche könnten deshalb aufgrund einer möglichen unterschiedlichen Motivation der Genotypen zur Futtersuche verfälscht werden.

Der Hippocampus ist an der Verarbeitung von räumlichen Eindrücken beteiligt. Genau in dieser Region zeigen APP23 Tiere amyloide Plaques und einen Verlust von Neuronen (Sturchler-Pierrat & Staufenbiel 2000; Vloeberghs et al. 2006). In verschiedenen Lernversuchen zeigten APP-überexprimierende Tiere Defizite im Lernen (Spires & Hyman 2005), die u.a. aus der Aggregation von amyloiden Plaques, welche die Struktur der Neuronen stören, resultieren könnten (Schilling et al. 2008). Verhaltensversuche mit CB1-Knockout-Mäusen zeigten ebenfalls Lerndefizite in diesen Tieren (Zimmer et al. 1999; Bilkei-Gorzo et al. 2005). Deshalb war es wichtig, den APP23/CBN-Mausstamm im Morris Water-Maze bezüglich des Lernverhaltens zu untersuchen.

Im Vergleich zum Wildtyp ($CB1^{+/+}$) zeigten $APP23/CB1^{+/-}$ - und $CB1^{-/-}$ -Tiere eine signifikant reduzierte Lernleistung. $APP23/CB1^{-/-}$ -Mäuse zeigten eine sehr schlechte Lernleistung über die Zeit und ein signifikant reduziertes Lernverhalten zu allen Genotypen des APP23/CBN-Mausstamms (Abb. 3.2.2.8). Damit wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass durch eine Kreuzung von APP23 transgenen- mit CB1 defizienten-Tieren die Fähigkeit zum räumlichen Lernen nochmals beeinträchtigt wird.

Im APP23/CBN-Mausstamm wurde gezeigt, dass eine Defizienz des CB1-Rezeptors die Lernleistung negativ beeinflusst. Der Einfluss des CB1-Rezeptors auf das Gedächtnis wurde zuvor von verschiedenen Arbeitsgruppen beschrieben. Eine Arbeitsgruppe zeigte, dass eine Stimulation des CB1-Rezeptors anti-inflammatorisch wirkt und im Tiermodell zu einer besseren Lernleistung führt (Marchalant et al. 2007; Marchalant et al. 2008). Die chronische Verabreichung von zelltoxischen Lipopolysacchariden (LPS) in den Hippocampus, bei gleichzeitiger Gabe von Win2, führte in einem Rattenmodell zur Reduktion von aktivierten Mikrogliazellen und einer Verbesserung des räumlichen Lernens im Morris Water-Maze. Im

Gegensatz zur Studie in 23 Monate alten F-344 Sprague-Dawley Wildtyp Ratten von Marchalant et al. zeigte der APP23/CB1^{-/-}-Genotyp des APP23/CBN-Mausstamms trotz einer reduzierten Anzahl von Mikro- und Astrogliazellen im Hippocampus eine sehr schlechte Lernleistung. Dies verdeutlicht, dass die APP-Prozessierung, die A β -Menge, sowie die Gliaaktivierung im APP23/CB1^{-/-}-Genotyp nicht die auslösenden Faktoren für eine schlechte Lernleistung darstellen. Deshalb könnten andere Stoffwechsel-Veränderungen die potentiell schlechte Lernleistung herbeiführen.

Des Weiteren führt der starke Gewichtsverlust der APP23/CB1^{-/-}-Tiere zu einer möglichen Abnahme in der Fitness der Tiere. Ein geringes Körpergewicht kann im Wasser zu einer schnellen Unterkühlung der Tiere führen und evtl. kann durch eine verringerte Muskelkraft die Schwimmleistung der APP23/CB1^{-/-}-Mäuse eingeschränkt sein.

Zusätzlich wird in den letzten Jahren die Funktion der amyloiden Plaques als mögliche toxische Komponente kontrovers diskutiert. Die Rolle der extrazellulären Ablagerung wird vielmehr als Schutzfunktion diskutiert, welche die Zelle vor den stärker toxischen A β -Oligomeren schützen könnte. Die Veröffentlichungen von Cohen et al. unterstützen diese Hypothese (Cohen et al. 2006; Cohen et al. 2009). In dem Tiermodell von Cohen et al. führte die Reduktion von IGF-1 (Insulin-Wachstums-Faktor 1), einem wichtigen Signalmolekül bei der Alterung von Invertebraten und Vertebraten, in Alzheimer-transgenen Mäusen zu einer verbesserten Lernleistung, obwohl die Tiere dichter gepackte A β -Plaques im Vergleich zu den Kontrollen (normale Alzheimer-transgene Mäuse) aufwiesen. Die Autoren ordneten diese Hyperaggregation im Alter als Schutzmechanismus ein, der die Zelle vor den weitaus toxischeren A β Oligomeren schützen könnte. Die Übersichtsstudie von Abbott et al. unterstützt ebenfalls diese Theorie, in welcher die A β Plaques nicht als alleinige toxische Komponente in der Alzheimer Krankheit eingestuft werden (Abbott 2008).

Die seit einigen Jahren postulierte modifizierte Form der Amyloid-Hypothese spricht der intrazellulären Akkumulation von Amyloid β -Peptiden in Neuronen eine zentralere Rolle als den extrazellulären Plaqueablagerungen zu (Wirhth et al. 2004) und konnte in mehreren Studien bestätigt werden.

In klinischen Studien und anhand von Tiermodellen wurde gezeigt, dass intrazelluläre amyloide Oligomere schon vor der Ablagerung potente Neurotoxine darstellen und Synapsen beschädigen (Walsh & Selkoe 2007). Diese Hypothese wurde auch in einem APP/PS1 transgenen Mausmodell bestätigt, bei dem die Akkumulation der toxischen Amyloid β -Peptide zur synaptischen Instabilität, einem Neuronenverlust und zu einer Beeinträchtigung

des Lernverhaltens führten (Bayer & Wirths 2008). Des Weiteren wurde anhand von Hirnschnitten aus Ratten, APP-Knockout Mäusen und menschlichem Gehirngewebe, eine Akkumulation von A β 42-Peptiden in sog. „Multivesicular Bodies“ innerhalb des präsynaptischen und postsynaptischen Zwischenraums beschrieben, welche zu einer pathologisch veränderten Morphologie der Synapsen führte (Takahashi et al. 2002). Diese Veränderungen zeigten sich bereits vor dem Auftreten von extrazellulären amyloiden Plaques. Eine neuere Studie mit AICD transgenen Tieren zeigte, dass die AICD-Domäne des APP-Proteins eine Neuroinflammation und gestörte hippocampale Neurogenese herbeiführen kann, die unabhängig von Amyloid β induziert wird (Ghosal et al. 2010).

In der vorliegenden Arbeit wurden jedoch in den APP23/CB1^{-/-}-Tieren insgesamt weniger Amyloid Plaques und A β -Spiegel in der löslichen Fraktion detektiert. Eine gestörte extrazelluläre Ablagerung wurde in diesem Tiermodell nicht beobachtet und kann deshalb nicht das schlechte Abschneiden der Tiere im Lernversuch begründen.

Zusätzlich wird die amyloide Prozessierung des APP-Proteins von der Phosphorylierung des Tau-Proteins begleitet, die zur Aggregation von Neurofibrillenbündeln führt (siehe Einleitung). Man nimmt an, dass als Folge der Phosphorylierung die Symptome der Alzheimer Krankheit nochmals verstärkt werden. Dies wurde im APP23 transgenen Mausmodell mit einer zusätzlichen Tau-Defizienz gezeigt, welche im Vergleich zu normalen APP23 Mäusen länger lebten und im Morris Water-Maze eine bessere Lernleistung ablieferten (Ittner et al. 2010b). Deshalb sollte erwähnt werden, dass die Kombination aus intrazellulärem Amyloid β und Neurofibrillenbündeln wichtige Indikatoren der Alzheimer Krankheit darstellen.

Die schlechte Lernleistung der APP23/CB1^{-/-}-Tiere im Morris Water-Maze könnte auch durch die Schädigung der Pyramidenzellen im Hippocampus verursacht werden. Die Pyramidenzellen des Hippocampus nehmen eine wichtige Rolle bei der Verarbeitung von räumlichen Eindrücken und bei der Überführung vom Kurzzeit- ins Langzeitgedächtnis ein. Eine Schädigung dieser Regionen könnte die Lernleistung der Tiere einschränken.

Zusätzlich zu den schlechten Lernleistungen der APP23/CB1^{-/-}-Tiere konnte in dieser Arbeit für den CB1^{-/-}-Genotyp ein Defizit im räumlichen Lernen während der Trainingsläufe und im Testlauf des Morris Water-Maze aufgezeigt werden. Dieses Defizit wurde in einem ähnlich

durchgeführten Morris Water-Maze Experiment zumindest in den Testläufen bestätigt (Varvel & Lichtman 2002). In dieser Studie zeigten die $CB1^{-/-}$ -Mäuse während der Trainingsphase von insgesamt sieben Tagen keine Unterschiede im räumlichen Lernen im Vergleich zum Wildtyp. Wurde die Plattform in den Testläufen jedoch in eine neue Position des Beckens gegeben, benötigten die Tiere eine signifikant längere Zeit und legten eine längere Wegstrecke zurück. Verschiedene Tierexperimente mit $CB1^{-/-}$ -Mäusen zeigten ein altersabhängiges Lernverhalten des Mausstamms (Bilkei-Gorzo et al. 2005). Im Vergleich zum Wildtyp lernten die $CB1^{-/-}$ -Mäuse im Alter zwischen sechs und sieben Wochen sogar zum Teil besser. Interessanterweise zeigten drei bis fünf Monate alte $CB1^{-/-}$ -Tiere ein Lernverhalten, das dem einer 14 bis 17 Monate alten $CB1^{+/+}$ -Maus entspricht. Zusätzlich wird dieses Defizit im Lernverhalten von einem Neuronenverlust im Hippocampus begleitet. Diese Befunde zeigen, dass der $CB1$ -Rezeptor vor allem im Alter einen Einfluss auf das Lernverhalten hat und werden durch die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigt, in der gezeigt werden konnte, dass der $CB1$ Knockout im APP23 transgenen Hintergrund (20 Monate alte Tiere) die Lernleistung der Tiere nochmals herabsetzt.

Des Weiteren könnte die Degeneration von Synapsen und der Myelinschicht im APP23/ $CB1^{-/-}$ -Genotyp die Signalweiterleitung stören. Als Folge würde sowohl die saltatorische Erregungsleitung sowie die Übertragung am synaptischen Spalt gestört werden, was in einer Einschränkung der Lernleistung resultiert.

Deshalb wurden Myelin- und Synapsenmarker im APP23/CBN-Mausmodell untersucht (Abb. 3.2.2.9). Die ersten proteinbiochemischen Untersuchungen zeigten, dass die Expression der Synapsenmarker in allen Genotypen des APP23/CBN-Mausstamms konstant blieb. Untersuchungen in APP23 transgenen Tieren unterstützen dieses Ergebnis. In drei- und 25 Monate alten Mäusen wurden keine Unterschiede in der Expression des Synaptophysinmarkers zwischen APP23 transgenen- und Wildtyp-Tieren festgestellt (Boncristiano et al. 2005). Die Expression von Myelinmarkern war in den APP23/ $CB1^{+/+}$ -, APP23/ $CB1^{-/-}$ und $CB1^{-/-}$ -Genotypen reduziert. Somit könnte eine Degeneration der Myelinschicht zu einer eingeschränkten Lernleistung führen. Einige Studien unterstützen die hier postulierte Hypothese. Eine Reduktion der Myelinschicht wurde in der Alzheimer Krankheit und eine Beteiligung des ECS bei Prozessen der Myelinreifung beschrieben (Galve-Roperh et al. 2007; Bartzokis 2009). Lee et al. zeigte, dass A β eine Degeneration der Oligodendrozyten durch Aktivierung des neutralen Sphingomyelinase-Ceramid-Signalwegs auslöst (Lee et al. 2004). Des Weiteren wurde für das ECS System beschrieben, dass eine

Aktivierung des CB1- oder CB2-Rezeptors zu einer verstärkten Expression des „Myelin basic proteins (MBP)“ führt (Arévalo-Martín et al. 2007). MBP ist am Aufbau der Myelin-Struktur beteiligt und eine Beschädigung der Myelinschicht führt zur gestörten Weiterleitung von Nervenimpulsen. Jackson et al. zeigte, dass die Caspase 3-Aktivität, ein Regulator des neuronalen Zelltods, in CB1-Rezeptor-Knockout Mäusen erhöht ist und eine Induktion einer CREAE („chronic relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis“) in den Tieren zu einer massiven Abnahme des MBP-Proteins führt (Jackson et al. 2005).

Alle in diesem Kapitel aufgeführten Ergebnisse zeigen, dass der CB1-Rezeptor Knockout in APP23 transgenen Tieren zu weitreichenden Veränderungen im Überleben, in der Biochemie, sowie im Lernverhalten der Tiere führte und sind zusammenfassend in Tabelle 4.1.2 dargestellt.

	APP23/CB1 ^{-/-}	APP23/CB1 ^{+/+}	APP23/CB1 ^{+/-}
Mortalität	+++	++	++
Gewicht	---	-	-
APP-Expression	+	+++	++
Aβ	+	+++	++
Aβ Plaques	+	+++	++
Räumliches Lernen	---	-	-

Tabelle 4.1.2: Effekt des CB1-Rezeptor Knockout in APP23 transgenen Tieren

Die Zeichen + (Zunahme) und – (Abnahme) geben die Intensitäten der Veränderung im Vergleich zum CB1^{+/+} an. Bei APP und dessen Prozessierungsprodukte bezieht sich die Bewertung auf den APP23/CB1^{+/-}-Genotyp

4.2 Der Einfluss des Cannabinoidsystems in der Alzheimer Krankheit

Das Cannabinoidsystem nimmt eine wichtige Funktion bei der präsynaptischen Neurotransmitterfreisetzung im Gehirn ein und eine Störung des Endocannabinoid-Stoffwechsels oder der Cannabinoidrezeptoren kann eine eingeschränkte synaptische Aktivität herbeigeführen.

Für das ECS konnten weitreichende schützende Eigenschaften in verschiedenen Alzheimer Modellen, wie Schutz vor Lipidoxidation, A β -Toxizität, Verbesserung der Lernleistung, reduzierte Mikrogliaaktivierung oder die Inhibition der Acetylcholinesterase-Aktivität beschrieben werden (siehe 1.3.1).

Eine Störung des ECS konnte bei der Untersuchung von Gehirnen von an Alzheimer verstorbenen Patienten festgestellt werden. In Bereichen mit einer hohen Dichte an amyloiden Aggregaten und aktivierten Mikogliazellen wurde in Alzheimer Gehirnen eine Abnahme von Cannabinoidrezeptoren beschrieben. Durch die Verabreichung von Dronabinol, einer Lösung von Δ^9 -THC in Öl, kam es zu einer Besserung des gestörten Verhaltens, zur Verbesserung der nächtlichen Unruhephasen und zur Stimulation des Appetits bei Alzheimer-Patienten (Volicer et al. 1997; Walther et al. 2006).

Des Weiteren wurde eine Störung des ECS durch Nitrosylierung von Proteinen (u.a. des CB1- und CB2-Proteins) in Gehirnen von an Alzheimer verstorbenen Patienten beschrieben (Ramírez et al. 2005). Diese Nitrosylierung der CB1-Rezeptoren könnte zu einer Störung bei der Kopplung an weiter „downstream“ liegenden Effektor-Signalmolekülen führen. Es konnte gezeigt werden, dass eine Schädigung von Neuronen zu einem Anstieg der Endocannabinoid-Produktion führt und Zellen ohne CB1-Rezeptor vulnerabler für neuronale Schäden sind (Stella et al. 1997; Marsicano et al. 2003). Diese Studien verdeutlichen, dass das ECS direkt an Prozessen wie dem Schutz von Neuronen beteiligt sein muss. Diese mögliche Schutzfunktion konnte auch in Studien mit A β -induzierter Toxizität bewiesen werden, in der die Aktivierung des CB1-Rezeptors durch Cannabinoide die schädigende Wirkung dieser Peptide reduzierte (Milton 2002; van der Stelt et al. 2006).

Zugleich konnte aber auch der gegenläufige Effekt gezeigt werden, bei dem die Inhibition des CB1-Rezeptors durch Rimonabant eine Besserung des Lernverhaltes im NagermodeLL nach Administration von A β hervorrief (Mazzola et al. 2003). Somit müsste auch eine Blockade des CB1-Rezeptors als mögliche therapeutische Maßnahme überdacht werden.

In der Alzheimer Krankheit kommt es des Weiteren zu einer gesteigerten Exzitotoxizität welche durch die Dysregulation der Ca^{2+} Homöostase sowie durch die erhöhte Aktivierung von NMDA-Rezeptoren hervorgerufen wird. Manche Cannabinoide (z.B. HU-211) können direkt den NMDA-Rezeptor durch Inhibition regulieren und somit vor Exzitotoxizität schützen (Eshhar et al. 1993; Nadler et al. 1993). Ebenfalls die Aktivierung des CB1-Rezeptors durch Cannabinoide kann vor Exzitotoxizität schützen (Shen & Thayer 1998; Abood et al. 2001), was nochmals den Einsatz von Cannabinoiden als mögliches Therapeutikum bei Alzheimer-Patienten untermauert.

Abgesehen vom CB1-Rezeptor wird dem CB2-Rezeptor eine wichtige Schutzfunktion bei neuronalen Schädigungen zugeschrieben. In Alzheimer-Patienten wurde eine Hochregulation dieser Rezeptoren in aktivierten Mikrogliazellen beschrieben (Benito et al. 2003; Ramírez et al. 2005). Der Aktivierung von CB2-Rezeptoren in solchen pathologischen Situationen werden unter anderem antiinflammatorische und neuroprotektive Eigenschaften zugeschrieben (Ehrhart et al. 2005; Fernández-Ruiz et al. 2007). Es gibt noch zahlreiche weitere schützende Eigenschaften des ECS in der Alzheimer Krankheit, welche zusammenfassend in dem Übersichtsartikel von Campbell und Gowran et al. dargestellt sind (Campbell & Gowran 2007).

4.3 Klinische Relevanz des Cannabinoidsystems in der Alzheimer Krankheit

In den Kapiteln 1.3 und 4.2 sind zahlreiche Beispiele zur Aktivität des ECS in der Alzheimer Krankheit aufgeführt. Die Neuroinflammation und der oxidative Stress sind schädigende Prozesse der Alzheimer Krankheit. Neue Therapien zur Behandlung der Alzheimer Demenz könnten auf Basis der antioxidativen und antiinflammatorischen Eigenschaften der Cannabinoide entwickelt werden.

Zurzeit werden vor allem Acetylcholinesterase-Inhibitoren (z.B. Donepezil, Galantamin) zur Steigerung der Acetylcholinmengen und NMDA-Rezeptor Antagonisten wie Memantine (z.B. Namenda, Ebixa) zur Besserung der Symptome bei Alzheimer-Patienten eingesetzt. Über die Manipulation des ECS können ähnliche schützende Effekte erreicht werden und deshalb bieten diese Stoffe zumindest eine Alternative zu den bisher auf dem Markt verwendeten Therapeutika. In der Alzheimer Krankheit wird durch Dysregulation der Ca^{2+} Homöostase, sowie durch die erhöhte Aktivierung von NMDA-Rezeptoren eine gesteigerte Exzitotoxizität hervorgerufen. Der CB1-Rezeptor ist an der Regulation von spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanälen beteiligt und nimmt Einfluss auf die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration (siehe 1.2.3). Über die Manipulation des ECS könnte deshalb auch die Ca^{2+} Homöostase bei Alzheimer-Patienten reguliert werden. Als Folge könnten die Zellen vor erhöhter Exzitotoxizität geschützt werden.

Ein auf Cannabinoiden basierendes Spray (Sativex) wurde auch schon erfolgreich bei der Behandlung von Multipler Sklerose oder bei neuropathischem Schmerz angewendet (Perez 2006). Deshalb wäre es in naher Zukunft durchaus möglich, dass weitere auf Cannabinoiden-basierende Stoffe Ihre Anwendung in der Medizin finden.

Der Einsatz von Cannabinoiden als Therapeutikum ist jedoch umstritten, da neuere klinische Alzheimer-Studien keine Unterschiede an Endocannabinoid-Mengen im Plasma von Alzheimer-Patienten und gesunden Kontrollgruppen feststellen konnten (Koppel et al. 2009). Des Weiteren müssten eventuelle psychoaktive Nebenwirkungen vorher durch intensive klinische Studien im Tiermodell untersucht werden. Das ECS ist an zahlreichen physiologischen Funktionen beteiligt (siehe Punkt 1.2.4). Deshalb können zusätzliche Stoffwechselveränderungen bei einer Manipulation dieses Systems nicht ausgeschlossen werden.

Der Einsatz von Endocannabinoiden könnte dieses Risiko minimieren. Endocannabinoide werden nur bei Bedarf produziert und unterliegen einer schnellen Degradation. Die

Manipulation des ECS durch Endocannabinoide stellt eine neue Möglichkeit dar, die Nebenwirkungen, welche oft durch die Administration von exogenen Cannabinoiden oder von Pharmazeutika hervorgerufen werden, zu verhindern.

5 Zusammenfassung

Die Alzheimer Krankheit ist eine der häufigsten neurodegenerativen Erkrankungen, deren Ursache, abgesehen von einem geringen Prozentsatz vererbter Formen, bisher nicht bekannt ist. Ein wichtiges Ziel der Grundlagenforschung liegt derzeit in der Modulation der APP-spaltenden Enzyme. Durch die Modulation dieser Enzyme könnten weniger schädigende Amyloid β -Peptide entstehen. Die Aktivität des ECS ist in vielen neurodegenerativen Krankheiten verändert. Protektive Eigenschaften der Cannabinoidrezeptoren wurden bei der Alzheimer Krankheit beschrieben. Deshalb sollte in dieser Arbeit der Einfluss des ECS auf die Pathogenese der Alzheimer Erkrankung untersucht werden. In Zellkultursystemen wurde der Einfluss von Cannabinoiden auf die Prozessierung des Amyloid-Vorläuferproteins analysiert. Durch Inkubation der Zellen mit CB1-Rezeptor Agonisten konnte die APP-Prozessierung zugunsten von sAPP α moduliert werden. Gleichzeitig führte die Inkubation mit Cannabinoiden zur reduzierten Amyloid β Menge im Medium der Zellen. In dieser Arbeit konnte die APP-Prozessierung durch die Aktivierung des CB1-Rezeptors zugunsten des nicht-amyloiden Wegs moduliert werden.

In einem Tiermodell wurde der Einfluss des CB1-Rezeptors in APP23 transgenen Mäusen untersucht. Der Knockout des CB1-Rezeptors führte in APP23 transgenen Tieren zu weitreichenden biochemischen Veränderungen. APP23/CB1^{-/-}-Tiere zeigten eine erhöhte Mortalität und ein sehr geringes Durchschnittsgewicht. Im Vergleich zu APP23/CB1^{+/-}-Tieren führte der CB1-Rezeptor Knockout zur Reduktion der APP-Expression und dessen Prozessierungsprodukten. In den histologischen Untersuchungen wurde eine reduzierte Anzahl an amyloiden Plaques, sowie eine reduzierte Neuroinflammation ermittelt. Biochemische Untersuchungen zeigten, dass der CB1-Rezeptor einen möglichen regulatorischen Einfluss auf die Expression und Prozessierung von APP ausübt. Die Tiere mit der geringsten Plaque-Menge (APP23/CB1^{-/-}) und einer reduzierten Prozessierung von sAPP α - und den CTFs zeigten die schlechteste Lernleistung im Morris Water-Maze. Deshalb müssen andere Faktoren (z.B. die Degradation der Myelinschicht) für die schlechte Lernleistung verantwortlich sein. Mit einem zweiten Tiermodell könnte in CB1-Knockout Mäusen durch den viral-vermittelten Gentransfer eine mögliche Toxizität von A β Peptiden untersucht werden. Die in dieser Arbeit ermittelten Ergebnisse zeigen, dass der CB1-Rezeptor an der Regulation der APP-Prozessierung beteiligt ist und zu proteinbiochemischen Veränderungen im Zell- und Tiermodell führt.

Abstract

Today, Alzheimer's pathology is one of the most prominent neurodegenerative diseases. The origin of the disease is still unknown, aside from some disease-causing mutations and genetic polymorphisms that increase the risk to develop Alzheimer's disease. In Alzheimer's disease, the processing of the amyloid precursor protein (APP) is changed. One aim in research is to modulate APP cleaving enzymes. The modulation of these enzymes can change APP processing towards the non-amyloidogenic pathway which results in a decrease of the cell-toxic A β peptides. Changes of the ECS activity have been described in many neurodegenerative diseases. Moreover, a potential protective role of cannabinoid receptors in Alzheimer's disease has been shown by basic research.

Based on these previous findings, this thesis aimed to investigate the role of the ECS in Alzheimer's pathology. In cell-culture systems the influence of cannabinoids on APP processing has been analyzed. The treatment of cell lines with CB1 agonists resulted in an increased amount of the neuroprotective sAPP α and has been accompanied by decreased A β peptide levels. These results show that the activation of the CB1 receptor can change APP processing to the non-amyloidogenic pathway.

In the second part of this thesis, the influence of the CB1 receptor has been analyzed in a well-established Alzheimer's disease model (APP23 mouse). The knockout of the CB1 receptor resulted in extensive changes. APP23/CB1^{-/-} mice showed a high mortality and a very low body weight. Compared to the APP23/CB1^{+/+} genotype, the CB1 receptor knockout lead to a reduction of APP expression and processing. Histological analyzes showed that altered APP-levels were accompanied by a reduced amyloid plaque load and glial inflammation. The biochemical results show that there might be a regulatory influence of the CB1 receptor on APP expression and processing. The animals with the lowest amyloid plaque load (APP23/CB1^{-/-} mice) and reduced processing of sAPP α and of CTFs showed impaired learning and memory in the Morris Water-Maze. These data indicate that other factors than A β plaques, such as a degradation of the myelin layer may cause the impaired learning and memory of APP23/CB1^{-/-} mice. In a second animal model, the potential toxicity of A β peptides has been investigated via adeno-associated virus (AAV)-based gene transfer. These findings indicate that the CB1 receptor has a potential role on the regulation of APP processing and the absence of this receptor leads to biochemical changes in cell- and animal models.

6 Literaturverzeichnis

- Abbott, A., 2008. Neuroscience: The plaque plan. *Nature*, 456(7219), pp.161-164.
- Abood, M.E. et al., 2001. Activation of the CB1 cannabinoid receptor protects cultured mouse spinal neurons against excitotoxicity. *Neuroscience Letters*, 309(3), pp.197-201.
- Aguado, T. et al., 2007. The CB1 cannabinoid receptor mediates excitotoxicity-induced neural progenitor proliferation and neurogenesis. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(33), pp.23892-23898.
- Alzheimer, A., 1907. "Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde". *Allgemeine Zeitschrift für Psychiatrie und Psychisch-gerichtliche Medizin*, 64, 146-148.
- Ameri, A., 1999. The effects of cannabinoids on the brain. *Progress in Neurobiology*, 58(4), pp.315-348.
- Ankri, J. & Poupard, M., 2003. [Prevalence and incidence of dementia among the very old. Review of the literature]. *Revue D'épidémiologie Et De Santé Publique*, 51(3), pp.349-360.
- Arendt, T., 2003. Synaptic plasticity and cell cycle activation in neurons are alternative effector pathways: the 'Dr. Jekyll and Mr. Hyde concept' of Alzheimer's disease or the yin and yang of neuroplasticity. *Progress in Neurobiology*, 71(2-3), pp.83-248.
- Arévalo-Martín, A. et al., 2007. Cannabinoids modulate Olig2 and polysialylated neural cell adhesion molecule expression in the subventricular zone of post-natal rats through cannabinoid receptor 1 and cannabinoid receptor 2. *The European Journal of Neuroscience*, 26(6), pp.1548-1559.
- Artal, P. et al., 1998. Retinal image quality in the rodent eye. *Visual Neuroscience*, 15(4), pp.597-605.
- Ashton, J.C. & Glass, M., 2007. The cannabinoid CB2 receptor as a target for inflammation-dependent neurodegeneration. *Current Neuropharmacology*, 5(2), pp.73-80.
- Ashton, J.C. et al., 2007. Cerebral hypoxia-ischemia and middle cerebral artery occlusion induce expression of the cannabinoid CB2 receptor in the brain. *Neuroscience Letters*, 412(2), pp.114-117.
- Auer, I.A. et al., 1995. Paired helical filament tau (PHFtau) in Niemann-Pick type C disease is similar to PHFtau in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathologica*, 90(6), pp.547-551.
- Baker, D. et al., 2006. In silico patent searching reveals a new cannabinoid receptor. *Trends in Pharmacological Sciences*, 27(1), pp.1-4.

- Barinaga, M., 1995. Missing Alzheimer's gene found. *Science (New York, N.Y.)*, 269(5226), pp.917-918.
- Bartzokis, G., 2009. Alzheimer's disease as homeostatic responses to age-related myelin breakdown. *Neurobiology of Aging*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19775776> [Accessed September 17, 2010].
- Baty, D.E. et al., 2008. Cannabinoid CB2 receptor activation attenuates motor and autonomic function deficits in a mouse model of spinal cord injury. *Clinical Neurosurgery*, 55, pp.172-177.
- Bayer, T.A. & Wirths, O., 2008. Review on the APP/PS1KI mouse model: intraneuronal Abeta accumulation triggers axonopathy, neuron loss and working memory impairment. *Genes, Brain, and Behavior*, 7 Suppl 1, pp.6-11.
- Behl, C., 1997. Amyloid beta-protein toxicity and oxidative stress in Alzheimer's disease. *Cell and Tissue Research*, 290(3), pp.471-480.
- Behl, C. et al., 1994. Hydrogen peroxide mediates amyloid beta protein toxicity. *Cell*, 77(6), pp.817-827.
- Benito, C. et al., 2003. Cannabinoid CB2 receptors and fatty acid amide hydrolase are selectively overexpressed in neuritic plaque-associated glia in Alzheimer's disease brains. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 23(35), pp.11136-11141.
- Benito, C. et al., 2007. Cannabinoid CB1 and CB2 receptors and fatty acid amide hydrolase are specific markers of plaque cell subtypes in human multiple sclerosis. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 27(9), pp.2396-2402.
- Berry, E.M. & Mechoulam, R., 2002. Tetrahydrocannabinol and endocannabinoids in feeding and appetite. *Pharmacology & Therapeutics*, 95(2), pp.185-190.
- Biedler, J.L., Helson, L. & Spengler, B.A., 1973. Morphology and growth, tumorigenicity, and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture. *Cancer Research*, 33(11), pp.2643-2652.
- Bilkei-Gorzo, A. et al., 2005. Early age-related cognitive impairment in mice lacking cannabinoid CB1 receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(43), pp.15670-15675.
- Blacker, D. et al., 1998. Alpha-2 macroglobulin is genetically associated with Alzheimer disease. *Nature Genetics*, 19(4), pp.357-360.

- Blennow, K., de Leon, M.J. & Zetterberg, H., 2006. Alzheimer's disease. *Lancet*, 368(9533), pp.387-403.
- Block, M.L. & Hong, J., 2005. Microglia and inflammation-mediated neurodegeneration: multiple triggers with a common mechanism. *Progress in Neurobiology*, 76(2), pp.77-98.
- Boggs, J.M., 2006. Myelin basic protein: a multifunctional protein. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 63(17), pp.1945-1961.
- Boncrisiano, S. et al., 2005. Neocortical synaptic bouton number is maintained despite robust amyloid deposition in APP23 transgenic mice. *Neurobiology of Aging*, 26(5), pp.607-613.
- Bondolfi, L. et al., 2002. Amyloid-associated neuron loss and gliogenesis in the neocortex of amyloid precursor protein transgenic mice. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 22(2), pp.515-522.
- Bornemann, K.D. & Staufenbiel, M., 2000. Transgenic mouse models of Alzheimer's disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 908, pp.260-266.
- Bouaboula, M. et al., 2005. Anandamide induced PPARgamma transcriptional activation and 3T3-L1 preadipocyte differentiation. *European Journal of Pharmacology*, 517(3), pp.174-181.
- Braak, H. & Braak, E., 1997. Frequency of stages of Alzheimer-related lesions in different age categories. *Neurobiology of Aging*, 18(4), pp.351-357.
- Braak, H. et al., 1996. Pattern of brain destruction in Parkinson's and Alzheimer's diseases. *Journal of Neural Transmission (Vienna, Austria: 1996)*, 103(4), pp.455-490.
- Breivogel, C.S. & Childers, S.R., 1998. The functional neuroanatomy of brain cannabinoid receptors. *Neurobiology of Disease*, 5(6 Pt B), pp.417-431.
- Breyhan, H. et al., 2009. APP/PS1KI bigenic mice develop early synaptic deficits and hippocampus atrophy. *Acta Neuropathologica*, 117(6), pp.677-685.
- Brion, J.P. et al., 1985. Neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease: an immunohistochemical study. *Journal of Submicroscopic Cytology*, 17(1), pp.89-96.
- Buckley, N.E. et al., 2006. Experimental methods to study the role of the peripheral cannabinoid receptor in immune function. *Methods in Molecular Medicine*, 123, pp.19-40.
- Burger, C., Nash, K. & Mandel, R.J., 2005. Recombinant adeno-associated viral vectors in the nervous system. *Human Gene Therapy*, 16(7), pp.781-791.

- Cabranes, A. et al., 2006. Changes in CB1 receptors in motor-related brain structures of chronic relapsing experimental allergic encephalomyelitis mice. *Brain Research*, 1107(1), pp.199-205.
- Caccamo, A. et al., 2006. M1 receptors play a central role in modulating AD-like pathology in transgenic mice. *Neuron*, 49(5), pp.671-682.
- Cadas, H. et al., 1996. Biosynthesis of an endogenous cannabinoid precursor in neurons and its control by calcium and cAMP. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 16(12), pp.3934-3942.
- Calhoun, M.E. et al., 1996. Comparative evaluation of synaptophysin-based methods for quantification of synapses. *Journal of Neurocytology*, 25(12), pp.821-828.
- Calhoun, M.E. et al., 1998. Neuron loss in APP transgenic mice. *Nature*, 395(6704), pp.755-756.
- Camden, J.M. et al., 2005. P2Y2 nucleotide receptors enhance alpha-secretase-dependent amyloid precursor protein processing. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(19), pp.18696-18702.
- Campbell, V.A. & Gowran, A., 2007. Alzheimer's disease; taking the edge off with cannabinoids? *British Journal of Pharmacology*, 152(5), pp.655-662.
- Casas, C. et al., 2004. Massive CA1/2 neuronal loss with intraneuronal and N-terminal truncated Abeta42 accumulation in a novel Alzheimer transgenic model. *The American Journal of Pathology*, 165(4), pp.1289-1300.
- Cedazo-Minguez, A. et al., 1999. Nicergoline stimulates protein kinase C mediated alpha-secretase processing of the amyloid precursor protein in cultured human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Neurochemistry International*, 35(4), pp.307-315.
- Centonze, D. et al., 2007. The endocannabinoid system in targeting inflammatory neurodegenerative diseases. *Trends in Pharmacological Sciences*, 28(4), pp.180-187.
- Chan, G.C. et al., 1998. Hippocampal neurotoxicity of Delta9-tetrahydrocannabinol. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 18(14), pp.5322-5332.
- Childers, S.R., 2006. Activation of G-proteins in brain by endogenous and exogenous cannabinoids. *The AAPS Journal*, 8(1), pp.E112-117.
- Christensen, D.Z. et al., 2008. Transient intraneuronal A beta rather than extracellular plaque pathology correlates with neuron loss in the frontal cortex of APP/PS1KI mice. *Acta Neuropathologica*, 116(6), pp.647-655.

- Clement, A.B. et al., 2008. Effects of neuron-specific ADAM10 modulation in an in vivo model of acute excitotoxic stress. *Neuroscience*, 152(2), pp.459-468.
- Cohen, E. et al., 2006. Opposing activities protect against age-onset proteotoxicity. *Science (New York, N.Y.)*, 313(5793), pp.1604-1610.
- Cohen, E. et al., 2009. Reduced IGF-1 signaling delays age-associated proteotoxicity in mice. *Cell*, 139(6), pp.1157-1169.
- Corder, E.H. et al., 1993. Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science (New York, N.Y.)*, 261(5123), pp.921-923.
- Correa, F. et al., 2010. Anandamide enhances IL-10 production in activated microglia by targeting CB(2) receptors: roles of ERK1/2, JNK, and NF-kappaB. *Glia*, 58(2), pp.135-147.
- Cota, D. et al., 2003. The endogenous cannabinoid system affects energy balance via central orexigenic drive and peripheral lipogenesis. *The Journal of Clinical Investigation*, 112(3), pp.423-431.
- Cota, D. et al., 2003. Endogenous cannabinoid system as a modulator of food intake. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders: Journal of the International Association for the Study of Obesity*, 27(3), pp.289-301.
- Coulson, E.J. et al., 2000. What the evolution of the amyloid protein precursor supergene family tells us about its function. *Neurochemistry International*, 36(3), pp.175-184.
- Cravatt, B.F. et al., 1996. Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides. *Nature*, 384(6604), pp.83-87.
- De Strooper, B. et al., 1998. Deficiency of presenilin-1 inhibits the normal cleavage of amyloid precursor protein. *Nature*, 391(6665), pp.387-390.
- De Strooper, B., 2007. Loss-of-function presenilin mutations in Alzheimer disease. Talking Point on the role of presenilin mutations in Alzheimer disease. *EMBO Reports*, 8(2), pp.141-146.
- Derkinderen, P. et al., 2003. Regulation of extracellular signal-regulated kinase by cannabinoids in hippocampus. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 23(6), pp.2371-2382.
- Desai, M.K. et al., 2010. Early Oligodendrocyte/Myelin Pathology in Alzheimer's Disease Mice Constitutes a Novel Therapeutic Target. *The American Journal of Pathology*, 177(3), pp.1422-1435.

- Deshmukh, S. et al., 2007. Postnatal development of cannabinoid receptor type 1 expression in rodent somatosensory cortex. *Neuroscience*, 145(1), pp.279-287.
- Devane, W.A. et al., 1988. Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Molecular Pharmacology*, 34(5), pp.605-613.
- Devane, W.A. et al., 1992. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science (New York, N.Y.)*, 258(5090), pp.1946-1949.
- Devlin, M.G. & Christopoulos, A., 2002. Modulation of cannabinoid agonist binding by 5-HT in the rat cerebellum. *Journal of Neurochemistry*, 80(6), pp.1095-1102.
- Di Carlo, G. & Izzo, A.A., 2003. Cannabinoids for gastrointestinal diseases: potential therapeutic applications. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 12(1), pp.39-49.
- Di Marzo, V. et al., 1998. Interactions between synthetic vanilloids and the endogenous cannabinoid system. *FEBS Letters*, 436(3), pp.449-454.
- Di Marzo, V. et al., 1994. Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. *Nature*, 372(6507), pp.686-691.
- Di, S. et al., 2005. Activity-dependent release and actions of endocannabinoids in the rat hypothalamic supraoptic nucleus. *The Journal of Physiology*, 569(Pt 3), pp.751-760.
- Dirnagl, U., Iadecola, C. & Moskowitz, M.A., 1999. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends in Neurosciences*, 22(9), pp.391-397.
- Dowie, M.J. et al., 2009. Altered CB1 receptor and endocannabinoid levels precede motor symptom onset in a transgenic mouse model of Huntington's disease. *Neuroscience*, 163(1), pp.456-465.
- Ehrhart, J. et al., 2005. Stimulation of cannabinoid receptor 2 (CB2) suppresses microglial activation. *Journal of Neuroinflammation*, 2, p.29.
- Eljaschewitsch, E. et al., 2006. The endocannabinoid anandamide protects neurons during CNS inflammation by induction of MKP-1 in microglial cells. *Neuron*, 49(1), pp.67-79.
- Elsohly, M.A. & Slade, D., 2005. Chemical constituents of marijuana: the complex mixture of natural cannabinoids. *Life Sciences*, 78(5), pp.539-548.
- Eshhar, N., Striem, S. & Biegon, A., 1993. HU-211, a non-psychotropic cannabinoid, rescues cortical neurones from excitatory amino acid toxicity in culture. *Neuroreport*, 5(3), pp.237-240.
- Eubanks, L.M. et al., 2006. A molecular link between the active component of marijuana and Alzheimer's disease pathology. *Molecular Pharmaceutics*, 3(6), pp.773-777.

- Felder, C.C. et al., 1995. Comparison of the pharmacology and signal transduction of the human cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Molecular Pharmacology*, 48(3), pp.443-450.
- Fernández-Ruiz, J. et al., 2007. Cannabinoid CB2 receptor: a new target for controlling neural cell survival? *Trends in Pharmacological Sciences*, 28(1), pp.39-45.
- Ferri, C.P. et al., 2005. Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *Lancet*, 366(9503), pp.2112-2117.
- Friedhoff, P. et al., 2000. Structure of tau protein and assembly into paired helical filaments. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1502(1), pp.122-132.
- Furukawa, K. et al., 1996. Activation of K⁺ channels and suppression of neuronal activity by secreted beta-amyloid-precursor protein. *Nature*, 379(6560), pp.74-78.
- Galve-Roperh, I. et al., 2007. The endocannabinoid system and neurogenesis in health and disease. *The Neuroscientist: A Review Journal Bringing Neurobiology, Neurology and Psychiatry*, 13(2), pp.109-114.
- Games, D. et al., 1995. Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpressing V717F beta-amyloid precursor protein. *Nature*, 373(6514), pp.523-527.
- Gaoni, Y., Mechoulam, R., Isolation, structure, and partial synthesis of an active constituent of hashish. *J. Am. Chem. Soc.* 86: 1646-1647., 1964.
- García-Arencibia, M. et al., 2007. Evaluation of the neuroprotective effect of cannabinoids in a rat model of Parkinson's disease: importance of antioxidant and cannabinoid receptor-independent properties. *Brain Research*, 1134(1), pp.162-170.
- Ghosal, K. & Pimplikar, S.W., 2010. Aging and excitotoxic stress exacerbate neural circuit reorganization in amyloid precursor protein intracellular domain transgenic mice. *Neurobiology of Aging*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20493588> [Accessed September 9, 2010].
- Ghosal, K., Stathopoulos, A. & Pimplikar, S.W., 2010. APP Intracellular Domain Impairs Adult Neurogenesis in Transgenic Mice by Inducing Neuroinflammation. *PLoS ONE*, 5(7), p.e11866.
- Ghosal, K. et al., 2009. Alzheimer's disease-like pathological features in transgenic mice expressing the APP intracellular domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(43), pp.18367-18372.
- Gilbert, G.L. et al., 2007. Delta9-tetrahydrocannabinol protects hippocampal neurons from excitotoxicity. *Brain Research*, 1128(1), pp.61-69.

- Glass, M., Dragunow, M. & Faull, R.L., 2000. The pattern of neurodegeneration in Huntington's disease: a comparative study of cannabinoid, dopamine, adenosine and GABA(A) receptor alterations in the human basal ganglia in Huntington's disease. *Neuroscience*, 97(3), pp.505-519.
- Glass, M., Faull, R.L. & Dragunow, M., 1993. Loss of cannabinoid receptors in the substantia nigra in Huntington's disease. *Neuroscience*, 56(3), pp.523-527.
- Goate, A. et al., 1991. Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature*, 349(6311), pp.704-706.
- Goedert, M. et al., 1996. Assembly of microtubule-associated protein tau into Alzheimer-like filaments induced by sulphated glycosaminoglycans. *Nature*, 383(6600), pp.550-553.
- Goodenough, S., Engert, S. & Behl, C., 2000. Testosterone stimulates rapid secretory amyloid precursor protein release from rat hypothalamic cells via the activation of the mitogen-activated protein kinase pathway. *Neuroscience Letters*, 296(1), pp.49-52.
- Goodenough, S., Schäfer, M. & Behl, C., 2003. Estrogen-induced cell signalling in a cellular model of Alzheimer's disease. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 84(2-3), pp.301-305.
- Götz, J. et al., 2001. Formation of neurofibrillary tangles in P3011 tau transgenic mice induced by Abeta 42 fibrils. *Science (New York, N.Y.)*, 293(5534), pp.1491-1495.
- Gralle, M. & Ferreira, S.T., 2007. Structure and functions of the human amyloid precursor protein: the whole is more than the sum of its parts. *Progress in Neurobiology*, 82(1), pp.11-32.
- Grimm, M.O.W. et al., 2005. Regulation of cholesterol and sphingomyelin metabolism by amyloid-beta and presenilin. *Nature Cell Biology*, 7(11), pp.1118-1123.
- Gunawardena, S. & Goldstein, L.S., 2001. Disruption of axonal transport and neuronal viability by amyloid precursor protein mutations in *Drosophila*. *Neuron*, 32(3), pp.389-401.
- Guo, Q., Robinson, N. & Mattson, M.P., 1998. Secreted beta-amyloid precursor protein counteracts the proapoptotic action of mutant presenilin-1 by activation of NF-kappaB and stabilization of calcium homeostasis. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(20), pp.12341-12351.
- Guy, J., Qi, X. & Hauswirth, W.W., 1998. Adeno-associated viral-mediated catalase expression suppresses optic neuritis in experimental allergic encephalomyelitis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(23), pp.13847-13852.

- Guzmán, M., 2003. Cannabinoids: potential anticancer agents. *Nature Reviews. Cancer*, 3(10), pp.745-755.
- Haass, C. et al., 1994. Mutations associated with a locus for familial Alzheimer's disease result in alternative processing of amyloid beta-protein precursor. *The Journal of Biological Chemistry*, 269(26), pp.17741-17748.
- Hall, G.F., Lee, S. & Yao, J., 2002. Neurofibrillary degeneration can be arrested in an in vivo cellular model of human tauopathy by application of a compound which inhibits tau filament formation in vitro. *Journal of Molecular Neuroscience: MN*, 19(3), pp.253-260.
- Hampson, A.J. et al., 1998. Cannabidiol and (-)Delta9-tetrahydrocannabinol are neuroprotective antioxidants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(14), pp.8268-8273.
- Hardy, J., 1999. The shorter amyloid cascade hypothesis. *Neurobiology of Aging*, 20(1), p.85; discussion 87.
- Hardy, J. & Selkoe, D.J., 2002. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science (New York, N.Y.)*, 297(5580), pp.353-356.
- Harris, M.E. et al., 1995. Direct evidence of oxidative injury produced by the Alzheimer's beta-amyloid peptide (1-40) in cultured hippocampal neurons. *Experimental Neurology*, 131(2), pp.193-202.
- Hayakawa, K. et al., 2007. High-cholesterol feeding aggravates cerebral infarction via decreasing the CB1 receptor. *Neuroscience Letters*, 414(2), pp.183-187.
- Hilairret, S. et al., 2003. Hypersensitization of the Orexin 1 receptor by the CB1 receptor: evidence for cross-talk blocked by the specific CB1 antagonist, SR141716. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(26), pp.23731-23737.
- Howlett, A.C., 2005. Cannabinoid receptor signaling. *Handbook of Experimental Pharmacology*, (168), pp.53-79.
- Howlett, A.C. et al., 2002. International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacological Reviews*, 54(2), pp.161-202.
- Howlett, A.C., 2002. The cannabinoid receptors. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*, 68-69, pp.619-631.
- Idelevich, E., Kirch, W. & Schindler, C., 2009. Current pharmacotherapeutic concepts for the treatment of obesity in adults. *Therapeutic Advances in Cardiovascular Disease*, 3(1), pp.75-90.

- Iqbal, K. et al., 2005. Tau pathology in Alzheimer disease and other tauopathies. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1739(2-3), pp.198-210.
- Ishida, A. et al., 1997. Secreted form of beta-amyloid precursor protein shifts the frequency dependency for induction of LTD, and enhances LTP in hippocampal slices. *Neuroreport*, 8(9-10), pp.2133-2137.
- Ittner, L.M. et al., 2010a. Dendritic function of tau mediates amyloid-beta toxicity in Alzheimer's disease mouse models. *Cell*, 142(3), pp.387-397.
- Ittner, L.M. et al., 2010b. Dendritic function of tau mediates amyloid-beta toxicity in Alzheimer's disease mouse models. *Cell*, 142(3), pp.387-397.
- Iuvone, T. et al., 2004. Neuroprotective effect of cannabidiol, a non-psychoactive component from Cannabis sativa, on beta-amyloid-induced toxicity in PC12 cells. *Journal of Neurochemistry*, 89(1), pp.134-141.
- Izquierdo, I. et al., 2008. The molecular cascades of long-term potentiation underlie memory consolidation of one-trial avoidance in the CA1 region of the dorsal hippocampus, but not in the basolateral amygdala or the neocortex. *Neurotoxicity Research*, 14(2-3), pp.273-294.
- Jackson, G.R. et al., 2002. Human wild-type tau interacts with wingless pathway components and produces neurofibrillary pathology in Drosophila. *Neuron*, 34(4), pp.509-519.
- Jackson, S.J. et al., 2005. Cannabinoid-receptor 1 null mice are susceptible to neurofilament damage and caspase 3 activation. *Neuroscience*, 134(1), pp.261-268.
- Jin, L.W. et al., 1994. Peptides containing the RERMS sequence of amyloid beta/A4 protein precursor bind cell surface and promote neurite extension. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 14(9), pp.5461-5470.
- Jung, T.W. et al., 2006. Rosiglitazone protects human neuroblastoma SH-SY5Y cells against acetaldehyde-induced cytotoxicity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 340(1), pp.221-227.
- Kalaria, R.N. et al., 2008. Alzheimer's disease and vascular dementia in developing countries: prevalence, management, and risk factors. *Lancet Neurology*, 7(9), pp.812-826.
- Kang, J. et al., 1987. The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature*, 325(6106), pp.733-736.
- Kaplitt, M.G. et al., 1994. Long-term gene expression and phenotypic correction using adeno-associated virus vectors in the mammalian brain. *Nature Genetics*, 8(2), pp.148-154.

- Katano, H. et al., 2004. Identification of adeno-associated virus contamination in cell and virus stocks by PCR. *BioTechniques*, 36(4), pp.676-680.
- Katzman, R., 1986. Alzheimer's disease. *The New England Journal of Medicine*, 314(15), pp.964-973.
- Kearn, C.S. et al., 2005. Concurrent stimulation of cannabinoid CB1 and dopamine D2 receptors enhances heterodimer formation: a mechanism for receptor cross-talk? *Molecular Pharmacology*, 67(5), pp.1697-1704.
- Kelly, P.H. et al., 2003. Progressive age-related impairment of cognitive behavior in APP23 transgenic mice. *Neurobiology of Aging*, 24(2), pp.365-378.
- Kern, A. & Behl, C., 2009. The unsolved relationship of brain aging and late-onset Alzheimer disease. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1790(10), pp.1124-1132.
- Kern, A. et al., 2006. Down-regulation of endogenous amyloid precursor protein processing due to cellular aging. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(5), pp.2405-2413.
- Khaspekov, L.G. et al., 2004. Involvement of brain-derived neurotrophic factor in cannabinoid receptor-dependent protection against excitotoxicity. *The European Journal of Neuroscience*, 19(7), pp.1691-1698.
- Kivipelto, M. et al., 2002. Apolipoprotein E epsilon4 allele, elevated midlife total cholesterol level, and high midlife systolic blood pressure are independent risk factors for late-life Alzheimer disease. *Annals of Internal Medicine*, 137(3), pp.149-155.
- Klein, T.W., 2005. Cannabinoid-based drugs as anti-inflammatory therapeutics. *Nature Reviews. Immunology*, 5(5), pp.400-411.
- Koehler & Dinger, 1953. Orientierungsvermögen bei Mäusen Versuche im Hochlabyrinth. *Institut für den Wissenschaftlichen Film (audiovisuelles Material)*.
- Kojro, E. et al., 2006. The neuropeptide PACAP promotes the alpha-secretase pathway for processing the Alzheimer amyloid precursor protein. *The FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 20(3), pp.512-514.
- Koo, E.H. et al., 1990. Precursor of amyloid protein in Alzheimer disease undergoes fast anterograde axonal transport. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(4), pp.1561-1565.
- Koppel, J. et al., 2009. Endocannabinoids in Alzheimer's disease and their impact on normative cognitive performance: a case-control and cohort study. *Lipids in Health and Disease*, 8, p.2.

- Kraemer, B.C. et al., 2003. Neurodegeneration and defective neurotransmission in a *Caenorhabditis elegans* model of tauopathy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(17), pp.9980-9985.
- Kreutz, S. et al., 2007. Cannabinoids and neuronal damage: differential effects of THC, AEA and 2-AG on activated microglial cells and degenerating neurons in excitotoxically lesioned rat organotypic hippocampal slice cultures. *Experimental Neurology*, 203(1), pp.246-257.
- Kuster, J.E. et al., 1993. Aminoalkylindole binding in rat cerebellum: selective displacement by natural and synthetic cannabinoids. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 264(3), pp.1352-1363.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), pp.680-685.
- Lalonde, R. et al., 2005. Neurobehavioral characterization of APP23 transgenic mice with the SHIRPA primary screen. *Behavioural Brain Research*, 157(1), pp.91-98.
- Lawlor, P.A. et al., 2007. Novel rat Alzheimer's disease models based on AAV-mediated gene transfer to selectively increase hippocampal Abeta levels. *Molecular Neurodegeneration*, 2, p.11.
- Lee, J.-T. et al., 2004. Amyloid-beta peptide induces oligodendrocyte death by activating the neutral sphingomyelinase-ceramide pathway. *The Journal of Cell Biology*, 164(1), pp.123-131.
- Lemere, C.A. et al., 1996. Sequence of deposition of heterogeneous amyloid beta-peptides and APO E in Down syndrome: implications for initial events in amyloid plaque formation. *Neurobiology of Disease*, 3(1), pp.16-32.
- Lezoualc'h, F. et al., 2000. Corticotropin-releasing hormone-mediated neuroprotection against oxidative stress is associated with the increased release of non-amyloidogenic amyloid beta precursor protein and with the suppression of nuclear factor-kappaB. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, 14(1), pp.147-159.
- Link, C.D., 1995. Expression of human beta-amyloid peptide in transgenic *Caenorhabditis elegans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(20), pp.9368-9372.
- Lin-Lee, Y.C. et al., 1985. Apolipoprotein E gene mapping and expression: localization of the structural gene to human chromosome 19 and expression of ApoE mRNA in lipoprotein- and non-lipoprotein-producing tissues. *Biochemistry*, 24(14), pp.3751-3756.

- Lobo, A. et al., 2000. Prevalence of dementia and major subtypes in Europe: A collaborative study of population-based cohorts. Neurologic Diseases in the Elderly Research Group. *Neurology*, 54(11 Suppl 5), pp.S4-9.
- Loría, F. et al., 2008. Study of the regulation of the endocannabinoid system in a virus model of multiple sclerosis reveals a therapeutic effect of palmitoylethanolamide. *The European Journal of Neuroscience*, 28(4), pp.633-641.
- Luo, Y.Q. et al., 1995. Physiological levels of beta-amyloid increase tyrosine phosphorylation and cytosolic calcium. *Brain Research*, 681(1-2), pp.65-74.
- Lüthi, A. et al., 1997. Endogenous serine protease inhibitor modulates epileptic activity and hippocampal long-term potentiation. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 17(12), pp.4688-4699.
- Ma, G. et al., 2005. Short-term interleukin-1(beta) increases the release of secreted APP(alpha) via MEK1/2-dependent and JNK-dependent alpha-secretase cleavage in neuroglioma U251 cells. *Journal of Neuroscience Research*, 80(5), pp.683-692.
- Mackie, K. & Stella, N., 2006. Cannabinoid receptors and endocannabinoids: evidence for new players. *The AAPS Journal*, 8(2), pp.E298-306.
- Mahlapuu, R. et al., 2003. Amyloid precursor protein carboxy-terminal fragments modulate G-proteins and adenylate cyclase activity in Alzheimer's disease brain. *Brain Research. Molecular Brain Research*, 117(1), pp.73-82.
- Mahley, R.W., 1988. Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science (New York, N.Y.)*, 240(4852), pp.622-630.
- Manthey, D. et al., 2001. Estrogen induces a rapid secretion of amyloid beta precursor protein via the mitogen-activated protein kinase pathway. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, 268(15), pp.4285-4291.
- Marchalant, Y., Rosi, S. & Wenk, G.L., 2007. Anti-inflammatory property of the cannabinoid agonist WIN-55212-2 in a rodent model of chronic brain inflammation. *Neuroscience*, 144(4), pp.1516-1522.
- Marchalant, Y. et al., 2008. Cannabinoid receptor stimulation is anti-inflammatory and improves memory in old rats. *Neurobiology of Aging*, 29(12), pp.1894-1901.
- Marlow, L. et al., 2003. Beta-secretase processing of the Alzheimer's amyloid protein precursor (APP). *Journal of Molecular Neuroscience: MN*, 20(3), pp.233-239.
- Marsicano, G. et al., 2003. CB1 cannabinoid receptors and on-demand defense against excitotoxicity. *Science (New York, N.Y.)*, 302(5642), pp.84-88.

- Marsicano, G. et al., 2002. Neuroprotective properties of cannabinoids against oxidative stress: role of the cannabinoid receptor CB1. *Journal of Neurochemistry*, 80(3), pp.448-456.
- Marsicano, G. et al., 2002. The endogenous cannabinoid system controls extinction of aversive memories. *Nature*, 418(6897), pp.530-534.
- Masliah, E. et al., 1996. Comparison of neurodegenerative pathology in transgenic mice overexpressing V717F beta-amyloid precursor protein and Alzheimer's disease. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 16(18), pp.5795-5811.
- Matsuda, L.A. et al., 1990. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature*, 346(6284), pp.561-564.
- Mattson, M.P., 2000. Apoptosis in neurodegenerative disorders. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 1(2), pp.120-129.
- Mattson, M.P., 1997. Cellular actions of beta-amyloid precursor protein and its soluble and fibrillogenic derivatives. *Physiological Reviews*, 77(4), pp.1081-1132.
- Mazanetz, M.P. & Fischer, P.M., 2007. Untangling tau hyperphosphorylation in drug design for neurodegenerative diseases. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 6(6), pp.464-479.
- Mazzola, C., Micale, V. & Drago, F., 2003. Amnesia induced by beta-amyloid fragments is counteracted by cannabinoid CB1 receptor blockade. *European Journal of Pharmacology*, 477(3), pp.219-225.
- Mechoulam, R. et al., 1995. Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochemical Pharmacology*, 50(1), pp.83-90.
- Mechoulam, R., 1986. Cannabis as Therapeutic Agent. *CRC Press Boca Ranton*, 1-19.
- Meyer-Luehmann, M. et al., 2003. Extracellular amyloid formation and associated pathology in neural grafts. *Nature Neuroscience*, 6(4), pp.370-377.
- Meziane, H. et al., 1998. Memory-enhancing effects of secreted forms of the beta-amyloid precursor protein in normal and amnesic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(21), pp.12683-12688.
- Miglio, G. et al., 2009. PPARgamma stimulation promotes neurite outgrowth in SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *Neuroscience Letters*, 454(2), pp.134-138.
- Milton, N.G.N., 2002. Anandamide and noladin ether prevent neurotoxicity of the human amyloid-beta peptide. *Neuroscience Letters*, 332(2), pp.127-130.

- Mogi, M. et al., 2008. Telmisartan prevented cognitive decline partly due to PPAR-gamma activation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 375(3), pp.446-449.
- Molina-Holgado, E. et al., 2009. The endocannabinoid system is modulated in response to spinal cord injury in rats. *Neurobiology of Disease*, 33(1), pp.57-71.
- Monory, K. et al., 2006. The endocannabinoid system controls key epileptogenic circuits in the hippocampus. *Neuron*, 51(4), pp.455-466.
- Morin, P.J. et al., 1993. Amyloid precursor protein is synthesized by retinal ganglion cells, rapidly transported to the optic nerve plasma membrane and nerve terminals, and metabolized. *Journal of Neurochemistry*, 61(2), pp.464-473.
- Morris, R.G. et al., 1982. Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature*, 297(5868), pp.681-683.
- Movsesyan, V.A. et al., 2004. Anandamide-induced cell death in primary neuronal cultures: role of calpain and caspase pathways. *Cell Death and Differentiation*, 11(10), pp.1121-1132.
- Mullen, R.J., Buck, C.R. & Smith, A.M., 1992. NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development (Cambridge, England)*, 116(1), pp.201-211.
- Mullis, K.B. & Faloona, F.A., 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology*, 155, pp.335-350.
- Munro, S., Thomas, K.L. & Abu-Shaar, M., 1993. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature*, 365(6441), pp.61-65.
- Nadler, V., Mechoulam, R. & Sokolovsky, M., 1993. The non-psychotropic cannabinoid (+)-(3S,4S)-7-hydroxy-delta 6- tetrahydrocannabinol 1,1-dimethylheptyl (HU-211) attenuates N-methyl-D-aspartate receptor-mediated neurotoxicity in primary cultures of rat forebrain. *Neuroscience Letters*, 162(1-2), pp.43-45.
- Nagayama, T. et al., 1999. Cannabinoids and neuroprotection in global and focal cerebral ischemia and in neuronal cultures. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 19(8), pp.2987-2995.
- Oakley, H. 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. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 26(40), pp.10129-10140.
- Oddo, S. et al., 2004. Abeta immunotherapy leads to clearance of early, but not late, hyperphosphorylated tau aggregates via the proteasome. *Neuron*, 43(3), pp.321-332.

- Ofek, O. et al., 2006. Peripheral cannabinoid receptor, CB2, regulates bone mass. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(3), pp.696-701.
- O'Sullivan, S.E., 2007. Cannabinoids go nuclear: evidence for activation of peroxisome proliferator-activated receptors. *British Journal of Pharmacology*, 152(5), pp.576-582.
- O'Sullivan, S.E. & Kendall, D.A., 2010. Cannabinoid activation of peroxisome proliferator-activated receptors: potential for modulation of inflammatory disease. *Immunobiology*, 215(8), pp.611-616.
- Pagotto, U. et al., 2006. The emerging role of the endocannabinoid system in endocrine regulation and energy balance. *Endocrine Reviews*, 27(1), pp.73-100.
- Paik, Y.K. et al., 1985. Nucleotide sequence and structure of the human apolipoprotein E gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 82(10), pp.3445-3449.
- Panikashvili, D. et al., 2001. An endogenous cannabinoid (2-AG) is neuroprotective after brain injury. *Nature*, 413(6855), pp.527-531.
- Parmentier-Batteur, S. et al., 2002. Increased severity of stroke in CB1 cannabinoid receptor knock-out mice. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 22(22), pp.9771-9775.
- Peng, Y. et al., 2007. Huperzine A regulates amyloid precursor protein processing via protein kinase C and mitogen-activated protein kinase pathways in neuroblastoma SK-N-SH cells over-expressing wild type human amyloid precursor protein 695. *Neuroscience*, 150(2), pp.386-395.
- Perez, J., 2006. Combined cannabinoid therapy via an oromucosal spray. *Drugs of Today (Barcelona, Spain: 1998)*, 42(8), pp.495-503.
- Pertwee, R.G., 1997. Pharmacology of cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Pharmacology & Therapeutics*, 74(2), pp.129-180.
- Pfaffl, M.W., Horgan, G.W. & 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 Research*, 30(9), p.e36.
- Pike, C.J. et al., 1994. Beta-amyloid-induced changes in cultured astrocytes parallel reactive astrocytosis associated with senile plaques in Alzheimer's disease. *Neuroscience*, 63(2), pp.517-531.
- Piomelli, D., 2003. The molecular logic of endocannabinoid signalling. *Nature Reviews. Neuroscience*, 4(11), pp.873-884.

- Pisani, A. et al., 2005. High endogenous cannabinoid levels in the cerebrospinal fluid of untreated Parkinson's disease patients. *Annals of Neurology*, 57(5), pp.777-779.
- Postina, R. et al., 2004. A disintegrin-metalloproteinase prevents amyloid plaque formation and hippocampal defects in an Alzheimer disease mouse model. *The Journal of Clinical Investigation*, 113(10), pp.1456-1464.
- Pietrzik, C. & Behl, C., 2005. Concepts for the treatment of Alzheimer's disease: molecular mechanisms and clinical application. *International Journal of Experimental Pathology*, 86(3), pp.173-185.
- Price, D.A. 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. *The European Journal of Neuroscience*, 29(11), pp.2177-2186.
- Rabinowicz, A.L. et al., 2000. Transient epileptic amnesia in dementia: a treatable unrecognized cause of episodic amnesic wandering. *Alzheimer Disease and Associated Disorders*, 14(4), pp.231-233.
- Ramírez, B.G. et al., 2005. Prevention of Alzheimer's disease pathology by cannabinoids: neuroprotection mediated by blockade of microglial activation. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 25(8), pp.1904-1913.
- Randall, M.D. et al., 2002. Cardiovascular effects of cannabinoids. *Pharmacology & Therapeutics*, 95(2), pp.191-202.
- Rinaldi-Carmona, M. et al., 1994. SR141716A, a potent and selective antagonist of the brain cannabinoid receptor. *FEBS Letters*, 350(2-3), pp.240-244.
- Rocchi, A. et al., 2003. Causative and susceptibility genes for Alzheimer's disease: a review. *Brain Research Bulletin*, 61(1), pp.1-24.
- Rossner, S. et al., 2006. Transcriptional and translational regulation of BACE1 expression--implications for Alzheimer's disease. *Progress in Neurobiology*, 79(2), pp.95-111.
- Sagredo, O. et al., 2009. Cannabinoid CB2 receptor agonists protect the striatum against malonate toxicity: relevance for Huntington's disease. *Glia*, 57(11), pp.1154-1167.
- Saiki, R.K. et al., 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science (New York, N.Y.)*, 239(4839), pp.487-491.
- Samulski, R.J. et al., 1982. Cloning of adeno-associated virus into pBR322: rescue of intact virus from the recombinant plasmid in human cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 79(6), pp.2077-2081.

- Sánchez-Alavez, M. et al., 2007. Electrophysiological and cerebrovascular effects of the alpha-secretase-derived form of amyloid precursor protein in young and middle-aged rats. *Brain Research*, 1131(1), pp.112-117.
- Sarnataro, D. et al., 2006. The cannabinoid CB1 receptor antagonist rimonabant (SR141716) inhibits human breast cancer cell proliferation through a lipid raft-mediated mechanism. *Molecular Pharmacology*, 70(4), pp.1298-1306.
- Sastre, M. et al., 2006. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs repress beta-secretase gene promoter activity by the activation of PPARgamma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(2), pp.443-448.
- Saunders, A.M. et al., 1993. Association of apolipoprotein E allele epsilon 4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease. *Neurology*, 43(8), pp.1467-1472.
- Schäbitz, W. et al., 2002. Release of fatty acid amides in a patient with hemispheric stroke: a microdialysis study. *Stroke; a Journal of Cerebral Circulation*, 33(8), pp.2112-2114.
- Schilling, S. et al., 2008. Glutaminyl cyclase inhibition attenuates pyroglutamate Aβ and Alzheimer's disease-like pathology. *Nature Medicine*, 14(10), pp.1106-1111.
- Schubert, D. & Behl, C., 1993. The expression of amyloid beta protein precursor protects nerve cells from beta-amyloid and glutamate toxicity and alters their interaction with the extracellular matrix. *Brain Research*, 629(2), pp.275-282.
- Schwab, C., Hosokawa, M. & McGeer, P.L., 2004. Transgenic mice overexpressing amyloid beta protein are an incomplete model of Alzheimer disease. *Experimental Neurology*, 188(1), pp.52-64.
- Selkoe, D.J., 2001. Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiological Reviews*, 81(2), pp.741-766.
- Selkoe, D.J., 1999. Translating cell biology into therapeutic advances in Alzheimer's disease. *Nature*, 399(6738 Suppl), pp.A23-31.
- Selkoe, D.J., 2004. Alzheimer disease: mechanistic understanding predicts novel therapies. *Annals of Internal Medicine*, 140(8), pp.627-638.
- Senechal, Y., Larmet, Y. & Dev, K.K., 2006. Unraveling in vivo functions of amyloid precursor protein: insights from knockout and knockdown studies. *Neuro-Degenerative Diseases*, 3(3), pp.134-147.
- Sennvik, K. et al., 2000. Levels of alpha- and beta-secretase cleaved amyloid precursor protein in the cerebrospinal fluid of Alzheimer's disease patients. *Neuroscience Letters*, 278(3), pp.169-172.

- Sharma, S., Rakoczy, S. & Brown-Borg, H., 2010. Assessment of spatial memory in mice. *Life Sciences*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20837032> [Accessed October 11, 2010].
- Shen, M. & Thayer, S.A., 1998. Cannabinoid receptor agonists protect cultured rat hippocampal neurons from excitotoxicity. *Molecular Pharmacology*, 54(3), pp.459-462.
- Sherrington, R. et al., 1995. Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature*, 375(6534), pp.754-760.
- Shoemaker, J.L. et al., 2007. The CB2 cannabinoid agonist AM-1241 prolongs survival in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis when initiated at symptom onset. *Journal of Neurochemistry*, 101(1), pp.87-98.
- Sinha, S. & Lieberburg, I., 1999. Cellular mechanisms of beta-amyloid production and secretion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(20), pp.11049-11053.
- Slipetz, D.M. et al., 1995. Activation of the human peripheral cannabinoid receptor results in inhibition of adenylyl cyclase. *Molecular Pharmacology*, 48(2), pp.352-361.
- Small, D.H. et al., 1999. Neurite-outgrowth regulating functions of the amyloid protein precursor of Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease: JAD*, 1(4-5), pp.275-285.
- Small, D.H. et al., 1994. A heparin-binding domain in the amyloid protein precursor of Alzheimer's disease is involved in the regulation of neurite outgrowth. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 14(4), pp.2117-2127.
- Soba, P. et al., 2005. Homo- and heterodimerization of APP family members promotes intercellular adhesion. *The EMBO Journal*, 24(20), pp.3624-3634.
- Spires, T. & Hyman, B., 2005. Transgenic models of Alzheimer's disease: learning from animals. *NeuroRx*, 2(3), pp.423-37.
- Spires, T.L. & Hyman, B.T., 2005. Transgenic models of Alzheimer's disease: learning from animals. *NeuroRx: The Journal of the American Society for Experimental Neurotherapeutics*, 2(3), pp.423-437.
- Stalder, M. et al., 1999. Association of microglia with amyloid plaques in brains of APP23 transgenic mice. *The American Journal of Pathology*, 154(6), pp.1673-1684.
- Steffens, S. et al., 2005. Low dose oral cannabinoid therapy reduces progression of atherosclerosis in mice. *Nature*, 434(7034), pp.782-786.

- Stein, T.D. et al., 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. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 24(35), pp.7707-7717.
- Stella, N., Schweitzer, P. & Piomelli, D., 1997. A second endogenous cannabinoid that modulates long-term potentiation. *Nature*, 388(6644), pp.773-778.
- van der Stelt, M. et al., 2006. Endocannabinoids and beta-amyloid-induced neurotoxicity in vivo: effect of pharmacological elevation of endocannabinoid levels. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 63(12), pp.1410-1424.
- van der Stelt, M. & Di Marzo, V., 2003. The endocannabinoid system in the basal ganglia and in the mesolimbic reward system: implications for neurological and psychiatric disorders. *European Journal of Pharmacology*, 480(1-3), pp.133-150.
- Storey, E., Beyreuther, K. & 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 Research*, 735(2), pp.217-231.
- Sturchler-Pierrat, C. et al., 1997. Two amyloid precursor protein transgenic mouse models with Alzheimer disease-like pathology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(24), pp.13287-13292.
- Sturchler-Pierrat, C. & Staufenbiel, M., 2000. Pathogenic mechanisms of Alzheimer's disease analyzed in the APP23 transgenic mouse model. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 920, pp.134-139.
- Sugiura, T. et al., 1995. 2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 215(1), pp.89-97.
- Sun, Y. et al., 2006. Cannabinoids and PPARalpha signalling. *Biochemical Society Transactions*, 34(Pt 6), pp.1095-1097.
- Suzuki, N. et al., 1994. An increased percentage of long amyloid beta protein secreted by familial amyloid beta protein precursor (beta APP717) mutants. *Science (New York, N.Y.)*, 264(5163), pp.1336-1340.
- Szabo et al., 2008. Pharmacology of Cannabinoid Receptors. BIOTREND (Review No.2/2-2008).

- Takahashi, R.H. et al., 2002. Intraneuronal Alzheimer abeta42 accumulates in multivesicular bodies and is associated with synaptic pathology. *The American Journal of Pathology*, 161(5), pp.1869-1879.
- Tanzi, R.E. et al., 1988. Protease inhibitor domain encoded by an amyloid protein precursor mRNA associated with Alzheimer's disease. *Nature*, 331(6156), pp.528-530.
- Thal, D.R. et al., 2005. The impact of argyrophilic grain disease on the development of dementia and its relationship to concurrent Alzheimer's disease-related pathology. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 31(3), pp.270-279.
- Thinakaran, G. et al., 1996. Metabolism of the "Swedish" amyloid precursor protein variant in neuro2a (N2a) cells. Evidence that cleavage at the "beta-secretase" site occurs in the golgi apparatus. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(16), pp.9390-9397.
- Thullier, F. et al., 1997. Neurobehavioral evaluation of lurcher mutant mice during ontogeny. *Brain Research. Developmental Brain Research*, 100(1), pp.22-28.
- Tian, Y. et al., 2010. An APP inhibitory domain containing the Flemish mutation residue modulates gamma-secretase activity for Abeta production. *Nature Structural & Molecular Biology*, 17(2), pp.151-158.
- Tsukuda, K. et al., 2009. Cognitive deficit in amyloid-beta-injected mice was improved by pretreatment with a low dose of telmisartan partly because of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activation. *Hypertension*, 54(4), pp.782-787.
- Turner, P.R. et al., 2003. Roles of amyloid precursor protein and its fragments in regulating neural activity, plasticity and memory. *Progress in Neurobiology*, 70(1), pp.1-32.
- Van Dam, D. et al., 2003. Age-dependent cognitive decline in the APP23 model precedes amyloid deposition. *The European Journal of Neuroscience*, 17(2), pp.388-396.
- Van Dijk, A. et al., 2008. Evaluation of the APP23-model for Alzheimer's disease in the odour paired-associate test for hippocampus-dependent memory. *Behavioural Brain Research*, 190(1), pp.147-151.
- Van Gaal, L.F. et al., 2005. Effects of the cannabinoid-1 receptor blocker rimonabant on weight reduction and cardiovascular risk factors in overweight patients: 1-year experience from the RIO-Europe study. *Lancet*, 365(9468), pp.1389-1397.
- Varma, N. et al., 2001. Metabotropic glutamate receptors drive the endocannabinoid system in hippocampus. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 21(24), p.RC188.

- Varvel, S.A., Anum, E.A. & Lichtman, A.H., 2005. Disruption of CB(1) receptor signaling impairs extinction of spatial memory in mice. *Psychopharmacology*, 179(4), pp.863-872.
- Varvel, S.A. & Lichtman, A.H., 2002. Evaluation of CB1 receptor knockout mice in the Morris water maze. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 301(3), pp.915-924.
- Verdile, G., Gandy, S.E. & Martins, R.N., 2007. The role of presenilin and its interacting proteins in the biogenesis of Alzheimer's beta amyloid. *Neurochemical Research*, 32(4-5), pp.609-623.
- Vloeberghs, E. et al., 2006. APP23 mice display working memory impairment in the plus-shaped water maze. *Neuroscience Letters*, 407(1), pp.6-10.
- Volicer, L. et al., 1997. Effects of dronabinol on anorexia and disturbed behavior in patients with Alzheimer's disease. *International Journal of Geriatric Psychiatry*, 12(9), pp.913-919.
- Walsh, D.M. & Selkoe, D.J., 2007. A beta oligomers - a decade of discovery. *Journal of Neurochemistry*, 101(5), pp.1172-1184.
- Walther, S. et al., 2006. Delta-9-tetrahydrocannabinol for nighttime agitation in severe dementia. *Psychopharmacology*, 185(4), pp.524-528.
- Wee Yong, V., 2010. Inflammation in neurological disorders: a help or a hindrance? *The Neuroscientist: A Review Journal Bringing Neurobiology, Neurology and Psychiatry*, 16(4), pp.408-420.
- Weidemann, A. et al., 1989. Identification, biogenesis, and localization of precursors of Alzheimer's disease A4 amyloid protein. *Cell*, 57(1), pp.115-126.
- Westlake, T.M. et al., 1994. Cannabinoid receptor binding and messenger RNA expression in human brain: an in vitro receptor autoradiography and in situ hybridization histochemistry study of normal aged and Alzheimer's brains. *Neuroscience*, 63(3), pp.637-652.
- Wilson, C.A., Doms, R.W. & Lee, V.M., 1999. Intracellular APP processing and A beta production in Alzheimer disease. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 58(8), pp.787-794.
- Wilson, R.I. & Nicoll, R.A., 2001. Endogenous cannabinoids mediate retrograde signalling at hippocampal synapses. *Nature*, 410(6828), pp.588-592.
- Wirths, O. et al., 2008. Deficits in working memory and motor performance in the APP/PS1ki mouse model for Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, 29(6), pp.891-901.

- Wirhth, O., Multhaup, G. & Bayer, T.A., 2004. A modified beta-amyloid hypothesis: intraneuronal accumulation of the beta-amyloid peptide--the first step of a fatal cascade. *Journal of Neurochemistry*, 91(3), pp.513-520.
- Wirhth, O. et al., 2007. Age-dependent axonal degeneration in an Alzheimer mouse model. *Neurobiology of Aging*, 28(11), pp.1689-1699.
- Wirhth, O. et al., 2006. Axonopathy in an APP/PS1 transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Acta Neuropathologica*, 111(4), pp.312-319.
- Wisniewski, K.E. et al., 1985. Alzheimer's disease in Down's syndrome: clinicopathologic studies. *Neurology*, 35(7), pp.957-961.
- Wittmann, C.W. et al., 2001. Tauopathy in *Drosophila*: neurodegeneration without neurofibrillary tangles. *Science (New York, N.Y.)*, 293(5530), pp.711-714.
- Wolozin, B. et al., 1995. Transforming growth factor beta induces a beta-responsive calcium fluxes in neurons. *Neuroreport*, 6(10), pp.1429-1433.
- Wotjak, C.T., 2005. Role of endogenous cannabinoids in cognition and emotionality. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 5(7), pp.659-670.
- Yamaguchi, H. et al., 1989. Electron micrograph of diffuse plaques. Initial stage of senile plaque formation in the Alzheimer brain. *The American Journal of Pathology*, 135(4), pp.593-597.
- Yang, H. et al., 2007. New protein kinase C activator regulates amyloid precursor protein processing in vitro by increasing alpha-secretase activity. *The European Journal of Neuroscience*, 26(2), pp.381-391.
- Yankner, B.A., Duffy, L.K. & Kirschner, D.A., 1990. Neurotrophic and neurotoxic effects of amyloid beta protein: reversal by tachykinin neuropeptides. *Science (New York, N.Y.)*, 250(4978), pp.279-282.
- Zhao, P. et al., 2008. Altered presymptomatic AMPA and cannabinoid receptor trafficking in motor neurons of ALS model mice: implications for excitotoxicity. *The European Journal of Neuroscience*, 27(3), pp.572-579.
- Zheng, H. & Koo, E.H., 2006. The amyloid precursor protein: beyond amyloid. *Molecular Neurodegeneration*, 1, p.5.
- Zhu, X. et al., 2002. The role of mitogen-activated protein kinase pathways in Alzheimer's disease. *Neuro-Signals*, 11(5), pp.270-281.
- Zimmer, A. et al., 1999. Increased mortality, hypoactivity, and hypoalgesia in cannabinoid CB1 receptor knockout mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(10), pp.5780-5785.

- Zimmer, A. et al., 1999. Increased mortality, hypoactivity, and hypoalgesia in cannabinoid CB1 receptor knockout mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(10), pp.5780-5785.
- Zlokovic, B.V., 2008. The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders. *Neuron*, 57(2), pp.178-201.
- Zygmunt, P.M. et al., 1999. Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. *Nature*, 400(6743), pp.452-457.

7 Anhang

7.1 Danksagung

7.2 Erklärung

Ich erkläre hiermit, die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt zu haben.

Mainz, den

Christoph Stumm

7.3 Lebenslauf

7.4 Publikationen

Die Ergebnisse dieser Arbeit werden in folgender wissenschaftlichen Publikation veröffentlicht.

Für meine Familie