

Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
(Direktor: Prof. Dr. med. Dr. agr. Bernd Fischer)

Institut Anatomie II der Medizinischen Fakultät der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main
(Direktor: Prof. Dr. med. Horst-Werner Korf)

**Neue Wirkmechanismen von Cannabinoiden bei der
exzitotoxischen neuronalen Schädigung:
Untersuchungen am Modell der organotypischen hippocampalen Schnittkulturen**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt
der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Charlotte Sophie Böttger
geboren am 19.09.1987 in Frankfurt am Main

Betreuer: Prof. Dr. med. Faramarz Dehghani

Gutachter: Prof. Dr. med. Faramarz Dehghani
Prof. Dr. med. Christian Strauss
Prof. Dr. med. Doychin Angelov

Verteidigungsdatum: 22.07.2013

Referat

Akute neuronale Läsionen gehen für die Betroffenen oft mit schwerwiegenden sensiblen, motorischen und psychosozialen Einschränkungen einher. Exo- und endogene Cannabinoide (CB) sind zur Behandlung zunehmend in den Fokus wissenschaftlichen Interesses gerückt. Speziell Palmitylethanolamin (PEA), das Endocannabinoid 2-Arachidonylglycerol (2-AG) und das synthetische Cannabinoid WIN 55,212-2 (WIN) sollten in der vorliegenden Arbeit auf ihr neuroprotektives Potential und ihre Angriffspunkte hin untersucht werden.

Für die Untersuchung wurde das Modell der organotypischen hippocampalen Schnittkultur (OHSC) gewählt. Die exzitotoxische neuronale Läsion wurde durch NMDA Applikation induziert und anhand der Anzahl degenerierender Neurone, markiert mit dem Fluorochrom Propidium Iodid, in der Körnerzellschicht des Gyrus dentatus (DG) bestimmt. Außerdem wurde die Zahl der Mikrogliazellen, gekennzeichnet durch Isolektin B₄, im Bereich des DG quantifiziert. Hierzu wurden die markierten Neurone und Mikrogliazellen mit einem konfokalen Laserscanningmikroskop visualisiert und die anschließende quantitative Erfassung statistisch analysiert. Um die Angriffspunkte von PEA, 2-AG und WIN zu untersuchen, wurden außerdem Antagonisten gegen CB Rezeptoren, den *abnormal cannabidiol-sensitive receptor* (abn-CBD Rezeptor) und *peroxisome proliferator-activated receptors* (PPARs) eingesetzt.

In den durchgeführten experimentellen Arbeiten konnte PPAR α als der die neuroprotektiven Effekte von PEA in der OHSC vermittelnde Rezeptor identifiziert werden. 2-AG und *abnormal cannabidiol* (abn-CBD) zeigten in der OHSC neuroprotektive Eigenschaften, die über den abn-CBD Rezeptor auf Mikrogliazellen vermittelt scheinen, da bei Depletion der Mikrogliazellen die neuroprotektiven Effekte von 2-AG und abn-CBD aufgehoben wurden. Nach Behandlung exzitotoxisch geschädigter OHSC mit WIN könnte der CB1 Rezeptor für die neuroprotektiven Effekte identifiziert werden. Weiterführende Untersuchungen der Arbeitsgruppe konnten bereits modulierende Einflüsse von *transient receptor potential ankyrin* (TRPA1) Kanälen und spannungsabhängigen Calciumkanälen beim Einsatz von hohen WIN Konzentrationen aufzeigen. Die vorliegende Arbeit erweitert das Wissen über Cannabinoid vermittelte Neuroprotektion, indem neue Wirkmechanismen für PEA, 2-AG und WIN dargestellt werden. Die Befunde beschreiben relevante Angriffspunkten, die als potentielle therapeutische Ziele bei der Behandlung akuter neuronaler Läsionen Verwendung finden könnten.

Böttger, Charlotte Sophie: Neue Wirkmechanismen von Cannabinoiden bei der exzitotoxischen neuronalen Schädigung: Untersuchungen am Modell der organotypischen hippocampalen Schnittkulturen, Halle (Saale), Univ., Med. Fak., Diss., 80 Seiten, 2012

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	IV
1 Einleitung	1
1.1 Neuronale Läsion	1
1.1.1 Pathophysiologie des zerebralen Traumas	1
1.1.2 Permeabilitätsverlust der Blut-Hirn-Schranke	3
1.1.3 Mirkogliazellen im Kontext der neuronalen Läsion	4
1.2 Cannabinoide	6
1.2.1 Cannabinoide im Rückblick	6
1.2.2 Das Endocannabinoidsystem	7
1.2.3 Cannabinoide bei der akuten neuronalen Schädigung	9
1.3 Palmitylethanolamin (PEA)	10
1.3.1 Entdeckung von PEA	10
1.3.2 Biosynthese und Abbau von PEA	11
1.3.3 PEA und der <i>peroxisome proliferator-activated receptor</i> (PPAR)	13
1.4 2-Arachidonylglycerol (2-AG) als Endocannabinoid	16
1.4.1 Biosynthese und Abbau von 2-AG	16
1.4.2 2-AG bei der neuronalen Läsion und der <i>abnormal cannabdiol-sensitive receptor</i> (abn-CBD Rezeptor)	17
1.5 WIN-55,212-2 (WIN) als synthetisches Cannbinoid	18
1.6 Die Organotypische Hippokampale Schnittkultur (OHSC)	20
2 Zielsetzung der Arbeit	22
2.1 Generelle Zielsetzung	22
2.2 Ziel beim Einsatz von PEA	22
2.3 Ziel beim Einsatz von 2-AG	23
2.4 Ziel beim Einsatz von WIN	23
3 Material und Methoden	23
3.1 Versuchstiere	23
3.2 Verwendete Substanzen und Pufferlösungen	23
3.2.1 Agonisten und Antagonisten	23
3.2.2 Lektine und Färbereagenzien	24
3.2.3 Pufferlösungen	25
3.3 Aufbereitung und Zusammensetzung der Medien zur Präparation und Kultivierung von Schnittkulturen	25
3.3.1 Präparationsmedium	25

3.3.2	Kulturmedium	25
3.3.3	Herstellung der Agarblöcke	25
3.4	Fertigung der OHSC	25
3.4.1	Benötigte Materialien zur Vorbereitung des Arbeitsplatzes	25
3.4.2	Präparation der OHSC	26
3.5	Behandlungsschema und experimentelle Gruppen	27
3.6	Markierung degenerierter Neurone in der OHSC	28
3.7	Fixierung der OHSC	28
3.8	Kennzeichnung und Visualisierung von Mikrogliazellen in der OHSC	29
3.9	Datenauswertung und -analyse	29
3.9.1	Quantitative Erfassung der Mikrogliazellen und degenerierender Neurone	29
3.10	Statistische Auswertung	30
4	Ergebnisse	30
4.1	Anwendung der NMDA induzierten exzitotoxischen Schädigung in der OHSC	30
4.2	Untersuchung des Cannabimimetikums PEA am Modell der exzitotoxischen Schädigung in der OHSC	30
4.2.1	Wirkung von PEA und des PPAR α Agonisten Wy-14,643 auf neuronales Überleben und Mikrogliazellen	30
4.2.2	Effekte beim Einsatz von PPAR Antagonisten	34
4.3	Ergebnisse zu 2-AG und der Rolle des abn-CBD Rezeptors im Schädigungsmodell der OHSC	37
4.3.1	Wirkungen von 2-AG und abn-CBD auf neuronales Überleben und Mikrogliazellen	37
4.3.2	Ergebnisse der Applikation von 2-AG und abn-CBD nach Depletion der Mikrogliazellen	43
4.4	Beobachtungen zu WIN und seinen Angriffspunkten in der exzitotoxisch geschädigten OHSC	45
4.4.1	Auswirkungen von WIN auf das neuronale Überleben	45
4.4.2	Einfluss von CB1 und CB2 Rezeptor Antagonisten	46
5	Diskussion	49
5.1	PEA als neuroprotektives Agens	50
5.2	Kontroverse um den Angriffspunkt von PEA	50
5.3	PEA vermittelt neuroprotektive Effekte in der OHSC über PPAR α	52

5.4	2-AG als neuroprotektiver Modulator neuronaler Läsion und Inflammation	53
5.5	Der abn-CBD Rezeptor auf Mikrogliazellen vermittelt neuroprotektive Eigenschaften von 2-AG in der OHSC	53
5.6	WIN als neuroprotektive Substanz	56
5.7	Neue Angriffspunkte für WIN	57
5.8	Ausblick	61
6	Zusammenfassung	64
7	Literaturverzeichnis	71
8	Thesen	79

Anhang

Tabellarischer Lebenslauf

Selbstständigkeitserklärung

Erklärung über frühere Promotionsversuche

Danksagung

Abkürzungsverzeichnis

Abn-CBD	abnormal cannabidiol
Abn-CBD Rezeptor	abnormal cannabidiol-sensitive receptor
AEA	Arachidonylethanolamin, Anandamid
2-AG	2-Arachidonylglycerol
AITC	Allylisothiocyanat
BKCa	large-conductance Ca^{2+} - and voltage-activated K^{+}
CA	Cornu Ammonis, Ammonshorn
Ca^{2+}	Calcium
Caspasen	Cysteinyl-Aspartat-spezifische Proteinasen
CB	Cannabinoid
CBD	Cannabidiol
CTL	Kontrolle
COX-2	Cyclooxygenase-2
DAG	sn-1-acyl-Arachidonylglycerol
DAGL	sn-1 selektive Diacylglycerollipase
DG	dentate gyrus, Gyrus dentatus
DSMO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EC	Entorinaler Kortex
EMSA	electro mobility shift assay
FAAH	fatty acid amid hydrolase
GABA	γ -aminobutyric acid, γ -Aminobuttersäure
G-Protein	Guaninnucleotid bindendes Protein
GPR(55)	G-Protein gekoppelter Rezeptor (55)
HBSS	Hanks' balanced salt solution
HI	Hilusregion
IB ₄	Isolektin B ₄
IL	Interleukin
ICR	Ionotrope CB Rezeptoren
K^{+}	Kalium
MAGL	Monoacylglycerollipase
MAPK	Mitogen aktivierte Proteinkinase
MEM	minimal essential medium
NAPE	N-Acyl Phosphatidylethanolamin
NAT	N-Acetyltransferase

NFAT	nuclear factor of activated t-cells
NF-κB	nuclear factor-κ binding protein
NHS	Normal Horse Serum
NMDA	N-methyl-D-Aspartat
NO	Stickstoffmonoxid
OEA	Oleylethanolamin
OHSC	Organotypische Hippokampale Schnittkultur
PAA	PEA-prefering acid amidase
PE	Phosphatidylethanolamin(e)
PEA	Palmitylethanolamin
PL(C/D)	Phospholipase (C/D)
PPAR(s)	peroxisome proliferator-activated receptor(s)
PPRE	PPAR responsive element
PI	Propidium Iodid
RhoA	ras homologue gene family, member A
RXR	Retinsäurerezeptor
SNARE	soluble n-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor
STAT	signal transducer and activator of transcription
SUB	Subiculum
TGF	tumor growth factor
THC	(-)-Δ ⁹ -trans-Tetrahydrocannabinol
TNF	Tumornekrosefaktor
TRP(V/A)	transient receptor potential (vanilloid/ankyrin)
WIN	WIN 55,212-2
ZNS	Zentralnervensystem

1 Einleitung

1.1 Neuronale Läsion

Akute zerebrale Läsionen gehen für die Betroffenen häufig mit gravierenden langfristigen Einschränkungen einher. Die Ätiologie des Verlustes neuronalen Gewebes ist dabei vielseitig. So kommen traumatische Gewebeverletzungen, intrakranielle Blutungen, aber auch hypoxische oder entzündliche Zustände als mögliche Ursachen neuronaler Degeneration in Frage. Irreversible Defektzustände nach Hirnverletzungen sind geprägt durch neurologische und psychische Störungen beziehungsweise Ausfälle, welche wesentlich von Lokalisation und Umfang des betroffenen Areals abhängen. Veränderungen der Persönlichkeitsstruktur, der amnestischen Funktion und des Antriebs sind mögliche Folgen einer zerebralen Läsion. Motorische und sensible Einschränkungen oder Ausfälle können für die Betroffenen gravierende Einbußen der Beweglichkeit und der zwischenmenschlichen Kommunikation, etwa bei Störungen der Sprache, und der sozialen Integration bedeuten und sie im schwerwiegenden Fall von äußerer Hilfe abhängig werden lassen. Daher bedarf es langfristiger rehabilitativer Maßnahmen, die jedoch häufig nur unterstützend wirken und die neuronale Läsion nicht aufheben können.

Die Protektion der Neurone vor einer irreversiblen Manifestation der Läsion stellt somit ein erstrebenswertes Therapieziel dar und verlangt nach der Exploration neuer Therapieansätze. Grundlagenforschung hierzu wird in der vorliegenden Arbeit präsentiert. Dabei stehen die Cannabinoide Palmitylethanolamin (PEA) und 2-Arachidonylglycerol (2-AG) und WIN-55,212 (WIN) im Zentrum. Es soll dargelegt werden, ob und über welche Angriffspunkte sie neuroprotektive Effekte erzielen können.

Zunächst wird nun auf die pathophysiologischen Prozesse im Rahmen des zerebralen Traumas eingegangen und anschließend die im Fokus der Arbeit stehende Substanzgruppe der Cannabinoide vorgestellt.

1.1.1 Pathophysiologie des zerebralen Traumas

Das akute zerebrale Trauma ist durch zwei Schädigungsphasen gekennzeichnet: die Primärschädigung und die Sekundärschädigung. Die Primärschädigung bezeichnet die Läsion der Neurone als sofortige Konsequenz des traumatischen Ereignisses. Sie ist bereits nach der ersten Stunde irreversibel (Blight, 1985; Tator und Fehlings, 1991; Young, 1993). Die Blut-Hirn-Schranke (siehe unten) wird gestört, wodurch jetzt auch periphere Immunzellen das neuronale Überleben beeinflussen können. Eine Reihe verschiedenster biochemischer Prozesse bedingen nun den Sekundärschaden. Hierbei spielen ischämische, inflammatorische und zytotoxische Prozesse eine Rolle. Einer der für die Sekundärschädigung bedeutendsten Faktoren ist die exzessive

Freisetzung von Neurotransmitter wie Glutamat und Aspartat, wobei die hierdurch hervorgerufene Exzitotoxizität als hauptsächliche Ursache des akuten sowie verzögerten Neuronenuntergangs bei traumatischen, vaskulären und degenerativen Erkrankungen des ZNS allgemein akzeptiert ist (Choi, 1988;Goldberg et al., 1988). Die Aktivierung des N-methyl-D-Aspartat (NMDA) Rezeptors führt zu einer Veränderung der Zellmembrandurchlässigkeit, die eine Erhöhung des intrazellulärem Calcium- und Natriumspiegels nach sich zieht und in einer Aktivierung von Calcineurin und Calmodulin resultiert. Letztendliche Folge ist die Axonzerstörung (Bullock et al., 1998;Smith et al., 2003). Außerdem geht der Einstrom von Calcium in die betroffenen Neurone mit einem massiven Einstrom von Natriumionen einher. Die Zelle wird depolarisiert und nachfolgend strömt Wasser in das Zellinnere, wodurch es zur Neuronschwellung kommt (Choi, 1988). Der exzessive Calciumeinstrom führt zudem über die Freisetzung von Stickstoffmonoxid (NO) zur Manifestation der exzitotoxischen Schädigung (Garthwaite et al., 1988). Eine komplexe Kaskade zellulärer Entzündungsprozesse treibt den sekundären Schädigungsprozess kontinuierlich Stunden bis Tage nach der primären Läsion an. Im wesentlichen sind hier Wachstumsfaktoren, Katecholamine, Neurokinine, Zytokine und Chemokine beteiligt (Ghirnikar et al., 1998). Die primäre Schädigung resultiert außerdem in einer gestörten zerebralen Zirkulation, die wiederum eine ischämische Zellschädigung bedingt. Diese wird durch Hypotension, Hypoxie, einen erhöhten intrakraniellen Druck, Ödeme, fokale Gewebskompression, Mikrovaskulationsschäden und Vasospasmen begünstigt (Hlatky et al., 2003;Martin et al., 1997).

Apoptose, der so genannte programmierte Zelltod, wird als ein weiterer Prozess im Rahmen der Sekundärschädigung beschrieben (Rink et al., 1995). Es liegt hier ein aktiver Mechanismus zur Elimination von Zellen unter Einbeziehung spezifischer Gene und Proteine zugrunde. Im Zentrum steht eine Familie von Proteasen, die den Namen Caspasen (Cysteinyl-Aspartat-spezifische Proteinasen) tragen (Alnemri et al., 1996). Nach zerebralem Trauma ist die Expression der für die Gruppe der Caspasen codierenden Gene sowie einer zu dem Onkogen Bcl-2 homologen Genfamilie, die den Zelltod sowohl fördern als auch unterdrücken können, gesteigert (Clark et al., 1999;Graham et al., 2000;Kroemer, 1997;Yang und Korsmeyer, 1996). Demgegenüber steht die der primären zerebralen Läsion folgende Nekrose. Nach einem zerebralen Trauma können sowohl nekrotische Zellen beobachtet werden, als auch Zellen, die die typischen morphologischen Charakteristika der Apoptose aufweisen (Clark et al., 1999;Rink et al., 1995). Ganz im Gegensatz zu nekrotisierenden Zellen, die aufgrund von ATP-Mangel und letztlich dem Versagen membranständiger Ionenpumpen zugrunde gehen, bleibt die Zellmembran

apoptotischer Zellen weitestgehend intakt und als Folge werden weniger inflammatorische Reaktionen ausgelöst, weshalb die Apoptose als protektive Antwort des Gehirns verstanden wird (Tolias und Bullock, 2004). Möglicherweise werden so geschädigte Gewebszellen mit wenigen Auswirkungen auf das umliegende Gewebe eliminiert (Raghupathi, 2004).

Bei Betrachtung der langfristigen pathophysiologischen Auswirkungen eines zerebralen Traumas zeigte sich eine generalisierte Gehirnatrophie, die in ihrer Ausprägung der Schwere der ursprünglichen Läsion proportional ist (Carrier et al., 2004; Yount et al., 2002). Beim Vergleich anoxischer und traumatischer zerebraler Schädigung zeigte sich, dass das Ausmaß des Gewebeuntergangs, nicht aber die Ätiologie, der die kognitiven und emotionalen Funktionen beeinflussende Faktor ist, was für einen gleichen finalen Mechanismus neuronaler Schädigung unabhängig vom Typ des initialen Schadens spricht (Hopkins et al., 2005). Der Verlauf zerebraler Schädigung kann durch nicht dem ZNS zugehörige Zellen mitbestimmt werden, wenn nämlich die Integrität der Blut-Hirn-Schranke gestört wird.

1.1.2 Permeabilitätsverlust der Blut-Hirn-Schranke

Die Blut-Hirn-Schranke ist eine Barriere zwischen dem Lumen zerebraler Blutgefäße und dem Gehirnparenchym. Die luminal durch *tight junctions* verbundenen Endothelzellen bilden die interendotheliale Schranke. Außen werden die Endothelzellen von einer Basalmembran bedeckt, die wiederum von Perizyten umgeben ist, denen Astrozytenfortsätze aufsitzen. Die Perizyten sind definitionsgemäß Teil der Gefäßwand und befinden sich im sogenannten ersten Kompartiment an den sich der perivaskuläre (Virchow/Robin) Raum anschließt, der wiederum vom juxtavaskulären Parenchym umgeben wird (Krueger und Bechmann, 2010). Die Gesamtheit dieser Strukturen wird als *neurovascular unit* bezeichnet (Saunders et al., 2008). Im Falle verschiedener pathophysiologischer Bedingungen kann es zur Zerstörung der Blut-Hirn-Schranke in den betroffenen Gebieten kommen. Eine Entzündungsreaktion tritt auf, die weitere Schäden der Blut-Hirn-Schranke nach sich zieht und den Sekundärschaden des umliegenden Gewebes weiter fördert (Saunders et al., 2008). So geht beispielsweise eine durch Interleukin(IL)-17 induzierte Destruktion der Bluthirnschranke *in vitro* mit Bildung von reaktiven Sauerstoffradikalen einher, die wiederum zu einer Herabregulierung von *tight junctions* Molekülen und der Aktivierung des kontraktiven Apparates der Endothelzellen führen (Huppert et al., 2010). Es wurde darüber hinaus demonstriert, dass IL-17 *in vivo* die Adhäsion und Transmigration von Monozyten über die Bluthirnschranke steigert (Huppert et al., 2010). IL-17 und andere proinflammatorische Zytokine wie IL-1, IL-6 und der Tumornekrosefaktor (TNF) α führen zu Veränderungen in der Struktur der *tight*

junctions und so zu einer erhöhten Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke. Leukozyten aus der peripheren Blutbahn können in das verletzte Gehirnparenchym eindringen (Stolp und Dziegielewska, 2009). Das weitere neuronale Überleben wird nun durch die aus der Peripherie eingewanderten immunkompetenten Zellen und die im Gehirngewebe ansässigen Mikrogliazellen beeinflusst.

1.1.3 Mikrogliazellen im Kontext der neuronalen Läsion

Mikrogliazellen nehmen eine entscheidende Rolle als residente immunkompetente und phagozytierende Zellen des zentralen Nervensystems (ZNS) ein (Kreutzberg, 1996; Perry und Gordon, 1988; Streit, 2004). Sie fungieren als Phagozyten im Falle von traumatischen oder ischämischen Läsionen, Inflammation und Neurodegeneration im ZNS (Gonzalez-Scarano und Baltuch, 1999; McGeer und McGeer, 1995; Thomas, 1992). Sie stammen aus der myelomonocytyischen Zelllinie des Mesoderms (Ginhoux et al., 2010; Streit, 2001). Zwei im Vordergrund stehende Subpopulationen können in der prä- und frühen postnatalen Entwicklung differenziert werden: Eine hauptsächlich von extravaskulären Vorläuferzellen stammende Population, die während der Fetalzeit einwandert, differenziert und als Mikroglia im Parenchym persistiert, sowie eine zweite Population, die vor allem in der peri- und postnatalen Entwicklung auftritt und von zirkulierenden Vorläuferzellen abstammt (Chan et al., 2007). Im adulten ZNS machen Mikrogliazellen 5-20% der glialen Population aus und haben ein sehr hohes mitotisches Potential (Streit, 2004). Mikrogliazellen sind in der Lage, ihre Morphologie und die Expression verschiedener Zelloberflächenantigene in Abhängigkeit von ihrer Umgebung zu verändern (Lawson et al., 1990; Lawson et al., 1992).

So können Mikrogliazellen im adulten ZNS in verschiedenen Zuständen beobachtet werden (Abb. 1). Im Ruhezustand weist die Mikrogliazelle eine charakteristische ramifizierte Morphologie auf, welche die Rolle der Zelle als Sensor für biochemische oder bioelektrische Veränderungen, die ein pathologisches Geschehen signalisieren, widerspiegelt (Kreutzberg, 1996; Nimmerjahn et al., 2005; Streit et al., 1988). Im Rahmen pathologischer zerebraler Veränderungen, wie zum Beispiel nach einem Trauma, induzieren geschädigte Neurone die Aktivierung der ruhenden, ramifizierten Mikrogliazellen (Heppner et al., 1998). Die Mikrogliazelle geht in den aktivierten Zustand über und ihre Morphologie verändert sich in charakteristischer Weise: Der Zellkörper hypertrophiert unter Zurückziehen der Zellfortsätze. Die Zelle proliferiert, wird jedoch noch nicht zum Phagozyten (Streit et al., 1988). Moderate Schäden im ZNS resultieren zunächst in einer Übergangsform zwischen den beiden Zuständen, die morphologisch durch Hyperramifizierung charakterisiert ist (Wilson und Molliver, 1994). Nur wenn Zelldebris von degenerierenden Zellen eliminiert werden muss, folgt nach dem aktivierten Zustand die Transformation in eine phagozytierende Mikrogliazelle, die

in ihrer runden Erscheinung einem Makrophagen gleicht (Streit et al., 1988; Streit, 2004).



Abb. 1 Stadien der Mikrogliaktivierung

Mikrogliazellen können in mindestens drei morphologischen Stadien im ZNS identifiziert werden: Stadium 1, in der Abbildung links gezeigt, beschreibt ruhende, ramifizierte Mikrogliazellen, die im ZNS physiologischerweise vorkommen. Das 2. Stadium, in der Abbildung mittig dargestellt, ist charakterisiert durch aktivierte Mikrogliazellen, die reaktiv im Falle pathologischer Geschehen auftreten, aber nicht phagozytieren. Phagozytierende Mikrogliazellen mit runder Morphologie gehören dem Stadium 3 an und sind in der Abbildung rechts dargestellt (verändert nach Kettenmann, 2006).

Die oben genannte Proliferation aktivierter Mikrogliazellen geht mit einer Veränderung ihres Genexpressionsmusters einher (Potucek et al., 2006). Besonders im aktivierten Zustand sezernieren Mikrogliazellen ein weites Spektrum an Chemokinen, die sowohl para- als auch autokrin immunoregulatorisch wirken können (Ambrosini und Aloisi, 2004; Tambuyzer et al., 2009). Außerdem werden im Falle der neuronalen Entzündungsreaktion Zytokine exprimiert und sezerniert. So wird beispielsweise das proinflammatorische Zytokin TNF α von aktivierten Mikrogliazellen sezerniert (Sawada et al., 1989; Streit, 2002). IL-6 ist ein weiteres von Mikrogliazellen sezerniertes Interleukin. Es besitzt pro- und anti-inflammatorische Eigenschaften (Frei et al., 1989). Mikrogliazellen produzieren auch eine Reihe antiinflammatorischer Zytokine (z.B. IL-10, Tumor Growth Factor (TGF)), welche die Expression proinflammatorischer Zytokine, Chemokine und mit der Phagozytose assoziierte mikrogläre Moleküle herabregulieren (Wirjatijasa et al., 2002). Die morphologischen und immunphänotypischen Veränderungen, die Mikrogliazellen nach einer akuten Schädigung unterlaufen, sind reversibel: Die Zellen kehren in einer späteren Phase wieder in den Ruhezustand zurück (Streit, 2004).

1.2 Cannabinoide

1.2.1 Cannabinoide im Rückblick

Cannabis sativa, die Hanfpflanze, ist sowohl eine anerkannte Arzneipflanze als auch eine weit verbreitete Droge (Watson et al., 2000). Sie enthält circa sechzig Phytocannabinoide, von denen jedoch nur wenige bioaktiv sind, die spezifisch mit den körpereigenen membrangebundenen Cannabinoid (CB) Rezeptoren interagieren. Der wohl bekannteste Vertreter, das THC ((-)- Δ^9 -*trans*-Tetrahydrocannabinol), vermittelt einige der psychotropen Eigenschaften von *Cannabis sativa* (Hall und Solowij, 1998; Mechoulam und Gaoni, 1965). Mit Cannabinol und Cannabidiol (CBD) sind zwei weitere, jedoch nicht psychoaktive, Phytocannabinoide auf Grund ihrer ausgeprägten antiinflammatorischen Effekte in den Fokus wissenschaftlichen Interesses gerückt (Herring und Kaminski, 1999; Malfait et al., 2000).

Erste Hinweise auf therapeutische Eigenschaften von *Cannabis sativa* gibt es bereits aus dem Jahre 3000 vor Christus in China (Russo, 2007). Jedoch wurde die Pflanze erst im 19. Jahrhundert eingehend wissenschaftlich untersucht. Zunächst wurden die nichtpsychotropen Phytocannabinoide Cannabinol und CBD identifiziert und 1964 schließlich THC als psychoaktives Phytocannabinoid in *Cannabis sativa* nachgewiesen (Mechoulam und Gaoni, 1967). 1988 wurde die erste Ligandenbindungsstelle für THC im Gehirn charakterisiert (Devane et al., 1988). Zwei Jahre später wurde der Cannabinoid (CB)₁ Rezeptor molekular kloniert und weitere drei Jahre später wurde der zweite THC bindende Rezeptor, der CB₂ Rezeptor, auf Zellen des Immunsystems identifiziert (Devane et al., 1988; Matsuda et al., 1990; Munro et al., 1993). Substanzen von nichtcannabinoider Struktur, welche jedoch ebenfalls eine hohe intrinsische Aktivität an CB₁ und CB₂ Rezeptoren besitzen, wie zum Beispiel das Aminoalkylindol WIN-55,212 (WIN), wurden entwickelt und zur Charakterisierung und Kartierung von CB Rezeptoren im Gehirn eingesetzt (Howlett et al., 2002; Pacheco et al., 1993; Pertwee, 1999).

Bis vor wenigen Jahren wurde THC auf Grund des bestehenden Suchtpotentials und der Gefahr der Abhängigkeit therapeutisch ausschließlich zur antiemetischen Behandlung bei Patienten mit terminalen Leiden angewandt. Jedoch rückte die Identifizierung der CB₁ und CB₂ Rezeptoren Cannabinoide als therapeutische Mediatoren erneut in den Vordergrund. Klinische Studien mit nichtpsychotropen Phytocannabinoiden sowie synthetischen Cannabinoiden und Cannabisextrakten zur Behandlung von multipler Sklerose, traumatischer Rückenmarksläsionen und anderer neurologischer Pathologien wurden durchgeführt. Der Einsatz von Cannabinoiden bei der Behandlung chronischer Schmerzen, verschiedener Entzündungsprozesse,

Kopfverletzungen, dem Glaukom, der Epilepsie und psychiatrischer Erkrankungen wird diskutiert (Di Marzo und Petrocellis, 2006).

Die Entdeckung der CB Rezeptoren stieß außerdem die Suche nach körpereigenen Cannabinoiden an. Nach der Entdeckung von Anandamid (Arachidonylethanolamin, AEA), wurden noch weitere Lipide, unter ihnen 2-Arachidonylglycerol (2-AG), als endogene Cannabinoide, so genannte Endocannabinoide (Abb. 2), identifiziert und damit der Weg zur Erforschung der physiologischen und pathophysiologischen Relevanz des Endocannabinoidsystems gebahnt (Devane et al., 1992; Sugiura et al., 1995).

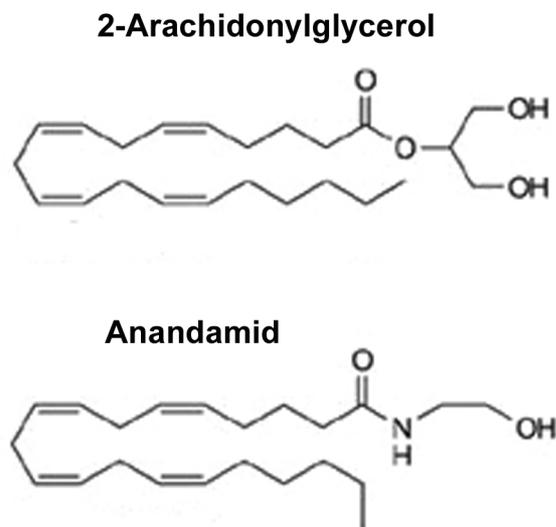


Abb. 2 Strukturformel der Endocannabinoide 2-Arachidonylglycerol (2 AG) und Anandamid (Arachidonylethanolamin, AEA) (verändert nach Piomelli, 2003)

1.2.2 Das Endocannabinoidsystem

CB1 und CB2 Rezeptor sind G-Protein gekoppelte Rezeptoren, die durch ihre α -Untereinheit die Aktivität intrazellulärer *second messenger* modulieren. Sie sind meist vom inhibitorischen, so genannten $G_{i/o}$ -Typ, und hemmen nach Ligandenbindung die Adenylatzyklase und stimulieren die Mitogen aktivierte Proteinkinase (MAPK). CB1 Rezeptoren sind außerdem an die Inhibition spannungsabhängiger Calcium (Ca^{2+})-Kanäle, die Stimulation einwärtsgerichteter Kalium (K^+)-Kanäle und die Aktivierung sowohl der Phospholipase C als auch der PI-3-Kinase gekoppelt. CB2 Rezeptoren stoßen zudem die Aktivierung der Ceramidsynthese an (Howlett et al., 2004).

Die Unterschiede psychotroper und peripherer THC-Effekte spiegeln sich in der Verteilung der CB Rezeptoren wieder. Der CB1 Rezeptor ist ein im ZNS sehr stark vorkommender G-Protein gekoppelter Rezeptor und ist hier besonders zahlreich in den

Basalganglien, dem Zerebellum, dem Kortex und dem Hippokampus vorhanden. CB1 Rezeptoren scheinen hauptsächlich präsynaptisch lokalisiert zu sein, wo sie die Ausschüttung verschiedener Neurotransmitter verhindern. Weiterhin ist der CB1 Rezeptor im peripheren Nervensystem und in einigen peripheren Organen zu finden, wohingegen der CB2 Rezeptor am häufigsten auf Immunzellen und in immunologisch aktivem Gewebe zu finden ist (Howlett et al., 2004).

Unter physiologischen Bedingungen greifen Cannabinoide in die synaptische Plastizität ein - sowohl kurzfristig als auch als Langzeiteffekt. So hemmen sie durch einen depolarisierenden Stimulus ausgelöst sowohl die exzitatorische als auch die inhibitorische Signaltransduktion und können außerdem eine Langzeitpotenzierung oder -depression modulieren (Wilson und Nicoll, 2002). Cannabinoide greifen so regulierend in kognitive Abläufe und emotionales Erleben ein und sind wirkungsverstärkend bei Suchtmittelkonsum (Gerdeman et al., 2003). Sie sind außerdem in der Lage, Bewegung und Haltung über Einflüsse auf das dopaminerge System zu modulieren (van der Stelt und Di Marzo, 2003). Die Effekte der Cannabinoide auf das sensorische und autonome Nervensystem werden hauptsächlich über CB1 Rezeptoren vermittelt, die Einfluss auf die Schmerzwahrnehmung und außerdem auf kardiovaskuläre und gastrointestinale Funktionen nehmen (Di Carlo und Izzo, 2003; Iversen und Chapman, 2002; Randall et al., 2002). CB1 Rezeptoren interagieren mit Hormonen, beeinflussen die Nahrungsaufnahme und die hypothalamisch-hypophysäre Achse und die Reproduktion (Maccarrone und Wenger, 2005). CB2 Rezeptoren auf der anderen Seite spielen eine Rolle bei zellulären, aber vor allem humoralen Immunreaktionen (Klein, 2005).

Zu den Aufgaben, die das Endocannabinoidsystem unter physiologischen Bedingungen wahrnimmt, kommen wichtige Aufgaben bei der Regulation pathophysiologischer Ereignisse. Endocannabinoide werden bei Schmerz- und Entzündungsgeschehen sowie bei Autoimmun- und allergischen Erkrankungen verstärkt synthetisiert. Sie werden außerdem bei kardiovaskulären, gastrointestinalen und metabolischen Erkrankungen, sowie im Falle von Krebsleiden gewebespezifisch vermehrt (Di Marzo und Petrocellis, 2006). Das Endocannabinoidsystem wird aktiviert, um die Auswirkungen des Schadens und der Stressoren zu minimieren. Hier können Endocannabinoide beispielsweise durch die retrograde Hemmung glutamaterger Neurone, diese selbst vor Exzitotoxizität schützen. Sie können appetithemmende Stimuli unterdrücken und nozizeptive Neurone hemmen, um so Analgesie hervorzurufen (Kirkham et al., 2002; Marsicano et al., 2003; Walker et al., 1999). Im Gegensatz zu diesen transienten Situationen können chronisch progressive

Erkrankungen zu einer ständigen Überaktivierung des Endocannabinoidsystems führen. Auch hier agieren Endocannabinoide zur Wiederherstellung der Homöostase und üben antiinflammatorische Effekte aus. Jedoch gibt es Hinweise dafür, dass die permanente Überaktivierung eventuell zur Unterhaltung krankheitsspezifischer Symptome, zum Beispiel beim Morbus Parkinson, beitragen kann (Di Marzo und Petrocellis, 2006;van der Stelt et al., 2005). Eine generelle Einteilung in protektive Mechanismen im Falle akuter Bedingungen und krankheitsfördernde Effekte bei chronischen Erkrankungen scheint jedoch nicht möglich. Bei einigen neurodegenerativen Erkrankungen wie beispielsweise der amyotrophen Lateralsklerose induziert das Endocannabinoidsystem protektive Effekte über CB1 und CB2 Rezeptoren (Di Marzo und Petrocellis, 2006). Diese ambivalente Rolle des Endocannabinoidsystems verlangt nach weiterer eingehender Aufklärung der Bedeutung und den Wirkmechanismen von Cannabinoiden bei pathologischen Geschehen.

1.2.3 Cannabinoide bei der akuten neuronalen Schädigung

Im ZNS vermitteln Endocannabinoide als retrograde Botenstoffe Signale zwischen post- und präsynaptischem Neuron. So kommt es nach Erregung eines postsynaptischen Neurons zur Synthese der Endocannabinoide, die nach Freisetzung im synaptischen Spalt retrograd zu CB1 Rezeptoren an der Präsynapse gelangen. Deren Aktivierung verhindert schließlich die Ausschüttung der Transmitter, die auslösend für die ursprüngliche De- oder Hyperpolarisation an der Postsynapse waren (Freund et al., 2003;Piomelli, 2003;Wilson und Nicoll, 2002; Abb. 3). Das Endocannabinoidsystem übt so eine wichtige Kontrolle über exzessive synaptische Aktivität aus und ist in der Lage, die massive Glutamatfreisetzung bei Exzitotoxizität zu hemmen (Freund et al., 2003;Katona et al., 2006;Katona und Freund, 2008).

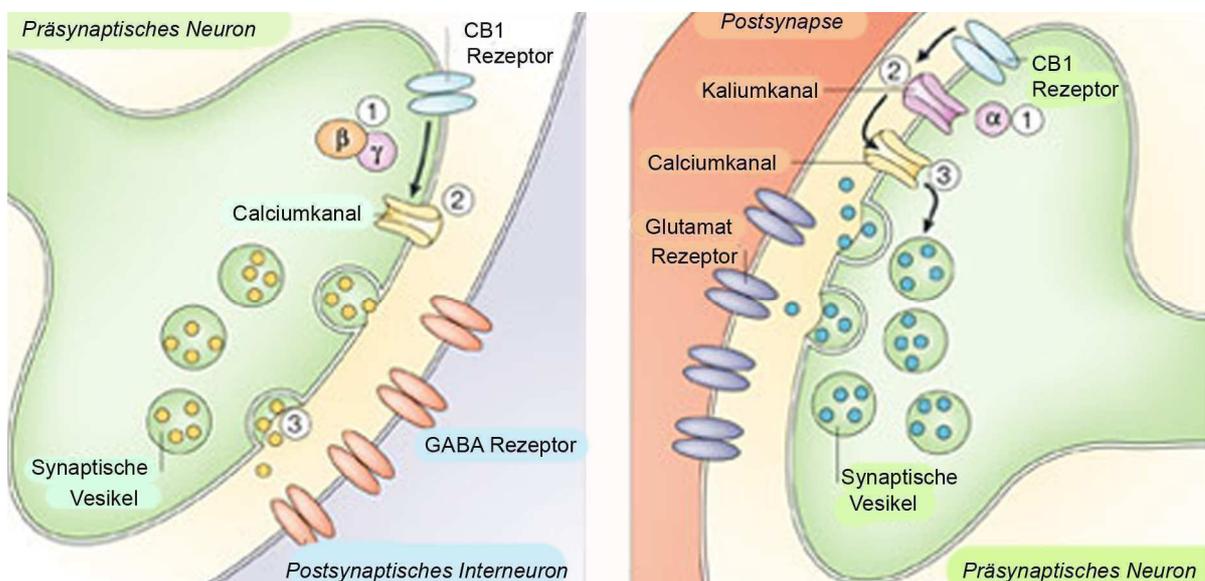


Abb. 3 Regulation der präsynaptischen Neurotransmitterfreisetzung durch CB1 Rezeptoren (siehe bitte vorherige Seite)

Die Abbildung linksseitig zeigt beispielhaft die Aktivierung präsynaptischer G-Protein gekoppelter CB1 Rezeptoren an einer GABA(γ -Aminobuttersäure)ergen Synapse, die mit der Aktivierung der β - γ -G-Protein-Untereinheit (1) einhergehen kann. Die intrazelluläre Signalkaskade setzt sich über den Schluss spannungsgesteuerter Ca^{2+} -Kanäle (2) und die folgende Hemmung der Freisetzung von GABA (3) fort. An glutamatergen Synapsen, hier rechts in der Abbildung gezeigt, kann die Inhibition der Freisetzung von Glutamat über präsynaptische CB1 Rezeptoren erfolgen: Nach einer durch die α -Untereinheit (1) aktivierter G-Proteine vermittelten Öffnung von K^+ -Kanälen (2) kann es zur Hyperpolarisation und folglich zu einem verminderten Ca^{2+} -Einstrom (3) kommen, was zu einer verminderten Freisetzung von Glutamat aus synaptischen Vesikeln führt (verändert nach Piomelli, 2003).

Erhöhte Spiegel verschiedener Endocannabinioide, unter ihnen Anandamid und 2-AG, wurden in verschiedenen Modellen zerebraler Schädigung gemessen und mit neuroprotektiven Effekten in Verbindung gebracht (Hansen et al., 2002; Mechoulam und Shohami, 2007). Es wurde zum einen beobachtet, dass CB1 Rezeptoren bei einem Infarkt induziert werden (Jin et al., 2000). Zum anderen wurde gezeigt, dass Cannabinoide die Symptomatik in verschiedenen Modellen neuroinflammatorischer Erkrankungen zumindest teilweise durch die Modulation der Mikrogliazellaktivierung lindern (Galve-Roperh et al., 2008). Mikrogliazellen exprimieren den CB2 Rezeptor, dessen Expression während neuroinflammatorischer Prozesse verstärkt ist (Maresz et al., 2005).

Cannabinoide sind jedoch auch in der Lage, unabhängig vom CB1/CB2 Rezeptor, zum Beispiel über antioxidative Eigenschaften oder bioaktive Metabolite, neuroprotektive Effekte auszulösen (Hampson et al., 1998; Matas et al., 2007). Das synthetische Cannabinoid WIN konnte in einer Studie an CB1 defizienten Mäusen glutamaterge Transsmmission hemmen (Hajos et al., 2001). Weiterhin bindet 2-AG nicht nur an CB Rezeptoren, sondern ist auch am abnormal (abn) CBD Rezeptor aktiv und kann so als ein starker Aktivator der Migration von Mikrogliazellen fungieren (Franklin und Stella, 2003; Walter et al., 2003). Außerdem sind während einer zerebralen Schädigung nicht nur der Gehalt von Anandamid und 2-AG, sondern auch anderer Fettsäureethanolamide erhöht, die nicht an die beiden bekannten CB Rezeptoren binden. Der Spiegel des antiinflammatorischen Lipids PEA nimmt bei fokaler zerebraler Ischämie deutlich zu (Franklin et al., 2003).

1.3 Palmitylethanolamin (PEA)

1.3.1 Entdeckung von PEA

Die Entdeckung dieses natürlich vorkommenden Fettsäureethanolamins geht auf die frühen 1940er Jahre zurück: Untersuchungen unterprivilegierter Kinder zeigten, dass der Zusatz von getrocknetem Hühncheneidotter zur Nahrung das Wiederkehren von rheumatischem Fieber verhindern konnte, obwohl eine Streptokokkeninfektion

weiterhin bestand (Coburn et al., 1954b). Aufbauend auf diese Beobachtungen konnte gezeigt werden, dass aus Eidotter isolierte Lipidfraktionen antiallergische Effekte hatten. Schließlich wurde PEA als Mediator dieser antientzündlichen Wirkung identifiziert, was schließlich zur Entdeckung von PEA in Gewebe von Säugetieren führte (Bachur et al., 1965; Coburn, A.F. 1954a; Long und Martin, 1956). In den siebziger Jahren konnte in klinischen Studien gezeigt werden, dass durch die Behandlung mit PEA ein milderer und kürzerer Verlauf der durch eine virale Influenza hervorgerufenen Symptome erzielt werden konnte (Kahlich et al., 1979; Masek et al., 1974). PEA wurde in den späten 1970er Jahren in der ehemaligen Tschechoslowakei zur Behandlung akuter Erkrankungen des Respirationstraktes angewendet (Lo Verme et al., 2005b). Das wachsende Verständnis des Cannabinoidsystems und damit verbunden potentieller Angriffspunkte zur pharmakologischen Intervention ließen auch das Interesse an dem endogenen Lipid PEA (Abb. 4) wieder steigen, als das dem PEA strukturell nahe verwandte Anandamid als endogenes Cannabinoid identifiziert wurde (Devane et al., 1992).

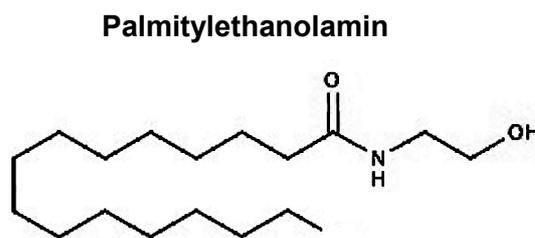


Abb. 4 Strukturformel von Palmitylethanolamin (PEA)

Das Interesse an dem endogenen Lipid PEA wuchs nach Entdeckung des strukturell nahe verwandten Endocannabinoids Anandamid (siehe Abb. 2).

1.3.2 Biosynthese und Abbau von PEA

PEA wird, wie auch das Endocannabinoid Anandamid, nicht in intrazellulären sekretorischen Vesikeln an der Synapse gespeichert, sondern als Reaktion auf einen Stimulus in der Lipidmembran produziert (Cadas et al., 1996; Schmid et al., 1990). $[Ca^{2+}]_i$ -mobilisierende Stimuli wie zum Beispiel eine Membrandepolarisation oder die Aktivierung von Glutamatrezeptoren stellen potente Initiatoren für die Synthese von Fettsäureethanolaminen in Neuronen dar (Cadas et al., 1996; Cadas et al., 1997; Di Marzo et al., 1994; Hansen et al., 1999). Die Biosynthese verläuft in zwei Schritten: Zunächst wird Ca^{2+} - und cAMP-abhängig Palmitinsäure von membrangebundenen Phospholipiden auf Phosphatidylethanolamin (PE) übertragen und so durch eine N-Acyltransferase (NAT) die Entstehung des Vorläufermoleküls N-Acyl Phosphatidylethanolamin (NAPE) katalysiert. Anschließend katalysiert eine NAPE

spezifische Phospholipase D (PLD) die Abspaltung des membrangebundenen NAPE und somit die Freisetzung von PEA (Bisogno et al., 1997;Lo Verme et al., 2005b). Der oben beschriebene Syntheseweg weist große Homologien zu der Biosynthese anderer Fettsäureamine auf, so auch zu der des PEA strukturell nahe verwandten Endocannabinoids Anandamid. Verschiedene Fettsäureaminvorläufer werden durch die NAT synthetisiert. Entscheidend ist hierbei, welche Fettsäure initial auf PE übertragen wird. Wird initial statt Palmitinsäure Arachidonsäure transferiert, resultiert ein Vorläufermolekül für Anandamid. Die den zweiten enzymatischen Schritt der Synthese katalysierende PLD weist nur wenige Sequenzhomologien zu anderer Phospholipasen aus der PLD-Familie auf. Sie erkennt das NAPE verschiedener Fettsäuren und produziert so neben PEA auch andere Fettsäureethanolamine (Okamoto et al., 2004). Ein alternativer Syntheseweg beschreibt die Hydrolyse von NAPE zu N-palmitoyl-lysoPE, welche von einer löslichen Phospholipase A2 mit anschließender Spaltung durch eine Phospholipase D katalysiert wird (Natarajan et al., 1984).

Die Inaktivierung von PEA verläuft über seine intrazelluläre Hydrolyse, welche durch zwei Lipidhydrolasen katalysiert wird: Die FAAH (*fatty acid amid hydrolase*) ist eine membrangebundene Serinhydrolase, die im Gehirn- und Leberparenchym von Säugetieren besonders häufig vorkommt (Desarnaud et al., 1995;Hillard et al., 1995;Lichtman et al., 2002;Ueda et al., 1995;Ueda et al., 2001). Außerdem inaktiviert die NAAA (*N-acylethanolamine hydrolyzing acid amidase*) Fettsäureethanolamine mit Präferenz für PEA gegenüber Anandamid (Tsuboi et al., 2005;Ueda et al., 2001;Ueda et al., 2010).

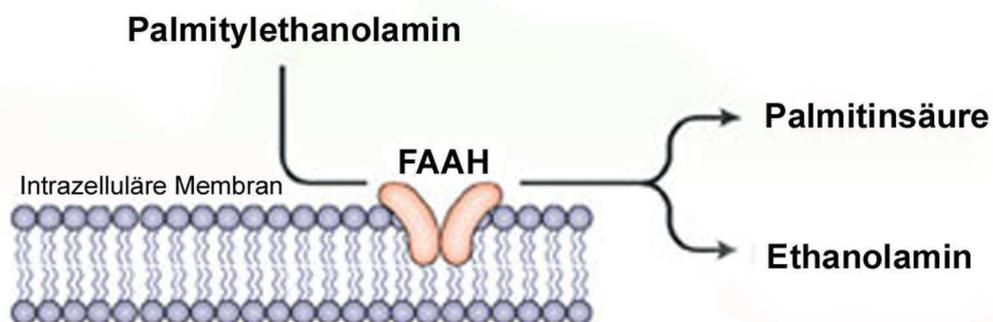


Abb. 5 Abbau von PEA über die *fatty acid amid hydrolase* (FAAH)

PEA wird von der intrazellulären membrangebundenen Serinhydrolase FAAH hydrolysiert. Auch Anandamid wird so enzymatisch abgebaut. Beide endogenen Lipide werden außerdem durch die NAAA (in der Abbildung nicht dargestellt) inaktiviert, die PEA gegenüber Anandamid präferiert (verändert nach Piomelli, 2003).

1.3.3 PEA und der *peroxisome proliferator-activated receptor* (PPAR)

PEA imitiert als lipiderger Transmitter verschiedene durch Endocannabinoide hervorgerufene Effekte und ist ihnen chemisch nahe verwandt. Wo aber liegt der Angriffspunkt für PEA? Aufgrund der strukturellen Verwandtschaft zum CB2 Rezeptor Agonisten Anandamid wurde für PEA zunächst ein über CB2 Rezeptoren vermittelter Wirkmechanismus vermutet. Eine erste Untersuchung zeigte, dass PEA in der Lage war, den synthetischen CB Rezeptor Agonisten WIN 55,212-2 von Mastzellen (RBL-2H3) zu verdrängen, die CB2 Rezeptor mRNA exprimierten (Facci et al., 1995). Dieses Ergebnis konnte jedoch anschließend nicht reproduziert werden und es gilt als allgemein akzeptiert, dass PEA nicht an CB Rezeptoren bindet (Lambert et al., 2002; Mackie und Stella, 2006; Sugiura et al., 2000; für weitere Erläuterungen siehe Diskussion).

Antiinflammatorische Effekte von PEA wurden schließlich mit dem PPAR α Rezeptor in Verbindung gebracht (Lo Verme et al., 2005a; Abb. 6). PPARs (*peroxisome proliferator-activated receptors*) sind durch Ligandenbindung aktivierte Transkriptionsfaktoren, die zur Familie der nukleären Rezeptoren gehören (Mangelsdorf et al., 1995). Es sind drei Subtypen nämlich α , β (auch δ genannt) und γ bekannt, die durch separate Gene kodiert werden und eine spezifische Verteilung aufweisen (Braissant et al., 1996; Granneman et al., 1998). PPARs finden sich im Rückenmark und im Gehirn und werden hier auf Neuronen und Gliazellen exprimiert (Cullingford et al., 1998; Moreno et al., 2004). Außerdem werden PPARs in immunologischen und vaskulären Zellwandtypen exprimiert: PPAR α und PPAR γ finden sich in Endothelzellen und Zellen der glatten Muskulatur sowie in Monozyten beziehungsweise Makrophagen. Weiterhin sind PPARs besonders in Geweben mit hohem Fettsäuremetabolismus beschrieben (Leber, Niere, Herz, Fettgewebe), jedoch auch in vielen weiteren Geweben zu finden (Braissant et al., 1996).

PPARs agieren als Regulatoren des Lipidmetabolismus und dienen der Glucosehomöostase, wobei PPAR β/δ eine Schlüsselrolle einnimmt (Berger und Moller, 2002). Nach Aktivierung durch Ligandenbindung heterodimerisiert PPAR mit dem Retinsäurerezeptor (RXR) und kann an das PPAR responsive Element (PPRE) im Promotor der Zielgene binden (Schoonjans et al., 1996). Die Bindung führt dann entweder zur Aktivierung oder Suppression des Zielgens. Über die Effekte auf den Metabolismus hinaus können PPARs auch Entzündungsgeschehen regulieren (Blanquart et al., 2003). Die Aktivierung von PPAR α hemmt sowohl die Freisetzung von Zytokinen (IL-6 und TNF α) als auch die Induktion proinflammatorischer Mediatoren wie der Cyclooxygenase-2 (COX-2) und von Adhäsionsproteinen. Weiterhin führt die Bindung eines passenden Liganden an PPAR α zur Induktion antioxidativer Enzyme

wie der Superoxid-Dismutase und der Glutathion-Peroxidase. PPAR γ Aktivierung hemmt sowohl die Expression der induzierbaren NO-Synthase als auch die der COX-2 und reduziert ebenfalls die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine (Berger und Moller, 2002; Bordet et al., 2006; Moraes et al., 2006).

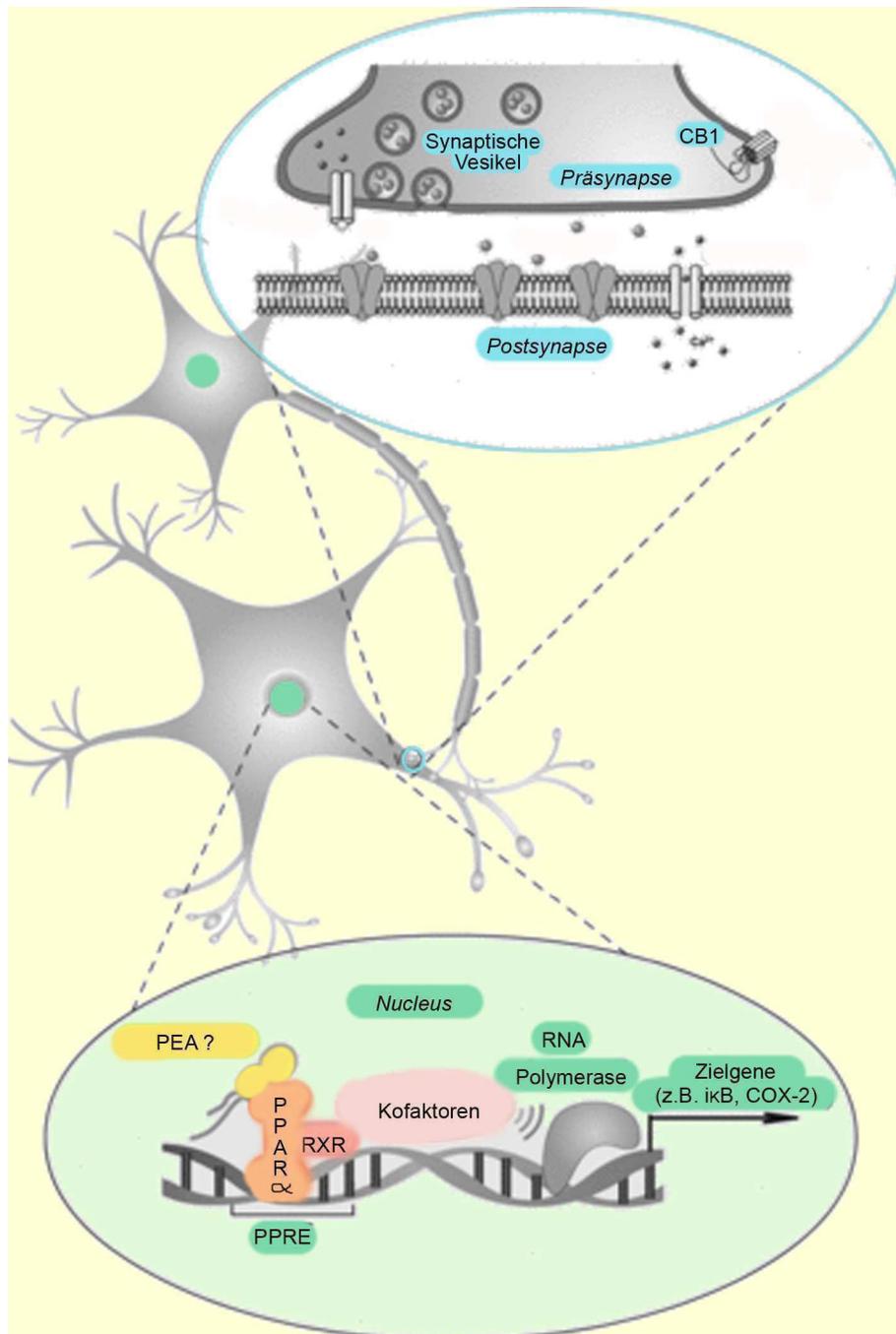


Abb. 6 Mögliche Mechanismen PEA vermittelter Antiinflammation und Neuroprotektion

CB1 Rezeptoren, wie im rechten oberen Bildausschnitt dargestellt, können nach Aktivierung antiinflammatorische Signalkaskaden anstoßen und zur präsynaptischen

Modulation der Transmitterfreisetzung führen (siehe auch Abb. 3). PEA imitiert viele der antiinflammatorischen Effekte von Cannabinoiden und ist in seiner chemischen Struktur dem Endocannabinoid Anandamid nahe verwandt, bindet jedoch nicht an CB Rezeptoren. Stattdessen werden die antiinflammatorischen Eigenschaften von PEA mit PPAR Rezeptoren in Verbindung gebracht, wie im linken unteren Bildausschnitt illustriert (verändert nach Sun et al., 2006).

PPARs können die Repression von Gentranskription auch in einem von der Desoxyribonucleinsäure (DNA)-Bindung unabhängigen Mechanismus erwirken, indem sie hemmend in die Signalwege von NF- κ B (*nuclear factor κ binding protein*) und STAT (*signal transducer and activator of transcription*) eingreifen (Chinetti et al., 1998; Ricote et al., 1998; Staels et al., 1998; Zhou und Waxman, 1999). So verhindert PPAR die Bindung von NF- κ B an die Zielsequenz und interagiert beispielsweise mit c-Jun, einem *immediate early gene*, dass als Transkriptionsfaktor bei traumatischen Läsionen wichtige Gene hoch reguliert (Delerive et al., 1999; Sakai et al., 1995).

PPARs werden sowohl durch endogene Fettsäuren und Fettsäurederivate als auch durch eine Vielzahl synthetischer pharmakologischer Liganden aktiviert (Chinetti et al., 2000). So agiert das Fettsäureethanolamin Oleoylethanolamin (OEA), ein strukturelles Analogon von PEA, als PPAR α und PPAR β/δ Agonist (Lo Verme et al., 2005b). Die synthetische Substanz Wy-14,643 ist ebenfalls ein Agonist am PPAR α und zeigt hier ausgeprägte antiinflammatorische Effekte (Sheu et al., 2002). Die durch PEA erzielten antiinflammatorischen Effekte gehen mit einer Aktivierung von PPAR α einher und in einem Model der Rückenmarksläsion bei der Maus wurden protektive Effekte von PEA parallel zur Induktion der PPAR α Expression und einer PEA induzierten Hochregulation von potentiellen PPAR α Zielgenen beschrieben (Genovese et al., 2008; Lo Verme et al., 2005a). Neben antiinflammatorischen Effekten zeigt PEA analgetische Wirkungen und erste Hinweise deuten auf eine antiepileptische und neuroprotektive Wirkung im ZNS hin (Calignano et al., 1998; Calignano et al., 2001; Franklin et al., 2003; Jaggar et al., 1998; Lambert et al., 2001; Sheerin et al., 2004; Skaper et al., 1996). Verschiedene Effekte auf Immunzellen wie beispielsweise die Inhibition der Mastzelldegranulation, die Hemmung der Leukozytenextravasation und die Modulation der Zytokinfreisetzung durch Makrophagen wurden für PEA beschrieben. Die Befunde lassen vermuten, dass PEA nicht nur auf periphere immunkompetente Zellen wirkt, sondern auch aktivierte Mikrogliazellen beeinflusst und so eine Rolle im Prozess des Sekundärschadens nach zerebralem Trauma spielen kann (Berdyshev, 2000; Ross et al., 2000). Mikrogliazellen scheinen durch Produktion und Hydrolyse von PEA in der Lage zu sein, Einfluss auf die autokrine Regulation der mikroglialen Zellmigration zu nehmen (Franklin et al., 2003; Muccioli und Stella, 2008).

Zusammenfassend ergeben sich aus den bisherigen Untersuchungen folgende Fragestellungen bezüglich der Rolle von PEA bei der exzitotoxischen neuronalen Schädigung: 1) Hat PEA direkte protektive Effekte im ZNS, 2) moduliert ortsansässige Mikrogliazellen und die Invasion peripherer immunkompetenter Zellen und nimmt so indirekt Einfluss auf die Neuroprotektion und 3) welcher Rezeptortyp spielt hier die Schlüsselrolle?

1.4 2-Arachidonylglycerol (2-AG) als Endocannabinoid

1.4.1 Biosynthese und Abbau von 2-AG

2-AG ist ein gut charakterisierter Vertreter des oben erläuterten Endocannabinoidsystems und agiert als Endocannabinoid als hochspezifischer Ligand für CB Rezeptoren (Sugiura et al., 2006).

2-AG wird über die Hydrolyse von sn-1-acyl-2-Arachidonylglycerol (DAG) synthetisiert (Abb. 7). Zunächst katalysiert die Phospholipase C die Bereitstellung von 1,2-DAG aus Glycerophospholipiden. Die Hydrolyse von 1,2-DAG wird dann durch die Aktivität zweier sn-1 selektiver Diacylglycerollipasen (DAGL α und DAGL β) katalysiert (Bisogno et al., 2003).

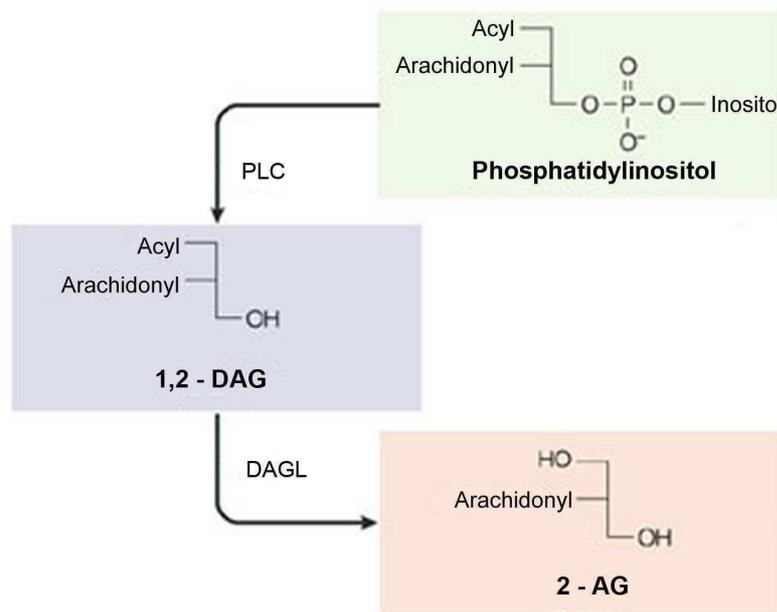


Abb. 7 Mechanismen der neuronalen Synthese von 2-Arachidonylglycerol (2-AG)

Der Syntheseweg des Endocannabinoids beginnt mit der Freisetzung von 1,2-Diacylglycerol (1,2-DAG) aus Phosphatidylinositol katalysiert durch die Phospholipase C (PLC). Im zweiten Syntheseschritt katalysiert nun eine Diacylglycerollipase (DAGL) die Hydrolyse von 1,2-DAG zu 2-AG (verändert nach Piomelli, 2003).

Beide Isoformen der DAGL gehören der Familie der Serinlipasen an und befinden sich in der Plasmamembran postsynaptischer Neurone, wo sie durch eine Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels aktiviert werden. So induziert eine Depolarisation die 2-AG-Synthese. Das erst jetzt synthetisierte und nicht in intrazellulären Vesikeln gespeicherte 2-AG gelangt nach Freisetzung als retrograder Transmitter zur Präsynapse, wo es beispielsweise über CB1 Rezeptoren die Ausschüttung des exzitatorischen Transmitters, der ursprünglich die 2-AG stimulierende Depolarisation ausgelöst hatte, hemmen kann. 2-AG kann so lokal und direkt modulatorisch wirken. Der Effekt ist zeitlich begrenzt, da 2-AG schnell durch die Zelle aufgenommen und inaktiviert wird. 2-AG diffundiert rapide, möglicherweise unterstützt durch einen spezifischen membrangebundenen Transporter für Endocannabinoide durch die Zellmembran (Di Marzo et al., 2004). Das Endocannabinoid 2-AG wird dann durch intrazelluläre Hydrolyse inaktiviert. Dieser Prozess wird durch eine Monoacylglycerollipase (MAGL) katalysiert und Produkte dieser präsynaptisch ablaufenden enzymatischen Reaktion sind Glycerol und Arachidonsäure (Di Marzo et al., 2004;Dinh et al., 2002). 2-AG wird stimulusabhängig synthetisiert und freigesetzt und kann so bis zu seiner Wiederaufnahme in die Zelle auch bei neuropathologischen Geschehen modulatorisch wirken.

1.4.2 2-AG bei der neuronalen Läsion und der *abnormal cannabdiol-sensitive receptor* (abn-CBD Rezeptor)

Es wurde gezeigt, dass das 2-AG Neurone vor Schädigung durch traumatische zerebrale Läsion, Exzitotoxizität oder Ischämie schützen und die Migration, Proliferation sowie die Produktion proinflammatorischer Zytokine durch aktivierte Mikrogliazellen modulieren kann (Facchinetti et al., 2003;Melis et al., 2006;Panikashvili et al., 2001;Walter et al., 2003). Die neuroprotektiven Effekte von Endocannabinoiden wie 2-AG gingen bei *in vivo* und *in vitro* Experimenten mit der Aktivierung des CB1 Rezeptors auf Neuronen einher (Matsuda et al., 1990;Mechoulam und Lichtman, 2003;Munro et al., 1993;Panikashvili et al., 2005). Des weiteren aktiviert 2-AG den CB2 Rezeptor und kann hier auch inflammatorisch wirken (Sugiura et al., 2006). Jedoch liefern Studien an CB1 und CB2 Rezeptor defizienten Mäusen Belege für die Existenz weiterer CB Rezeptoren, die zwar noch nicht kloniert werden konnten, aber pharmakologisch und funktionell charakterisiert wurden (Mackie und Stella, 2006).

Der abn-CBD Rezeptor wurde erstmals als Vasodilatator auf Endothelzellen mesenterischer Blutgefäße beschrieben (Wagner et al., 1999). Er gilt als einer der so genannten *non-CB1/non-CB2* Rezeptoren, der noch nicht kloniert, aber durch Experimente mit CB1 und CB2 Rezeptor defizienten Mäusen pharmakologisch identifiziert und funktionell charakterisiert wurde (Mackie und Stella, 2006). Der abn-

CBD Rezeptor ist ein $G_{i/o}$ -Protein gekoppelter Rezeptor, an dem das Endocannabinoid Anandamid und die synthetische Substanz abn-CBD als Agonisten wirken, wohingegen das Phytocannabinoid CBD als Antagonist agiert (Begg et al., 2003; Jarai et al., 1999; Offertaler et al., 2003; Wagner et al., 1999; Walter et al., 2003). Für 2-AG konnte gezeigt werden, dass das Endocannabinoid die Migration von Mikrogliazellen über den abn-CBD Rezeptor aktiviert (Walter et al., 2003). Es wurde außerdem beschrieben, dass 2-AG in der Lage ist, die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine wie TNF α durch Mikrogliazellen unabhängig von CB1 und CB2 Rezeptoren zu vermindern (Facchinetti et al., 2003; Puffenbarger et al., 2000). Im Modell der OHSC reduziert 2-AG sowohl die Anzahl degenerierender Neurone als auch die Mikrogliazellzahl nach exzitotoxischer NMDA Schädigung – Effekte, die durch den Einsatz des spezifischen CB2 Rezeptor Antagonisten AM630 nicht aufgehoben werden konnten (Kreutz et al., 2007). Daher stellt sich die Frage, ob die durch 2-AG erzielte Neuroprotektion ebenfalls über abn-CBD Rezeptoren auf Mikrogliazellen vermittelt wird?

1.5 WIN 55,212-2 (WIN) als synthetisches Cannabinoid

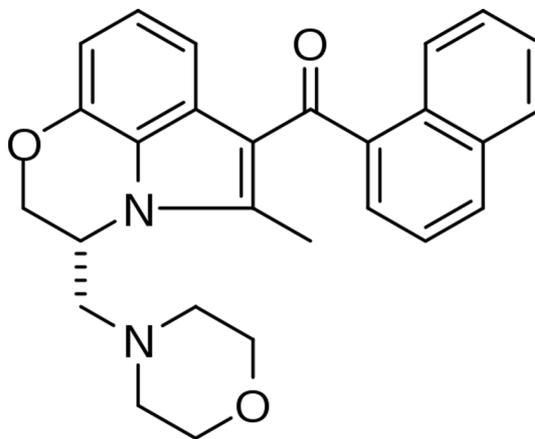


Abb. 8 Strukturformel des synthetischen Cannabinoids WIN

Das Aminoalkylindol WIN ist ein synthetisches Cannabinoid (Abb. 8). Seine Entdeckung resultierte aus der Entwicklung einer Gruppe von Pravadolin strukturell nahe verwandten Substanzen. Diese können zwar im Vergleich zu anderen nichtsteroidalen antiinflammatorischen Substanzen die Cyclooxygenase nur vermindert hemmen, binden jedoch verstärkt an CB1 Rezeptoren (D'Ambra et al., 1992; Eissenstat et al., 1995). WIN ist wohl der bekannteste Vertreter dieser Gruppe, agiert als Agonist sowohl am CB1 als auch CB2 Rezeptor und erzielt an beiden Rezeptortypen eine hohe intrinsische Aktivität (Howlett et al., 2002; Kuster et al.,

1993; Showalter et al., 1996). Die neuroprotektiven Effekte von CB Rezeptor Agonisten wie WIN werden hauptsächlich der Aktivierung von CB1 Rezeptoren zugeschrieben, während indirekte Effekte über eine antiinflammatorische Wirkung der Aktivierung des CB2 Rezeptors auf Immunzellen zugeschrieben werden (Melis et al., 2006; Panikashvili et al., 2001; Stella, 2009).

Immer mehr Studienergebnisse deuten jedoch, wie bereits unter Kapitel 1.4 beschrieben, auf andere bislang noch nicht klonierte CB Rezeptoren hin. So erzielt auch WIN Effekte am Hippokampus, die nicht durch CB1 oder CB2 Rezeptoren zu vermittelt werden scheinen (Breivogel et al., 2001; Hajos et al., 2001). Für WIN wird die Reduktion exzitatorischer postsynaptischer Ströme über die Inhibition von N-Typ spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanälen ($Ca_v2.2$) im Hippokampus diskutiert, da eine durch hohe WIN-Konzentrationen ($>10\mu M$) hervorgerufene Glutamatfreisetzung durch Omega-Konotoxin (GIVA), ein Hemmstoff des $Ca_v2.2$, reduziert werden konnte und WIN in CB1 Rezeptor defizienten Mäusen den exzitatorischen postsynaptischen Strom reduzierte, nicht aber den inhibitorischen (Hajos et al., 2001; Nemeth et al., 2008).

Des Weiteren moduliert WIN, wie auch viele andere synthetische Cannabinoide und das Endocannabinoid Anandamid, inflammatorische und nozizeptive Prozesse im peripheren Nervensystem durch Desensibilisierung von TRP (*transient receptor potential*) Ionenkanälen auf sensiblen Neuronen. Zu der Familie der TRP Ionenkanäle gehören der TRPV1 Rezeptor, früher als Vanilloidrezeptor bekannt, sowie der TRPA(ankyrin)1 Rezeptor (Akopian et al., 2009).

Die Expression von TRPA1 und TRPA2 konnte im menschlichen und im Rattengehirn nachgewiesen werden (Cristino et al., 2006; Starowicz et al., 2008; Stokes et al., 2006). Mehrere Studien beschreiben zudem die Effekte einer TRPV1 Aktivierung auf die zentrale Kontrolle der Körpertemperatur, von Bewegungsabläufen und zentraler Aktivierung, jedoch bleibt die Rolle des TRPA1 im Gehirn unklar (Cristino et al., 2006; Starowicz et al., 2008; Stokes et al., 2006)

WIN kann als protektives Agens bei Prozessen neuronaler Schädigung wirken. So wurde gezeigt, dass WIN den Verlust hippocampaler Neurone nach transienter globaler Ischämie reduziert, das Infarkt volumen nach permanenter fokaler Ischämie vermindert und außerdem in einem *in vivo* Modell der neonatalen hypoxisch-ischämischen Encephalopathie das Ausmaß zerebraler Schädigung herabsetzt (Fernandez-Lopez et al., 2007; Nagayama et al., 1999). Nun stellt sich die Frage, ob WIN auch bei exzitotoxischer neuronaler Schädigung protektiv wirkt und wenn ja, welcher Rezeptor diesen Effekt vermittelt?

1.6 Die Organotypische Hippokampale Schnittkultur

Die neuroprotektive Wirksamkeit und die potentiellen Angriffspunkte der einleitend vorgestellten Cannabinoide wurden an der organotypischen hippokampalen Schnittkultur (OHSC) untersucht.

Die OHSC ist ein für das Studium physiologischer und pathophysiologischer Prozesse, die das neuronale Überleben und die synaptische Plastizität beeinflussen, exzellent geeignetes und gut kontrollierbares Modell (Holopainen, 2005). Die organotypische Formation von Neuronen und Gliazellen simuliert die *in vivo* Situation und die komplexe Organisation neuronaler Fortsätze bleibt ebenso erhalten wie die synaptische Aktivität und Transmission. (Gahwiler et al., 1997; Stoppini et al., 1991). Unter Kulturbedingungen bestehen die typischen morphologischen Charakteristika und die laminierte Struktur des Hippokampus weiter und die Reifung verschiedener Zelltypen, Synapsen sowie die Rezeptorexpression ähnelt *in vivo* Verhältnissen (Dailey et al., 1994; Frotscher et al., 1995; Gahwiler et al., 1997; Holopainen, 2005).

Die Morphologie der Hippokampusformation (Abb. 9) gliedert sich in das Ammonshorn (Cornu Ammonis, CA), den Gyrus dentatus (DG), der als Halbmond um die Hilusregion (HI) zu liegen kommt und in der vorliegenden Arbeit speziell untersucht wurde, das Subiculum (SUB), das Prä- und Parasubiculum und den entorhinalen Kortex (EC). Die charakteristische histologische Ordnung des Hippokampus in Laminae zeigt einen oberflächlichen Faserschweif, der als Alveus bezeichnet wird und an den sich die Korbzellschicht, das Stratum oriens, anschließt (Forster et al., 2006). Hierauf folgt die Pyramidenzellschicht (Stratum pyramidale), das Stratum radiatum, das Stratum lacunosum und nach innen abschließend die zellarme Molekularschicht, das Stratum moleculare. Sowohl das CA als auch der DG weisen eine prominente Zellschicht auf. Im Falle des DG ist dies eine kräftige Körnerzellschicht, wohingegen das CA eine ausgeprägte Pyramidenzellschicht aufweist. Nach der unterschiedlichen Dichte der Pyramidenzellen werden verschiedene CA-Regionen differenziert und nummeriert.

Afferenzen erreichen den Hippokampus über den Tractus perforans, ein myelinisierter Fasertrakt, der den EC mit dem Hippokampus verbindet. Die Hauptprojektion des EC führt zum DG, der seinerseits mittels feiner Axone, die man Moosfasern nennt, auf CA3 projiziert. Die in CA3 entspringenden Axone verlaufen im Alveus, verlassen den Hippokampus und werden so zum Bestandteil eines mächtigen Faserbogens, dem Fornix. Zuvor projizieren sie über die so genannten Schaffer-Kollateralen auch auf CA1 und das SUB, die ihrerseits mit Axonen zur Fornix stoßen.

In diesem System der Erregungsleitung steht Glutamat als primärer exzitatorischer Neurotransmitter modulierenden Einflüssen GABA(γ -Aminobuttersäure)erger Interneurone gegenüber (Freund und Buzsaki, 1996;Lothman et al., 1991).

Das Modellsystem der OHSC bietet zwei entscheidende Vorzüge, da erstens der Zellverband in der OHSC erhalten ist, weshalb hier das Verhalten von Neuronen und Mikrogliazellen nach toxischer Schädigung beobachtet werden kann und zweitens aufgrund der experimentellen Bedingungen das Einwandern peripherer immunkompetenter Zellen ausgeschlossen werden kann. Somit ermöglicht die OHSC die selektive Betrachtung residenter Mikrogliazellen und Neurone und der direkten Auswirkung einer toxischen Schädigung auf diese beiden Zelltypen.

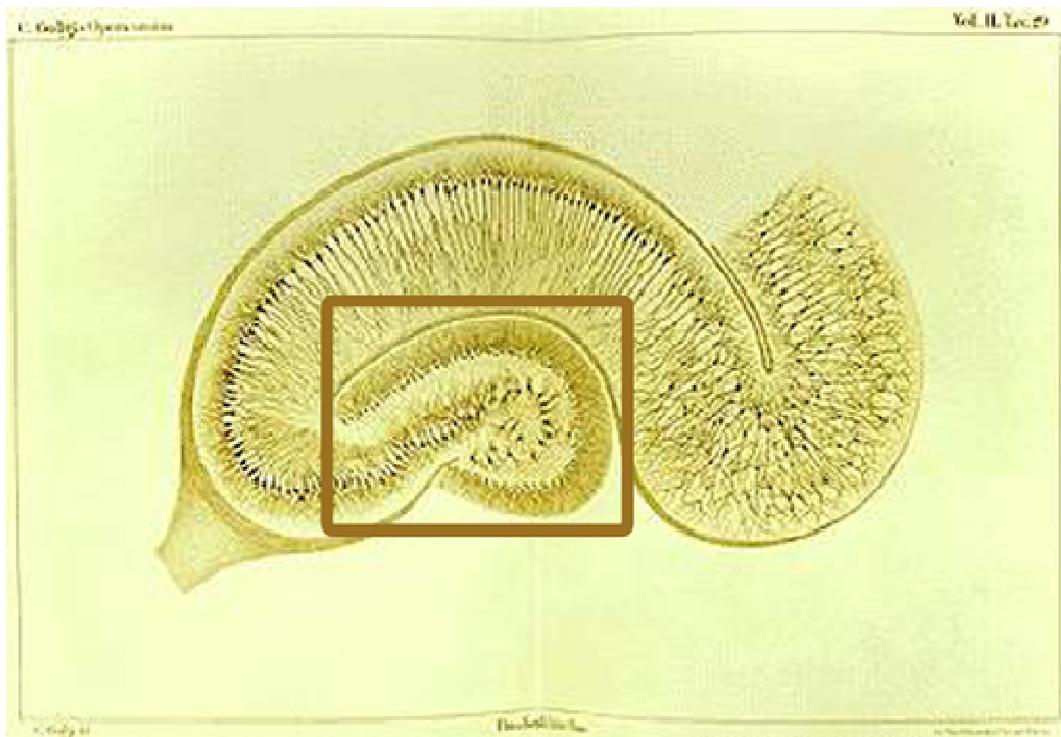


Abb. 9 Morphologie der Hippokampusformation

Die Abbildung zeigt den Hippokampus in der Zeichnung einer Silbernitratfärbung von Camillo Golgi (aus Golgis *Opera Omnia*). Zusätzlich ist durch das Rechteck der in der vorliegenden Arbeit untersuchte Gyrus dentatus hervorgehoben und stellt sich als nach links geöffneter Halbmond dar.

Zur Auslösung neuronaler Schädigung wurde NMDA eingesetzt. Es handelt sich hierbei um einen Agonisten des NMDA Rezeptors, der zur Familie der ionotropen Glutamatrezeptoren gehört. Die Bindung von NMDA führt zu einem Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle und damit verbunden zu einer Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration. Eine Überaktivierung des Kanals durch NMDA Exzitation hat eine Zellschädigung zu Folge, die deshalb exzitotoxische Schädigung genannt wird (siehe Kapitel 1.1). Die selektive Wirkung der NMDA Schädigung auf die Pyramidenzellen des

CA und die Körnerzellen des DG liegt in einer besonders hohen NMDA Rezeptordichte auf den Neuronen dieser beiden Regionen der Hippokampusformation begründet. Physio- und pathophysiologische Bedingungen werden an verschiedenen Regionen des Hippokampus untersucht. So wird die CA1 Region insbesondere zu Experimenten bei ischämischen Situationen genutzt, während im Bereich CA3 vorwiegend Kainat assoziierte Neurodegeneration näher beleuchtet wird. In der vorliegenden Arbeit wurde speziell die Region des DG am Hippokampus untersucht. Der DG stellt eine optimale Region für die quantitative Analyse der NMDA induzierten Neurotoxizität dar, da 1) der DG die höchste Dichte an NMDA Rezeptoren aufweist, 2) die NMDA Effekte auf die Körnerzellen gut beschrieben sind und sich durch die klare Morphologie des DG gut abgrenzen lassen und 3) *in vitro* Studien gezeigt haben, dass CA1 Neurone im Vergleich zu Neuronen der Fascia dentata anfälliger für neuronale Schäden durch das Prozedere der Schnittkulturherstellung sind und die CA1 Region sich bei NMDA Toxizität stark morphologisch verändert und ihre klare Struktur verliert (Boscia et al., 2006)

Die Präparation bedingt eine Verletzung neuronaler Afferenzen und Efferenzen des Hippokampus und damit eine mechanische Schädigung der in der OHSC residenten Zelltypen, was eine spontane Gliaaktivierung nach sich zieht (Hailer et al., 1996). Diese präparationsbedingte Veränderung verlangt nach einer mehrtägigen Phase, in der die Gliazellen, insbesondere aktivierte Mikrogliazellen, wieder in den Ruhezustand zurückkehren. In dem hier vorgestellten Schädigungsmodell wurde die Applikation von NMDA erst am sechsten Präparationstag vorgenommen, um zu gewährleisten, dass im Inneren der Schnittkulturen wieder organotypische Bedingungen herrschen.

2 Zielsetzung der Arbeit

2.1 Generelle Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, das neuroprotektive Potential verschiedener Cannabinoide zu demonstrieren und ihre möglichen Angriffspunkte zu untersuchen. Hierzu sollte geprüft werden, inwieweit unterschiedliche Cannabinoide das Absterben von Neuronen in der Körnerzellschicht im DG des Hippokampus nach exzitotoxischer Schädigung mit NMDA beeinflussen. Einige der Cannabinoide wurden zusätzlich auf ihre Wirkung auf das Verhalten von Mikrogliazellen hin überprüft. Speziell für das Endocannabinoid 2-AG, das synthetische Cannabinoid WIN und für PEA sollten neue, noch unbekannte Wirkmechanismen beleuchtet werden.

2.2 Ziel beim Einsatz von PEA

Um die Hypothese zu untermauern, dass PEA neuroprotektive Effekte hat und um aufzuzeigen, ob PEA direkt neuroprotektiv über Zielstrukturen im ZNS wirkt oder indirekt über die Modulation peripherer Blutzellen zur Neuroprotektion führt, sollten die

Effekte von PEA im Modell der OHSC untersucht werden. Zur Differenzierung des hierbei entscheidenden Rezeptors sollte zunächst eine exzitotoxische Schädigung durch NMDA Applikation herbeigeführt werden und dann die Behandlung mit PEA oder dem spezifischen PPAR α Agonisten Wy-14,643, alleine, oder in Kombination mit dem PPAR α Antagonisten GW6471 oder dem PPAR γ Antagonisten GW9662 erfolgen.

2.3 Ziel beim Einsatz von 2-AG

Zur Überprüfung der Arbeitshypothese, dass die neuroprotektiven Effekte von 2-AG in dem Modellsystem der OHSC über abn-CBD Rezeptoren auf Mikrogliazellen vermittelt werden, sollten die Effekte von 2-AG und abn-CBD sowie der Antagonisten CBD und O-1918 am abn-CBD Rezeptor auf die Mikrogliazellzahl und die Neuroprotektion in der exzitotoxisch geschädigten OHSC untersucht werden. Zur Abgrenzung des Angriffspunktes von 2-AG sollte außerdem der CB1 Rezeptor Antagonist AM251 eingesetzt werden.

Um zu testen, ob sich die neuroprotektiven Effekte durch Depletion der Mikrogliazellen aufheben lassen, sollten die OHSC mit dem Bisphosphonat Clodronat inkubiert werden. Hier sollte insbesondere die These überprüft werden, ob sich der abn-CBD Rezeptor auf Mikrogliazellen befindet und neuroprotektive Effekte vermittelt.

2.4 Ziel beim Einsatz von WIN

Das neuroprotektive Potential des synthetischen Cannabinoids WIN sollte in dem Modellsystem der OHSC demonstriert und mögliche Angriffspunkte der Substanz untersucht werden. Zur Differenzierung der hierbei beteiligten Rezeptoren sollte für den CB1 Rezeptor der Antagonist AM251 und für den CB2 Rezeptor der Antagonist AM630 untersucht werden, um zu prüfen, ob sie die neuroprotektiven Effekte von WIN nach NMDA Schädigung aufheben können.

3 Material und Methoden

3.1 Versuchstiere

Die Versuchstiere (*Rattus norvegicus*) des Wistar Inzucht-Stammes wurden von der Firma Charles River (Sulzfeld) bezogen. Mit *ad libitum* Zugang zu Wasser und Futter wurden die Ratten für ein bis fünf Tage in einem Hell/Dunkel-Rhythmus von zwölf Stunden Licht und weiteren zwölf Stunden Dunkelheit gehalten. Die Jungtiere wurden am achten Tag nach ihrer Geburt durch Dekapitation getötet. Alle Tierexperimente erfolgten in Übereinstimmung mit den Richtlinien für Tierversuche nach Maßgabe der Europäischen Gemeinschaft (Direktive 86/609/EEC).

3.2 Verwendete Substanzen und Pufferlösungen

3.2.1 Agonisten und Antagonisten

Die zur Behandlung der Schnittkulturen eingesetzten Cannabinoide sowie andere eingesetzte Rezeptoragonisten und -antagonisten sind unten folgend mit ihren

verwendeten Endkonzentrationen aufgeführt. Für die Cannabinoide als lipophile Substanzen wurde Ethanol als Lösungsmittel gewählt. Sie wurden bei -20°C langfristig gelagert. Vor Applikation auf die OHSC wurden die Substanzen in Kulturmedium weiter bis zu einer maximalen Lösungsmittelkonzentration von 0,1% (v/v) verdünnt. Lösungsmittelleffekte wurden durch Kontrollexperimente mit äquivalenten Mengen an Ethanol ausgeschlossen. Das Bisphosphonat Clodronat (Roche Diagnostik GmbH, Mannheim, Deutschland) wurde zunächst in sterilem Wasser gelöst und bei -20°C aufbewahrt. Zur Anwendung wurde es mit Kulturmedium weiter bis zu einer Konzentration von 100µg/ml verdünnt.

Wenn nicht anders spezifiziert, wurden alle Feinsubstanzen von den Firmen Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) oder Sigma-Aldrich (Schnelldorf) bezogen. Von der Firma Invitrogen (Karlsruhe) wurden die in der Zellkultur verwendeten Materialien und Substanzen bezogen.

<u>Agonisten</u>	<u>Verwendete Konzentration</u>
Abnormal Cannabidiol	0,001µM; 0,01µM; 0,05µM; 0,1µM 1µM; 10µM
2-Arachidonylglycerol	0,001µM
Palmitylethanolamin	0,01µM
WIN-55,212-2 (mesylat)	0,001µM, 0,01µM, 0,1µM, 1µM, 10µM
Wy-14,643	0,01µM, 0,1µM, 1µM
<u>Antagonisten</u>	<u>Verwendete Konzentration</u>
AM251	0,1µM, 1µM, 10µM
AM630	10µM
Cannabidiol	10µM
GW6471	0,05µM, 0,5µM, 5µM
GW9662	0,01µM, 0,1µM, 1µM
O-1918	30µM

3.2.2 Lektine und Färbereagenzien

Zur Fixierung der Schnittkulturen nach Abschluss der Versuche wurde 4% (w/v) Paraformaldehyd verwendet. Die Zellstrukturen wurden markiert und mittels der unten aufgeführten Chemikalien dargestellt. Zugeordnet ist die jeweils angewandte Verdünnung.

<u>Lektine</u>	<u>Verdünnung</u>
<i>Griffonia simplicifolia</i> Isolektin B4 (IB4), FITC konjugiert (Vector Labs, Burlingame, CA,USA)	1 : 50
<u>Fluorchrom</u>	<u>Konzentration</u>
Propidium Iodid (PI; Sigma-Aldrich)	5µg/ml

3.2.3 Pufferlösungen

Die Zusammensetzung der in den Versuchsansätzen eingesetzten Puffer findet sich im Folgenden. Die Angaben beziehen sich jeweils auf die Lösung in einem Liter Aqua destillata. Alle Pufferlösungen wurden auf einen pH-Wert im Bereich von 7,35 bis 7,4 eingestellt.

<u>Phosphatpufferlösung 0,1M:</u>	11,36g Na ₂ HPO ₄ ; 2,72g KH ₂ PO ₄
<u>Phosphatpufferlösung 0,2M:</u>	22,72g Na ₂ HPO ₄ ; 5,44g KH ₂ PO ₄
<u>Phosphatpufferlösung (PBS) 0,02M:</u>	9g NaCl; 0,54g KH ₂ PO ₄
<u>Phosphatpufferlösung (PBS/Triton)</u> <u>0,02M mit 0,3% (v/v) Triton X-100:</u>	9g NaCl; 0,54g KH ₂ PO ₄ ; 2,27g Na ₂ HPO ₄ ; 3ml Triton X-100

3.3 Aufbereitung und Zusammensetzung der Medien zur Präparation und Kultivierung von Schnittkulturen (OHSC)

3.3.1 Präparationsmedium

Zur Herstellung des Präparationsmediums wurden 99 ml Minimum Essential Medium (MEM) und 1ml L-Glutamin verwendet und ein pH-Wert von 7,36-7,38 eingestellt. Die Temperatur des Mediums wurde während des Experiments bei 4°C gehalten.

3.3.2 Kulturmedium

Das Kulturmedium setzte sich aus 50 ml MEM, 25 ml Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS), 25 ml normales Pferdeserum (NHS), 2 ml Glutamin, 1µ/ml Insulin, 7,5% (w/v) Natriumbikarbonat, 1,2 mg/ml Glukose, 0,1 mg/ml Streptomycin, 100 U/ml Penicillin und 0,8 µg/ml Vitamin C zusammen. Der pH wurde auf einen Wert von 7,4 eingestellt und das Medium vor Gebrauch auf 35 °C erwärmt.

3.3.3 Herstellung der Agarblöcke

Zur Fertigung der für die Präparation benötigten Agarblöcke wurde eine Lösung aus 0,725 g NaCl, 0,0373 g KCl, 17,25 mg Na₂HPO₄*H₂O, 0,0493 g MgSO₄*7H₂O, 0,2184 NaHCO₃, 0,18 g Glucose, 0,0294 g CaCl₂*2H₂O und 5 g Agar angesetzt. Die Bestandteile wurden in 100 ml Aqua destillata gelöst, vermischt und anschließend für 30 Minuten bei 70 °C auf einem Magnetrührer erhitzt. Die fertige Masse wurde in eine Gewebekulturschale (Durchmesser 35 mm) abgefüllt und bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.

3.4 Fertigung der OHSC

3.4.1 Benötigte Materialien und Vorbereitung des Arbeitsplatzes

Folgende Präparationsinstrumente wurden zur Präparation genutzt: zwei kleine Scheren, eine große Verbandsschere, eine feine chirurgische Pinzette, zwei gebogene

Pinzetten, je zwei gebogene chirurgische Einmalklingen (Größe 15) und zwei gerade chirurgische Einmalklingen (Größe 11), zwei Skalpellhalter, eine halbierte Rasierklinge, eine Pasteurpipette aus Glas, zwei Pasteurpipetten, bei denen die Spitzen abgesägt wurden, drei Rundfilter (Durchmesser 55 mm). Alle verwendeten Materialien wurden vor dem Gebrauch sterilisiert.

Eisbeutel wurden zur Kühlung des Gewebes für die Zeit der Präparation und danach bereitgestellt. Auch das Präparationsmedium wurde auf Eis gelagert. Im Präparationsmedium wurden das entnommene Hirngewebe während der Präparation versorgt und außerdem die daraus gewonnenen Schnittkulturen bis zur Überführung in einen Zellkultureinsatz und somit bis zur Versorgung mit Kulturmedium in Präparationsmedium aufbewahrt. Hierzu wurden zwei mit Präparationsmedium gefüllte Gewebeschalen (Durchmesser 35mm) neben dem Vibratom (Typ Leica VT1000S, Wetzlar, Deutschland) bereitgestellt. Eine weitere Gewebekulturschale wurde zur Aufbewahrung der OHSC bis zu ihrer Überführung in das Kulturmedium auf einen Eisbeutel platziert und mit Präparationsmedium gefüllt.

Um das Hirngewebe anschließend auf dem Plexiglas-Einsatz des Vibratoms zu stabilisieren wurden vor der Präparation zwei zugeschnittene Stücke des angefertigten Agars mit Histoacryl-Kleber (Braun, Melsungen) befestigt und nach der Präparation ein zusätzlicher Agarstreifen hinzugefügt, um ausreichend Halt zu gewährleisten.

Folgende Parametereinstellungen wurden am Vibratom vorgenommen: Frequenz, 100 Hz; Amplitude, 0,6 mm und Geschwindigkeit 0,1mm/s.

3.4.2 Präparation der OHSC

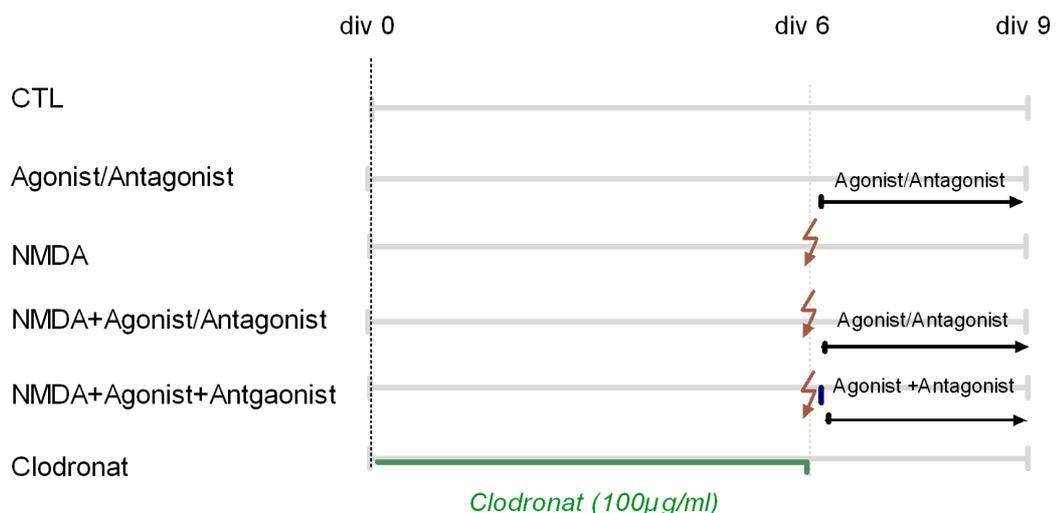
Die OHSC wurden aus den Gehirnen acht Tage alter Wistar Ratten gewonnen. Eine Verbandsschere wurde zur Dekapitation der Tiere genutzt; anschließend wurde die Kopfhaut abgetragen. Die nun folgenden Präparationsschritte wurden unter aseptischen Bedingungen durchgeführt. Zur Freilegung des Gehirns wurde die Kalotte mit einer feinen Schere eröffnet. Um den Temporallappen darstellen zu können wurde nun zunächst mit einem scharfen Skalpell das Kleinhirn entfernt und anschließend ungefähr zwei Millimeter des frontalen Gehirnpols abpräpariert. Der nun den Hippokampus enthaltende isolierte Hirnanteil wurde in eine mit Präparationsmedium gefüllte, bereits bei der Vorbereitung bereitgestellte Gewebekulturschale überführt. Danach wurde die apikale Seite des Gewebes auf einen Filter platziert, um es für zehn Sekunden leicht antrocknen zu lassen. Mithilfe eines Metallspatels wurde das Gehirngewebe dann in den vorbereiteten Plexiglas-Einsatz mit Histoacryl-Kleber fixiert und, um ein Verschieben des Gewebes während des Schneidens zu verhindern, mit den Agar-Blöcken stabilisiert. Der Metallteller wurde nun in das dazugehörige Metallbecken geschraubt, das mit 150 ml Präparationsmedium befüllt wurde, um eine

ausreichende Versorgung des Gewebes während der Präparation zu gewährleisten. Durch Einsatz des Vibratoms wurden 350 µm starke Horizontalschnitte der Hippokampusregion angefertigt. Hierzu wurden zunächst die obersten 500 µm des Rattengehirns entfernt und verworfen bevor die einzelnen Schnitte angefertigt wurden. Deren Gewebearchitektur wurde dann sofort unter einem binokularen Mikroskop begutachtet, um anschließend mit einem Skalpell zurechtgeschnitten und in dem Präparationsmedium zu Kühlung auf Eisbeutel gelegt zu werden. Pro Rattenhirn konnten durchschnittlich 6-8 Schnittkulturen gewonnen werden. Diese wurden nach Abschluss des Schneidevorgangs in Zellkultureinsätze überführt und in 6-Loch-Platten, die pro Loch einen Milliliter Kulturmedium enthielten, in einem Brutschrank bei 35 °C und 5% CO₂ in einer voll gesättigten Atmosphäre kultiviert. Alle zwei Tage wurde ein Mediumwechsel durchgeführt und je nach Bedarf verschiedene Testsubstrate in der entsprechenden Verdünnung zugesetzt.

3.5 Behandlungsschema und experimentelle Gruppen

Im Anschluss an die Präparation der OHSC wurden diese zum weiteren experimentellen Verfahren in verschiedene Versuchsgruppen gegliedert, welche im Folgenden näher erläutert sind. Abbildung 10 zeigt die experimentellen Bedingungen der einzelnen Gruppen zusätzlich schematisch auf. Pro Gruppe wurden mindestens drei unabhängige Experimente mit je doppeltem Probenlauf durchgeführt.

Behandlungsschema



⚡ NMDA (50µM) für vier Stunden

⚡ 15-minütige Präinkubation mit Antagonist nach NMDA Applikation

Abb. 10 Behandlungsschema der experimentellen Gruppen (siehe bitte auch vorherige Seite)

Kontrolle (CTL): Die OHSC dieser Gruppe wurden vom Tag der Präparation (0. div, *days in vitro*) bis zum Tag der Fixierung (9. div) mit Kulturmedium versorgt. Diese Gruppe stellt die negativ-Kontrolle dar.

NMDA: Es handelt sich hierbei um OHSC, die vom 0. div bis zum 6. div in Kulturmedium inkubiert wurden. Am 6. div wurden die Schnittkulturen für vier Stunden mit 50 μM NMDA geschädigt, anschließend kurz mit Kulturmedium gewaschen und danach bis zur Fixierung in Kulturmedium allein belassen. Sie fungierten als positiv-Kontrolle.

Agonist/Antagonist: Die OHSC dieser Gruppe wurden ungeschädigt mit Agonisten oder Antagonisten der untersuchten Rezeptoren behandelt, um einen möglichen Einfluss auf nicht geschädigte OHSC zu ermitteln.

NMDA+Agonist oder Antagonist: Die Schnittkulturen wurden von 0. div bis 6. div mit Kulturmedium versorgt und am 6. div für vier Stunden mit 50 μM NMDA geschädigt. Nach den vier Stunden wurden die OHSC einmal kurz mit Kulturmedium oder HBSS gespült. Es erfolgte danach die Applikation des Agonisten oder Antagonisten bis zum Tag der Fixierung (9. div).

NMDA+Agonist+Antagonist: Die zu dieser Gruppe gehörenden OHSC wurden bis zum 6. div in Kulturmedium allein belassen. Am 6. wurden sie für vier Stunden mit NMDA inkubiert. Danach wurden die OHSC 15 Minuten mit dem gewählten Antagonisten präinkubiert und anschließend bis zur Fixierung am 9. div mit der Kombination aus Agonist und entsprechendem Antagonisten weiterbehandelt.

Clodronat: Die Schnittkulturen dieser Gruppe wurden vom 1. div bis zum 6. div mit dem Bisphosphonat Clodronat behandelt. Die nachfolgende Behandlung erfolgte entsprechend wie oben bereits beschrieben.

3.6 Markierung degenerierter Neurone in der OHSC

Der Farbstoff Propidium Iodid (PI) wurde zur Darstellung degenerierender Neurone verwendet. Es handelt sich hierbei um einen fluoreszierenden Farbstoff, der vor Fixation des Gewebes selektiv in den Zellkern geschädigter Zellen eindringt und mit der Desoxyribonukleinsäure interkaliert, wodurch die degenerierenden Neurone markiert werden (Norberg et al., 1999). Zwei Stunden vor der Fixierung der OHSC wurde PI in einer Endkonzentration von 5 $\mu\text{l/ml}$ dem Kulturmedium zugesetzt. Um das Ausmaß der neuronalen Schädigung zu bestimmen, wurde die Anzahl PI positiver neuronaler Zellkerne in den unterschiedlichen experimentellen Gruppen ermittelt.

3.7 Fixierung der OHSC

Nach neun Tagen in Kultur wurden die OHSC fixiert. Zunächst wurde das Kulturmedium abgesaugt und anschließend eine 4% (w/v) Paraformaldehydlösung für mindestens drei Stunden zur Fixation angewendet. Danach wurden die Schnittkulturen mit 0,1 M PBS für 30 Minuten gespült und daraufhin mit einem feinen Pinsel von der Membran der Einsätze gelöst. Es folgte der Transfer der OHSC in eine 0,1 M Phosphatpufferlösung, welche mit 0,1 % (v/v) Natriumazid (NaN_3) versetzt wurde, in der die OHSC bei 4°C bis zum Fortgang der Verarbeitungsschritte aufbewahrt wurden.

3.8 Kennzeichnung und Visualisierung von Mikrogliazellen in der OHSC

Das mit dem Fluorochrom FITC konjugierte Lektin Isolektin B4 (IB₄) wurde eingesetzt, um Mikrogliazellen sichtbar zu machen. Der 30-minütigen Inkubation der fixierten OHSC mit normalem Ziegen Serum (1:20 in PBST) ging eine über-Nacht Inkubation mit FITC-konjugiertem IB₄ (1:50 in 0,5% (w/v) BSA in PBST) voraus. Anschließend wurden die OHSC zunächst mit PBST gespült (3 x 10 Minuten), dann mit dem Fluoreszenz Eindeckmedium Dakomount (DAKO, GmbH, Hamburg, Deutschland) eingebettet und bei 4°C bis zur Analyse und weiteren Auswertung aufbewahrt.

3.9 Datenauswertung und -analyse

3.9.1 Quantitative Erfassung der degenerierten Neurone und Mikrogliazellen

Um eine Aussage über die Auswirkung der Behandlung der Schnittkulturen mit den Testsubstraten auf die Mikrogliazellen und das neuronale Überleben treffen zu können, wurden die IB₄ positiven Mikrogliazellen und die PI positiven Neurone in der Körnerzellschicht des Gyrus dentatus (DG) ausgezählt. Die Angabe der Zellzahlen des jeweiligen Zelltypes erfolgte stets prozentual des erzielten Mittelwertes bei Zählung des entsprechenden Zelltyps in der Körnerzellschicht NMDA geschädigter OHSC.

Zur Bestimmung der Zellzahlen wurden Aufnahmen an einem konfokalen Laserscanningmikroskop (CLSM; LSM 500 Axiovert 100, Zeiss, Göttingen), das Fluoreszenzsignale in einer konfokalen Ebene darstellt, verwendet. Das Lasermodul des CLSM enthält drei Laserrohre, darunter neben zwei Helium/Neon Lasern (Anregungswellenlängen: 543 nm, beziehungsweise 633 nm) auch einen Argon Laser (Anregungswellenlängen: 458 nm und 488 nm). Monochromatisches Licht der Wellenlänge 488 nm sowie ein Farbteiler (FT 488/543) und ein Emissions-Bandpassfilter mit 505-530 nm wurden zur Visualisierung der IB₄ markierten Mikrogliazellen genutzt. Um die PI positiven Neurone sichtbar zu machen, wurde monochromatisches Licht der Wellenlänge 543 nm und ein Emissions-Bandpassfilter mit 585-615 nm eingesetzt. Der Anschluss an einen Computer ermöglichte sowohl die Modulsteuerung als auch das Speichern der Bilddaten bis zur weiteren Verarbeitung und Analyse.

Unter Nutzung des CLSM wurden die OHSC optisch in 2 µm starke Schichten geschnitten. Es wurden Aufnahmen in 160-facher Vergrößerung angefertigt.

Mit Hilfe des Zeiss KS400 Systems wurde die Anzahl der PI positiven Neurone ausgewertet. Hierzu wandelte das System zunächst das konfokale in ein Binärbild um. Nun wurden die PI markierten Neurone heraussegmentiert. Die Arbeitsschritte zur quantitativen Auswertung erfolgten an jeder dritten optischen Schnittebene, um die doppelte Abbildung einzelner Neurone auf mehreren Ebenen zu verhindern.

3.9.2 Statistische Auswertung

Alle Analysen wurden mit Hilfe des Computerprogramms Graph Pad Prism durchgeführt. Die Signifikanz der Unterschiede zwischen den Gruppen wurde durch Varianzanalyse (one-way analysis of variance, ANOVA) mit darauf folgendem Dunnett-Test für mehrfache Vergleiche bestimmt. Die Ergebnisdaten wurden als Mittelwert mit Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben.

4 Ergebnisse

4.1 Anwendung der NMDA induzierten exzitotoxischen Schädigung im Modell der OHSC

Um die neuroprotektiven Effekte und Wirkmechanismen von PEA, 2-AG und WIN zu untersuchen, wurde das Modell der OHSC gewählt und hier exzitotoxische Schädigungen durch NMDA Applikation induziert.

Ungeschädigte Kontrollschnitte wiesen nur sehr vereinzelt PI positive Neurone in der Körnerzellschicht des DG und eine sehr gute Strukturhaltung auf (CTL, Abb. 11 A). Lediglich wenige Mikrogliazellen wurden im Bereich des DG ungeschädigter Kontrollen beobachtet (CTL, Abb. 11 A). Sie waren meist in der Molekularschicht lokalisiert, weit ramifiziert und durchzogen mit ihren Zellausläufern den DG. Ihre Zellkörper wurden mit IB₄ markiert und waren in grün zu erkennen.

Die durch vierstündige NMDA Applikation geschädigten OHSC wiesen hingegen eine massive Akkumulation von degenerierten, PI positiven neuronalen Zellkernen mit deutlicher Rotfärbung in der Körnerzellschicht des DG auf (NMDA, Abb. 11 A). Der Mittelwert der Anzahl PI positiver Neurone bei NMDA Schädigung wurde für alle Experimente als 100% (Durchschnittswert: 193 PI positive Neurone) definiert. Aktivierte IB₄ positive Mikrogliazellen mit charakteristischer amöboider Morphologie akkumulierten in allen Schichten des DG geschädigter OHSC (NMDA, Abb. 11 A). Der Mittelwert der Anzahl IB₄ positiver Mikrogliazellen im Bereich der Körnerzellschicht des DG nach exzitotoxischer Schädigung wurde auf 100% (Durchschnittswert: 114 IB₄ positive Mikrogliazellen) festgesetzt.

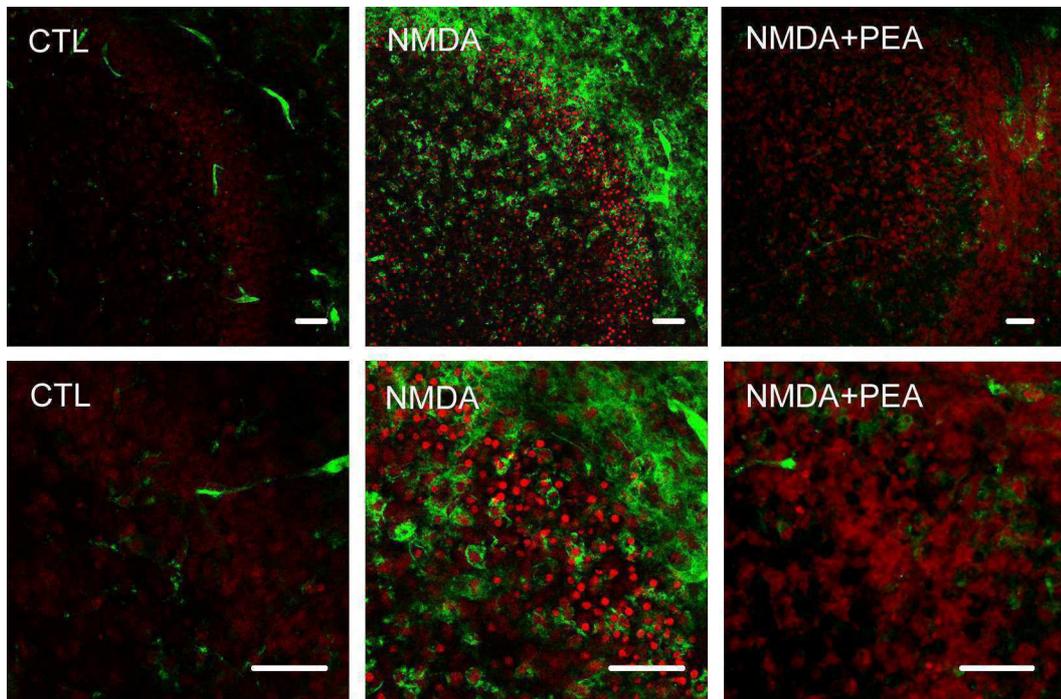
4.2 Untersuchung des Cannabinoids PEA am Modell der exzitotoxischen Schädigung in der OHSC

4.2.1 Wirkung von PEA und des PPAR α Agonisten Wy-14,643 auf neuronales Überleben und Mikrogliazellen

Die gute neuronale Erhaltung unbehandelter und ungeschädigter Schnittkulturen konnte mit dem konfokalen Laserscanningmikroskop bestätigt werden (CTL, Abb. 11 A). Es fanden sich nur wenige PI positive Neurone in der Körnerzellschicht des DG und einzelne ramifizierte Mikrogliazellen (CTL 5,3% der Zahl PI positiver Neurone bei NMDA Applikation, Abb. 11 B; CTL 14,5% der Zahl IB₄ positiver Mikrogliazellen bei

NMDA Applikation, Abb. 11 C). OHSC, die mit 0,01 μ M PEA behandelt wurden, ähnelten den Kontrollschnitten: Sie enthielten fast keine PI positiven Neurone (PEA 0,01 μ M, 0,9% der Zahl PI positiver Neurone bei NMDA Applikation, Abb. 11 B) und sehr wenige IB₄ positive Mikrogliazellen (PEA 0,01 μ M, 20,2% der Zahl IB₄ positiver Mikrogliazellen bei NMDA Applikation, Abb. 11 C).

Die Schädigung mit 50 μ M NMDA führte zu einer massiven Akkumulation von PI positiven Zellkernen degenerierender Körnerzellen des DG und IB₄ positiven Mikrogliazellen (Abb. 11 A). Die Applikation von 0,01 μ M PEA auf NMDA geschädigte OHSC konnte sowohl die Zahl PI positiver Neurone signifikant reduzieren (NMDA+PEA 0,01 μ M, 32,1% der Zahl PI positiver Neurone bei NMDA Applikation, $p < 0,01$ gegenüber NMDA, Abb. 11 A und B) als auch die Zahl IB₄ positiver Mikrogliazellen signifikant mindern (NMDA+PEA 0,01 μ M, 45,2% der Zahl IB₄ positiver Mikrogliazellen bei NMDA Applikation, $p < 0,01$ gegenüber NMDA, Abb. 11 A und C).



A

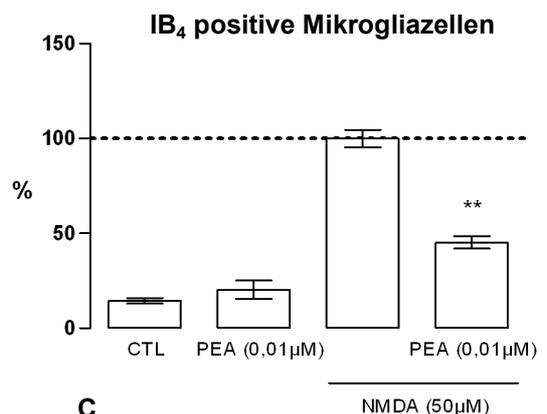
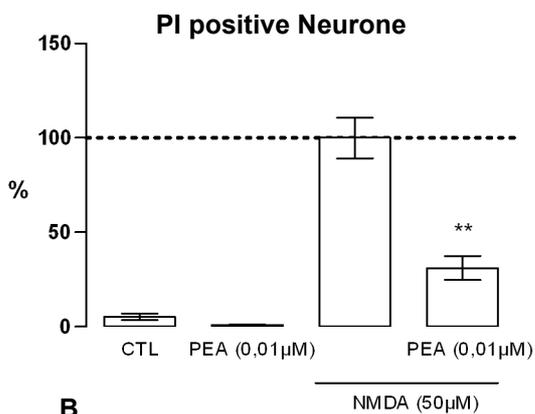
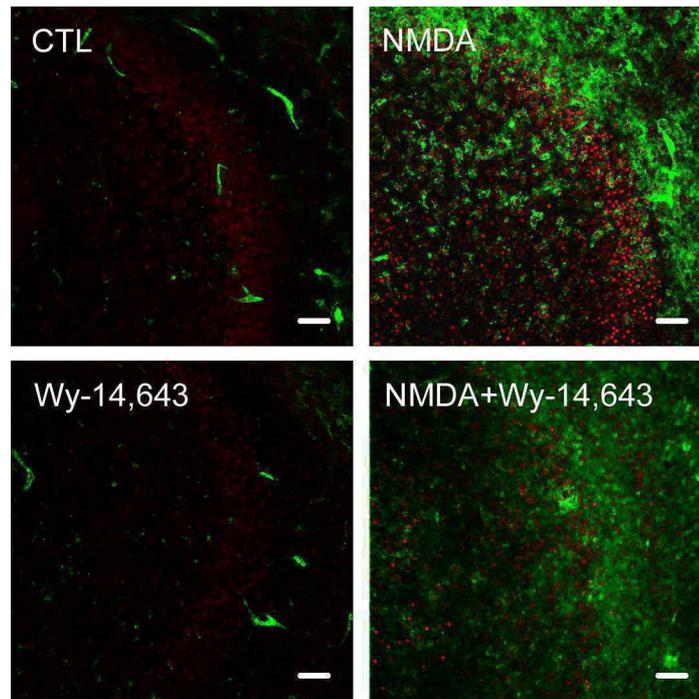


Abb. 11 Effekte von PEA auf die Körnerzellen des DG sowie die Mikrogliazellzahl mit dem konfokalen Laserscanningmikroskop (A) und statistisch (B und C) analysiert (siehe bitte vorherige Seite)

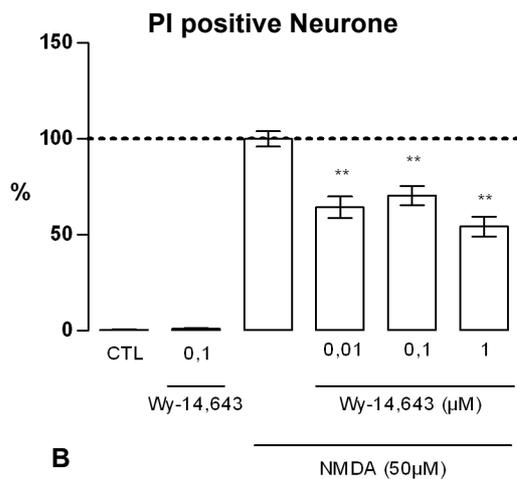
A zeigt den DG in lasermikroskopischer Betrachtung (Maßstabsbalken = 50µM). Es wurde eine Doppelmarkierung mit PI zur Darstellung der degenerierenden neuronalen Zellkerne (rot) und IB₄ zur Kennzeichnung der Mikrogliazellen (grün) vorgenommen. Die obere Bildreihe zeigt Übersichtsaufnahmen des DG mit der jeweiligen Vergrößerung in der unteren Reihe zugeordnet. Unbehandelte Kontrollschnitte wiesen eine sehr gute neuronale Erhaltung mit fast keinen PI positiven Neuronen und nur vereinzelten ramifizierten Mikrogliazellen auf (CTL). Nach Applikation von NMDA zeigte sich eine massive Akkumulation PI positiver neuronaler Zellkerne sowie IB₄ positiver Mikrogliazellen (NMDA). Eine Reduktion der PI positiven Neurone sowie der IB₄ positiven Mikrogliazellen wurde bei zusätzlicher Behandlung mit PEA beobachtet (NMDA+PEA). B und C: Statistische Analyse (Fehlerbalken = SEM). OHSC, die nur mit 0,01µM PEA behandelt wurden zeigten wie unbehandelte Kontrollen fast keine PI positiven Neurone (B). Im Vergleich zu NMDA geschädigten OHSC, wurde die Zahl PI positiver Neurone bei zusätzlicher Applikation von 0,01µM PEA signifikant reduziert (B; **p < 0,01). Wie unbehandelte Kontrollen zeigten auch OHSC, die nur mit 0,01µM PEA behandelt wurden, lediglich wenige IB₄ positive Mikrogliazellen (C). Im Vergleich zu NMDA geschädigten Schnittkulturen wurde die Anzahl IB₄ positiver Mikrogliazellen bei zusätzlicher Applikation von 0,01µM PEA signifikant reduziert (C; **p < 0,01).

Wurde Wy-14,643 auf unbehandelte OHSC appliziert, zeigte sich ein unbehandelten Kontrollschnitten ähnliches Bild mit fast keinen PI positiven Neuronen (Wy-14,643 1µM, 1% der Zahl PI positiver Neurone bei NMDA Applikation, Abb. 12 A und B) und sehr wenigen IB₄ positiven Mikrogliazellen (Wy-14,643 1µM, 9% der Zahl IB₄ positiver Mikrogliazellen bei NMDA Applikation, Abb. 12 A und C).

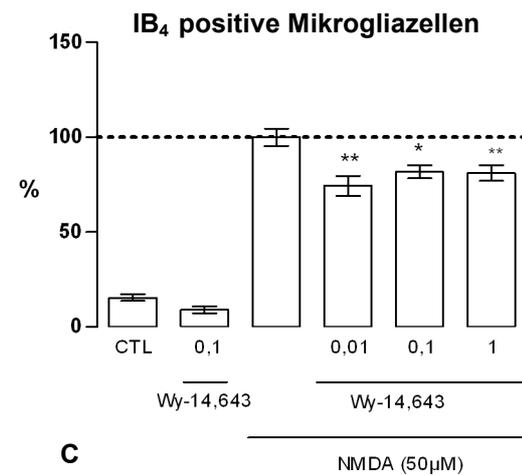
In NMDA geschädigten OHSC war als Konsequenz der Applikation des PPARα Agonisten Wy-14,643 in den Konzentrationen 0,01µM, 0,1µM sowie 1µM eine signifikante Reduktion PI positiver Neurone zu beobachten (NMDA+Wy-14,643 0,01µM, 64,3% der Zahl PI positiver Neurone bei NMDA Applikation, p<0,01, Abb. 12 A und B; NMDA+Wy-14,643 0,1µM, 70,4% der Zahl PI positiver Neurone bei NMDA Applikation, p<0,01, Abb. 12 B; NMDA+Wy-14,643 1µM, 54,2% der Zahl PI positiver Neurone bei NMDA Applikation, p<0,01, Abb. 12 B; für alle Gruppen gegenüber NMDA). Wy-14,643 angewandt in 0,01, 0,1 und 1 mikromolarer Konzentration konnte bei Applikation auf geschädigte OHSC außerdem die Anzahl IB₄ positiver Mikrogliazellen signifikant reduzieren (NMDA+Wy-14,643 0,01 µM, 74,4% der Zahl IB₄ positiver Mikrogliazellen bei NMDA Applikation, p<0,01, Abb. 12 A und C; NMDA+Wy-14,643 0,1 µM, 81,8% der Zahl IB₄ positiver Zellen bei NMDA Applikation, p<0,05, Abb. 12 C; NMDA+Wy-14,643 1 µM, 81,1% der Zahl IB₄ positiver Zellen bei NMDA Applikation, p<0,01, Abb. 12 C; für alle Gruppen gegenüber NMDA).



A



B



C

Abb. 12 Effekte von Wy-14,643 auf die Körnerzellen des DG sowie die Mikrogliazellzahl mit dem konfokalen Laserscanningmikroskop (A) und statistisch (B und C) analysiert

A zeigt den DG in lasermikroskopischer Betrachtung (Maßstabsbalken = 50µm). Es wurde eine Doppelfärbung mit PI zur Markierung der degenerierenden neuronalen Zellkerne (rot) und IB₄ zur Kennzeichnung der Mikrogliazellen (grün) verwendet. Nur mit 0,1µM WY-14,643 behandelte OHSC (Wy-14,643) ähnelten unbehandelten Kontrollschnitten (CTL): Es waren fast keine PI positiven Neurone und nur vereinzelte IB₄ positive Mikrogliazellen zu beobachten. Nach Applikation von NMDA zeigte sich eine Akkumulation PI positiver Neurone und IB₄ positiver Mikrogliazellen (NMDA). PI positive Neurone und IB₄ positive Mikrogliazellen wurden durch zusätzliche Applikation von 0,01µM Wy-14,643 (NMDA+Wy-14,643) reduziert. B und C: Statistische Analyse (Fehlerbalken = SEM). OHSC, die nur mit 0,01µM WY-14,643 behandelt wurden zeigten eine sehr geringe Zahl PI positiver Neurone (A). Die Behandlung NMDA geschädigter OHSC mit Wy-14,643 (0,01µM, 0,1µM oder 1µM) reduzierte die Zahl PI positiver Neurone signifikant (A; **p < 0,01). Nur mit 0,01µM WY-14,643 behandelte

OHSC zeigten ebenso wie unbehandelte Kontrollschnitte nur wenige IB₄ positive Mikrogliazellen (B). Die Behandlung NMDA geschädigter OHSC mit WY-14,643 führte zu einer signifikanten Reduktion der Zahl IB₄ positiver Mikrogliazellen (B; **p < 0,01 für 0,01µM oder 1µM Wy-14,643, B; *p < 0,05 für 0,1µM Wy-14,643).

4.2.2 Effekte beim Einsatz von PPAR Antagonisten

Die Behandlung mit dem PPAR α Antagonist GW6471 konnte die durch PEA herbeigeführte Reduktion degenerierender Neurone signifikant und konzentrationsabhängig bei 0,05µM, 0,5µM und 5µM mit maximalem Effekt bei höchster Konzentration aufheben (NMDA+PEA+GW6471 0,05 µM, 64,6% der Zahl PI positiver Neurone bei NMDA Applikation, p<0,05, Abb. 14; NMDA+PEA+GW6471 0,5 µM, 80,6% der Zahl PI positiver Neurone bei NMDA Applikation, p<0,01, Abb. 14; NMDA+PEA+GW6471 5 µM, 87,6% der Zahl PI positiver Neurone bei NMDA Applikation, p<0,01, Abb. 13 und 14; für alle Gruppen gegenüber NMDA+PEA). Applikation von 5µM GW6471 auf NMDA geschädigte OHSC alleine beeinflusste die Anzahl PI positiver Neurone im Vergleich zu geschädigten OHSC, die mit 5µM GW6471 und PEA inkubiert wurden nicht (NMDA+GW6471 5µM, 78,3% der Zahl PI positiver Neurone bei NMDA Applikation p>0,05 gegenüber NMDA+GW6471 5µM +PEA; Abb. 14).

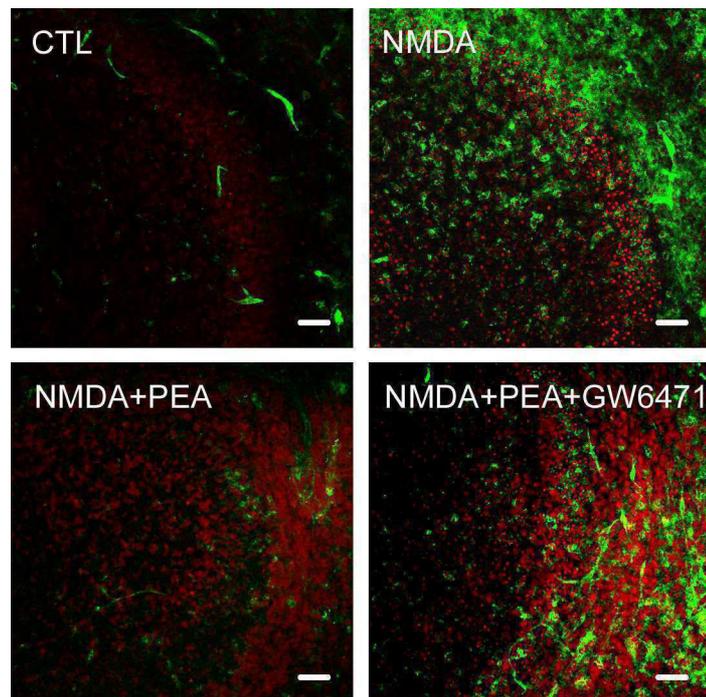


Abb. 13 Lasermikroskopische Analyse der Effekte von PEA alleine und in Kombination mit GW6471 auf neuronales Überleben und die Mikrogliazellzahl in exzitotoxisch geschädigten OHSC

Maßstabsbalken = 50µM. Es wurde PI zu Markierung der degenerierenden neuronalen Zellkerne (rot) und IB₄ zu Darstellung der Mikrogliazellen (grün) verwendet. Kontrollschnitte zeigten fast keine PI positiven Neurone und nur wenige IB₄ positive Mikrogliazellen (CTL). Nach Applikation von NMDA war eine massive

Akkumulation PI positiver Neurone und IB₄ positiver Mikrogliazellen zu beobachten (NMDA). Bei Behandlung geschädigter OHSC mit 0,01µM PEA zeigte sich eine deutliche Reduktion der PI positiven Neurone sowie der Zahl IB₄ positiver Mikrogliazellen (NMDA+PEA). Die Reduktion PI positiver Neurone und IB₄ positiver Mikrogliazellen wurde durch zusätzliche Applikation von 5µM GW6471 blockiert (NMDA+PEA+GW6471).

Im Gegensatz dazu konnte der PPAR γ Antagonist GW9662 die durch PEA verursachte Reduktion der Anzahl PI positiver Neurone in der Körnerzellschicht des DG in der eingesetzten Konzentrationsreihe von 0,01µM bis 1µM nicht aufheben (NMDA+PEA+GW9662 0,01 µM, 13,1% der Zahl PI positiver Neurone bei NMDA Applikation, $p>0,05$, Abb. 15; NMDA+PEA+GW9662 0,1 µM, 18,7% der Zahl PI positiver Neurone bei NMDA Applikation, $p>0,05$, Abb. 15; NMDA+PEA+GW9662 1 µM, 12,2% der Zahl PI positiver Neurone bei NMDA Applikation, $p>0,05$, Abb 15; für alle Gruppen gegenüber NMDA+PEA). Geschädigte OHSC, auf die 1µM GW9662 appliziert wurde, wiesen eine signifikant höhere Menge an PI positiven Neuronen im Vergleich zu geschädigten OHSC auf, die mit GW9662 und PEA behandelt wurden (NMDA+GW9662 1µM, 87,5% der Zahl PI positiver Zellen bei NMDA Applikation $p<0,01$ gegenüber NMDA+GW9662 1µM +PEA; Abb. 15).

Die Reduktion der Anzahl IB₄ markierter Mikrogliazellen in der Körnerzellschicht des DG von geschädigten OHSC, die mit PEA behandelt wurden, wurde nach Applikation von GW6471 ebenfalls signifikant aufgehoben (NMDA+PEA+GW6471 5µM, 87,3% der Zahl IB₄ positiver Mikrogliazellen bei NMDA Applikation, $p>0,05$ gegenüber NMDA+PEA; Abb. 16). GW9662 hatte dagegen in einer Konzentration von 1µM keinen Effekt auf die Reduktion IB₄ positiver Mikrogliazellen (NMDA+PEA+GW9662 1 µM, 48% der Zahl IB₄ positiver Zellen bei NMDA Applikation, $p>0,05$; Abb. 16).

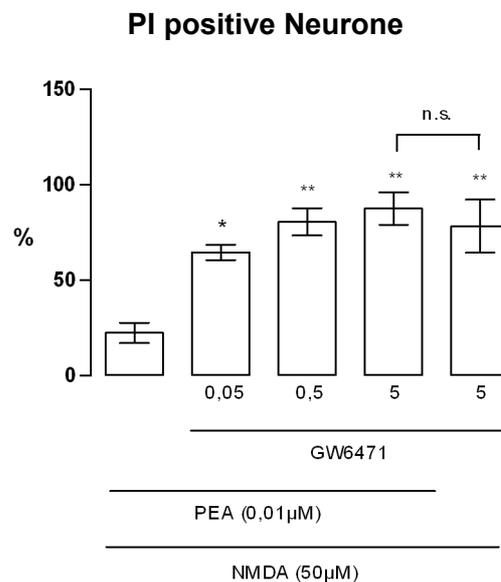


Abb. 14 Aufhebung der PEA vermittelten Reduktion PI positiver Neurone in exzitotoxisch geschädigten OHSC durch GW6471 (siehe bitte vorherige Seite)

Statistische Analyse. Fehlerbalken = SEM. GW6471 (0,05µM, 0,5µM oder 5 µM) antagonisierte konzentrationsabhängig die PEA vermittelte Reduktion PI positiver Neurone in NMDA geschädigten OHSC mit maximalem Effekt bei Anwendung von 5µM GW6471 (**p < 0,01 vs. NMDA+PEA). Die Behandlung geschädigter OHSC mit 5µM GW6471 beeinträchtigte die Zahl PI positiver Neurone im Vergleich zu geschädigten OHSC, die mit 5µM GW6471 und PEA behandelt wurden nicht.

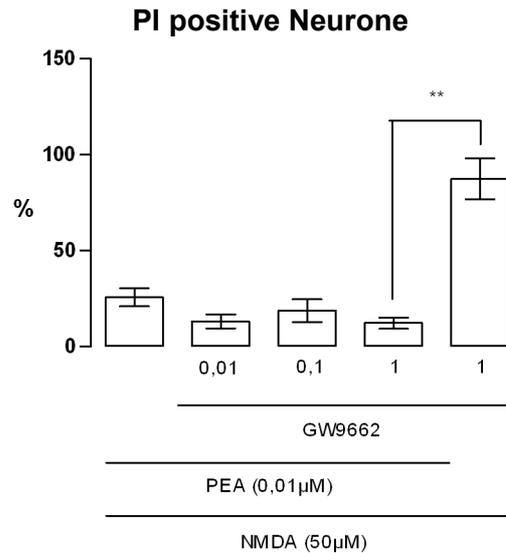


Abb. 15 Fehlende Blockade der PEA medierten Reduktion PI positiver Neurone in NMDA geschädigten OHSC durch GW9662

Statistische Analyse. Fehlerbalken = SEM. GW9662 (0,01µM, 0,1µM oder 1µM) antagonisierte die durch PEA vermittelte Reduktion PI positiver Neurone in geschädigten OHSC nicht. NMDA geschädigte OHSC, die nur mit GW 9662 (1µM) behandelt wurden, zeigten eine signifikant größere Zahl PI positiver Neurone als geschädigte OHSC, die mit PEA und 1µM GW9662 behandelt wurden (**p < 0,01 vs. NMDA +PEA).

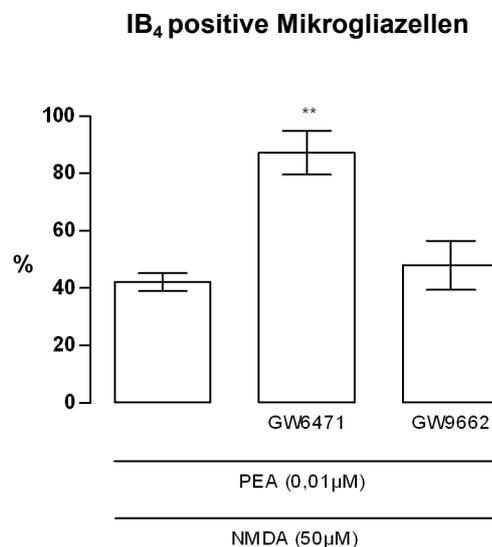


Abb. 16 Effekte von GW6471 und GW 9662 auf die von PEA medierte Reduktion IB₄ positiver Mikrogliazellen in exzitotoxisch geschädigten OHSC (siehe bitte vorherige Seite)

Statistische Analyse. Fehlerbalken = SEM. Die durch PEA vermittelte Reduktion der Zahl IB₄ positiver Mikrogliazellen wurde durch den PPAR α Antagonisten GW6471, nicht aber durch den PPAR γ Antagonisten GW9662 signifikant blockiert.

4.3 Ergebnisse zu 2-AG und der Rolle des abn-CBD Rezeptors im Schädigungsmodell der OHSC

4.3.1 Wirkungen von 2-AG und abn-CBD auf neuronales Überleben und Mikrogliazellen

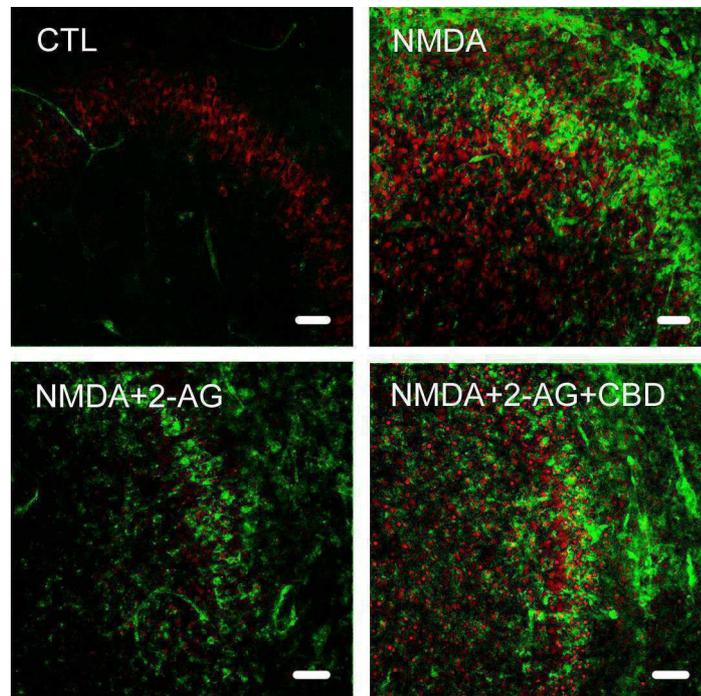
Ungeschädigte Kontrollschnitte zeigten fast keine PI positiven Neurone in der Körnerzellschicht des DG (CTL 0,6% der Zahl PI positiver Neurone bei NMDA Applikation; Abb. 17 A und B). Die vereinzelt, weit ramifizierten IB₄ positiven Mikrogliazellen konnten durch konfokale Lasermikroskopie hauptsächlich in der Molekularschicht lokalisiert werden (CTL 13,1% der Zahl IB₄ positiver Mikrogliazellen bei NMDA Applikation; Abb. 17 A und C). Durch Schädigung mit NMDA kam es sowohl zu einem deutlichen Anstieg der Zahl PI positiver degenerierender neuronaler Zellkerne in der Körnerzellschicht des DG als auch zu einer massiven Akkumulation aktivierter, IB₄ positiver Mikrogliazellen (Abb. 17 A, B und C).

Die durch Schädigung mit NMDA hervorgerufene Akkumulation PI positiver Neurone in der Körnerzellschicht des DG wurde durch die Applikation des Endocannabinoids 2-AG (0,001 μ M) signifikant gegenüber allein mit NMDA behandelter OHSC reduziert (NMDA+ 2-AG 0,001 μ M, 55,1% der Zahl PI positiver Neurone bei NMDA Applikation, $p < 0,01$ gegenüber NMDA; Abb. 17 A und B). Ebenso wurde die Zahl IB₄ positiver Mikrogliazellen im Bereich des DG (NMDA+ 2-AG 0,001 μ M, 51,8% der Zahl IB₄ positiver Mikrogliazellen bei NMDA Applikation, $p < 0,01$ gegenüber NMDA; Abb. 17 A und C) signifikant gegenüber NMDA geschädigter OHSC, die nicht mit 2-AG behandelt wurden, gesenkt.

Die zusätzliche Applikation des CB1 Rezeptor Antagonisten AM251 hatte weder in hohen (10 μ M), noch in niedrigen Konzentrationen (0,1 μ M und 1 μ M) signifikanten Einfluss auf die von 2-AG verursachte Reduktion der Anzahl PI positiver Zellen in der Körnerzellschicht des DG von geschädigten OHSC (NMDA+2-AG+AM251 10 μ M, 48% der Zahl PI positiver Neurone bei NMDA Applikation, $p > 0,05$; NMDA+2-AG+AM251 1 μ M, 56,9% der Zahl PI positiver Neurone bei NMDA Applikation, $p > 0,05$; NMDA+2-AG +AM251 0,1 μ M, 52,5% der Zahl PI positiver Neurone bei NMDA Applikation, $p > 0,05$; für alle Gruppen gegenüber NMDA+2-AG; Abb. 17 B). Auch die durch 2-AG erzielte Reduktion der Mikrogliazellzahl in NMDA geschädigten OHSC wurde von AM251 in der gesamten Konzentrationsserie von 0,1 μ M bis 10 μ M nicht signifikant

aufgehoben (NMDA+2-AG +AM251 0,1 μ M, 57,7% der Zahl IB₄ positiver Mikrogliazellen bei NMDA Applikation, $p > 0,05$; NMDA+2-AG +AM251 1 μ M, 66,3% der Zahl IB₄ positiver Mikrogliazellen bei NMDA Applikation, $p > 0,05$; NMDA+2-AG +AM251 10 μ M, 47,8% der Zahl IB₄ positiver Mikrogliazellen bei NMDA Applikation, $p > 0,05$; für alle Gruppen gegenüber NMDA+2-AG; Abb. 17 C).

Die durch 2-AG erzielte Reduktion der Anzahl PI positiver Neurone in der Körnerzellschicht des DG in NMDA geschädigten OHSC konnte jedoch durch Einsatz der abn-CBD Rezeptor Antagonisten CBD oder O-1918 aufgehoben werden (NMDA+2-AG+CBD 10 μ M, 90,9% der Zahl PI positiver Neurone bei NMDA Applikation, $p < 0,01$, Abb. 17 A und B; NMDA+2-AG+O-1918 30 μ M, 79,4%, $p < 0,05$, Abb. 17 B; für beide Gruppen gegenüber NMDA+2-AG). Beide abn-CBD Rezeptor Antagonisten konnten außerdem die durch die Applikation von 2-AG auf geschädigte OHSC herbeigeführte Minderung der Mikrogliazellzahl signifikant revertieren (NMDA+2-AG+CBD 10 μ M, 92,7% der Zahl IB₄ positiver Zellen bei NMDA Applikation, $p < 0,01$, Abb. 17 A und C; NMDA+2-AG+O-1918 30 μ M, 91,7%, $p < 0,05$, Abb. 17 C; für beide Gruppen gegenüber NMDA+2-AG).



A

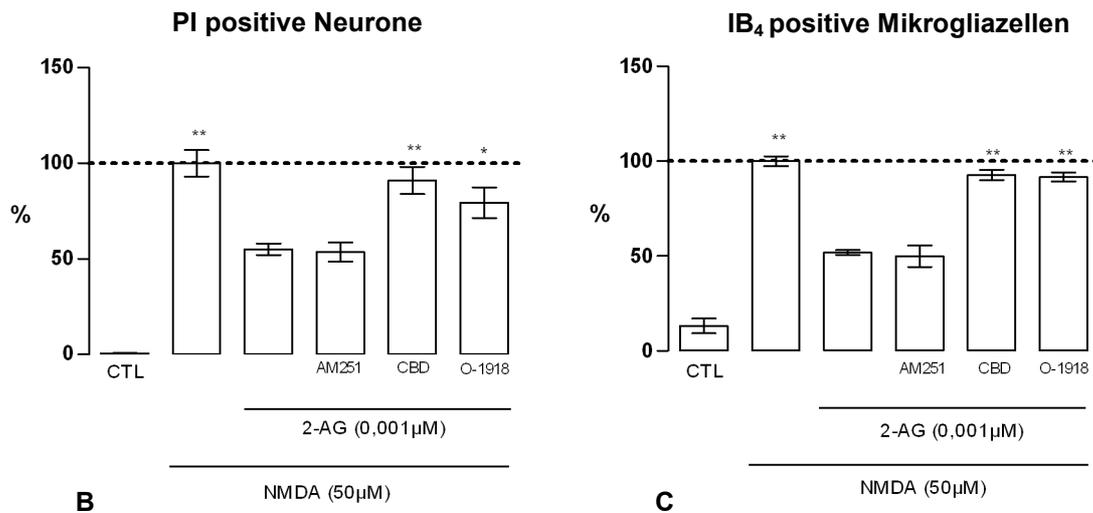
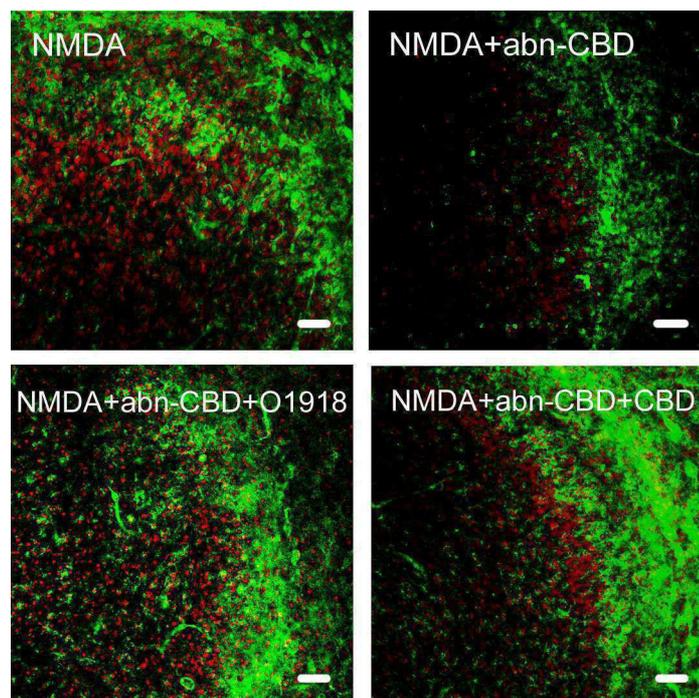


Abb. 17 Effekte von 2-AG auf exzitotoxisch geschädigte OHSC

A zeigt eine lasermikroskopische Analyse des DG. Maßstabsbalken = 50µM. Es wurde eine Doppelmarkierung mit PI zur Kennzeichnung degenerierender Neurone (rot) und IB₄ zur Darstellung von Mikrogliazellen (grün) verwendet. In unbehandelten Kontrollschnitten waren vereinzelte ramifizierte Mikrogliazellen und fast keine PI positiven Neurone zu beobachten (CTL). Nach NMDA Applikation zeigten sich viele PI positive Neurone und eine massive Akkumulation IB₄ positiver Mikrogliazellen (NMDA). Die Behandlung NMDA geschädigter OHSC mit 0,001µM 2-AG resultierte in einer Reduktion der IB₄ positiven Mikrogliazellen und PI positiven Neurone (NMDA+2-AG). Die erzielte Reduktion der PI positiven Neurone und IB₄ positiven Mikrogliazellen konnte durch zusätzliche Applikation von CBD blockiert werden (NMDA+2-AG+CBD). B und C: Statistische Analyse (Fehlerbalken = SEM). 2-AG reduzierte signifikant die Zahl PI positiver Neurone in NMDA geschädigten OHSC (A; **p < 0,01 NMDA vs. NMDA+ 2-AG). Dieser Effekt wurde nicht durch den CB1 Rezeptor Antagonisten AM251 beeinträchtigt, aber signifikant durch die Applikation des abn-CBD Rezeptor Antagonisten CBD (A; **p < 0,01 vs. NMDA + 2-AG) oder O-1918 antagonisiert (A; *p < 0,05 vs. NMDA+2-AG). Im Vergleich zu NMDA geschädigten OHSC wurde durch die Applikation von 2-AG eine signifikante Reduktion der Zahl IB₄ positiver Mikrogliazellen erzielt (B; **p < 0,01 NMDA vs. NMDA+ 2-AG). Die durch 2-AG medierte Reduktion IB₄ positiver Mikrogliazellen wurde nicht durch AM251 blockiert, jedoch signifikant durch Behandlung mit CBD (B; **p < 0,01 vs. NMDA +2-AG) oder O-1918 (B; **p < 0,01 vs. NMDA+2-AG) antagonisiert.

Bei alleiniger Applikation von 10µM abn-CBD auf ungeschädigte OHSC ähnelte das Bild dem unbehandelten OHSC: Es wurden fast keine PI positiven Neurone (abn-CBD 10µM 2,1% der Zahl PI positiver Zellen bei NMDA Applikation; Abb. 18 B) detektiert und nur wenige IB₄ positive Mikrogliazellen (abn-CBD 10µM, 11,7% der Zahl IB₄ positiver Mikrogliazellen bei NMDA Applikation; Abb. 18 C) beobachtet. Die bei NMDA Schädigung auftretende massive Akkumulation PI positiver Neurone konnte durch die Behandlung mit abn-CBD signifikant im Bereich von 0,1µM bis 10µM mit maximalem Effekt bei 1µM reduziert werden (NMDA+abn-CBD 0,1µM, 60,1% der Zahl PI positiver Neurone bei NMDA Applikation, p<0,01; abn-CBD 1µM, 32,8% der Zahl PI positiver

Neurone bei NMDA Applikation, $p < 0,01$; abn-CBD 10 μ M, 37,6% der Zahl PI positiver Neurone bei NMDA Applikation, $p < 0,01$; für alle Gruppen gegenüber NMDA; Abb. 18 A und B), wohingegen 0,001, 0,01 und 0,05 μ M abn-CBD nicht ausreichten, um zu einer signifikanten Reduktion zu führen (NMDA+abn-CBD 0,001 μ M, 97% der Zahl PI positiver Neurone bei NMDA Applikation, $p > 0,05$; abn-CBD 0,01 μ M, 90,4% der Zahl PI positiver Neurone bei NMDA Applikation, $p > 0,05$; abn-CBD 0,05 μ M, 84,8% der Zahl PI positiver Neurone bei NMDA Applikation, $p > 0,05$; für alle Gruppen gegenüber NMDA; Abb. 18 B). In diesem niedrigen Konzentrationsbereich (0,001-0,05 μ M) hatte abn-CBD auch keinen signifikanten Einfluss auf die Zahl IB₄ positiver Mikrogliazellen (NMDA+abn-CBD 0,001 μ M, 104,9% der Zahl IB₄ positiver Mikrogliazellen bei NMDA Applikation, $p > 0,05$; abn-CBD 0,01 μ M, 100,2% der Zahl IB₄ positiver Mikrogliazellen bei NMDA Applikation, $p > 0,05$; abn-CBD 0,05 μ M, 97,9% der Zahl IB₄ positiver Mikrogliazellen bei NMDA Applikation, $p > 0,05$; für alle Gruppen gegenüber NMDA; Abb. 18 C), konnte die Zahl aktivierter IB₄ positiver Mikrogliazellen aber im Bereich von 0,1 μ M bis 10 μ M signifikant und konzentrationsabhängig senken (NMDA+abn-CBD 0,1 μ M, 80,8% der Zahl IB₄ positiver Mikrogliazellen bei NMDA Applikation, $p < 0,05$; abn-CBD 1 μ M, 64,9% der Zahl IB₄ positiver Mikrogliazellen bei NMDA Applikation, $p < 0,01$; abn-CBD 10 μ M, 56,8% der Zahl IB₄ positiver Mikrogliazellen bei NMDA Applikation, $p < 0,01$; für alle Gruppen gegenüber NMDA; Abb. 18 A und C). Die verbleibenden IB₄ positiven Mikrogliazellen zeigten eine den Mikrogliazellen in nur mit NMDA behandelten Schnittkulturen ähnliche amöboide Morphologie.



A

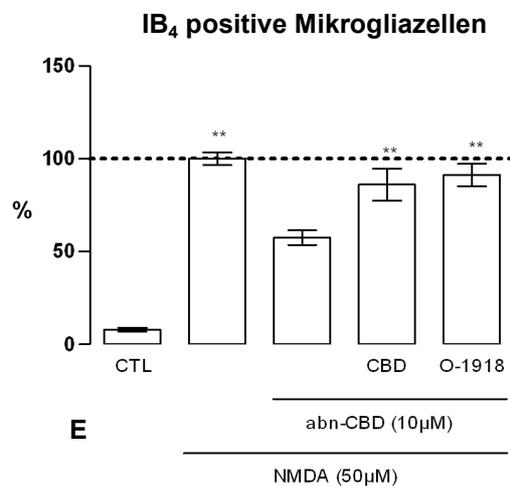
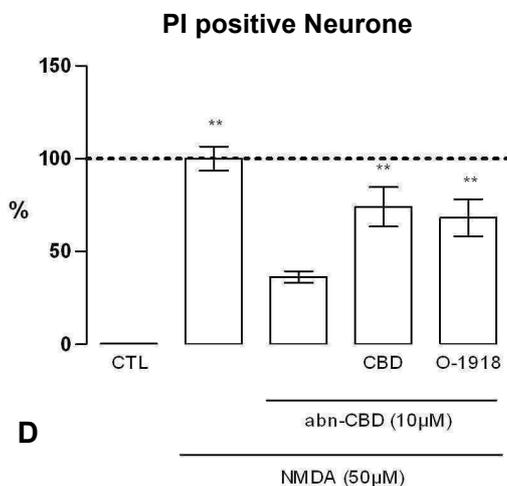
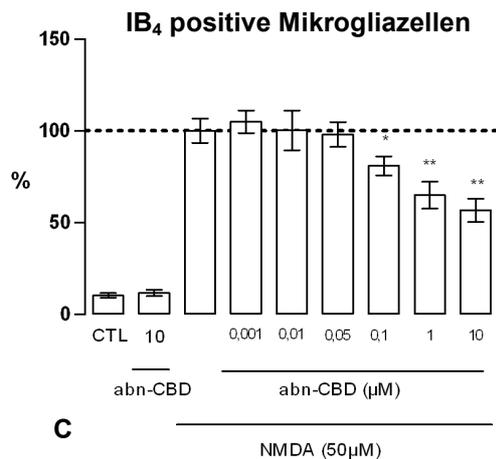
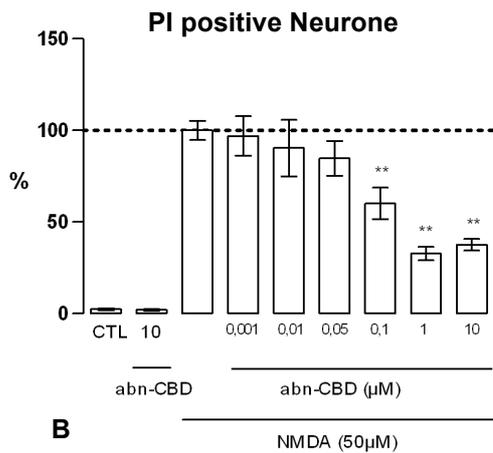


Abb. 18 (siehe bitte auch vorherige Seite) Effekte von abn-CBD auf NMDA geschädigte Schnittkulturen und deren Reversibilität durch die abn-CBD Rezeptor Antagonisten CBD und O-1918

A zeigt den DG in lasermikroskopischer Betrachtung (Maßstabsbalken = 50µM). Die OHSC wurden doppelt markiert mit PI zur Darstellung degenerierender neuronaler Zellkerne (rot) und IB₄ zur Kennzeichnung von Mikrogliazellen (grün). Mit NMDA geschädigte OHSC wiesen sehr viele PI positive Neurone und eine massive Akkumulation IB₄ positiver Mikrogliazellen auf (NMDA). Die zusätzliche Behandlung mit abn-CBD führte zu einer Reduktion von PI positiven Neuronen und IB₄ positiven Mikrogliazellen (NMDA+abn-CBD). Die Reduktion der PI positiven Neurone und IB₄ positiven Mikrogliazellen konnte durch zusätzliche Applikation des abn-CBD Rezeptor Antagonisten O-1918 (NMDA+abn-CBD+O1918) oder CBD (NMDA+abn-CBD+CBD) blockiert werden.

B, C, D und E: Statistische Analyse (Fehlerbalken = SEM). OHSC, die mit 10µM abn-CBD behandelt wurden enthielten sehr wenige PI positive Neurone (B). Im Vergleich zu NMDA geschädigten OHSC reduzierte abn-CBD (0,1µM, 1µM oder 10µM; **p < 0,01) die Zahl PI positiver Neurone signifikant mit maximalem Effekt bei Applikation von 1µM abn-CBD (B). Schnittkulturen, die mit 10µM abn-CBD behandelt wurde ähnelten Kontrollschnitten: Sie enthielten nur wenige IB₄ positive Mikrogliazellen (C). Im Vergleich zu NMDA geschädigten OSHC reduzierte abn-CBD (0,1µM, *p < 0,05; 1µM oder 10µM, **p < 0,01; C) die Zahl IB₄ positiver Mikrogliazellen signifikant und

konzentrationsabhängig. Die durch abn-CBD vermittelte Reduktion PI positiver Neurone in NMDA geschädigten OHSC konnte durch Applikation der abn-CBD Rezeptor Antagonisten CBD oder O-1918 signifikant antagonisiert werden (D; $^{**}p < 0,01$ vs. NMDA+abn-CBD). Die zusätzliche Applikation von CBD oder O-1918 auf NMDA geschädigte und mit abn-CBD behandelte OHSC antagonisiert die durch abn-CBD medierte Reduktion IB₄ positiver Mikrogliazellen signifikant (E; $^{**}p < 0,01$ vs. NMDA+abn-CBD).

Die durch abn-CBD erzielte Reduktion PI positiver Neurone in durch NMDA geschädigten OHSC wurde durch die Applikation der abn-CBD Rezeptor Antagonisten CBD oder O-1918 signifikant gemindert (NMDA+abn-CBD10 μ M+ CBD 10 μ M, 74,1% der Zahl PI positiver Neurone bei NMDA Applikation, $p < 0,01$; NMDA+abn-CBD10 μ M+O-1918 30 μ M, 68,3% der Zahl PI positiver Neurone bei NMDA Applikation, $p < 0,01$; für beide Gruppen gegenüber NMDA+abn-CBD μ M; Abb. 18 A und D). Ebenso wurde die durch abn-CBD erzielte Reduktion der Zahl IB₄ positiver Mikrogliazellen in geschädigten OHSC durch Anwedung der abn-CBD Rezeptor Antagonisten CBD oder O-1918 signifikant antagonisiert (NMDA+ abn-CBD10 μ M+ CBD 10 μ M 86,1% der Zahl IB₄ positiver Mikrogliazellen bei NMDA Applikation, $p < 0,01$; NMDA+ abn-CBD10 μ M+O-1918 30 μ M, 91,2% der Zahl IB₄ positiver Mikrogliazellen bei NMDA Applikation, $p < 0,01$; für beide Gruppen gegenüber NMDA+abn-CBD10 μ M; Abb. 18 A und E).

Ungeschädigte OHSC, die mit dem CB1 Rezeptor Antagonisten AM251 oder den abn-CBD Rezeptor Antagonisten CBD oder O1918 behandelt wurden, enthielten fast keine PI positiven Neurone (AM251: 1% der Zahl PI positiver Neurone bei NMDA Applikation; CBD: 1% der Zahl PI positiver Neurone bei NMDA Applikation; O-1918: 0,7% der Zahl PI positiver Neurone bei NMDA Applikation; Abb. 19 A) und sehr wenige IB₄ positive Mikrogliazellen (AM251: 5,2% der Zahl IB₄ positiver Mikrogliazellen bei NMDA Applikation; CBD: 10,4% der Zahl IB₄ positiver Mikrogliazellen bei NMDA Applikation; O-1918: 10,1% der Zahl IB₄ positiver Mikrogliazellen bei NMDA Applikation; Abb. 19 B), ähnelten also unbehandelten und nicht geschädigten OHSC. NMDA geschädigte Schnittkulturen, die mit CBD oder O-1918 behandelt wurden zeigten eine signifikante Reduktion PI positiver Neurone gegenüber NMDA geschädigter Schnitte ohne weitere Behandlung (NMDA+ CBD: 72% der Zahl PI positiver Neurone bei NMDA Applikation, $p < 0,01$; NMDA+ O-1918: 72,1% der Zahl PI positiver Neurone bei NMDA Applikation, $p < 0,01$; für beide Gruppen gegenüber NMDA; Abb. 19 A). Die Applikation von AM251 auf geschädigte OHSC hatte keine signifikanten Einfluss auf die Zahl PI positiver Neurone im Vergleich zu OHSC, die mit NMDA geschädigt, aber nicht weiter behandelt wurden (NMDA+AM251: 94,4% der Zahl PI positiver Neurone bei NMDA Applikation, $p > 0,05$ gegenüber NMDA; Abb. 19 A). Im Vergleich zu NMDA geschädigten OHSC hatte weder die Applikation von AM251 noch von CBD oder O-1918 auf geschädigte Schnittkulturen signifikanten Einfluss auf die Zahl IB₄ positiver Mikrogliazellen (AM251:

96,2% der Zahl IB₄ positiver Mikrogliazellen bei NMDA Applikation, p>0,05; CBD: 104,5% der Zahl IB₄ positiver Mikrogliazellen bei NMDA Applikation, p>0,05; O-1918: 100,6% der Zahl IB₄ positiver Mikrogliazellen bei NMDA Applikation, p>0,05; für alle Gruppen gegenüber NMDA; Abb. 19 B).

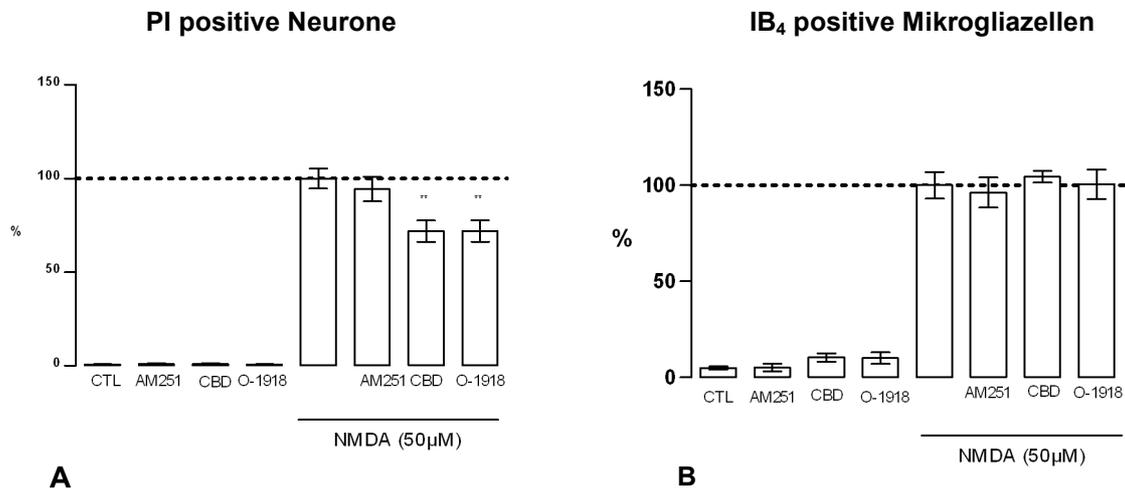


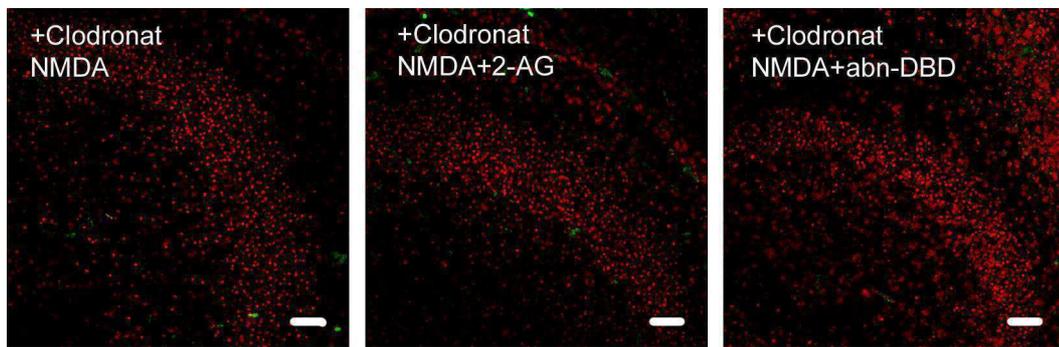
Abb. 19 Effekte der eingesetzten Antagonisten auf PI positive Neurone und IB₄ positive Mikrogliazellen

Statistische Analyse (Fehlerbalken = SEM). Im Vergleich zu unbehandelten Kontrollschnitten führte die alleinige Behandlung mit AM251, CBD oder O-1918 zu keiner Beeinträchtigung der Zahl PI positiver Neurone (A). Wurde AM251 zusätzlich auf NMDA geschädigte OHSC appliziert, wurde die Zahl PI positiver Neurone im Vergleich zu NMDA geschädigten OHSC ohne weitere Behandlung nicht signifikant beeinflusst (A). Die Applikation von CBD oder O-1918 auf NMDA geschädigte OHSC führte zu einer signifikanten Reduktion der Zahl PI positiver Neurone (A; **p < 0,01 vs. NMDA für NMDA+CBD oder NMDA+O-1918). Die Behandlung von OHSC mit AM251, CBD oder O-1918 beeinträchtigte die Zahl IB₄ positiver Mikrogliazellen im Vergleich zu unbehandelten Kontrollschnitten nicht (B). Wurde AM251, CBD oder O-1918 zusätzlich auf NMDA geschädigte OHSC appliziert, war die Zahl IB₄ positiver Mikrogliazellen ebenfalls nicht beeinträchtigt (B).

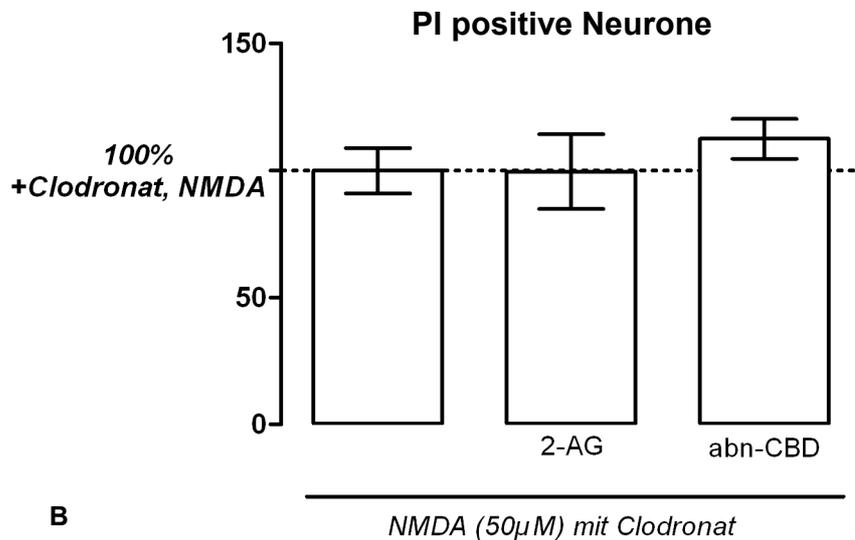
4.3.2 Ergebnisse der Applikation von 2-AG und abn-CBD nach Depletion der Mikrogliazellen

Die Inkubation der OHSC mit 100µg/mL Clodronat vom 1.div bis zum 6.div resultierte in einer nahezu vollständigen Depletion der Mikrogliazellen. Am 9.div wurden fast keine Mikrogliazellen (+Clodronat; Abb. 20 A) beobachtet. Die durch NMDA Schädigung der mit Clodronat behandelten OHSC auftretende massive Akkumulation PI positiver Neurone in der Körnerzellschicht des DG konnte weder durch die Applikation von abn-CBD noch durch 2-AG im Vergleich zu OHSC, die mit Clodronat inkubiert und mit NMDA geschädigt wurden signifikant reduziert werden (+Clodronat, NMDA+abn-CBD 10µM, 112,5% der Zahl PI positiver Zellen bei Applikation von +Clodronat, NMDA, p>0,05, Abb. 20 A und B; +Clodronat, NMDA+2-AG 0,001µM, 99,6% der Zahl PI

positiver Zellen bei Applikation von +Clodronat, NMDA, $p > 0,05$, Abb 20 A und B; für alle gegenüber +Clodronat, NMDA).



A



B

Abb. 20 Effekte von 2-AG und abn-CBD in exzitotoxisch geschädigten OHSC bei Depletion der Mikrogliazellen

A zeigt den DG bei Betrachtung mit dem konfokalen Laserscanningmikroskop (Maßstabsbalken = 50 μ M). Degenerierende neuronale Zellkerne (rot) wurden mit PI markiert und IB₄ zur Kennzeichnung verbliebener Mikrogliazellen (grün) eingesetzt. Die Inkubation mit Clodronat führte zu einer Depletion von Mikrogliazellen, so dass in NMDA geschädigten OHSC sehr viele PI positive Neurone zu beobachten waren, aber nahezu keine Mikrogliazellen zur Darstellung kamen (+Clodronat, NMDA). Weder die zusätzliche Applikation von 2-AG (+Clodronat, NMDA+2-AG) noch von abn-CBD (+Clodronat, NMDA+abn-CBD) auf NMDA geschädigte OHSC beeinträchtigte diese massive Akkumulation PI positiver Neurone. B: Statistische Analyse (Fehlerbalken = SEM). Die Applikation von NMDA auf mit Clodronat inkubierte OHSC resultierte in einer massiven Akkumulation PI positiver Neurone (+Clodronat, NMDA = 100%; B). Die zusätzliche Behandlung der exzitotoxisch geschädigten Schnittkulturen mit 2-AG oder abn-CBD reduzierte die Zahl PI positiver Neurone nicht (B).

4.4 Beobachtungen zu WIN und seinen Angriffspunkten in der exzitotoxisch geschädigten OHSC

4.4.1 Auswirkungen von WIN auf das neuronale Überleben

Durch Betrachtung der unbehandelten Kontrollschnitte mit dem konfokalen Laserscanningmikroskop konnte die gute neuronale Erhaltung mit nur sehr vereinzelt PI positiven Neuronen in der Körnerzellschicht des DG bestätigt werden (CTL 3% der Zahl PI positiver Neurone bei NMDA Applikation; Abb. 21 und 22 B). Ungeschädigte OHSC, die mit WIN behandelt wurden, enthielten ebenfalls nur sehr wenige PI positive Neurone (WIN 0,01 μ M 3,6% der Zahl PI positiver Neurone bei NMDA Applikation; Abb. 21), ähnelten also dem Bild ungeschädigter und unbehandelter OHSC. Nach Schädigung durch NMDA trat eine massive Akkumulation PI positiver degenerierender neuronaler Zellkerne auf (Abb. 21 und 22 B) die durch die Applikation von 0,01 μ M – 10 μ M WIN konzentrationsabhängig mit U-förmiger Dosis-Wirkungskurve reduziert werden konnte (NMDA+WIN 0,001 μ M 77,7% der Zahl PI positiver Neurone bei NMDA Applikation, $p > 0,05$, Abb. 21; NMDA+WIN 0,01 μ M, 35% der Zahl PI positiver Neurone bei NMDA Applikation, $p < 0,01$, Abb. 21 und 22 B; NMDA+WIN 0,1 μ M, 41,8% der Zahl PI positiver Neurone bei NMDA Applikation, $p < 0,01$, Abb. 21; NMDA+WIN 1 μ M, 46,7% der Zahl PI positiver Neurone bei NMDA Applikation, $p < 0,01$, Abb. 21; NMDA+WIN 10 μ M, 67,1% der Zahl PI positiver Neurone bei NMDA Applikation, $p < 0,01$, Abb. 21; für alle Gruppen gegenüber NMDA). Die stärkste Reduktion PI positiver Neurone in der Körnerzellschicht des DG nach exzitotoxischer Schädigung konnte bei Applikation von 0,01 μ M WIN erzielt werden (NMDA+WIN 0,01 μ M, 35% der Zahl PI positiver Neurone bei NMDA Applikation, $p < 0,01$; Abb. 21 und 22 B).

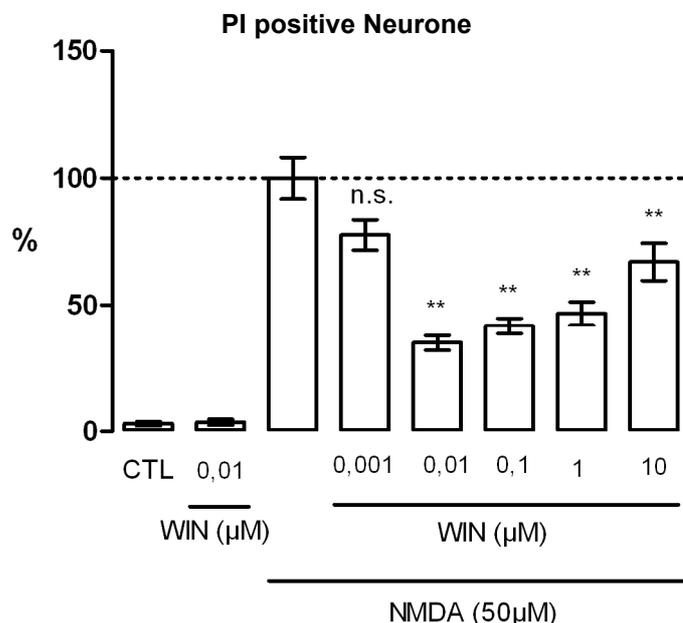
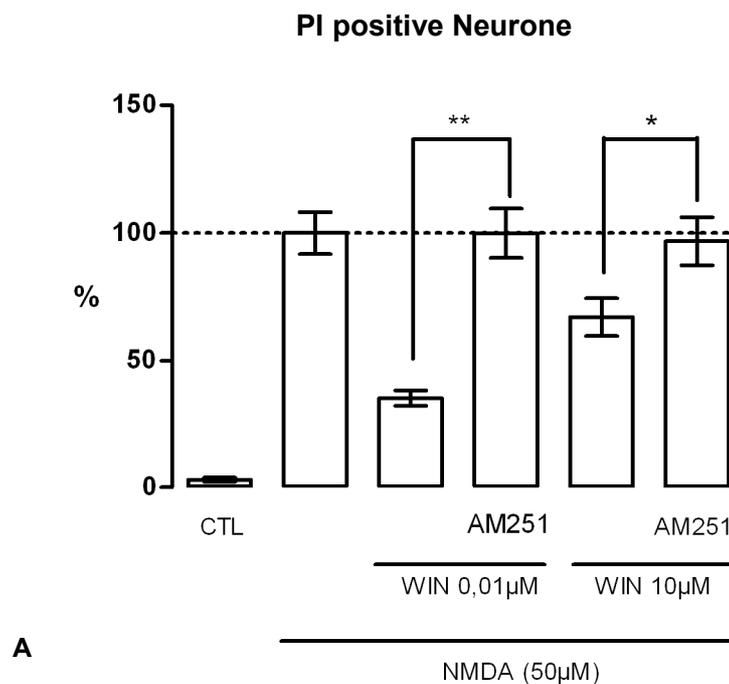


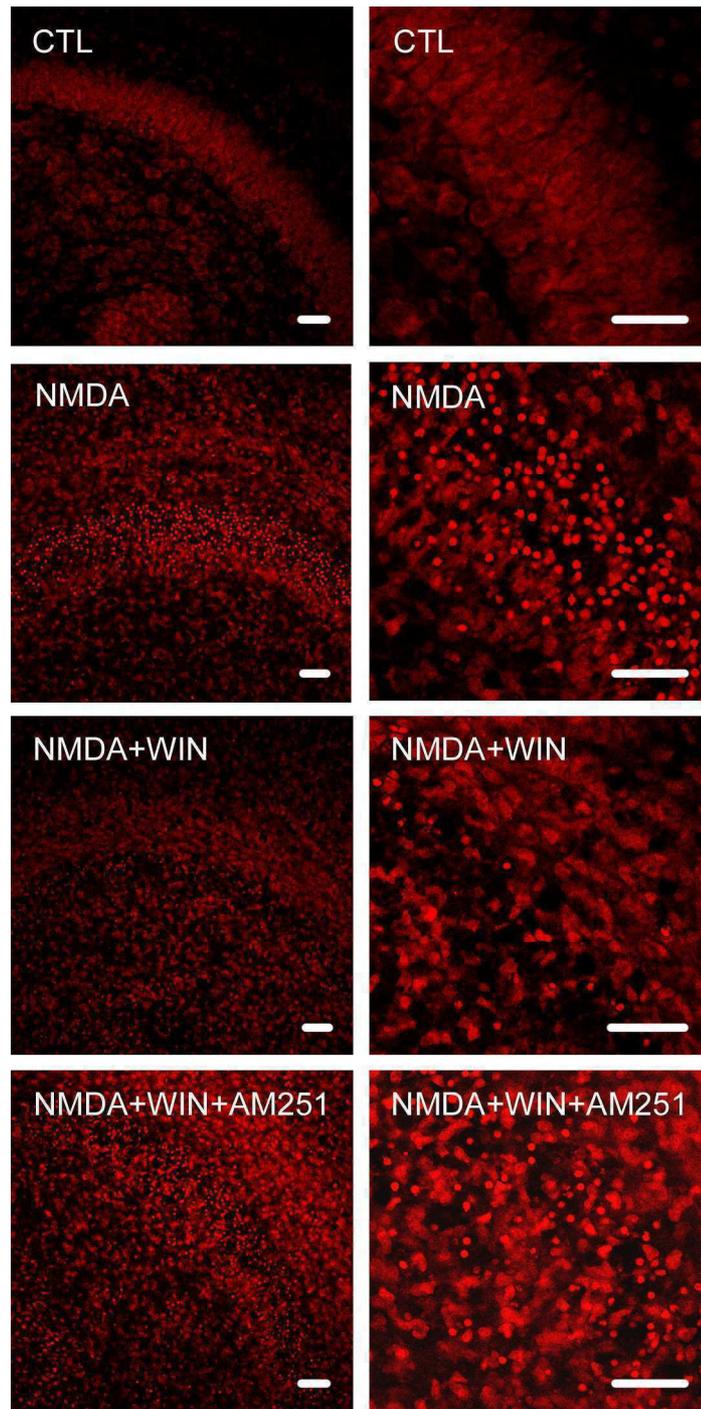
Abb. 21 (siehe bitte vorherige Seite) Effekte von WIN auf die Zahl PI positiver Neurone

Statistische Analyse (Fehlerbalken = SEM). Ungeschädigte OHSC, die mit 0,01µM WIN behandelt wurden zeigten nur sehr wenige PI positive Neurone. Sie ähnelten Kontrollschnitten. Im Vergleich zu mit NMDA geschädigten Schnittkulturen führte die Applikation von WIN (0,01µM, 0,1µM, 1µM oder 10µM) zu einer signifikanten Reduktion der Anzahl PI positiver Neurone, wobei ein maximaler Effekt bei Applikation von 0,01µM WIN erzielt werden konnte (**p < 0,01). Die Applikation von 0,001µM WIN führt zu keiner signifikanten Reduktion der Zahl PI positiver Neurone (p > 0,05).

4.4.2 Einfluss von CB1 und CB2 Rezeptor Antagonisten

Wurde AM251 auf ungeschädigte OHSC appliziert, so zeigten sich fast keine PI positiven Neurone (AM251 10µM, 1,2% der Zahl PI positiver Neurone bei NMDA Applikation, p>0,05; Abb. 24) und sie ähnelten unbehandelten und ungeschädigten OHSC. Bei Anwendung von AM251 auf NMDA geschädigte OHSC war die Anzahl PI positiver Neurone gegenüber mit NMDA alleine behandelter OHSC nicht beeinträchtigt (NMDA+AM251 10µM 102,6% der Zahl PI positiver Neurone bei NMDA Applikation, p>0,05 gegenüber NMDA; Abb. 24). Die durch die Applikation von 0,01µM oder 10µMWIN auf NMDA geschädigte OHSC erzielte Reduktion der Anzahl PI positiver Neurone konnte durch die zusätzliche Behandlung mit 10µM AM251 signifikant revertiert werden (NMDA+WIN 0,01µM+AM251, 99,9% der Zahl PI positiver Neurone bei NMDA Applikation, p<0,01 gegenüber NMDA+WIN 0,01µM, Abb. 22 A und B; NMDA+WIN10µM+AM251, 96,8%% der Zahl PI positiver Neurone bei NMDA Applikation, p<0,05 gegenüber NMDA+WIN10µM,Abb. 22 A).





B

Abb. 22 Reduktion PI positiver Neurone bei Applikation von WIN auf NMDA geschädigte OHSC und die Blockade dieses Effektes durch AM251 (siehe bitte auch vorherige Seite)

A: Statistische Analyse (Fehlerbalken = SEM). Die durch WIN vermittelte Reduktion PI positiver Neurone konnte durch den CB1 Antagonisten AM251 (10 μ M) blockiert werden (**p < 0,01 bei Applikation von 0,01 μ M WIN; *p < 0,05 bei Applikation von 10 μ M WIN; B). B zeigt den DG bei Betrachtung mit dem konfokalen Laserscanningmikroskop (Maßstabsbalken = 50 μ M). Linksseitig ist stets der DG im Überblick abgebildet und rechts zugeordnet die jeweilige Vergrößerung gezeigt. Die Zellkerne degenerierender Neurone wurden mit PI markiert und sind als deutlich abgrenzbare rote, runde

Strukturen zu sehen. Unbehandelte Kontrollschnitte wiesen eine gute neuronale Erhaltung mit fast keinen PI positiven Neuronen auf (CTL). Eine massive Akkumulation PI positiver Neurone in der Körnerzellschicht der DG konnte nach Applikation von NMDA beobachtet werden (NMDA). Die Behandlung geschädigter OHSC mit 0,01µM WIN führte zu einer Reduktion PI positiver Neurone (NMDA+WIN). Wurde zusätzlich der CB1 Rezeptor Antagonist AM251 (10µM) hinzugefügt, konnten nun wieder vermehrt PI positive Neurone in der Körnerzellschicht des DG beobachtet werden (NMDA+WIN+AM251).

Bei Anwendung von AM630 auf ungeschädigte OHSC zeigten sich fast keine PI positiven Neurone (AM630 10µM 2,9% der Zahl PI positiver Neurone bei NMDA Applikation; Abb. 24) und sie ähnelten unbehandelten und ungeschädigten OHSC. Wurde AM630 auf NMDA geschädigte OHSC appliziert war die Anzahl PI positiver Neurone gegenüber mit NMDA alleine behandelter OHSC nicht signifikant beeinträchtigt (NMDA+AM630 10µM 107,4% der Zahl PI positiver Neurone bei NMDA Applikation, $p > 0,05$ gegenüber NMDA Abb. 24).

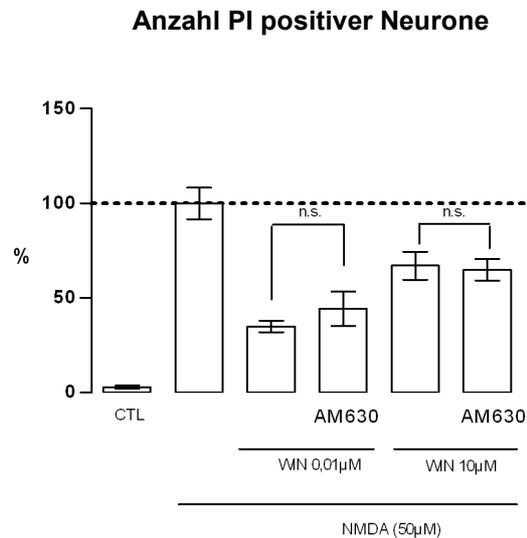


Abb. 23 Der CB2 Rezeptor Antagonist AM630 blockiert die durch WIN mediierte Reduktion PI positiver Neurone nicht

Statistische Analyse der Effekte von AM630 bei Applikation auf NMDA geschädigte und mit WIN behandelte OHSC. AM630 (10µM) blockiert weder die durch 0,01µM WIN vermittelte Reduktion PI positiver Neurone noch die durch 10µM WIN erzielte Minderung PI positiver Neurone. Fehlerbalken = SEM.

Die zusätzliche Behandlung von mit NMDA geschädigten und mit 0,01µM oder 10µM WIN inkubierten Schnittkulturen mit 10µM AM630 konnte die durch WIN erwirkte Reduktion der Anzahl PI positiver Neurone nicht aufheben (NMDA+WIN 0,01µM+AM630, 44,4% der Zahl PI positiver Neurone bei NMDA Applikation $p > 0,05$ gegenüber NMDA+WIN 0,01µM, Abb. 23; NMDA+WIN 10µM+AM630, 65% der Zahl PI positiver Neurone bei NMDA Applikation, $p > 0,05$ gegenüber NMDA+WIN 10µM, Abb. 23).

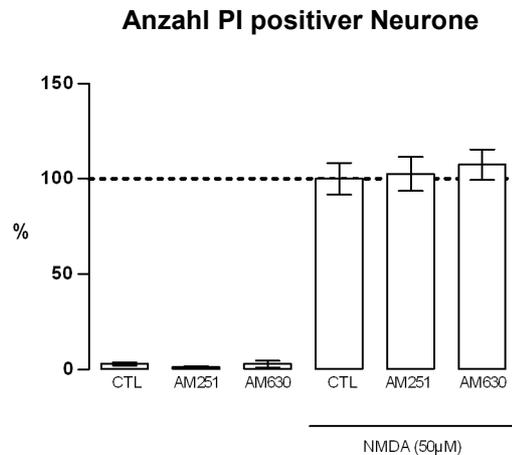


Abb. 24 (siehe bitte vorherige Seite) Effekte von AM251 und AM630 auf die Anzahl PI positiver Neurone

Die alleinige Behandlung von OHSC mit 10µM AM251 oder AM630 veränderte die Zahl gegenüber un behandelter OHSC nicht. Bei Applikation von 10µM AM251 oder AM630 auf mit NMDA geschädigte Schnitte wurde die Zahl PI positiver Neurone gegenüber allein mit NMDA behandelter Schnitte nicht signifikant beeinträchtigt. Fehlerbalken = SEM.

5 Diskussion

Die Protektion neuronalen Gewebes vor der Manifestation einer zerebralen Läsion und damit verbunden das Abwenden möglicher gravierender sensibler, motorischer und psychosozialer Einschränkungen für die Betroffenen stellt ein für die Behandlung akuter zerebraler Schädigungsprozesse wichtiges Therapieziel dar. Die vielfältigen Rollen des Cannabinoidsystems in physio- und pathophysiologischen Situationen haben Cannabinoide in den Fokus wissenschaftlicher Forschung gerückt. Cannabinoide spielen als Modulatoren neuronaler Inflammations- und Schädigungsprozesse eine wichtige Rolle und haben hier zum Beispiel über den CB1 Rezeptor neuroprotektive Effekte. Hinweise deuten aber auch zunehmend auf CB1/CB2 Rezeptor unabhängige Mechanismen für die Wirkung von Cannabinoiden bei neuronalen Läsionen hin. Das neuroprotektive Potential und die Angriffspunkte des endogenen Cannabinoids 2-AG, des synthetischen Cannabinoids WIN und von PEA sollten in der vorliegenden Arbeit am Modell der OHSC untersucht werden. Da in den Schnittkulturen der Gewebeverband erhalten bleibt, ist es möglich, sowohl Neurone als auch Mikrogliazellen zu untersuchen und Veränderungen durch exzitotoxische Schädigung und Behandlung mit den zu untersuchenden Substanzen zu beobachten. Durch den Einsatz von Rezeptor Antagonisten sollten die Angriffspunkte von PEA, 2-AG und WIN ermittelt werden.

5.1 PEA als neuroprotektives Agens

Das Cannabinoid PEA ist im ZNS in großen Mengen vorhanden (Cadas et al., 1997). Pharmakologische Evidenzen weisen auf eine antiepileptische und neuroprotektive Wirkung von PEA im ZNS hin (Lambert et al., 2001; Sheerin et al., 2004; Skaper et al., 1996). So konnte gezeigt werden, dass PEA in der Lage ist, einen chemisch durch Elektrostimulation induzierten epileptischen Anfall zu hemmen (Lambert et al., 2001). In Untersuchungen einer anderen Arbeitsgruppe konnte für PEA eine konzentrationsabhängige neuroprotektive Wirkung bei Glutamatexzitotoxizität in zerebellären Körnerzellen nachgewiesen werden (Skaper et al., 1996). Frühere Versuche von Mitgliedern unserer Arbeitsgruppe konnten zeigen, dass PEA in der Lage war, die Anzahl degenerierender Neurone in der Körnerzellschicht des DG der OHSC und die Anzahl aktivierter Mikrogliazellen nach exzitotoxischer Schädigung signifikant zu reduzieren, wobei die Applikation von 0,01 µM PEA als optimale Konzentration für beide Effekte ermittelt wurde (Kreutz, 2007). Außerdem war PEA in einer weiteren Studie in der Lage, Histamin induzierten Zelltod in hippokampalen Kulturen zu reduzieren (Skaper et al., 1996). Genovese und Mitarbeiter konnten in einem Modell der spinalen Läsion zeigen, dass PEA die Entzündung und Gewebeverletzung signifikant reduziert und sowohl die Infiltration von neutrophilen Granulozyten als auch die Expression proinflammatorischer Zytokine (TNFα und IL1β), die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-κB, die Expression der induzierbaren NO-Synthase und die Apoptose hemmt (Genovese et al., 2008). In derselben Studie resultierte die Behandlung mit PEA außerdem in einer verbesserten Rehabilitation motorischer Funktionen. Eine weitere Studie konnte zeigen, dass PEA die Ausdehnung verletzten Gewebes im Modell eines akuten ischämischen Infarktes signifikant reduziert (Schomacher et al., 2008).

5.2 Kontroverse um den Angriffspunkt von PEA

Wie einleitend dargelegt, führte die Suche nach dem Rezeptor dieses potentiell therapeutischen Agens zu kontroversen Diskussionen. So wurde zunächst vermutet, dass PEA auf Grund seiner strukturellen Ähnlichkeit zu Anandamid ebenfalls an CB Rezeptoren bindet. Eine erste Untersuchung zeigte, dass PEA in der Lage war, den synthetischen CB Rezeptor Agonisten WIN 55,212-2 von Mastzellen (RBL-2H3) zu verdrängen, die CB2 Rezeptor mRNA exprimierten (Facci et al., 1995). Dieses Ergebnis konnte jedoch anschließend nicht bestätigt werden (Lambert et al., 2002; Sugiura et al., 2000). Weiterhin konnten durch Einsatz des CB2 Rezeptor Antagonisten SR144528 zwar antinozizeptive Effekte von PEA aufgehoben werden, aber nicht seine anhaltenden antiinflammatorischen Eigenschaften (Calignano et al., 1998; Calignano et al., 2001; Costa et al., 2002; Jaggar et al., 1998). Weitere

Untersuchungen deuteten dann auf einen $G_{i/o}$ -Protein gekoppelten Rezeptor hin, über den PEA die Motilität von Mikrogliazellen in einem Modell fokaler zerebraler Ischämie zu fördern scheint (Franklin et al., 2003) .

Als Erklärungsansatz für diese widersprüchlichen Ergebnisse wurde der sogenannte *entourage effect* vorgeschlagen, wonach PEA den Abbau von Anandamid durch die Hemmung der FAAH inhibiert. Als Folge akkumuliert Anandamid, wodurch es letztendlich zu einer vermehrten Aktivierung von CB2 Rezeptoren kommt (Ben Shabat et al., 1998;Jonsson et al., 2001). Diese Theorie liefert jedoch keine Erklärung für die Beobachtung, dass eine durch PEA erwirkte Antiinflammation durch den CB2 Rezeptor Antagonisten SR144528 nicht beeinflusst wurde (Costa et al., 2002). Außerdem konnte gezeigt werden, dass Anandamid keine neuroprotektiven Effekte im DG oder der Hippokampusformation erzielt, was die durch PEA erreichte Neuroprotektion als Folge eines *entourage effect* als nicht wahrscheinlich erscheinen lässt (Kreutz et al., 2007).

Die Suche nach dem Angriffspunkt für PEA hielt an und schließlich konnten Lo Verme und Mitarbeiter den PPAR α Rezeptor als Rezeptor für PEA identifizieren und zeigen, dass PEA so seine antiinflammatorischen Effekte vermittelt (Lo Verme et al., 2005a). Verschiedene Beobachtungen legen nahe, dass PPAR α Rezeptoren und ihre Liganden wichtige antientzündliche Modulatoren sind. PPAR α defiziente Mäuse weisen verlängerte Inflamationsprozesse auf und synthetische PPAR α Agonisten erzielen deutliche antientzündliche Effekte, welche mit einer verminderten Expression der induzierbaren NO-Synthase, der COX-2 sowie verschiedener inflammatorischer Zytokine (z.B.: IL1 β , TNF α und Prostaglandin E2) einhergehen (Costa et al., 2002;Devchand et al., 1996;Sheu et al., 2002). PPAR α ist in Neuronen und Gliazellen lokalisiert und ist in unterschiedlicher Dichte im ZNS zu finden (Moreno et al., 2004;Ramanan et al., 2008). Besonders stark ist seine Expression beispielsweise in Teilen der Basalganglien, des Thalamus, der Hippokampusformation und des Mesencephalon ausgeprägt. In der Hippokampusformation und am DG wird PPAR α von pyramidalen CA1 Neuronen sowie den Körnerzellen des DG exprimiert, wohingegen in der CA3 Region kaum PPAR α -mRNA nachzuweisen ist (Braissant et al., 1996). In den Laminae VII bis IX des Rückenmarks ist PPAR α ebenfalls zu finden (Moreno et al., 2004). Im DG konnten Moreno und Mitarbeiter PPAR α sowie PPAR β/δ in Körnerzellen mittels spezifischer Antikörper nachweisen (Moreno et al., 2004) .

Lo Verme und Mitarbeiter konnten zeigen, dass PEA selektiv an PPAR α bindet und weder PPAR β/δ noch PPAR γ aktiviert (Lo Verme et al., 2005a). PEA hat antiinflammatorische Effekte im Modell Carageen und Phorbol ester induzierter Ödeme, jedoch zeigt PEA keine entzündungshemmende Wirkung in PPAR α defizienten Mäusen. Die topische Anwendung von PEA auf entzündete Haut von Mäusen führte

nicht nur zur Inhibition der Inflammation, sondern induzierte außerdem die Expression von PPAR α mRNA, was typischerweise auch bei der Verwendung von hoch affinen synthetischen PPAR α Liganden beobachtet wurde (Fu et al., 2003;Lo Verme et al., 2005a). Interessanterweise wurde außerdem gezeigt, dass die Behandlung mit PEA nicht zu einem Anstieg des Anandamidspiegels in der untersuchten Mäusehaut führte, sondern dieser eher vermindert war, was nahe legt, dass PEA den Anandamidabbau *in vivo* nicht hemmt, also als weiterer Punkt gegen die Hypothese des *entourage effect* spricht (Lo Verme et al., 2005a).

5.3 PEA vermittelt neuroprotektive Effekte in der OHSC über PPAR α

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass PEA im Modell der OHSC bei exzitotoxischer Schädigung neuroprotektiv wirkt und zu einer signifikanten Reduktion amöboider Mikrogliazellen führt. Der Einsatz des synthetischen PPAR α Agonisten Wy-14,643 resultierte in einer signifikanten Minderung der Anzahl degenerierender Neurone und einer deutlichen Reduktion der Mikrogliazellzahl. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit früheren Versuchen von Mitgliedern unserer Arbeitsgruppe, die eine neuroprotektive Wirkung von PEA und Wy-14,643 aufzeigen konnten (Kreutz, 2007). Die durch PEA erzielten Effekte konnten durch den PPAR α Antagonisten GW6471, nicht aber den PPAR γ Antagonisten GW9662 aufgehoben werden, was eindeutig für eine PPAR α Rezeptor vermittelte Neuroprotektion von PEA spricht. Sowohl die Reduktion der Mikrogliazellzahl als auch die neuroprotektive Wirkung wurde durch den PPAR α Antagonisten GW6471 antagonisiert.

So ist zum einen eine direkte neuroprotektive Wirkung von PEA über die Bindung von PPAR α in Neuronen möglich, zum anderen könnte die neuroprotektive Wirkung von PEA über die Aktivierung des PPAR α Rezeptors in Mikrogliazellen ablaufen, was zukünftige Studien beleuchten müssen. Es konnte bereits gezeigt werden, dass PPAR α Agonisten eine strahleninduzierte proinflammatorische Reaktion der Mikrogliazellen über die verminderte Translokation der p65 Untereinheit von NF- κ B in den Zellkern und der Phosphorylierung der c-jun-Untereinheit AP-1 reduzieren (Ramanan et al., 2008). Jedoch werden auch andere PPAR-Isoformen mit inflammatorischen Geschehen assoziiert. So hatte die Aktivierung von PPAR γ in Mikrogliazellen positive Effekte auf die klinische Entwicklung von Patienten nach ischämischen Schlaganfall, jedoch scheint in Neuronen die Aktivierung von PPAR γ zu verstärkter Neurotoxizität zu führen (Culman et al., 2007)

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die durch PEA erreichten neuroprotektiven Effekte in Abwesenheit peripherer Immunzellen erzielt werden konnten. Somit liegt eine PEA induzierte Neuroprotektion durch Modulation zentraler Immunzellen nahe. PEA erzielte seine neuroprotektiven Effekte im DG durch

Aktivierung von PPAR α . Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit stehen in Einklang mit den oben bereits beschriebenen Untersuchungen zur Neuroprotektion von PEA. Es ist außerdem gelungen, PPAR α als Rezeptor für die von PEA vermittelte Neuroprotektion zu ermitteln – ein wichtiger Schritt auf dem Weg zur weiteren Untersuchung dieses Agens und seines Rezeptors als potentielle therapeutische Angriffspunkte.

5.4 2-AG als neuroprotektiver Mediator neuronaler Läsion und Inflammation

Das Endocannabinoid 2-AG ist ein potenter Agonist am CB1 und CB2 Rezeptor und agiert, wie in verschiedenen Studien dargelegt werden konnte, als neuroprotektiver Modulator (Melis et al., 2006;Panikashvili et al., 2001;Sugiura et al., 2006). So wurde beispielsweise gezeigt, dass 2-AG in einem Ischämiemodell an dopaminergen Neuronen diese schützt (Melis et al., 2006). Es ist bekannt, dass 2-AG bei Hirnverletzung in einem *in vivo* Modell den neuronalen Zellverlust, das Infarktvolumen und das Hirnödem reduziert und zu einer verbesserten klinischen Rehabilitation führt (Panikashvili et al., 2001). Wie einleitend erläutert, werden Endocannabinoide wie 2-AG im Falle pathologischer Geschehen vermehrt produziert und akkumulieren, wobei bemerkenswert ist, dass Mikrogliazellen etwa zwanzig mal mehr Endocannabinoide produzieren als Neurone und Astrozyten (Marsicano et al., 2003;Walter et al., 2003). Es konnte beispielsweise demonstriert werden, dass 2-AG in einem *in vivo* Modell der fokalen zerebralen Ischämie akkumuliert (Degn et al., 2007). Der Großteil der Studien zur Bedeutung von Endocannabinoiden in inflammatorischen oder entzündlich schmerzhaften Situationen zeigt, dass 2-AG die Produktion und Freisetzung proinflammatorischer Zytokine und die Expression der COX-2 hemmt (Comelli et al., 2007;Zhang und Chen, 2008). Nur vereinzelt weisen Ergebnisse auf mögliche proinflammatorische Effekte von 2-AG hin. In einem Versuchsmodell der Oxazolol induzierten Kontaktdermatitis wurden in der chronischen Inflamationsphase erhöhte Werte von 2-AG gemessen und gleichzeitig eine erhöhte Migration eosinophiler Granulozyten beobachtet, weshalb 2-AG eine stimulierende Rolle bei der Exazerbation allergischer Entzündungsgeschehen nahe gelegt wurde (Kishimoto et al., 2006;Oka et al., 2006) .

5.5 Der abn-CBD Rezeptor auf Mikrogliazellen vermittelt neuroprotektive Eigenschaften von 2-AG in der OHSC

2-AG moduliert die Migration, Proliferation sowie die Produktion proinflammatorischer Zytokine von aktivierten Mikrogliazellen (Facchinetti et al., 2003;Walter et al., 2003). Wie bereits erwähnt, werden Mikrogliazellen im Falle einer zerebralen Läsion aktiviert, unterlaufen morphologische Veränderungen zu einer amöboiden Form hin, proliferieren, produzieren und sezernieren Zytokine und migrieren zum Ort des neuronalen Schadens (Heppner et al., 1998;Suk et al., 2001). Mikrogliazellen agieren

als neuroprotektive Modulatoren, indem sie toxischen Zelldebris unschädlich machen und trophische sowie antiinflammatorische Zytokine freisetzen, jedoch produzieren aktivierte Mikrogliazellen auch proinflammatorische Mediatoren wie TNF α (Sawada et al., 1989; Streit, 2002). Die Faktoren, die determinieren, ob Mikrogliazellen in einem pathologischen Geschehen neuroprotektiv oder -destruktiv wirken, sind unbekannt, weshalb diese ambivalente Rolle der Mikrogliazellen kontrovers diskutiert wird. 2-AG hemmt die Freisetzung des proinflammatorischen Zytokins TNF α durch mit Lipopolysacchariden stimulierte Mikrogliazellen (Facchinetti et al., 2003). Weiterhin wurde gezeigt, dass das Endocannabinoid 2-AG die Migration von Mikrogliazellen über die Aktivierung des abn-CBD Rezeptors fördert (Walter et al., 2003).

Die in der vorliegenden Arbeit präsentierten Untersuchungen am Modell der OHSC liefern eindeutige Evidenzen dafür, dass der abn-CBD Rezeptor auf Mikrogliazellen die neuroprotektiven Effekte von 2-AG am DG vermittelt. Die Behandlung exzitotoxisch geschädigter OHSC mit 2-AG führte zu einer signifikanten Reduktion sowohl degenerierender Neurone als auch der Zahl amöboider Mikrogliazellen im Bereich des DG.

Ebenso wirkte das synthetische Cannabinoid abn-CBD bei Anwendung auf NMDA geschädigten Schnittkulturen neuroprotektiv und konnte die Mikrogliazellzahl senken. Abn-CBD ist strukturell dem Phytocannabinoid CBD nahe verwandt und seine Effekte wurden zunächst im kardiovaskulären System beschrieben, wo es vasodilatatorisch wirkt (Adams et al., 1977; Kozłowska et al., 2007; Razdan et al., 1974). Diese vasodilatatorische Wirkung konnte durch CBD und den synthetischen abn-CBD Rezeptor Antagonisten O-1918 inhibiert werden (Begg et al., 2003; Jarai et al., 1999). Es wurde gezeigt, dass die in CB1/CB2 Rezeptor defizienten Mäusen durch abn-CBD vermittelte Vasodilatation $G_{i/o}$ -Protein abhängig ist und Veränderungen des cGMP-Spiegels und die Proteinkinase-G abhängige Regulation des BKCa (*large-conductance Ca²⁺- and voltage-activated K⁺*) Kanals bedingt (Begg et al., 2003; Jarai et al., 1999). Außerdem führte abn-CBD zu einer Phosphatidylinositol3-Kinase-abhängigen Phosphorylierung der p42/44 MAP Kinasen und der Proteinkinase B/Akt in den Endothelzellen humaner Umbilikalvenen (Begg et al., 2003). Über die Rolle des abn-CBD Rezeptors im ZNS ist nur wenig bekannt. Wie oben bereits erwähnt, ist mit der Regulation der Migration von Mikrogliazellen ein durch den abn-CBD Rezeptor vermittelter Effekt im ZNS bekannt (Walter et al., 2003). Des Weiteren konnte in einem Infarktmodell gezeigt werden, dass abn-CBD das Volumen des geschädigten Gewebes reduziert (Mishima et al., 2005). Die Autoren schlugen einen erhöhten zerebralen Blutfluss als Erklärungsansatz vor, ohne jedoch direkte neuroprotektive Wirkungen von abn-CBD in Betracht zu ziehen.

Die in der vorliegenden Arbeit demonstrierten neuroprotektiven Effekte von abn-CBD konnten durch Einsatz der abn-CBD Rezeptor Antagonisten CBD oder O-1918 antagonisiert werden. Abn-CBD bindet weder an CB1 noch an CB2 Rezeptoren (Offertaler et al., 2003). Somit legen die Ergebnisse nahe, dass der abn-CBD Rezeptor in der OHSC exprimiert wird und die neuroprotektiven Effekte von abn-CBD vermittelt. Ebenso konnten CBD und O-1918 die durch Behandlung von exzitotoxisch geschädigten OHSC mit abn-CBD erzielte Reduktion der Mikrogliazellzahl aufheben. Die Tatsache, dass CBD und sein strukturelles Analogon O-1918 selbst die Anzahl degenerierender Neurone in der OHSC nach exzitotoxischer Schädigung reduzieren konnten, aber klar die neuroprotektiven Effekte von abn-CBD aufheben, steht im Einklang mit Beobachtungen die zeigten, dass CBD antioxidative Eigenschaften besitzt. Durch Reduktion eines durch Hydroperoxid induzierten oxidativen Schadens konnte CBD bei Glutamatoxizität größere neuroprotektive Effekte erzielen als die klassischen Antioxidantien Ascorbat oder α -Tocopherol (Hampson et al., 1998; Hampson et al., 2000; Kreutz et al., 2009).

Die abn-CBD Rezeptor Antagonisten CBD und O-1918 waren in den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit nicht nur in der Lage die durch abn-CBD erzielten Wirkungen aufzuheben, sondern antagonisierten auch die neuroprotektiven Effekte von 2-AG und die Reduktion amöboider Mikrogliazellen. Die Ergebnisse liefern Evidenzen dafür, dass 2-AG ein natürlicher Ligand des abn-CBD Rezeptors ist und über diesen neuroprotektive Wirkungen in geschädigten OHSC vermittelt. Vorausgegangene Studien über die Migration von Mikrogliazellen und im kardiovaskulären System weisen ebenfalls auf 2-AG oder 2-Arachidonylglycerolether als endogene Liganden des abn-CBD Rezeptors neben Anandamid und dem synthetischen Liganden abn-CBD hin (Pocock und Kettenmann, 2007; Su and Vo, 2007; Wagner et al., 1999; Walter et al., 2003).

Die durch Endocannabinoide erzielte Neuroprotektion wird mit dem CB1 Rezeptor assoziiert. Eine durch Kainsäure induzierte Neurotoxizität war *in vitro* und *in vivo* bei der Blockade beziehungsweise dem Fehlen von CB1 Rezeptoren ausgeprägter (Khaspekov et al., 2004; Marsicano et al., 2003). In den hier vorliegenden Untersuchungen am Modell der OHSC konnte jedoch der CB1 Rezeptor Antagonist AM251 die durch 2-AG erzielte Neuroprotektion nicht aufheben. Untersuchungen am Modellsystem der OHSC zeigten außerdem, dass der CB2 Rezeptor Antagonist AM630 weder die Reduktion der Mikrogliazellzahl noch die Neuroprotektion von 2-AG bei exzitotoxischer Schädigung inhibiert (Kreutz et al., 2007).

Die neuroprotektiven Effekte von abn-CBD und 2-AG verschwanden, wenn die Mikrogliazellen durch Applikation von Clodronat depletiert wurden, was einen direkten

neuroprotektiven Effekt von 2-AG über CB1 Rezeptoren auf Neuronen weiter unwahrscheinlich macht und dafür spricht, dass sich der die neuroprotektiven Effekte von 2-AG vermittelnde abn-CBD Rezeptor auf Mikrogliazellen befindet. Die Applikation des Bisphosphonates Clodronat führt zur Depletion von Zellen der monozytären Linie, wie Osteoklasten, Makrophagen und Mikrogliazellen und ermöglicht so die Untersuchung pathologischer Prozesse in Abwesenheit dieser Zellen (Fulci et al., 2007;Kohl et al., 2003).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit liefern eindeutige Hinweise darauf, dass 2-AG seine neuroprotektiven Effekte über den abn-CBD Rezeptor auf Mikrogliazellen erzielt. Weitere Untersuchungen müssen nun den genauen Wirkmechanismus und die Interaktion von Neuronen und Mikrogliazellen näher beleuchten. Außerdem stellt das synthetische Cannabinoid abn-CBD ein potentiell zur Behandlung von neuronalen Läsionen *in vivo* einsetzbare Substanz mit möglicherweise weniger Nebenwirkungen auf Grund seiner Inaktivität an CB Rezeptoren dar.

5.6 WIN als neuroprotektive Substanz

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit verdeutlichen, dass WIN am Modell der OHSC neuroprotektiv wirkt und legen nahe, dass WIN diesen Effekt CB1 Rezeptor vermittelt erzielt. So führte die Applikation von WIN auf NMDA geschädigte OHSC zu einer signifikanten Reduktion der Anzahl degenerierender Neurone mit größerem Effekt bei Einsatz niedriger Konzentrationen (0,01 μ M). Dieser durch WIN erzielte Effekt konnte durch die Applikation des CB1 Rezeptor Antagonisten AM251 antagonisiert werden. Bemerkenswerterweise führte die Applikation des CB1 Antagonisten AM251 auf exzitotoxisch geschädigte OHSC alleine nicht zu einer vermehrten Degeneration von Körnerzellen am DG. Jedoch konnte gezeigt werden, dass AM251 und der CB1 Rezeptor Antagonist SR141716A agonistische Effekte am G-Protein gekoppelten Rezeptor 55 (GPR55) erzielen (Kapur et al., 2009;Pertwee, 2007;Ryberg et al., 2007). Die Aktivierung dieses Rezeptors führt über eine RhoA (*ras homologue gene family, member A*) und PLC abhängige Zunahme intrazellulärer Ca²⁺-Spiegel zur einer NFAT (*nuclear factor of activated t-cells*) abhängigen Transkription verschiedener Gene, die an der Regulation inflammatorischer Prozesse beteiligt sind (Henstridge et al., 2009;Pietr et al., 2009;Staton et al., 2008). Diese Modulation der Inflammation, zum Beispiel in Mikrogliazellen, könnte eine Erklärung für die fehlende Zunahme degenerierender Körnerzellen in NMDA geschädigten OHSC nach Applikation des CB1 Rezeptor Antagonisten AM251 sein.

Zur weiteren Differenzierung des Angriffspunktes von WIN wurde in dieser Arbeit außerdem der CB2 Rezeptor Antagonist AM630 eingesetzt. Jedoch konnte dieser die durch WIN erreichte Neuroprotektion nicht aufheben. Die Ergebnisse der vorliegenden

Arbeit zeigen, dass WIN im Modell der OHSC als neuroprotektives Agens wirkt und legen nahe, dass es diesen Effekt CB1 Rezeptor abhängig vermittelt.

Die Charakterisierung von WIN als neuroprotektives Agens steht im Einklang mit verschiedenen Studien, welche die neuroprotektiven Eigenschaften des CB1 und CB2 Rezeptor Agonisten WIN veranschaulichen. Es wurde demonstriert, dass WIN eine durch Quinolinsäure induzierte Läsion am Striatum blockiert (Pintor et al., 2006). Experimente *in vitro* wiesen hier auf einen CB1 Rezeptor vermittelten Effekt hin. Außerdem zeigten weitere Untersuchungen, dass WIN in einem *in vivo* Modell der globalen zerebralen Ischämie den neuronalen Verlust und das Infarktvolumen CB1 Rezeptor abhängig reduziert. In einer weiteren Studie konnte dargelegt werden, dass WIN die präsynaptische Freisetzung von Glutamat in hippokampalen Kulturen der Maus CB Rezeptor abhängig hemmt (Shen et al., 1996). In einem *in vivo* Modell hypoxisch-ischämischer Enzephalopathie wirkte WIN als neuroprotektives Agens und reduzierte so die Glutamatexzitotoxizität, die Freisetzung von TNF α und die Expression der induzierbaren NO-Synthase (Fernandez-Lopez et al., 2007). Diese Effekte schienen über den CB1 und CB2 Rezeptor vermittelt zu sein, jedoch war weder der durch WIN erzielte neuroprotektive Effekt in dieser Arbeit durch CB2 Rezeptorantagonisten revertierbar, noch konnten in weiteren Untersuchungen zur exzitotoxischen Schädigung der OHSC in unserer Arbeitsgruppe eine Beteiligung des CB2 Rezeptors bei der Neuroprotektion gezeigt werden (Kreutz et al., 2007; Kreutz et al., 2009). Die Tatsache, dass CB2 Rezeptoren, welche hauptsächlich auf Immunzellen lokalisiert sind, nicht an der Neuroprotektion im Modell der OHSC am DG, wohl aber in anderen Gehirnregionen beteiligt zu sein scheinen, ist möglicherweise ein modellabhängiger Effekt, da im Modell der OHSC das Einwandern peripherer Immunzellen ausgeschlossen ist. Weiterhin könnte dies auf eine immunologische Diversität einzelner Mikrogliapopulationen in verschiedenen Gehirnregionen zurückzuführen sein. Die immunologische Diversität der im Gehirn residenten Immunzellen könnte mit einer unterschiedlichen Expression des CB2 Rezeptors einhergehen. So werden beispielsweise immunologische Marker wie CD11b, MHCII oder CXCR3 regional unterschiedlich stark von Mikrogliazellen exprimiert (de Haas et al., 2008).

5.7 Neue Angriffspunkte für WIN

In Experimenten an CB1 und CB2 Rezeptor defizienten Mäusen konnten weitere, bislang nicht klonierte, aber pharmakologisch und funktionell gut charakterisierte Rezeptoren für Cannabinoide nachgewiesen werden (Mackie und Stella, 2006). Einer dieser sogenannten *non-CB1/non-CB2* Rezeptoren wurde mit dem *abn-CBD* Rezeptor und 2-AG als Ligand bei der Neuroprotektion in dieser Arbeit bereits vorgestellt. Auch

für WIN sind im Gehirn CB Rezeptor unabhängige Effekte bekannt (Breivogel et al., 2001). Die durch WIN erzielten Effekte waren zum einen nicht immer von CB Rezeptoren abhängig, zum anderen waren die benötigten Konzentrationen zum Erzielen bestimmter WIN-Effekte in verschiedenen Studien nicht klar zuzuordnen. So war WIN in nanomolaren Konzentrationen nach vorübergehender globaler Ischämie in der Lage, neuroprotektiv auf Pyramidenzellen der CA1 Region zu wirken und das Infarktvolumen nach fokaler Ischämie über CB1 und CB2 Rezeptoraktivierung *in vivo* zu reduzieren (Nagayama et al., 1999). In der gleichen Studie wurde jedoch gezeigt, dass WIN bei Hypoxie und Glukosedeprivation *in vitro* unabhängig von CB Rezeptoren protektiv auf Neurone wirkt. Außerdem konnte WIN in einer anderen Studie in niedrigen Konzentrationen CB1 Rezeptor vermittelt antiemetisch wirken, der hemmende Effekte auf die Motorik, wie beispielsweise die spontane Bewegungsaktivität, konnte jedoch nur in hohen Konzentrationen erzielt werden (Darmani, 2001).

Zunächst wurde von einigen Autoren als Erklärung für die Diversität der beobachteten Effekte eine unterschiedliche Affinität von CB1 Rezeptoren für WIN in Abhängigkeit von der Gehirnregion vermutet. Nach weiterführenden Untersuchungen werden nun aber besonders zwei neue Angriffspunkte für WIN diskutiert: Zum einen scheint WIN über den N-Typ spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanal $Ca_v2.2$ modulierende Effekte zu erzielen, zum anderen legen verschiedene Studien nahe, dass mehrere Cannabinoide, unter ihnen WIN, Mitglieder der Familie der TRP Kanäle aktivieren (Akopian et al., 2008; Hajos et al., 2001; Nemeth et al., 2008).

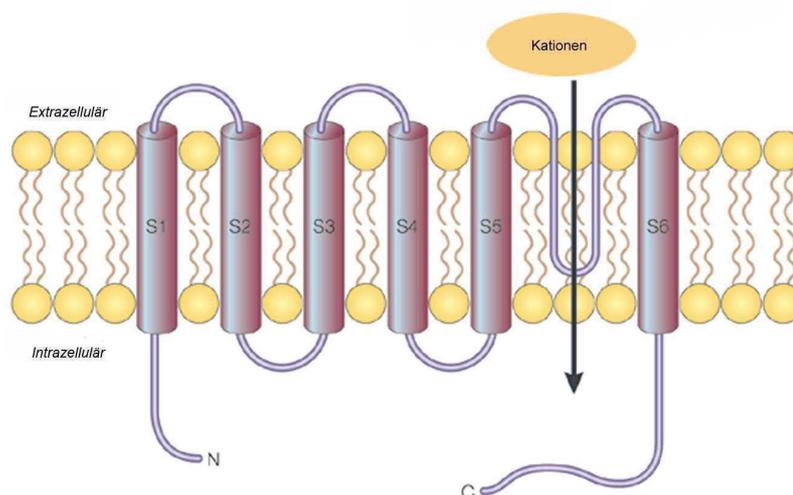


Abb. 25 Aufbau von *transient receptor potential* (TRP) Kanälen

TRP Kanäle sind Kationenkanäle, die sechs transmembranäre Domänen umfassen (verändert nach Clapham et al., 2001).

TRP Kanäle sind eine Familie nicht selektiver Kationenkanäle, die Reaktionen auf externe Stimuli wie Temperatur, mechanische oder osmotische Reize regulieren

(Starowicz et al., 2008). Anandamid war das erste Endocannabinoid, das als Ligand des TRPV1 identifiziert wurde (Zygmunt et al., 1999). Das synthetische Cannabinoid WIN bindet in mikromolarer Konzentration selektiv an TRPA1 (Akopian et al., 2008; Zygmunt et al., 1999). Beide Rezeptoren sind sowohl auf sensiblen Neuronen lokalisiert, wo sie Schmerzempfindung modulieren können, als auch im Gehirn (Cristino et al., 2006; Gunthorpe und Szallasi, 2008; Stokes et al., 2006). Cannabinoide können als Vermittler zwischen TRPA1 und TRPV1 agieren, indem sie beide Kanäle homo- und heterolog desensibilisieren, wodurch sie in peripheren Neuronen Antihyperalgesie modulieren (Akopian et al., 2009). Hierbei scheint die Co-Expression von TRPV1 zwingende Voraussetzung für die Desensibilisierung von TRPA1 durch TRPV1 selektive Cannabinoide zu sein. Ebenso scheint das Vorhandensein von TRPA1 notwendig für die Desensibilisierung von TRPV1 durch TRPA1 selektive Cannabinoide (Akopian et al., 2008).

Aufbauend auf die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, die zeigen, dass WIN im Modellsystem CB1 Rezeptor vermittelt neuroprotektiv wirkt und zwar mit höchster Effektivität bei niedrigen Konzentrationen (0,01µM), wurden in weiterführenden Experimenten der Arbeitsgruppe HC-030031 eingesetzt (Koch et al., 2010b). Hierbei handelt es sich um einen selektiven TRPA1 Blocker (Eid et al., 2008). Bei Einsatz von HC-030031 und gleichzeitiger Applikation von WIN in hoher Konzentration (10µM), war WIN genauso protektiv wie WIN in seiner effektivsten Konzentration (0,01µM). Das neuroprotektive Potential von 0,01µM WIN wurde bei gleichzeitiger Applikation von HC-030031 nicht beeinflusst. Bei Applikation der TRPA1 Agonisten Icilin und Allylisothiocyanat (AITC) auf NMDA geschädigte OHSC wurde der exzitotoxische Schaden verstärkt, wobei die Applikation auf ungeschädigte Kontrollschnitte keine neurotoxischen Auswirkungen der TRPA1 Aktivierung *per se* ergaben. Die Anwendung des TRPV1 Antagonisten 6-iodo-nordihydrocapsaicin ergab weder bei gleichzeitiger Anwendung mit hohen noch mit niedrigen WIN Konzentrationen eine Beeinflussung der Neuroprotektion. Die Ergebnisse legen nahe, dass WIN in niedrigen Konzentrationen (nM) ausschließlich agonistisch am CB1 Rezeptor wirkt und in hohen Konzentrationen (µM) außerdem TRPA1 aktiviert, was eine Abschwächung der durch WIN über CB1 Rezeptoren erzielten Neuroprotektion zu Folge hat, aber ohne gleichzeitige Aktivierung von TRPV1 einherzugehen scheint (Koch et al., 2010b).

Wie einleitend erläutert, wird außerdem Ca_v2.2 als weiterer Angriffspunkt für WIN diskutiert. WIN konnte in elektrophysiologischen Experimenten am Hippokampus exzitatorische Ströme über Aktivierung von Ca_v2.2 und unabhängig von CB1 Rezeptoren reduzieren (Nemeth et al., 2008). Auch Arachidonsäure und mehrere ihrer endogenen Derivate können spannungsgesteuerte Ca²⁺-Kanäle, darunter auch N-Typ

Kanäle, regulieren (Roberts-Crowley et al., 2009). Diese initiieren insbesondere schnelle synaptische Transmission. Die Regulation von $Ca_v2.2$ erfolgt hauptsächlich durch G-Proteine, SNARE(*soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor*) Proteine und auch durch Phosphorylierung (Catterall, 2000). $Ca_v2.2$ ist unter anderem an der Präsynapse glutamaterger Synapsen lokalisiert und ist hier an der Depolarisation mit folgender Exzitation beteiligt. $Ca_v2.2$ ist aber auch auf Dendriten zu finden, wo der lokale Ca^{2+} -Strom moduliert wird (Dolphin, 1998). Cannabinoide können den Ionenfluss durch Ca^{2+} -Kanäle und dadurch die Freisetzung von Glutamat regulieren, was möglicherweise zur Neuroprotektion führt (Nagayama et al., 1999; Shen et al., 1996). Die Aktivierung von CB1 Rezeptoren auf GABAergen Nervenendigungen führt zu einer Reduktion der Inhibition und damit zu einem Ungleichgewicht inhibitorischer und exzitatorischer Signale (Katona et al., 1999). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass das Zusammenspiel von an GABAergen Nervenendigungen exprimierten CB1 Rezeptoren und NMDA Rezeptoren zum Erzielen Amnesie-ähnlicher Effekte durch THC notwendig ist (Puighermanal et al., 2009).

Die in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse zur invers konzentrationsabhängigen Neuroprotektion von WIN am Hippokampus zur Grundlage nehmend, setzte die Arbeitsgruppe in weiterführenden Experimenten Omega-Conotoxin (GIVA) als spezifischen Hemmstoff von $Ca_v2.2$ im Modell der OHSC ein (Koch et al., 2010b). GIVA beeinflusste die durch WIN erzielte Neuroprotektion im Bereich nanomolarer Konzentrationen nicht, blockierte aber die Neuroprotektion beim Einsatz von $10\mu\text{M}$ WIN, was nahe legt, dass $10\mu\text{M}$ WIN direkt über $Ca_v2.2$ die durch CB1 Aktivierung erreichte Neuroprotektion moduliert (Koch et al., 2010b).

Die in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse zeigen, dass WIN neuroprotektiv auf Körnerzellen am DG über Aktivierung von CB1 Rezeptoren nach exzitotoxischer Schädigung wirkt. WIN ist hierbei in niedrigen Konzentrationen effektiver als in hohen. Weiterführende Experimente der Arbeitsgruppe zeigen, dass WIN in hohen Konzentrationen ($10\mu\text{M}$) auch auf TRPA1 wirkt, was zu einer Abschwächung der durch CB1 Aktivierung erzielten Neuroprotektion führt und hierbei TRPV1 nicht beteiligt ist (Koch et al., 2010b). Weiterhin intensiviert die selektive Aktivierung von TRPA1 durch spezifische Agonisten die exzitotoxische Schädigung. Die Blockade von $Ca_v2.2$ führt nur bei Anwendung von hohen WIN Konzentrationen zu einer Hemmung der Neuroprotektion (Koch et al., 2010b). So konnte die Modulation der durch WIN erzielten CB1 Rezeptor vermittelten Neuroprotektion durch TRPA1 und $Ca_v2.2$ aufgezeigt werden, welches nun als Grundlage für weiterführende Experimente zu

potentiellen Eingriffsmöglichkeiten im Rahmen neuropathologischer Geschehen bei der Entstehung sekundären neuronalen Schadens dienen kann.

5.8 Ausblick

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit liefern eindeutige Evidenzen für eine PPAR α vermittelte neuroprotektive Wirkung von PEA. Es gilt nun den genauen Wirkmechanismus von PEA zu identifizieren und unter anderem zu untersuchen, ob indirekte, durch Wirkung auf die Mikrogliazellen vermittelte neuroprotektive Effekte vorliegen oder, ob PEA möglicherweise ausschließlich direkte protektive Wirkung auf Neurone hat. In weiterführenden Experimenten der Arbeitsgruppe konnte eine starke Immunreaktion von PPAR α in BV-2 Mikrogliazellen sowie in der hippocampalen Zelllinie HT22 der Maus nachgewiesen werden (Koch et al., 2010a). In HT22-Zellen scheint ein durch Glutamat induzierter Zelltod mit chronischer Aktivierung des MAPK – Signalweges einherzugehen (Ho et al., 2008). Zukünftige Experimente müssen nun zeigen, ob PEA durch Aktivierung von PPAR α eben diese chronische Aktivierung modifizieren kann. Weiterhin bleibt es offen, ob PEA zu einer verstärkten Bindung von PPAR α an die DNA und folglich zu einer verstärkten Aktivität des PPAR α -Transkriptionsfaktors in Neuronen beziehungsweise Mikrogliazellen führt. Dies konnte bereits für andere potente PPAR α Agonisten wie Fibrate oder Wy-14,643 gezeigt werden (Bougarne et al., 2009; Kleemann et al., 2003). Es könnte ein Luciferase-Reportergen-Assay oder ein *electro mobility shift assay (EMSA)* zur Untersuchung dieser Fragestellung eingesetzt werden. Die Ergebnisanalyse der Untersuchungen zum Endocannabinoid 2-AG legen nahe, dass dieses seine neuroprotektiven Eigenschaften in der OHSC über den abn-CBD Rezeptor auf Mikrogliazellen vermittelt. Nun müssen weitere Experimente den Mechanismus dieser Wirkung aufdecken. Außerdem war abn-CBD, das weder an CB1 noch an CB2 Rezeptoren bindet, bei Exzitotoxizität in der OHSC neuroprotektiv und stellt somit ein potentiell therapeutisches Agens mit möglicherweise weniger Nebenwirkungen als CB1/CB2 Agonisten dar. Auch für das synthetische Cannabinoid WIN konnte in der OHSC eine neuroprotektive Wirkung gezeigt werden, die über CB1 vermittelt schien, wohingegen die Ergebnisse nahe legen, dass der CB2 Rezeptor nicht beteiligt ist. Weiterführende Untersuchungen konnten bereits eine modulierende Beteiligung von TRPA1 und Ca $_v$ 2.2 an der durch WIN und über CB1 vermittelten Neuroprotektion aufzeigen (Koch et al., 2010b).

6 Zusammenfassung

Akute neuronale Läsionen gehen für die Betroffenen oft mit schwerwiegenden sensiblen, motorischen und psychosozialen Einschränkungen einher. Exo- und

endogene Cannabinoide sind zur Behandlung, nicht nur neuronaler, pathophysiologischer Geschehen zunehmend in den Fokus wissenschaftlichen Interesses gerückt, da das Endocannabinoidsystem modulierend in periphere sowie zentrale Signalwege eingreift. So sind Cannabinoide im ZNS in der Lage, als retrograde Transmitter Exzitotoxizität durch eine präsynaptisch über CB1 Rezeptoren vermittelte Hemmung der Glutamatfreisetzung einzudämmen. Neben den bereits klonierten und besonders stark auf Neuronen lokalisierten CB1 Rezeptoren und den ebenfalls klonierten, hauptsächlich auf immunologisch aktiven Zellen zu findenden CB2 Rezeptoren, deuten Hinweise weitere Angriffspunkte für synthetische und endogene Cannabinoide an. Speziell PEA, das Endocannabinoid 2-AG und das synthetische Cannabinoid WIN sollten in der vorliegenden Arbeit auf ihr neuroprotektives Potential und ihre Angriffspunkte hin untersucht werden.

Für die Untersuchung wurde das Modell der Organotypischen hippocampalen Schnittkultur (OHSC) gewählt, welches die Beobachtung des komplexen Zellverbandes am Hippokampus ohne Einflüsse aus der Peripherie einwandernder immunkompetenter Zellen ermöglicht. Die neuronale Läsion wurde durch NMDA Exzitotoxizität induziert und anhand der Anzahl degenerierender Neurone, markiert mit dem Fluorochrom Propidium Iodid, in der Körnerzellschicht des Gyrus dentatus (DG) bestimmt. Außerdem wurde die Zahl der Mikrogliazellen, gekennzeichnet durch Isolektin B₄, im Bereich des DG quantifiziert. Hierzu wurden die markierten Neurone und Mikrogliazellen mit einem konfokalen Laserscanningmikroskop visualisiert und die anschließende quantitative Erfassung statistisch analysiert. Um die Angriffspunkte von PEA, 2-AG und WIN zu untersuchen, wurden außerdem Antagonisten gegen CB Rezeptoren, den abn-CBD Rezeptor und PPARs eingesetzt.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass sowohl PEA als auch 2-AG und WIN am Modell der exzitotoxisch geschädigten OHSC neuroprotektiv wirken. Die Ergebnisse liefern jedoch Evidenzen für ganz unterschiedliche Angriffspunkte der drei Substanzen. So war PEA ebenso wie der eingesetzte synthetische PPAR α Agonist Wy-14,643 in der Lage, die Zahl PI positiver Neurone und IB₄ positiver Mikrogliazellen im DG nach exzitotoxischer Schädigung signifikant zu reduzieren. Die durch PEA erzielte Neuroprotektion und Reduktion der Mikrogliazellzahl konnte nicht durch den PPAR γ Antagonisten GW9662 aufgehoben werden, wurde aber durch den PPAR α Antagonisten GW6471 signifikant antagonisiert. 2-AG zeigte ebenso wie abn-CBD eine ausgeprägte neuroprotektive Wirkung bei gleichzeitiger Reduktion der IB₄ positiven Mikrogliazellen nach NMDA Schädigung. Die durch abn-CBD und 2-AG erzielte Reduktion PI positiver Neurone konnte durch die abn-CBD Rezeptor Antagonisten CBD und O-1918 signifikant aufgehoben werden, die auch die Reduktion IB₄ positiver

Mikrogliazellen rewertierten. Hingegen beeinflusste der CB1 Rezeptor Antagonist AM251 beide der durch 2-AG erzielten Effekte nicht. Bei Depletion der Mikrogliazellen durch die Applikation von Clodronat verloren sowohl 2-AG als auch abn-CBD ihre neuroprotektive Wirkung. Es wurde außerdem demonstriert, dass WIN in der Lage ist, die Zahl PI positiver Neurone im DG nach NMDA Schädigung signifikant zu reduzieren. Diese neuroprotektive Wirkung von WIN war invers konzentrationsabhängig mit höchster Effektivität bei niedrigen Konzentrationen. Die Protektion ließ sich durch den CB1 Rezeptor Antagonisten AM251, nicht aber durch den CB2 Rezeptor Antagonisten AM630, aufheben.

Zusammenfassend konnte $PPAR\alpha$ als der die neuroprotektiven Effekte von PEA in der OHSC vermittelnde Rezeptor identifiziert werden. 2-AG und abn-CBD zeigte in der OHSC neuroprotektive Eigenschaften, die über den abn-CBD Rezeptor auf Mikrogliazellen vermittelt scheinen, da bei Depletion der Mikrogliazellen die neuroprotektiven Effekte von 2-AG und abn-CBD aufgehoben wurden. Die Behandlung exzitotoxisch geschädigter OHSC mit WIN hatte durch den CB1 Rezeptor mediierte neuroprotektive Effekte und weiterführende Untersuchungen der Arbeitsgruppe konnten bereits modulierende Einflüsse von TRPA1 und $Ca_v2.2$ beim Einsatz von hohen WIN Konzentrationen aufzeigen. Die vorliegende Arbeit erweitert das Wissen über Cannabinoid vermittelte Neuroprotektion, indem neue Wirkmechanismen für PEA, 2-AG und WIN dargestellt werden. Diese liefern nun grundlegende Ausgangspunkte zur weiteren Untersuchung von Cannabinoiden und deren Angriffspunkten als potentielle therapeutische Ziele bei der Behandlung akuter neuronaler Läsionen.

7 Literaturverzeichnis

- Adams,M.D., Earnhardt,J.T., Martin,B.R., Harris,L.S., Dewey,W.L. und Razdan,R.K. (1977). A cannabinoid with cardiovascular activity but no overt behavioral effects. *Experientia*. 33, 1204-1205.
- Akopian,A.N., Ruparel,N.B., Jeske,N.A., Patwardhan,A. und Hargreaves,K.M. (2009). Role of ionotropic cannabinoid receptors in peripheral antinociception and antihyperalgesia. *Trends Pharmacol. Sci.* 30, 79-84.
- Akopian,A.N., Ruparel,N.B., Patwardhan,A. und Hargreaves,K.M. (2008). Cannabinoids desensitize capsaicin and mustard oil responses in sensory neurons via TRPA1 activation. *J. Neurosci.* 28, 1064-1075.
- Alnemri,E.S., Livingston,D.J., Nicholson,D.W., Salvesen,G., Thornberry,N.A., Wong,W.W. und Yuan,J. (1996). Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell*. 87, 171.
- Ambrosini,E. und Aloisi,F. (2004). Chemokines and glial cells: a complex network in the central nervous system. *Neurochem. Res.* 29, 1017-1038.
- Bachur,N.R., Masek,K., Melmon,K.L. und Udenfriend,S. (1965). Fatty acide amides of ethanolamine in mammalian tissues. *J. Biol. Chem.* 240, 1019-1024.
- Begg,M., Mo,F.M., Offertaler,L., Batkai,S., Pacher,P., Razdan,R.K., Lovinger,D.M. und Kunos,G. (2003). G protein-coupled endothelial receptor for atypical cannabinoid ligands modulates a Ca²⁺-dependent K⁺ current. *J. Biol. Chem.* 278, 46188-46194.
- Ben Shabat,S., Fride,E., Sheskin,T., Tamiri,T., Rhee,M.H., Vogel,Z., Bisogno,T., De Petrocellis,L., Di Marzo,V. und Mechoulam,R. (1998). An entourage effect: inactive endogenous fatty acid glycerol esters enhance 2-arachidonoyl-glycerol cannabinoid activity. *Eur. J. Pharmacol.* 353, 23-31.
- Berdyshev,E.V. (2000). Cannabinoid receptors and the regulation of immune response. *Chem. Phys. Lipids.* 108, 169-190.
- Berger,J. und Moller,D.E. (2002). The mechanisms of action of PPARs. *Annu. Rev. Med.* 53, 409-435.
- Bisogno,T., Howell,F., Williams,G., Minassi,A., Cascio,M.G., Ligresti,A., Matias,I., Schiano-Moriello,A., Paul,P., Williams,E.J., Gangadharan,U., Hobbs,C., Di Marzo,V. und Doherty,P. (2003). Cloning of the first sn1-DAG lipases points to the spatial and temporal regulation of endocannabinoid signaling in the brain. *J. Cell Biol.* 163, 463-468.
- Bisogno,T., Maurelli,S., Melck,D., De Petrocellis,L. und Di Marzo,V. (1997). Biosynthesis, uptake, and degradation of anandamide and palmitoylethanolamide in leukocytes. *J. Biol. Chem.* 272, 3315-3323.
- Blanquart,C., Barbier,O., Fruchart,J.C., Staels,B. und Glineur,C. (2003). Peroxisome proliferator-activated receptors: regulation of transcriptional activities and roles in inflammation. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 85, 267-273.
- Blight,A.R. (1985). Delayed demyelination and macrophage invasion: a candidate for secondary cell damage in spinal cord injury. *Cent. Nerv. Syst. Trauma.* 2, 299-315.
- Bordet,R., Ouk,T., Petrault,O., Gele,P., Gautier,S., Laprais,M., Deplanque,D., Duriez,P., Staels,B., Fruchart,J.C. und Bastide,M. (2006). PPAR: a new pharmacological target for neuroprotection in stroke and neurodegenerative diseases. *Biochem. Soc. Trans.* 34, 1341-1346.

- Boscia,F., Annunziato,L. und Tagliatalata,M. (2006). Retigabine and flupirtine exert neuroprotective actions in organotypic hippocampal cultures. *Neuropharmacology*. *51*, 283-294.
- Bougarne,N., Paumelle,R., Caron,S., Hennuyer,N., Mansouri,R., Gervois,P., Staels,B., Haegeman,G. und De Bosscher,K. (2009). PPARalpha blocks glucocorticoid receptor alpha-mediated transactivation but cooperates with the activated glucocorticoid receptor alpha for transrepression on NF-kappaB. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 7397-7402.
- Braissant,O., Foufelle,F., Scotto,C., Dauca,M. und Wahli,W. (1996). Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR-alpha, -beta, and -gamma in the adult rat. *Endocrinology*. *137*, 354-366.
- Breivogel,C.S., Griffin,G., Di Marzo,V. und Martin,B.R. (2001). Evidence for a new G protein-coupled cannabinoid receptor in mouse brain. *Mol. Pharmacol.* *60*, 155-163.
- Bullock,R., Zauner,A., Woodward,J.J., Myseros,J., Choi,S.C., Ward,J.D., Marmarou,A. und Young,H.F. (1998). Factors affecting excitatory amino acid release following severe human head injury. *J. Neurosurg.* *89*, 507-518.
- Cadas,H., di Tomaso,E. und Piomelli,D. (1997). Occurrence and biosynthesis of endogenous cannabinoid precursor N-arachidonoyl phosphatidylethanolamine in rat brain. *J. Neurosci.* *17*, 1226-1242.
- Cadas,H., Gaillet,S., Beltramo,M., Venance,L. und Piomelli,D. (1996). Biosynthesis of an endogenous cannabinoid precursor in neurons and its control by calcium and cAMP. *J. Neurosci.* *16*, 3934-3942.
- Calignano,A., La Rana,G., Giuffrida,A. und Piomelli,D. (1998). Control of pain initiation by endogenous cannabinoids. *Nature*. *394*, 277-281.
- Calignano,A., La Rana,G. und Piomelli,D. (2001). Antinociceptive activity of the endogenous fatty acid amide, palmitylethanolamide. *Eur. J. Pharmacol.* *419*, 191-198.
- Carrier,E.J., Kearns,C.S., Barkmeier,A.J., Breese,N.M., Yang,W., Nithipatikom,K., Pfister,S.L., Campbell,W.B. und Hillard,C.J. (2004). Cultured rat microglial cells synthesize the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol, which increases proliferation via a CB2 receptor-dependent mechanism. *Mol. Pharmacol.* *65*, 999-1007.
- Catterall,W.A. (2000). Structure and regulation of voltage-gated Ca²⁺ channels. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *16*, 521-555.
- Chan,W.Y., Kohsaka,S. und Rezaie,P. (2007). The origin and cell lineage of microglia: new concepts. *Brain Res. Rev.* *53*, 344-354.
- Chinetti,G., Fruchart,J.C. und Staels,B. (2000). Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): nuclear receptors at the crossroads between lipid metabolism and inflammation. *Inflamm. Res.* *49*, 497-505.
- Chinetti,G., Griglio,S., Antonucci,M., Torra,I.P., Delerive,P., Majd,Z., Fruchart,J.C., Chapman,J., Najib,J. und Staels,B. (1998). Activation of proliferator-activated receptors alpha and gamma induces apoptosis of human monocyte-derived macrophages. *J. Biol. Chem.* *273*, 25573-25580.
- Choi,D.W. (1988). Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron*. *1*, 623-634.
- Clapham,D.E., Runnels,L.W. und Strubing,C. (2001). The TRP ion channel family. *Nat. Rev. Neurosci.* *2*, 387-396.

- Clark,R.S., Kochanek,P.M., Chen,M., Watkins,S.C., Marion,D.W., Chen,J., Hamilton,R.L., Loeffert,J.E. und Graham,S.H. (1999). Increases in Bcl-2 and cleavage of caspase-1 and caspase-3 in human brain after head injury. *FASEB J.* *13*, 813-821.
- Coburn,A.F., Graham,C.E. und Haninger,J. (1954a). The effect of egg yolk in diets on anaphylactic arthritis (passive Arthus phenomenon) in the guinea pig. *J. Exp. Med.* *100*, 425-435.
- Coburn,A.F., Trulson,M.F. und Moore,L.V. (1954b). Further study of the effect of the administration of egg yolk on susceptibility of children to rheumatic infection. *Minerva Med.* *45*, 1534-1536.
- Comelli,F., Giagnoni,G., Bettoni,I., Colleoni,M. und Costa,B. (2007). The inhibition of monoacylglycerol lipase by URB602 showed an anti-inflammatory and anti-nociceptive effect in a murine model of acute inflammation. *Br. J. Pharmacol.* *152*, 787-794.
- Costa,B., Conti,S., Giagnoni,G. und Colleoni,M. (2002). Therapeutic effect of the endogenous fatty acid amide, palmitoylethanolamide, in rat acute inflammation: inhibition of nitric oxide and cyclo-oxygenase systems. *Br. J. Pharmacol.* *137*, 413-420.
- Cristino,L., De Petrocellis,L., Pryce,G., Baker,D., Guglielmotti,V. und Di Marzo,V. (2006). Immunohistochemical localization of cannabinoid type 1 and vanilloid transient receptor potential vanilloid type 1 receptors in the mouse brain. *Neuroscience.* *139*, 1405-1415.
- Cullingford,T.E., Bhakoo,K., Peuchen,S., Dolphin,C.T., Patel,R. und Clark,J.B. (1998). Distribution of mRNAs encoding the peroxisome proliferator-activated receptor alpha, beta, and gamma and the retinoid X receptor alpha, beta, and gamma in rat central nervous system. *J. Neurochem.* *70*, 1366-1375.
- Culman,J., Zhao,Y., Gohlke,P. und Herdegen,T. (2007). PPAR-gamma: therapeutic target for ischemic stroke. *Trends Pharmacol. Sci.* *28*, 244-249.
- D'Ambra,T.E., Estep,K.G., Bell,M.R., Eissenstat,M.A., Josef,K.A., Ward,S.J., Haycock,D.A., Baizman,E.R., Casiano,F.M. und Beglin,N.C. (1992). Conformationally restrained analogues of pravadoline: nanomolar potent, enantioselective, (aminoalkyl)indole agonists of the cannabinoid receptor. *J. Med. Chem.* *35*, 124-135.
- Dailey,M.E., Buchanan,J., Bergles,D.E. und Smith,S.J. (1994). Mossy fiber growth and synaptogenesis in rat hippocampal slices in vitro. *J. Neurosci.* *14*, 1060-1078.
- Darmani,N.A. (2001). The cannabinoid CB1 receptor antagonist SR 141716A reverses the antiemetic and motor depressant actions of WIN 55, 212-2. *Eur. J. Pharmacol.* *430*, 49-58.
- de Haas,A.H., Boddeke,H.W. und Biber,K. (2008). Region-specific expression of immunoregulatory proteins on microglia in the healthy CNS. *Glia.* *56*, 888-894.
- Degn,M., Lambertsen,K.L., Petersen,G., Meldgaard,M., Artmann,A., Clausen,B.H., Hansen,S.H., Finsen,B., Hansen,H.S. und Lund,T.M. (2007). Changes in brain levels of N-acylethanolamines and 2-arachidonoylglycerol in focal cerebral ischemia in mice. *J. Neurochem.* *103*, 1907-1916.
- Deliverie,P., De Bosscher,K., Besnard,S., Vanden Berghe,W., Peters,J.M., Gonzalez,F.J., Fruchart,J.C., Tedgui,A., Haegeman,G. und Staels,B. (1999). Peroxisome proliferator-activated receptor alpha negatively regulates the vascular inflammatory gene response by negative cross-talk with transcription factors NF-kappaB and AP-1. *J. Biol. Chem.* *274*, 32048-32054.
- Desarnaud,F., Cadas,H. und Piomelli,D. (1995). Anandamide amidohydrolase activity in rat brain microsomes. Identification and partial characterization. *J. Biol. Chem.* *270*, 6030-6035.

- Devane,W.A., Dysarz,F.A., III, Johnson,M.R., Melvin,L.S. und Howlett,A.C. (1988). Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Mol. Pharmacol.* **34**, 605-613.
- Devane,W.A., Hanus,L., Breuer,A., Pertwee,R.G., Stevenson,L.A., Griffin,G., Gibson,D., Mandelbaum,A., Etinger,A. und Mechoulam,R. (1992). Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science.* **258**, 1946-1949.
- Devchand,P.R., Keller,H., Peters,J.M., Vazquez,M., Gonzalez,F.J. und Wahli,W. (1996). The PPARalpha-leukotriene B4 pathway to inflammation control. *Nature.* **384**, 39-43.
- Di Carlo,G. und Izzo,A.A. (2003). Cannabinoids for gastrointestinal diseases: potential therapeutic applications. *Expert. Opin. Investig. Drugs.* **12**, 39-49.
- Di Marzo,V., Bifulco,M. und De Petrocellis,L. (2004). The endocannabinoid system and its therapeutic exploitation. *Nat. Rev. Drug Discov.* **3**, 771-784.
- Di Marzo,V., Fontana,A., Cadas,H., Schinelli,S., Cimino,G., Schwartz,J.C. und Piomelli,D. (1994). Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. *Nature.* **372**, 686-691.
- Di Marzo,V. und Petrocellis,L.D. (2006). Plant, synthetic, and endogenous cannabinoids in medicine. *Annu. Rev. Med.* **57**, 553-574.
- Dinh,T.P., Freund,T.F. und Piomelli,D. (2002). A role for monoglyceride lipase in 2-arachidonoylglycerol inactivation. *Chem. Phys. Lipids.* **121**, 149-158.
- Dolphin,A.C. (1998). Mechanisms of modulation of voltage-dependent calcium channels by G proteins. *J. Physiol.* **506**, 3-11.
- Eid,S.R., Crown,E.D., Moore,E.L., Liang,H.A., Choong,K.C., Dima,S., Henze,D.A., Kane,S.A. und Urban,M.O. (2008). HC-030031, a TRPA1 selective antagonist, attenuates inflammatory- and neuropathy-induced mechanical hypersensitivity. *Mol. Pain.* **4**, 48.
- Eissenstat,M.A., Bell,M.R., D'Ambra,T.E., Alexander,E.J., Daum,S.J., Ackerman,J.H., Gruett,M.D., Kumar,V., Estep,K.G. und Olefirowicz,E.M. (1995). Aminoalkylindoles: structure-activity relationships of novel cannabinoid mimetics. *J. Med. Chem.* **38**, 3094-3105.
- Facchinetti,F., Del Giudice,E., Furegato,S., Passarotto,M. und Leon,A. (2003). Cannabinoids ablate release of TNFalpha in rat microglial cells stimulated with lipopolysaccharide. *Glia.* **41**, 161-168.
- Facci,L., Dal Toso,R., Romanello,S., Buriani,A., Skaper,S.D. und Leon,A. (1995). Mast cells express a peripheral cannabinoid receptor with differential sensitivity to anandamide und palmitoylethanolamide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 3376-3380.
- Fernandez-Lopez,D., Pazos,M.R., Tolon,R.M., Moro,M.A., Romero,J., Lizasoain,I. und Martinez-Org (2007). The cannabinoid agonist WIN55212 reduces brain damage in an in vivo model of hypoxic-ischemic encephalopathy in newborn rats. *Pediatr. Res.* **62**, 255-260.
- Forster,E., Zhao,S. und Frotscher,M. (2006). Laminating the hippocampus. *Nat. Rev. Neurosci.* **7**, 259-267.
- Franklin,A., Parmentier-Batteur,S., Walter,L., Greenberg,D.A. und Stella,N. (2003). Palmitoylethanolamide increases after focal cerebral ischemia and potentiates microglial cell motility. *J. Neurosci.* **23**, 7767-7775.

- Franklin,A. und Stella,N. (2003). Arachidonylcyclopropylamide increases microglial cell migration through cannabinoid CB2 and abnormal-cannabidiol-sensitive receptors. *Eur J Pharmacol.* 474, 195-198.
- Frei,K., Malipiero,U.V., Leist,T.P., Zinkernagel,R.M., Schwab,M.E. und Fontana,A. (1989). On the cellular source and function of interleukin 6 produced in the central nervous system in viral diseases. *Eur. J. Immunol.* 19, 689-694.
- Freund,T.F. und Buzsaki,G. (1996). Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus.* 6, 347-470.
- Freund,T.F., Katona,I. und Piomelli,D. (2003). Role of endogenous cannabinoids in synaptic signaling. *Physiol Rev.* 83, 1017-1066.
- Frotscher,M., Zafirov,S. und Heimrich,B. (1995). Development of identified neuronal types and of specific synaptic connections in slice cultures of rat hippocampus. *Prog. Neurobiol.* 45, 143-164.
- Fu,J., Gaetani,S., Oveisi,F., Lo Verme,J., Serrano,A., Rodriguez,D.F., Rosengarh,A., Luecke,H., Di Giacomo,B., Tarzia,G. und Piomelli,D. (2003). Oleylethanolamide regulates feeding and body weight through activation of the nuclear receptor PPAR-alpha. *Nature.* 425, 90-93.
- Fulci,G., Dmitrieva,N., Gianni,D., Fontana,E.J., Pan,X., Lu,Y., Kaufman,C.S., Kaur,B., Lawler,S.E., Lee,R.J., Marsh,C.B., Brat,D.J., van Rooijen,N., Stemmer-Rachamimov,A.O., Hochberg,F.H., Weissleder,R., Martuza,R.L. und Chiocca,E.A. (2007). Depletion of peripheral macrophages and brain microglia increases brain tumor titers of oncolytic viruses. *Cancer Res.* 67, 9398-9406.
- Gahwiler,B.H., Capogna,M., Debanne,D., McKinney,R.A. und Thompson,S.M. (1997). Organotypic slice cultures: a technique has come of age. *Trends Neurosci* 20, 471-477.
- Galve-Roperh,I., Aguado,T., Palazuelos,J. und Guzman,M. (2008). Mechanisms of control of neuron survival by the endocannabinoid system. *Curr. Pharm. Des.* 14, 2279-2288.
- Garthwaite,J., Charles,S.L. und Chess-Williams,R. (1988). Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain. *Nature.* 336, 385-388.
- Genovese,T., Esposito,E., Mazzon,E., Di Paola,R., Meli,R., Bramanti,P., Piomelli,D., Calignano,A. und Cuzzocrea,S. (2008). Effects of palmitoylethanolamide on signaling pathways implicated in the development of spinal cord injury. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 326, 12-23.
- Gerdeman,G.L., Partridge,J.G., Lupica,C.R. und Lovinger,D.M. (2003). It could be habit forming: drugs of abuse and striatal synaptic plasticity. *Trends Neurosci.* 26, 184-192.
- Ghirnikar,R.S., Lee,Y.L. und Eng,L.F. (1998). Inflammation in traumatic brain injury: role of cytokines and chemokines. *Neurochem. Res.* 23, 329-340.
- Ginhoux,F., Greter,M., Leboeuf,M., Nandi,S., See,P., Gokhan,S., Mehler,M.F., Conway,S.J., Ng,L.G., Stanley,E.R., Samokhvalov,I.M. und Merad,M. (2010). Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science.* 330, 841-845.
- Goldberg,M.P., Monyer,H. und Choi,D.W. (1988). Hypoxic neuronal injury in vitro depends on extracellular glutamine. *Neurosci. Lett.* 94, 52-57.
- Gonzalez-Scarano,F. und Baltuch,G. (1999). Microglia as mediators of inflammatory and degenerative diseases. *Annu. Rev. Neurosci.* 22, 219-240.

- Graham,S.H., Chen,J. und Clark,R.S. (2000). Bcl-2 family gene products in cerebral ischemia and traumatic brain injury. *J. Neurotrauma*. *17*, 831-841.
- Granneman,J., Skoff,R. und Yang,X. (1998). Member of the peroxisome proliferator-activated receptor family of transcription factors is differentially expressed by oligodendrocytes. *J. Neurosci. Res*. *51*, 563-573.
- Gunthorpe,M.J. und Szallasi,A. (2008). Peripheral TRPV1 receptors as targets for drug development: new molecules and mechanisms. *Curr. Pharm. Des*. *14*, 32-41.
- Hailer,N.P., Jarhult,J.D. und Nitsch,R. (1996). Resting microglial cells in vitro: analysis of morphology and adhesion molecule expression in organotypic hippocampal slice cultures. *Glia* *18*, 319-331.
- Hajos,N., Ledent,C. und Freund,T.F. (2001). Novel cannabinoid-sensitive receptor mediates inhibition of glutamatergic synaptic transmission in the hippocampus. *Neuroscience* *106*, 1-4.
- Hall,W. und Solowij,N. (1998). Adverse effects of cannabis. *Lancet*. *352*, 1611-1616.
- Hampson,A.J., Grimaldi,M., Axelrod,J. und Wink,D. (1998). Cannabidiol and (-)-Delta9-tetrahydrocannabinol are neuroprotective antioxidants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. *95*, 8268-8273.
- Hampson,A.J., Grimaldi,M., Lolic,M., Wink,D., Rosenthal,R. und Axelrod,J. (2000). Neuroprotective antioxidants from marijuana. *Ann. N. Y. Acad. Sci*. *899*, 274-282.
- Hansen,H.S., Moesgaard,B., Hansen,H.H., Schousboe,A. und Petersen,G. (1999). Formation of N-acyl-phosphatidylethanolamine and N-acylethanolamine (including anandamide) during glutamate-induced neurotoxicity. *Lipids*. *34*, 327-330.
- Hansen,H.S., Moesgaard,B., Petersen,G. und Hansen,H.H. (2002). Putative neuroprotective actions of N-acyl-ethanolamines. *Pharmacol. Ther*. *95*, 119-126.
- Henstridge,C.M., Balenga,N.A., Ford,L.A., Ross,R.A., Waldhoer,M. und Irving,A.J. (2009). The GPR55 ligand L-alpha-lysophosphatidylinositol promotes RhoA-dependent Ca²⁺ signaling and NFAT activation. *FASEB J*. *23*, 183-193.
- Heppner,F.L., Skutella,T., Hailer,N.P., Haas,D. und Nitsch,R. (1998). Activated microglial cells migrate towards sites of excitotoxic neuronal injury inside organotypic hippocampal slice cultures. *Eur. J Neurosci*. *10*, 3284-3290.
- Herring,A.C. und Kaminski,N.E. (1999). Cannabinol-mediated inhibition of nuclear factor-kappaB, cAMP response element-binding protein, and interleukin-2 secretion by activated thymocytes. *J. Pharmacol. Exp. Ther*. *291*, 1156-1163.
- Hillard,C.J., Wilkison,D.M., Edgemond,W.S. und Campbell,W.B. (1995). Characterization of the kinetics and distribution of N-arachidonylethanolamine (anandamide) hydrolysis by rat brain. *Biochim. Biophys. Acta*. *1257*, 249-256.
- Hlatky,R., Valadka,A.B. und Robertson,C.S. (2003). Intracranial hypertension and cerebral ischemia after severe traumatic brain injury. *Neurosurg. Focus*. *14*, 1-4.
- Ho,Y., Samarasinghe,R., Knoch,M.E., Lewis,M., Aizenman,E. und DeFranco,D.B. (2008). Selective inhibition of mitogen-activated protein kinase phosphatases by zinc accounts for extracellular signal-regulated kinase 1/2-dependent oxidative neuronal cell death. *Mol. Pharmacol*. *74*, 1141-1151.
- Holopainen,I.E. (2005). Organotypic hippocampal slice cultures: a model system to study basic cellular and molecular mechanisms of neuronal cell death, neuroprotection, and synaptic plasticity. *Neurochem. Res*. *30*, 1521-1528.

- Hopkins,R.O., Tate,D.F. und Bigler,E.D. (2005). Anoxic versus traumatic brain injury: amount of tissue loss, not etiology, alters cognitive and emotional function. *Neuropsychology*. 19, 233-242.
- Howlett,A.C., Barth,F., Bonner,T.I., Cabral,G., Casellas,P., Devane,W.A., Felder,C.C., Herkenham,M., Mackie,K., Martin,B.R., Mechoulam,R. und Pertwee,R.G. (2002). International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacol. Rev.* 54, 161-202.
- Howlett,A.C., Breivogel,C.S., Childers,S.R., Deadwyler,S.A., Hampson,R.E. und Porrino,L.J. (2004). Cannabinoid physiology and pharmacology: 30 years of progress. *Neuropharmacology*. 47, 345-358.
- Huppert,J., Closhen,D., Croxford,A., White,R., Kulig,P., Pietrowski,E., Bechmann,I., Becher,B., Luhmann,H.J., Waisman,A. und Kuhlmann,C.R. (2010). Cellular mechanisms of IL-17-induced blood-brain barrier disruption. *FASEB J.* 24, 1023-1034.
- Iversen,L. und Chapman,V. (2002). Cannabinoids: a real prospect for pain relief? *Curr. Opin. Pharmacol.* 2, 50-55.
- Jaggari,S.I., Hasnie,F.S., Sellaturay,S. und Rice,A.S. (1998). The anti-hyperalgesic actions of the cannabinoid anandamide and the putative CB2 receptor agonist palmitoylethanolamide in visceral and somatic inflammatory pain. *Pain*. 76, 189-199.
- Jarai,Z., Wagner,J.A., Varga,K., Lake,K.D., Compton,D.R., Martin,B.R., Zimmer,A.M., Bonner,T.I., Buckley,N.E., Mezey,E., Razdan,R.K., Zimmer,A. und Kunos,G. (1999). Cannabinoid-induced mesenteric vasodilation through an endothelial site distinct from CB1 or CB2 receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S. A.* 96, 14136-14141.
- Jin,K.L., Mao,X.O., Goldsmith,P.C. und Greenberg,D.A. (2000). CB1 cannabinoid receptor induction in experimental stroke. *Ann. Neurol.* 48, 257-261.
- Jonsson,K.O., Vandevoorde,S., Lambert,D.M., Tiger,G. und Fowler,C.J. (2001). Effects of homologues and analogues of palmitoylethanolamide upon the inactivation of the endocannabinoid anandamide. *Br. J. Pharmacol.* 133, 1263-1275.
- Kahlich,R., Klima,J., Cihla,F., Frankova,V., Masek,K., Rosicky,M., Matousek,F. und Bruthans,J. (1979). Studies on prophylactic efficacy of N-2-hydroxyethyl palmitamide (Impulsin) in acute respiratory infections. Serologically controlled field trials. *J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol.* 23, 11-24.
- Kapur,A., Zhao,P., Sharir,H., Bai,Y., Caron,M.G., Barak,L.S. und Abood,M.E. (2009). Atypical responsiveness of the orphan receptor GPR55 to cannabinoid ligands. *J. Biol. Chem.* 284, 29817-29827.
- Katona,I. und Freund,T.F. (2008). Endocannabinoid signaling as a synaptic circuit breaker in neurological disease. *Nat. Med.* 14, 923-930.
- Katona,I., Sperlagh,B., Sik,A., Kafalvi,A., Vizi,E.S., Mackie,K. und Freund,T.F. (1999). Presynaptically located CB1 cannabinoid receptors regulate GABA release from axon terminals of specific hippocampal interneurons. *J. Neurosci.* 19, 4544-4558.
- Katona,I., Urban,G.M., Wallace,M., Ledent,C., Jung,K.M., Piomelli,D., Mackie,K. und Freund,T.F. (2006). Molecular composition of the endocannabinoid system at glutamatergic synapses. *J. Neurosci.* 26, 5628-5637.
- Kettenmann,H. (2006). Triggering the brain's pathology sensor. *Nat Neurosci* 9, 1463-1464.
- Khaspekov,L.G., Brenz Verca,M.S., Frumkina,L.E., Hermann,H., Marsicano,G. und Lutz,B. (2004). Involvement of brain-derived neurotrophic factor in cannabinoid receptor-dependent protection against excitotoxicity. *Eur J Neurosci.* 19, 1691-1698.

- Kirkham, T.C., Williams, C.M., Fezza, F. und Di Marzo, V (2002). Endocannabinoid levels in rat limbic forebrain and hypothalamus in relation to fasting, feeding and satiation: stimulation of eating by 2-arachidonoyl glycerol. *Br. J. Pharmacol.* *136*, 550-557.
- Kishimoto, S., Oka, S., Gokoh, M. und Sugiura, T. (2006). Chemotaxis of human peripheral blood eosinophils to 2-arachidonoylglycerol: comparison with other eosinophil chemoattractants. *Int. Arch Allergy Immunol.* *140*, 3-7.
- Kleemann, R., Gervois, P.P., Verschuren, L., Staels, B., Princen, H.M. und Kooistra, T. (2003). Fibrates down-regulate IL-1-stimulated C-reactive protein gene expression in hepatocytes by reducing nuclear p50-NFkappa B-C/EBP-beta complex formation. *Blood.* *101*, 545-551.
- Klein, T.W. (2005). Cannabinoid-based drugs as anti-inflammatory therapeutics. *Nat. Rev. Immunol.* *5*, 400-411.
- Koch, M., Kreutz, S., Böttger, C., Benz, A., Maronde, E., Ghadban, C., Korf, H.-W. und Dehghani, F. (2011). Palmitoylethanolamide Protects Dentate Gyrus Granule Cells via Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-Alpha. *Neurotox. Res.* *19*, 330-340.
- Koch, M., Kreutz, S., Böttger, C., Grabiec, U., Ghadban, C., Korf, H.-W. und Dehghani, F. (2011). The cannabinoid WIN 55,212-2-mediated protection of dentate gyrus granule cells is driven by CB(1) receptors and modulated by TRPA1 and Ca_v(_v)2.2 channels. *Hippocampus.* *21*, 554-564.
- Kohl, A., Dehghani, F., Korf, H.-W. and Hailer, N.P. (2003). The bisphosphonate clodronate depletes microglial cells in excitotoxically injured organotypic hippocampal slice cultures. *Exp. Neurol.* *181*, 1-11.
- Kozłowska, H., Baranowska, M., Schlicker, E., Kozłowski, M., Laudanski, J. and Malinowska, B. (2007). Identification of the vasodilatory endothelial cannabinoid receptor in the human pulmonary artery. *J Hypertens.* *25*, 2240-2248.
- Kreutz, S.: Einfluss des Cannabinoidsystems auf die exzitotoxische neuronale Schädigung: Untersuchungen am Modellsystem NMDA geschädigter hippocampaler Schnittkulturen (OHSC) der Ratte, unv. Diss., Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main 2007.
- Kreutz, S., Koch, M., Böttger, C., Ghadban, C., Korf, H.-W. und Dehghani, F. (2009). 2-Arachidonoylglycerol elicits neuroprotective effects on excitotoxically lesioned dentate gyrus granule cells via abnormal-cannabidiol-sensitive receptors on microglial cells. *Glia.* *57*, 286-294.
- Kreutz, S., Koch, M., Ghadban, C., Korf, H.-W. und Dehghani, F. (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. *Exp Neurol* *203*, 246-257.
- Kreutzberg, G.W. (1996). Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci.* *19*, 312-318.
- Kroemer, G. (1997). The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis. *Nat. Med.* *3*, 614-620.
- Krueger, M. und Bechmann, I. (2010). CNS pericytes: concepts, misconceptions, and a way out. *Glia.* *58*, 1-10.
- Kuster, J.E., Stevenson, J.I., Ward, S.J., D'Ambra, T.E. und Haycock, D.A. (1993). Aminoalkylindole binding in rat cerebellum: selective displacement by natural and synthetic cannabinoids. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *264*, 1352-1363.

- Lambert,D.M., Vandevoorde,S., Diependaele,G., Govaerts,S.J. und Robert,A.R. (2001). Anticonvulsant activity of N-palmitoylethanolamide, a putative endocannabinoid, in mice. *Epilepsia*. 42, 321-327.
- Lambert,D.M., Vandevoorde,S., Jonsson,K.O. und Fowler,C.J. (2002). The palmitoylethanolamide family: a new class of anti-inflammatory agents? *Curr. Med. Chem.* 9, 663-674.
- Lawson,L.J., Perry,V.H., Dri,P. und Gordon,S. (1990). Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience*. 39, 151-170.
- Lawson,L.J., Perry,V.H. und Gordon,S. (1992). Turnover of resident microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience*. 48, 405-415.
- Lichtman,A.H., Hawkins,E.G., Griffin,G. und Cravatt,B.F. (2002). Pharmacological activity of fatty acid amides is regulated, but not mediated, by fatty acid amide hydrolase in vivo. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 302, 73-79.
- Lo Verme,J., Fu,J., Astarita,G., La Rana,G., Russo,R., Calignano,A. und Piomelli,D. (2005a). The nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor- α mediates the anti-inflammatory actions of palmitoylethanolamide. *Mol. Pharmacol.* 67, 15-19.
- Lo Verme,J., La Rana,G., Russo,R., Calignano,A. und Piomelli,D. (2005b). The search for the palmitoylethanolamide receptor. *Life Sci.* 77, 1685-1698.
- Long,D.A. und Martin,A.J. (1956). Factor in arachis oil depressing sensitivity to tuberculin in B.C.G.-infected guineapigs. *Lancet*. 270, 464-466.
- Lothman,E.W., Bertram,E.H. und Stringer,J.L. (1991). Functional anatomy of hippocampal seizures. *Prog. Neurobiol.* 37, 1-82.
- Maccarrone,M. und Wenger,T. (2005). Effects of cannabinoids on hypothalamic and reproductive function. *Handb. Exp. Pharmacol.* 555-571.
- Mackie,K. und Stella,N. (2006). Cannabinoid receptors and endocannabinoids: evidence for new players. *AAPS. J.* 8, E298-E306.
- Malfait,A.M., Gallily,R., Sumariwalla,P.F., Malik,A.S., Andreakos,E., Mechoulam,R. und Feldmann,M. (2000). The nonpsychoactive cannabis constituent cannabidiol is an oral anti-arthritic therapeutic in murine collagen-induced arthritis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 9561-9566.
- Mangelsdorf,D.J., Thummel,C., Beato,M., Herrlich,P., Schutz,G., Umesono,K., Blumberg,B., Kastner,P., Mark,M., Chambon,P. und Evans,R.M. (1995). The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell*. 83, 835-839.
- Maresz,K., Carrier,E.J., Ponomarev,E.D., Hillard,C.J. und Dittel,B.N. (2005). Modulation of the cannabinoid CB2 receptor in microglial cells in response to inflammatory stimuli. *J. Neurochem.* 95, 437-445.
- Marsicano,G., Goodenough,S., Monory,K., Hermann,H., Eder,M., Cannich,A., Azad,S.C., Cascio,M.G., Gutierrez,S.O., van der Stelt,M., Lopez-Rodriguez,M.L., Casanova,E., Schutz,G., Zieglgansberger,W., Di Marzo,V., Behl,C. und Lutz,B. (2003). CB1 cannabinoid receptors and on-demand defense against excitotoxicity. *Science* 302, 84-88.
- Martin,N.A., Patwardhan,R.V., Alexander,M.J., Africk,C.Z., Lee,J.H., Shalmon,E., Hovda,D.A. und Becker,D.P. (1997). Characterization of cerebral hemodynamic phases following severe head trauma: hypoperfusion, hyperemia, and vasospasm. *J. Neurosurg.* 87, 9-19.

- Masek,K., Perlik,F., Klima,J. und Kahlich,R. (1974). Prophylactic efficacy of N-2-hydroxyethyl palmitamide (impulsin) in acute respiratory tract infections. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 7, 415-419.
- Matas,D., Juknat,A., Pietr,M., Klin,Y. und Vogel,Z. (2007). Anandamide protects from low serum-induced apoptosis via its degradation to ethanolamine. *J. Biol. Chem.* 282, 7885-7892.
- Matsuda,L.A., Lolait,S.J., Brownstein,M.J., Young,A.C. und Bonner,T.I. (1990). Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature.* 346, 561-564.
- McGeer,P.L. und McGeer,E.G. (1995). The inflammatory response system of brain: implications for therapy of Alzheimer and other neurodegenerative diseases. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 21, 195-218.
- Mechoulam,R. und Gaoni,Y. (1965). A total synthesis of dl-delta-1-tetrahydrocannabinol, the active constituent of hashish. *J. Am. Chem. Soc.* 87, 3273-3275.
- Mechoulam,R. und Gaoni,Y. (1967). Recent advances in the chemistry of hashish. *Fortschr. Chem. Org. Naturst.* 25, 175-213.
- Mechoulam,R. und Lichtman,A.H. (2003). Neuroscience. Stout guards of the central nervous system. *Science.* 302, 65-67.
- Mechoulam,R. und Shohami,E. (2007). Endocannabinoids and traumatic brain injury. *Mol. Neurobiol.* 36, 68-74.
- Melis,M., Pillolla,G., Bisogno,T., Minassi,A., Petrosino,S., Perra,S., Muntoni,A.L., Lutz,B., Gessa,G.L., Marsicano,G., Di Marzo,V. und Pistis,M. (2006). Protective activation of the endocannabinoid system during ischemia in dopamine neurons. *Neurobiol. Dis.* 24, 15-27.
- Mishima,K., Hayakawa,K., Abe,K., Ikeda,T., Egashira,N., Iwasaki,K. und Fujiwara,M. (2005). Cannabidiol prevents cerebral infarction via a serotonergic 5-hydroxytryptamine1A receptor-dependent mechanism. *Stroke.* 36, 1077-1082.
- Moraes,L.A., Piqueras,L. und Bishop-Bailey,D. (2006). Peroxisome proliferator-activated receptors and inflammation. *Pharmacol. Ther.* 110, 371-385.
- Moreno,S., Farioli-Vecchioli,S. und Ceru,M.P. (2004). Immunolocalization of peroxisome proliferator-activated receptors and retinoid X receptors in the adult rat CNS. *Neuroscience.* 123, 131-145.
- Muccioli,G.G. und Stella,N. (2008). Microglia produce and hydrolyze palmitoylethanolamide. *Neuropharmacology.* 54, 16-22.
- Munro,S., Thomas,K.L. und Abu-Shaar,M. (1993). Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature.* 365, 61-65.
- Nagayama,T., Sinor,A.D., Simon,R.P., Chen,J., Graham,S.H., Jin,K. und Greenberg,D.A. (1999). Cannabinoids and neuroprotection in global and focal cerebral ischemia and in neuronal cultures. *J. Neurosci.* 19, 2987-2995.
- Natarajan,V., Schmid,P.C., Reddy,P.V. und Schmid,H.H. (1984). Catabolism of N-acylethanolamine phospholipids by dog brain preparations. *J. Neurochem.* 42, 1613-1619.
- Nemeth,B., Ledent,C., Freund,T.F. und Hajos,N. (2008). CB1 receptor-dependent and -independent inhibition of excitatory postsynaptic currents in the hippocampus by WIN 55,212-2. *Neuropharmacology.* 54, 51-57.

- Nimmerjahn,A., Kirchhoff,F. und Helmchen,F. (2005). Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science*. 308, 1314-1318.
- Norberg,J., Kristensen,B.W. und Zimmer,J. (1999). Markers for neuronal degeneration in organotypic slice cultures. *Brain Res. Protoc.* 3, 278-290.
- Offertaler,L., Mo,F.M., Batkai,S., Liu,J., Begg,M., Razdan,R.K., Martin,B.R., Bukoski,R.D. und Kunos,G. (2003). Selective ligands and cellular effectors of a G protein-coupled endothelial cannabinoid receptor. *Mol Pharmacol.* 63, 699-705.
- Oka,S., Wakui,J., Ikeda,S., Yanagimoto,S., Kishimoto,S., Gokoh,M., Nasui,M. und Sugiura,T. (2006). Involvement of the cannabinoid CB2 receptor and its endogenous ligand 2-arachidonoylglycerol in oxazolone-induced contact dermatitis in mice. *J. Immunol.* 177, 8796-8805.
- Okamoto,Y., Morishita,J., Tsuboi,K., Tonai,T. und Ueda,N. (2004). Molecular characterization of a phospholipase D generating anandamide and its congeners. *J. Biol. Chem.* 279, 5298-5305.
- Pacheco,M.A., Ward,S.J. und Childers,S.R. (1993). Identification of cannabinoid receptors in cultures of rat cerebellar granule cells. *Brain Res.* 603, 102-110.
- Panikashvili,D., Mechoulam,R., Beni,S.M., Alexandrovich,A. und Shohami,E. (2005). CB1 cannabinoid receptors are involved in neuroprotection via NF-kappa B inhibition. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 25, 477-484.
- Panikashvili,D., Simeonidou,C., Ben Shabat,S., Hanus,L., Breuer,A., Mechoulam,R. und Shohami,E. (2001). An endogenous cannabinoid (2-AG) is neuroprotective after brain injury. *Nature.* 413, 527-531.
- Perry,V.H. und Gordon,S. (1988). Macrophages and microglia in the nervous system. *Trends Neurosci.* 11, 273-277.
- Pertwee,R.G. (1999). Pharmacology of cannabinoid receptor ligands. *Curr. Med. Chem.* 6, 635-664.
- Pertwee,R.G. (2007). GPR55: a new member of the cannabinoid receptor clan? *Br. J. Pharmacol.* 152, 984-986.
- Pietr,M., Kozela,E., Levy,R., Rimmerman,N., Lin,Y.H., Stella,N., Vogel,Z. und Juknat,A. (2009). Differential changes in GPR55 during microglial cell activation. *FEBS Lett.* 583, 2071-2076.
- Pintor,A., Tebano,M.T., Martire,A., Grieco,R., Galluzzo,M., Scattoni,M.L., Pezzola,A., Coccurello,R., Felici,F., Cuomo,V., Piomelli,D., Calamandrei,G. und Popoli,P. (2006). The cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2 attenuates the effects induced by quinolinic acid in the rat striatum. *Neuropharmacology.* 51, 1004-1012.
- Piomelli,D. (2003). The molecular logic of endocannabinoid signalling. *Nat. Rev. Neurosci.* 4, 873-884.
- Pocock,J.M. und Kettenmann,H. (2007). Neurotransmitter receptors on microglia. *Trends Neurosci.* 30, 527-535.
- Potucek,Y.D., Crain,J.M. und Watters,J.J. (2006). Purinergic receptors modulate MAP kinases and transcription factors that control microglial inflammatory gene expression. *Neurochem. Int.* 49, 204-214.
- Puffenbarger,R.A., Boothe,A.C. und Cabral,G.A. (2000). Cannabinoids inhibit LPS-inducible cytokine mRNA expression in rat microglial cells. *Glia.* 29, 58-69.
- Puighermanal,E., Marsicano,G., Busquets-Garcia,A., Lutz,B., Maldonado,R. und Ozaita,A. (2009). Cannabinoid modulation of hippocampal long-term memory is mediated by mTOR signaling. *Nat. Neurosci.* 12, 1152-1158.

- Raghupathi,R. (2004). Cell death mechanisms following traumatic brain injury. *Brain Pathol.* *14*, 215-222.
- Ramanan,S., Kooshki,M., Zhao,W., Hsu,F.C. und Robbins,M.E. (2008). PPARalpha ligands inhibit radiation-induced microglial inflammatory responses by negatively regulating NF-kappaB and AP-1 pathways. *Free Radic. Biol. Med.* *45*, 1695-1704.
- Randall,M.D., Harris,D., Kendall,D.A. und Ralevic,V. (2002). Cardiovascular effects of cannabinoids. *Pharmacol. Ther.* *95*, 191-202.
- Razdan,R.K., Dalzell,H.C. und Handrick,G.R. (1974). Hashish. A simple one-step synthesis of (-)-delta1-tetrahydrocannabinol (THC) from p-mentha-2,8-dien-1-ol and olivetol. *J. Am. Chem. Soc.* *96*, 5860-5865.
- Ricote,M., Li,A.C., Willson,T.M., Kelly,C.J. und Glass,C.K. (1998). The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation. *Nature.* *391*, 79-82.
- Rink,A., Fung,K.M., Trojanowski,J.Q., Lee,V.M., Neugebauer,E. und McIntosh,T.K. (1995). Evidence of apoptotic cell death after experimental traumatic brain injury in the rat. *Am. J. Pathol.* *147*, 1575-1583.
- Roberts-Crowley,M.L., Mitra-Ganguli,T., Liu,L. und Rittenhouse,A.R. (2009). Regulation of voltage-gated Ca²⁺ channels by lipids. *Cell Calcium.* *45*, 589-601.
- Ross,R.A., Brockie,H.C. und Pertwee,R.G. (2000). Inhibition of nitric oxide production in RAW264.7 macrophages by cannabinoids and palmitoylethanolamide. *Eur. J. Pharmacol.* *401*, 121-130.
- Russo,E.B. (2007). History of cannabis and its preparations in saga, science and sobriquet. *Chem. Biodivers.* *4*, 1614-1648.
- Ryberg,E., Larsson,N., Sjogren,S., Hjorth,S., Hermansson,N.O., Leonova,J., Elebring,T., Nilsson,K., Drmota,T. und Greasley,P.J. (2007). The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor. *Br. J. Pharmacol.* *152*, 1092-1101.
- Sakai,M., Matsushima-Hibiya,Y., Nishizawa,M. und Nishi,S. (1995). Suppression of rat glutathione transferase P expression by peroxisome proliferators: interaction between Jun and peroxisome proliferator-activated receptor alpha. *Cancer Res.* *55*, 5370-5376.
- Saunders,N.R., Ek,C.J., Habgood,M.D. und Dziegielewska,K.M. (2008). Barriers in the brain: a renaissance? *Trends Neurosci.* *31*, 279-286.
- Sawada,M., Kondo,N., Suzumura,A. und Marunouchi,T. (1989). Production of tumor necrosis factor-alpha by microglia and astrocytes in culture. *Brain Res.* *491*, 394-397.
- Schmid,H.H., Schmid,P.C. und Natarajan,V. (1990). N-acylated glycerophospholipids and their derivatives. *Prog. Lipid Res.* *29*, 1-43.
- Schomacher,M., Muller,H.D., Sommer,C., Schwab,S. und Schabitz,W.R. (2008). Endocannabinoids mediate neuroprotection after transient focal cerebral ischemia. *Brain Res.* *1240*, 213-220.
- Schoonjans,K., Staels,B. und Auwerx,J. (1996). The peroxisome proliferator activated receptors (PPARS) and their effects on lipid metabolism and adipocyte differentiation. *Biochim. Biophys. Acta.* *1302*, 93-109.
- Sheerin,A.H., Zhang,X., Saucier,D.M. und Corcoran,M.E. (2004). Selective antiepileptic effects of N-palmitoylethanolamide, a putative endocannabinoid. *Epilepsia.* *45*, 1184-1188.
- Shen,M., Piser,T.M., Seybold,V.S. und Thayer,S.A. (1996). Cannabinoid receptor agonists inhibit glutamatergic synaptic transmission in rat hippocampal cultures. *J. Neurosci.* *16*, 4322-4334.

- Sheu, M.Y., Fowler, A.J., Kao, J., Schmuth, M., Schoonjans, K., Auwerx, J., Fluhr, J.W., Man, M.Q., Elias, P.M. und Feingold, K.R. (2002). Topical peroxisome proliferator activated receptor-alpha activators reduce inflammation in irritant and allergic contact dermatitis models. *J. Invest. Dermatol.* *118*, 94-101.
- Showalter, V.M., Compton, D.R., Martin, B.R. und Abood, M.E. (1996). Evaluation of binding in a transfected cell line expressing a peripheral cannabinoid receptor (CB2): identification of cannabinoid receptor subtype selective ligands. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *278*, 989-999.
- Skaper, S.D., Buriani, A., Dal Toso, R., Petrelli, L., Romanello, S., Facci, L. und Leon, A. (1996). The ALIAmide palmitoylethanolamide and cannabinoids, but not anandamide, are protective in a delayed postglutamate paradigm of excitotoxic death in cerebellar granule neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *93*, 3984-3989.
- Smith, D.H., Meaney, D.F. und Shull, W.H. (2003). Diffuse axonal injury in head trauma. *J. Head Trauma Rehabil.* *18*, 307-316.
- Staels, B., Koenig, W., Habib, A., Merval, R., Lebre, M., Torra, I.P., Delerive, P., Fadel, A., Chinetti, G., Fruchart, J.C., Najib, J., Maclouf, J. und Tedgui, A. (1998). Activation of human aortic smooth-muscle cells is inhibited by PPARalpha but not by PPARgamma activators. *Nature.* *393*, 790-793.
- Starowicz, K., Cristino, L. und Di Marzo, V. (2008). TRPV1 receptors in the central nervous system: potential for previously unforeseen therapeutic applications. *Curr. Pharm. Des.* *14*, 42-54.
- Staton, P.C., Hatcher, J.P., Walker, D.J., Morrison, A.D., Shapland, E.M., Hughes, J.P., Chong, E., Mander, P.K., Green, P.J., Billinton, A., Fulleylove, M., Lancaster, H.C., Smith, J.C., Bailey, L.T., Wise, A., Brown, A.J., Richardson, J.C. und Chessell, I.P. (2008). The putative cannabinoid receptor GPR55 plays a role in mechanical hyperalgesia associated with inflammatory and neuropathic pain. *Pain.* *139*, 225-236.
- Stella, N. (2009). Endocannabinoid signaling in microglial cells. *Neuropharmacology.* *56*, 244-253.
- Stokes, A., Wakano, C., Koblan-Huberson, M., Adra, C.N., Fleig, A. und Turner, H. (2006). TRPA1 is a substrate for de-ubiquitination by the tumor suppressor CYLD. *Cell Signal.* *18*, 1584-1594.
- Stolp, H. und Dziegielewska, K. (2009). Role of developmental inflammation and blood-brain barrier dysfunction in neurodevelopmental and neurodegenerative diseases. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* *35*, 132-146.
- Stoppini, L., Buchs, P.A. und Muller, D. (1991). A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. *J. Neurosci. Methods.* *37*, 173-182.
- Streit, W.J. (2001). Microglia and macrophages in the developing CNS. *Neurotoxicology.* *22*, 619-624.
- Streit, W.J. (2002). Microglia as neuroprotective, immunocompetent cells of the CNS. *Glia.* *40*, 133-139.
- Streit, W.J.: Microglial Cells. In: Kettenmann, H. und Ransom B.R. (ed): *Neuroglia.* Oxford University Press, 2004, pp. 60-71.
- Streit, W.J., Graeber, M.B. und Kreutzberg, G.W. (1988). Functional plasticity of microglia: a review. *Glia.* *1*, 301-307.
- Su, J.Y. und Vo, A.C. (2007). 2-Arachidonylglycerol ether and abnormal cannabidiol-induced vascular smooth muscle relaxation in rabbit pulmonary arteries via receptor-pertussis toxin sensitive G proteins-ERK1/2 signaling. *Eur. J. Pharmacol.* *559*, 189-195.

- Sugiura,T., Kishimoto,S., Oka,S. und Gokoh,M. (2006). Biochemistry, pharmacology and physiology of 2-arachidonoylglycerol, an endogenous cannabinoid receptor ligand. *Prog. Lipid Res.* *45*, 405-446.
- Sugiura,T., Kondo,S., Kishimoto,S., Miyashita,T., Nakane,S., Kodaka,T., Suhara,Y., Takayama,H. und Waku,K. (2000). Evidence that 2-arachidonoylglycerol but not N-palmitoylethanolamine or anandamide is the physiological ligand for the cannabinoid CB2 receptor. Comparison of the agonistic activities of various cannabinoid receptor ligands in HL-60 cells. *J. Biol. Chem.* *275*, 605-612.
- Sugiura,T., Kondo,S., Sukagawa,A., Nakane,S., Shinoda,A., Itoh,K., Yamashita,A. und Waku,K. (1995). 2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *215*, 89-97.
- Suk,K., Yeou,K.S. und Kim,H. (2001). Regulation of IL-18 production by IFN gamma and PGE2 in mouse microglial cells: involvement of NF-kB pathway in the regulatory processes. *Immunol. Lett.* *77*, 79-85.
- Sun,Y., Alexander,S.P., Kendall,D.A. und Bennett,A.J. (2006). Cannabinoids and PPARalpha signalling. *Biochem. Soc. Trans.* *34*, 1095-1097.
- Tambuyzer,B.R., Ponsaerts,P. und Nouwen,E.J. (2009). Microglia: gatekeepers of central nervous system immunology. *J. Leukoc. Biol.* *85*, 352-370.
- Tator,C.H. und Fehlings,M.G. (1991). Review of the secondary injury theory of acute spinal cord trauma with emphasis on vascular mechanisms. *J. Neurosurg.* *75*, 15-26.
- Thomas,W.E. (1992). Brain macrophages: evaluation of microglia and their functions. *Brain Res. Brain Res. Rev.* *17*, 61-74.
- Tolias,C.M. und Bullock,M.R. (2004). Critical appraisal of neuroprotection trials in head injury: what have we learned? *NeuroRx.* *1*, 71-79.
- Tsuboi,K., Sun,Y.X., Okamoto,Y., Araki,N., Tonai,T. und Ueda,N. (2005). Molecular characterization of N-acylethanolamine-hydrolyzing acid amidase, a novel member of the choloylglycine hydrolase family with structural and functional similarity to acid ceramidase. *J. Biol. Chem.* *280*, 11082-11092.
- Ueda,N., Kurahashi,Y., Yamamoto,S. und Tokunaga,T. (1995). Partial purification and characterization of the porcine brain enzyme hydrolyzing and synthesizing anandamide. *J. Biol. Chem.* *270*, 23823-23827.
- Ueda,N., Tsuboi,K. und Uyama,T. (2010). N-acylethanolamine metabolism with special reference to N-acylethanolamine-hydrolyzing acid amidase (NAAA). *Prog. Lipid Res.* *49*, 299-315.
- Ueda,N., Yamanaka,K. und Yamamoto,S. (2001). Purification and characterization of an acid amidase selective for N-palmitoylethanolamine, a putative endogenous anti-inflammatory substance. *J. Biol. Chem.* *276*, 35552-35557.
- van der Stelt,M. und Di Marzo,V. (2003). The endocannabinoid system in the basal ganglia and in the mesolimbic reward system: implications for neurological and psychiatric disorders. *Eur. J. Pharmacol.* *480*, 133-150.
- van der Stelt,M., Fox,S.H., Hill,M., Crossman,A.R., Petrosino,S., Di Marzo,V. und Brotchie,J.M. (2005). A role for endocannabinoids in the generation of parkinsonism and levodopa-induced dyskinesia in MPTP-lesioned non-human primate models of Parkinson's disease. *FASEB J.* *19*, 1140-1142.
- Wagner,J.A., Varga,K., Jarai,Z. und Kunos,G. (1999). Mesenteric vasodilation mediated by endothelial anandamide receptors. *Hypertension.* *33*, 429-434.

- Walker, J.M., Huang, S.M., Strangman, N.M., Tsou, K. und Sanudo-Pena, M.C. (1999). Pain modulation by release of the endogenous cannabinoid anandamide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 12198-12203.
- Walter, L., Franklin, A., Witting, A., Wade, C., Xie, Y., Kunos, G., Mackie, K. und Stella, N. (2003). Nonpsychotropic cannabinoid receptors regulate microglial cell migration. *J. Neurosci.* 23, 1398-1405.
- Watson, S.J., Benson, J.A., Jr. und Joy, J.E. (2000). Marijuana and medicine: assessing the science base: a summary of the 1999 Institute of Medicine report. *Arch. Gen. Psychiatry.* 57, 547-552.
- Wilson, M.A. und Molliver, M.E. (1994). Microglial response to degeneration of serotonergic axon terminals. *Glia.* 11, 18-34.
- Wilson, R.I. und Nicoll, R.A. (2002). Endocannabinoid signaling in the brain. *Science.* 296, 678-682.
- Wirjatijasa, F., Dehghani, F., Blaheta, R.A., Korf, H.-W. und Hailer, N.P. (2002). Interleukin-4, interleukin-10, and interleukin-1-receptor antagonist but not transforming growth factor-beta induce ramification and reduce adhesion molecule expression of rat microglial cells. *J. Neurosci. Res.* 68, 579-587.
- Yang, E. und Korsmeyer, S.J. (1996). Molecular thanatopsis: a discourse on the BCL2 family and cell death. *Blood.* 88, 386-401.
- Young, A.B. (1993). Role of excitotoxins in heredito-degenerative neurologic diseases. *Res. Publ. Assoc. Res. Nerv. Ment. Dis.* 71, 175-189.
- Yount, R., Raschke, K.A., Biru, M., Tate, D.F., Miller, M.J., Abildskov, T., Gandhi, P., Ryser, D., Hopkins, R.O. und Bigler, E.D. (2002). Traumatic brain injury and atrophy of the cingulate gyrus. *J. Neuropsychiatry Clin. Neurosci.* 14, 416-423.
- Zhang, J. und Chen, C. (2008). Endocannabinoid 2-AG protects neurons by limiting cox-2 elevation. *J. Biol. Chem.* 283, 22601-22611.
- Zhou, Y.C. und Waxman, D.J. (1999). Cross-talk between janus kinase-signal transducer and activator of transcription (JAK-STAT) and peroxisome proliferator-activated receptor-alpha (PPARalpha) signaling pathways. Growth hormone inhibition of pparalpha transcriptional activity mediated by stat5b. *J. Biol. Chem.* 274, 2672-2681.
- Zygmunt, P.M., Petersson, J., Andersson, D.A., Chuang, H., Sorgard, M., Di Marzo, V., Julius, D. und Hogestatt, E.D. (1999). Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. *Nature.* 400, 452-457.

Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
(Direktor: Prof. Dr. med. Dr. agr. Bernd Fischer)

Institut Anatomie II der Medizinischen Fakultät der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main
(Direktor: Prof. Dr. med. Horst-Werner Korf)

Thesen der Dissertation

**Neue Wirkmechanismen von Cannabinoiden bei der
exzitotoxischen neuronalen Schädigung:
Untersuchungen am Modell der organotypischen hippocampalen Schnittkulturen**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt
der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Charlotte Sophie Böttger
geboren am 19.09.1987 in Frankfurt am Main

1. Palmitylethanolamin (PEA) wirkt im Modell der organotypischen hippocampalen Schnittkultur (OHSC) bei exzitotoxischer Schädigung neuroprotektiv und führt zu einer signifikanten Reduktion amöboider Mikrogliazellen.
2. Die durch PEA erzielten Effekte konnten durch den *peroxisome proliferator-activated receptor* α (PPAR α) Antagonisten GW6471, nicht aber den PPAR γ Antagonisten GW9662 aufgehoben werden.
3. Die Ergebnisse sprechen für eine PPAR α Rezeptor vermittelte Neuroprotektion von PEA.
4. Die Behandlung exzitotoxisch geschädigter OHSC mit dem Endocannabinoid 2-Arachidonylglycerol (2-AG) führte zu einer signifikanten Reduktion sowohl degenerierender Neurone als auch der Zahl amöboider Mikrogliazellen im Bereich des Gyrus dentatus (DG). Ebenso wirkte das synthetische Cannabinoid *abnormal cannabidiol* (abn-CBD) bei Anwendung auf N-methyl-D-Aspartat (NMDA) geschädigten Schnittkulturen neuroprotektiv und konnte die Mikrogliazellzahl senken.
5. Die abn-CBD Rezeptor Antagonisten Cannabidiol (CBD) und O-1918 waren in den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit nicht nur in der Lage die durch abn-CBD erzielten Wirkungen aufzuheben, sondern antagonisierten auch die neuroprotektiven Effekte von 2-AG und die Reduktion amöboider Mikrogliazellen.
6. Die neuroprotektiven Effekte von abn-CBD und 2-AG verschwanden, wenn die Mikrogliazellen durch Applikation von Clodronat depletiert wurden.
7. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit liefern eindeutige Hinweise darauf, dass 2-AG seine neuroprotektiven Effekte über den abn-CBD Rezeptor auf Mikrogliazellen erzielt.
8. Die Applikation des synthetischen Cannabinoides WIN 55,212-2 (WIN) auf NMDA geschädigte OHSC führte zu einer signifikanten Reduktion der Anzahl degenerierender Neurone.
9. Dieser durch WIN erzielte Effekt konnte durch die Applikation des Cannabinoid 1 (CB1) Rezeptor Antagonisten AM251 antagonisiert werden, nicht jedoch durch den CB2 Rezeptor Antagonisten AM630.
10. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass WIN im Modell der OHSC als neuroprotektives Agens wirkt und legen nahe, dass es diesen Effekt CB1 Rezeptor abhängig vermittelt.

Lebenslauf

**Charlotte Sophie
Böttger**

*19.09.1987

Frankfurt/Main

Examen

05/2012

Approbation als Ärztin

05/2012

Ärztliche Prüfung

Note: sehr gut (1,5)

05/2012

Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Note: sehr gut (1,5)

04/2008

Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Note: sehr gut (1,5)

Studium

02/2011 - 01/2012

Praktisches Jahr

10/2011 - 01/2012

Drittes Tertial

Innere Medizin, Klinikum Darmstadt

06/2011 - 10/2011

Zweites Tertial

Pädiatrie, Darmstädter Kinderkliniken Prinzessin Margaret

02/2011 - 06/2011

Erstes Tertial

Chirurgie, Tygerberg Hospital, Stellenbosch University Südafrika
Stipendium des International Partnership on HIV (IPH) im Rahmen
des Deutschen Akademischen Austausch Dienstes (DAAD)

03/2006 - 05/2012

Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt/Main

Studium der Humanmedizin

10/2005 - 03/2006

Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg

Studium der Humanmedizin

Famulaturen/ Praktika

- 04/2010 **Johann Wolfgang Goethe - Universität Frankfurt/Main**
Blockpraktikum am Zentrum für Kinder und Jugendmedizin
- 01/2010 **Sankt Joseph Krankenhaus, Berlin**
Famulatur im Josephinchen, Zentrum für Kinder und Jugendmedizin
- 07/2009 **DRK Kliniken Berlin Westend**
Famulatur in der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin
- 05/2009 **DRK Kliniken Berlin Westend**
Blockpraktikum in der Klinik für Innere Medizin, Gastroenterologie
- 02/2009 **Arztpraxis Dr. Birgit Böttger, Frankfurt/Main**
Famulatur mit Schwerpunkt Diabetologie und Gestationsdiabetes
- 08/2008 **Heilig-Geist Hospital, Bensheim**
Famulatur in der Klinik für Allgemein-, Visceral- und Gefäßchirurgie
- 08/2007 **Johann Wolfgang Goethe - Universität Frankfurt/Main**
Krankenpflegepraktikum am Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin, Hämatologie, Onkologie und Hämostaseologie
- 08/2006 - 09/2006 **Klinikum Bremerhaven Reinkenheide**
Krankenpflegepraktikum

Universitäre Hilfstätigkeiten

- 2007 - 2008 Arbeits- und Lehrerfahrungen als studentische Hilfskraft der Biowissenschaften, Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt/Main
- Lehr- und wissenschaftliche Arbeitserfahrungen als studentische Hilfskraft am Institut der Dr. Senkenbergischen Anatomie, Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt/Main

Schulische Ausbildung

08/2003 - 06/2005	Lloyd Gymnasium Bremerhaven Bilinguales Abitur (Englisch-Deutsch); Note: sehr gut (1,0)
08/2002 - 06/2003	Shippensburg Senior High School, Pennsylvania, USA Auslandsaufenthalt während des 10. Schuljahres; Ausbildung zum Life Guard
07/1999 - 07/2002	Gutenberg Gymnasium Mainz
08/1997 - 06/1999	Rabanus - Maurus - Gymnasium Mainz
08/1993 - 07/1997	Heinrich - Mumbächer - Grundschule Mainz-Bretzenheim

Sprachen

Englisch	fließend in Wort und Schrift
Französisch	Grundkenntnisse in Wort und Schrift

Auszeichnungen

2005	Anerkennung für besondere Abiturleistung des Jahrgangs
2002	Gewinn des Bundesgruppenwettbewerbs Fremdsprache englisch

Andere Aktivitäten

2004 - 07/2010	Mitglied der Leo Clubs Navalis Bremerhaven und Frankfurt Kaiserstadt; Organisation gemeinnütziger Aktivitäten und Unterstützung wohltätiger Zwecke; Vorstandsmitglied 2007- 2009, Präsidentin 2008-2009
----------------	--

Unterschrift

Charlotte Döfges

Selbständigkeitserklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Ich versichere, dass ich für die inhaltliche Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- und Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen habe. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die in Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.



Unterschrift

Erklärung über frühere Promotionsversuche

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Universität ein Gesuch um Zulassung zum Promotionsverfahren eingereicht. Die vorliegende Arbeit wurde bisher nicht als Dissertation eingereicht.

Charlote Bokjer

Unterschrift

Danksagung

Ich möchte mich ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. Faramarz Dehghani bedanken, der mir nicht nur die Möglichkeit gab diese Arbeit durchzuführen, sondern mich stets hervorragend und zügig betreute und auf meinen frühen wissenschaftlichen Wegen unterstützte und begleitete.

Besonderer Dank gilt auch Herrn Dr. Marco Koch für die ausgezeichnete Mitbetreuung, die Ratschläge und Denkanstöße sowie Anleitung bei meinen ersten wissenschaftlichen Schritten.

Der gesamten Arbeitsgruppe und insbesondere Herrn Chalid Ghadban danke ich für die stete Hilfsbereitschaft und die freundliche Offenheit mit der ich in die Arbeitsgruppe aufgenommen wurde und als Teil ihrer in sehr angenehmer Arbeitsatmosphäre mitwirken durfte.

Ganz persönlich möchte ich mich bei meiner Familie und engen Freunden für die vielseitige und liebevolle Unterstützung bedanken, allen voran bei meinen Eltern, auf deren uneingeschränkte Liebe und Rückhalt ich mich immer verlassen kann.