

Cannabinoid medierte Neuroprotektion in exzitotoxisch geschädigten  
organotypischen hippokampalen Schnittkulturen (OHSC) der Ratte mit besonderem  
Fokus auf N-Arachidonyl-Dopamin (NADA)

Dissertation zum Erlangen des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften

Vorgelegt beim Fachbereich 14  
der Johann Wolfgang Goethe Universität  
in Frankfurt am Main

von

Urszula Grabiec

aus Dębica

(Polen)

Frankfurt (2012)

(D30)

Vom Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie der  
Johann Wolfgang Goethe – Universität als Dissertation angenommen

Dekan: Prof. Dr. Thomas Prisner

1. Gutachter: Prof. Dr. Manfred Schubert-Zsilavecz

2. Gutachter: Prof. Dr. med. Faramarz Dehghani

Datum der Disputation: 2 April 2013

1. Einleitung.....	12
1.1 Schädigungsmechanismen .....	12
1.1.1 Läsionen .....	12
1.1.2 Exzitotoxische Schädigung .....	14
1.2 Zelluläre Mechanismen im Gehirn als Antwort auf die Schädigung.....	15
1.2.1 Mikroglia.....	16
1.2.2 Astrozyten .....	17
1.3 Protektive Mechanismen im Gehirn.....	18
1.3.1 Endocannabinoid System .....	18
1.4 Der TRPV1 Rezeptor und seine toxische Wirkung.....	36
1.4.1. TRPV1, NADA und Schmerzempfindung.....	38
1.5 In vitro Modelle zur Untersuchung der neuronalen Schädigung .....	39
1.5.1 Modellsystem der organotypischen hippocampalen Schnittkulturen (OHSC) .....	39
1.5.2 Einzelzellkulturen und Zelllinien .....	43
1.6 Zielsetzung und Fragestellung .....	46
2. Material und Methoden.....	48
2.1 Materialien, Chemikalien und Lösungen .....	48
2.1.1 Verwendete Substanzen und Pufferlösungen .....	52
2.1.2 Puffer und Gele für Western Blot Analysen.....	54
2.1.3 Die Lösungen für PCR .....	58
2.1.4 Die Lösungen für die Elektrophysiologie .....	60
2.2 Versuchstiere .....	62
2.3 Vorbereitungen und Medienzusammensetzung .....	62
2.3.1 Die Medien zur Präparation und Kultivierung von OHSC.....	62
2.3.2 Herstellung der Agarblöcke.....	63

2.4 Präparation der organotypischen hippocampalen Schnittkulturen (OHSC) .....	63
2.4.1 Vorbereitung des Arbeitsplatzes .....	63
2.4.2 Präparation der OHSC .....	64
2.4.3 Fixierung und Markierung degenerierender Neurone und Mikrogliazellen in OHSC.....	65
2.5 Primärkulturen von Mikroglia und Astrozyten .....	66
2.5.1 Medien zur Präparation und Kultivierung von Mikroglia und Astrozyten ...	66
2.5.2 Gewinnung einer mikroglären und astrozytären Mischkultur.....	66
2.5.3 Isolierung von Mikroglia und Astrozyten.....	67
2.6 Gewinnung von hippocampalen Neuronen .....	68
2.6.1 Medien zur Präparation und Kultivierung von hippocampalen Neuronen..	68
2.6.2 Isolierung von hippocampalen neuronalen Zellkulturen .....	68
2.7 Zelllinien .....	69
2.7.1 Medien zur Kultivierung der Zelllinien BV2, HT22 und HEK-293, HEK-293- TRPV1 .....	69
2.8 Experimentelle Gruppen.....	70
2.8.1 Gruppeneinteilung von OHSC.....	70
2.8.2 Gruppeneinteilung von Einzelzellkulturen .....	72
2.9 Patch-Clamp-Experimente an HEK-293-TRPV1 Zellen .....	74
2.10 In vitro Calcium-Imaging.....	75
2.11 Messung des exzitatorischen postsynaptischen Stroms (EPSC) in autaptischen hippocampalen Neuronen .....	75
2.12 Genotypisierung der CB1 <sup>-/-</sup> Mäuse .....	76
2.12.1 DNA Extraktion aus Schwanzbiopsien .....	77
2.12.2 Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	77
2.12.3 Agarose-Gelelektrophorese .....	78
2.13 Reverse Transkription und Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) .....	79
2.13.1 Isolierung von messenger RNA (mRNA).....	79

2.13.2	Synthese komplementärer DNA.....	80
2.13.3	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	80
2.13.4	Gelelektrophorese und Färbung.....	81
2.14	Western Blot Analyse .....	81
2.14.1	Extraktion von Gesamtprotein .....	82
2.14.2	Proteinbestimmung mit Protein Assay Kit .....	82
2.14.3	Gelelektrophorese.....	83
2.15	Datenanalyse und Auswertung.....	83
2.15.1	Bestimmung von Zellzahl mit Hilfe des Konfokalmikroskops (CLSM) .....	83
2.15.2	Western Blot.....	84
2.15.3	Statistik .....	84
3.	Ergebnisse.....	86
3.1	Protektive Wirkung von NADA auf Neurone und aktivierte Mikroglia in NMDA geschädigten OHSC.....	86
3.2	Abhängigkeit NADA vermittelter Neuroprotektion vom CB1 Rezeptor .....	90
3.3	Einfluss von CB2, abnCBD und Dopamin Rezeptoren auf die NADA medierte Neuroprotektion.....	93
3.4	TRPV1 ist nicht in die NADA-vermittelter Neuroprotektion involviert.....	96
3.4.1	Vorkommen von TRPV1 auf mRNA-Ebene .....	96
3.4.2	NADA ist ein potenter Agonist für den TRPV1 Rezeptor.....	98
3.4.3	Funktionelle Aktivität von TRPV1 .....	99
3.4.4	Capsaicin und 6-iodonordihydrocapsaicin haben keinen Einfluss auf die unbehandelten und geschädigten OHSC .....	100
3.5	Signalkaskaden, die in der NADA Neuroprotektion involviert sind .....	101
3.7	ARA-S allein steigert die Anzahl der IB4 positiven Mikroglia in GCL des GD.....	120
3.8	OMDM-1 .....	122
4.	Diskussion .....	125
4.1	Endocannabinoide als intrinsische Protektoren.....	126

4.1.1 Klinische Anwendung von Cannabinoiden .....	128
4.2 NADA ist ein neuartiges, neuroprotektives, aber zugleich wenig untersuchtes Endocannabinoid.....	128
4.3 Mechanismen der NADA mediierter Aktion und Beteiligung von CB Rezeptoren .....	130
4.4 Effekte und Bedeutung von NADA an TRPV1: TRPV1 ist nicht bei NADA vermittelten Effekten involviert.....	133
4.4.1 Einfluss von NADA auf die Schmerzvermittlung.....	137
4.5 Beteiligung der Signalkaskaden .....	138
4.6 Anstieg der Anzahl der Mikroglia in GD des OHSC durch ARA-S Behandlung .....	142
4.9 OMDM-1 .....	143
5. Zusammenfassung .....	146
6. Abbildungsverzeichnis und Tabellen .....	148
7. Danksagung .....	152
8. Lebenslauf .....	153
9.Literaturverzeichnis .....	154

## Abkürzungsverzeichnis

AA: *arachidonic acid*, Arachidonsäure

Abb.: Abbildung

abnCBD: abnormal Cannabidiol

ACU: *Anandamide Cellular Uptake*

AEA: Anandamid

2-AG: 2-Arachidonyl Glycerol

AHCN: autaptische hippokampale Neuronen

AMPA:  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionsäure

AMT: *anandamide membrane transporter*, Endocannabinoid Transporter

ANOVA: *analysis of variance*, Varianzanalyse

ARA-S: N-Arachidonyl-L-Serin

ATF-2: *Activating transcription factor 2*

ATP: Adenosintriphosphat

Bp: Basenpaare

BSA: *bovine serum albumin*, Rinder-Serumalbumin

BCL-xL: *B-cell lymphoma-extra large*

°C: Grad Celsius

CA: *Cornu Ammonis*, Ammons Horn

Ca<sup>2+</sup>: Calciumionen

[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>: Konzentration der intrazellulären Calciumionen

CAMKII: Calcium-abhängige Calmodulin Kinase II

cAMP: zyklisches Adenosinmonophosphat

Ca<sub>v</sub>2.2: *N-type voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channel*, spannungsabhängiger Calciumkanal vom N-Typ

CB: *Cannabinoid*, Cannabinoid

cDNA: *complementary deoxyribonucleic acid*, komplementäre DNA

CHI: *closed head injury*, geschlossenes Schädel Hirn Trauma

COMT: Catechol-O-Methyltransferase

CREB: *cAMP response element binding protein*

DAG: Diacylglycerol

DAGL: Diacylglycerol Lipase

div: *day in vitro*,Tage in Kultur

DMEM: *Dulbecco's modified eagle medium*,

DMSO: Dimethylsulfoxid

DNA: *deoxyribonucleic acid*, Desoxyribonukleinsäure

DOPA: 3,4-Dihydroxyphenylalanin

dNTP: *2'-deoxyribonucleosid-5'-triphosphat*, Desoxynucleosidtriphosphate (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)

DRG: *dorsal root ganglion*, Spinalganglion

DSE: Depolarisation-induzierte Suppression der Exzitation

DSI: Depolarisation-induzierte Suppression der Inhibition

eCB: *endocannabinoid*, Endocannabinoid

EDTA: Ethylendiamintetraessigsäure

EPSC: *excitatory postsynaptic current*, exzitatorischer postsynaptischer Strom

EPSP: *excitatory postsynaptic potential*, exzitatorisches postsynaptisches Potential

Et al.: *et alteres*

ERK: *extracellular -regulated kinase*, extrazellulär signalregulierte Kinase

FAAH: *fatty acid amide hydrolase*

FLAT: *FAAH like anandamide transporter*

FasL: Fas Ligand

FCS: fetal calf serum, fötales Kälberserum

g: Gravitation/ Erdbeschleunigung

GABA  $\gamma$ :  $\gamma$ -*Gamma-aminobutyric acid*,  $\gamma$ -Aminobuttersäure



GAPDH: Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase

GCL: *granular cell layer*, Körnerzellschicht

GD: Gyrus dentatus

GTP: Guanosintriphosphat

GVIA: *ω-conotoxin*

HBSS: *Hank's buffered salt solution*

HEK-Zellen: *human embryonic kidney cells*, humane embryonale Nierenzellen

HMVEC: *primary human dermal microvaskular endothelial cells*, primäre humane mikrovaskuläre Endothelzellen der Haut

HPETE: *hydroperoxyeicosatetraenoic*

HRP: *Horseradish peroxidase*, Meerrettichperoxidase

IFN $\gamma$ : Interferon Gamma

IPSP: *inhibitory postsynaptic potential*, inhibitorisches postsynaptisches Potential

JNK: *C-Jun N-terminal Kinase*

K<sup>+</sup>: Kaliumionen

kb: Kilobasenpaare

kDa: Kilodalton

KIR: *inwardly rectifying potassium ion channel*, einwärtsgleichrichtender Kaliumkanal

LO: Lipooxygenase

LPS: Lipopolysaccharid

LTD: *long-term depression*, Langzeit-Depression

LTP: *long term potentiation*, Langzeit-Potentiation

M: Molarität

MAC: *macrophage antigen complex*, Makrophagen Antigen

MAO: Monoaminoxidase

MAPK: Mitogen-aktivierte Proteinkinase

MEF2C: *Myocyte Enhancer Factor 2C*

mEPSC: *mini EPSC*

mGlu: *metabotropic glutamate receptor*, metabotroper Glutamat Rezeptor

Mg<sup>2+</sup>: Magnesiumionen

mRNA: *messenger ribonucleic acid*, messenger Ribonukleinsäure

Na<sup>+</sup>: Natriumionen

NAPE-PLD: *N-acyl phosphatidylethanolamine phospholipase D*

NGF: *nerve growth factor*, Nervenwachstumsfaktor

NMDA: N-Methyl-D-Aspartat

NO: Stickstoffmonoxid

p Wert: *probability-value*, Signifikanzwert

PB: *phosphate buffer*, Phosphatpuffer

PBS: *phosphate buffered saline*, phosphatgepufferte Salzlösung

PBST: PBS Triton

PCR: *polymerase chain reaction*, Polymerase Kettenreaktion

PLL: Poly-L-Lysine

PLC: Phospholipase C

PPAR $\gamma$ : *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma*

RNA: *ribonucleic acid*, Ribonukleinsäure

RNase: *Ribonuclease*, Ribonuklease

RT-PCR: *Reverse Transcriptase PCR*

SDS: *sodium dodecylsulfate*, Natriumdodecylsulfat

Sek: Sekunde

SEM: *Standard error of the mean*, Standardabweichung

Taq: *Thermus aquaticus*

TBI: *traumatic brain injury*, traumatische Hirnverletzung

TH: Tyrosinhydroxylase

THC (-)-trans- $\Delta^9$ -Tetrahydrocannabinol

TNF: *tumor necrosis factor*, Tumornekrosefaktor

TRPA: *transient receptor potential ankyrin*

TRPM: *transient receptor potential melastatin*

TRPV: *transient receptor potential vanilloide*

TX-100: Triton-100

U: *unit*

v/v: *volume/volume*, Volumenprozent einer Lösung

w/v: *weight/volume*, Masseprozent einer Lösung

ZNS: Zentralnervensystem

# **1. Einleitung**

In Europa sind jährlich 0.3 bis 0.4 % der Menschen von Hirntraumata aller Schweregrade betroffen (Deutsche Gesellschaft für Neurochirurgie; Poeck *et al.*, 2006). Die Erkrankung zeigt eine steigende Tendenz. Neben primären, mechanisch bedingten Läsionen, entstehen auch sekundäre, relative Gewebeschädigungen, die in Form von Diapedeseblutungen, Ödemen, Parenchymnekrosen und anderen Gewebsalterationen auftreten können (Loane *et al.*, 2010; Thurman *et al.*, 1999).

Sekundäre Hirnverletzungen, die nach primärer Schädigung entstehen, entwickeln sich mit zeitlicher Verzögerung und haben vorwiegend zirkulationsbedingte Folgen (Hirnödem und diapedetische Blutungen oder Infektionen). Konsequenzen einer (traumatischen) Hirnschädigung sind häufig bleibende Behinderungen, welche die persönliche Lebensgestaltung drastisch beeinflussen können und mit hohen Behandlungs- und Rehabilitationskosten verbunden sind (Loane *et al.*, 2010; Poeck *et al.*, 2006; Thurman *et al.*, 1999).

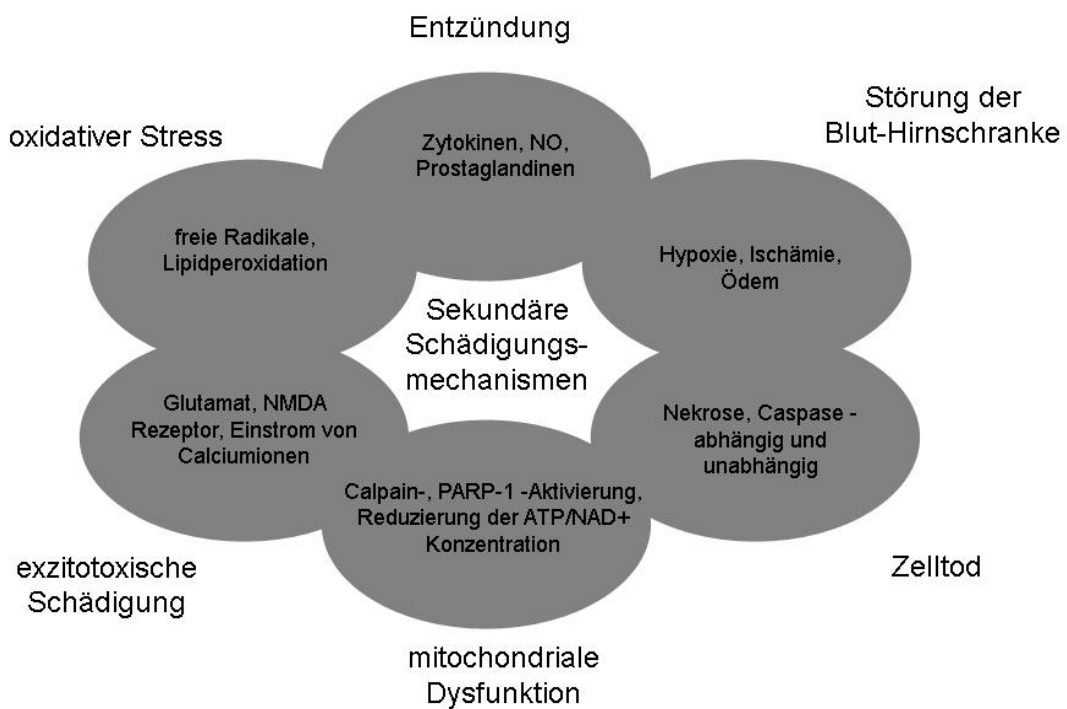
## **1.1 Schädigungsmechanismen**

### **1.1.1 Läsionen**

Sowohl der primäre als auch der verzögerte sekundäre Schaden tragen zu neurologischen Defiziten bei. Schädelhirnverletzungen stellen ein komplexes Krankheitsbild dar, das sich durch Kontusionen, axonale Schädigungen, Blutungen und Hypoxien äußern kann. Diese Effekte führen zu biochemischen und

metabolischen Veränderungen, welche zu schwerwiegenden Gewebeschäden und damit verbunden zum Zelltod führen (Loane *et al.*, 2010; Poeck *et al.*, 2006).

Trotz intensiver Suche existiert bis heute keine adäquate Therapie der neuronalen Schädigung. Die aktuelle Forschung beschäftigt sich mit der Aufklärung sekundärer Schädigungsmechanismen, um wirksame neuroprotektive Behandlungen zu entwickeln. Es wurden mehrere Läsionsmodelle etabliert um die zahlreichen Phasen der neuronalen Läsion widerzuspiegeln. Ein zentraler Aspekt stellt die Exzitotoxizität dar (Loane *et al.*, 2010; Tator *et al.*, 1991; Thurman *et al.*, 1999).



**Abb.1:** Primäre und sekundäre Schädigung. Der Mechanismus des sekundären Schadens im Gehirn nach (Loane *et al.*, 2010).

### 1.1.2 Exzitotoxische Schädigung

Exzitotoxische Schädigung findet sich bei vielen Pathologien des Gehirns, wie bei ischämischen Schlaganfällen, posttraumatischen Verletzungen, Epilepsien und neurodegenerativen Erkrankungen (Chen *et al.*, 2006; Heppner *et al.*, 1998).

Exzitotoxizität, wird durch einen exzessiven  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom, insbesondere durch N-Methyl-D-Aspartat (NMDA) Rezeptoren, vermittelt, welcher zu einer Aktivierung von zytoplasmatischen und nukleären Prozessen, die schließlich das Absterben von Neuronen auslösen, führt. Der NMDA Rezeptor gehört zur Familie der ligandengesteuerten Ionenkanäle, die auf Neuronen vorkommen. Der exzitatorische Neurotransmitter Glutamat aktiviert NMDA Rezeptoren. Sowohl NMDA Rezeptoren als auch dessen Liganden sind erforderlich für den Erhalt der physiologischen Funktionen des Zentralnervensystems (ZNS) (Chen *et al.*, 2006). Im ZNS beeinflusst die aktivitätsabhängige synaptische Effizienz, beispielweise durch Langzeitpotenzierung (LTP, long term potentiation) oder Langzeitdepression (LTD, long term depression), das deklarative Gedächtnis und Lernprozesse (Malenka *et al.*, 2004). Die exzitatorische synaptische Übertragung wird durch die Änderungen in der Anzahl und Funktion der postsynaptischen AMPA ( $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole Propionsäure) Rezeptoren, NMDA Rezeptoren und Kainat Rezeptoren reguliert. In der Forschung liegt der Fokus auf der Regulation von LTP und LTD durch NMDA und AMPA Rezeptoren. NMDA Rezeptoren spielen eine entscheidene Rolle in der Induzierung von verschiedenen aktivitätsabhängigen LTP und LTD Formen (Malenka *et al.*, 2004; Rebola *et al.*, 2010).

Der NMDA Rezeptor ist ein Tetramer, bei dem die Peptidketten jeder Untereinheit dreimal die Membran durchqueren.  $\text{Na}^+$ -,  $\text{K}^+$ - und  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen sind in der Lage den

NMDA-Kanal zu passieren,  $Mg^{2+}$ -Ionen dagegen blockieren ihn. Die potentialabhängige Blockade durch  $Mg^{2+}$ -Ionen scheint bei der Informationsübertragung, bei der synaptischen Plastizität und Lernprozessen eine große Rolle zu spielen. Wie vorher erwähnt, führt die übermäßige Aktivierung der Rezeptoren über Glutamat zu mannigfaltigen neurotoxischen Effekten (Lau *et al.*, 2010; Van Dongen, 2009).

Durch intrazelluläres Calcium werden proteolytische Enzyme, wie Calpain aktiviert, die weitere essenzielle Proteine inaktivieren können. Auch die  $Ca^{2+}$ -abhängige Calmodulin Kinase II (CaM-KII) wird aktiviert und phosphoryliert eine Reihe von Enzymen, was deren Aktivität erhöht und DNA Schäden verursacht. Alle diese Mechanismen induzieren sowohl Nekrose als auch Apoptose bei der exzitotoxischen Schädigung (Malenka *et al.*, 2004; Pozzo Miller *et al.*, 1994; Rebola *et al.*, 2010).

## ***1.2 Zelluläre Mechanismen im Gehirn als Antwort auf die Schädigung***

Neurone stellen einen zentralen Bestandteil des Zentralnervensystems (ZNS) dar, allerdings sind Gliazellen am häufigsten im Gehirn anzutreffen. Nicht-neuronale Zellen des ZNS werden von Astrozyten, Oligodendrozyten, Mikroglia und NG2-positiven Zellen gebildet (Freeman, 2010). Sie haben umfangreiche Funktionen in der Entwicklung und Physiologie des ZNS, von einfacher topischer Unterstützung, Hilfe bei der Signalübertragung bis zur Modulierung synaptischer Verbindungen. Während Mikroglia, als immunkompetente Zellen monozytärer Herkunft, später in das ZNS einwandern, entstammen die Oligodendrozyten und Astrozyten den Glioblasten. Im adulten ZNS zeigen Mikroglia eine ramifizierte Morphologie und weisen ein sehr

niedriges Expressionsniveau an immunologisch relevanten Molekülen auf (Freeman, 2010; Graeber *et al.*, 2010; Kettenmann *et al.*, 2011; Streit *et al.*, 2009).

### **1.2.1 Mikroglia**

Auf zellulärer Ebene ist bekannt, dass Gliazellen durch Änderungen in der Konzentration von proinflammatorischen Zytokinen in ihrer Umgebung mit einer starken Aktivierung und Proliferation reagieren. Infolgedessen kann es zu einer verstärkten Zerstörung von Nervenzellen kommen (Kettenmann *et al.*, 2011).

Die ramifizierten Mikrogliazellen sind im ganzen Gehirnparenchym verteilt. Bei fast allen Pathologien des ZNS ist eine schnelle Aktivierung von Mikroglia zu beobachten. Die aktivierte Mikroglia unterscheidet sich morphologisch durch einen Rückgang der Ramifizierung und funktionell durch ihre phagozytotische Aktivität, die Expression einer Vielzahl immunologisch relevanter Moleküle, die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine und freier Radikale (Graeber *et al.*, 2010; Kettenmann *et al.*, 2011). Nach der Schädigung akkumuliert Mikroglia in geschädigten Arealen des ZNS als Konsequenz von Proliferation und Chemotaxis. Zytokine können die Gehirnschädigung initiieren und Mikroglia aktivieren, aber auch die physiologische Gehirnfunktion unterstützen und die Aktivierung von Mikroglia verhindern (Kettenmann *et al.*, 2011; Kettenmann *et al.*, 2008).



## 1.2.2 Astrozyten

Astrozyten sind morphologisch komplex aufgebaut. Abhängig von der Gehirnregion ist ein Astrozyt in der Lage den Bereich von 20000 bis zu 80000  $\mu\text{m}^3$  zu umfassen, sich mit 300 bis 600 Dendriten zu verbinden und Kontakt mit ungefähr 100000 Synapsen zu haben (Freeman, 2010). Astrozyten kontrollieren den lokalen Blutfluss und versorgen die Neuronen mit energiereichen Substraten. Tatsächlich stellen sich Astrozyten als wichtiges homöostatisches zelluläres Element im Gehirn heraus. Die Regulation des Gehirnvolumens und die Zusammensetzung der Milieus im Extrazellulärraum ist stark von Astrozyten abhängig. Des Weiteren spielen Astrozyten eine wichtige Rolle bei der Regulation der synaptischen Verbindungen, der Aufrechterhaltung von Synapsen und der Stärke und Plastizität von synaptischen Kontakten. Astrozyten wurden als wichtige Partner in der synaptischen Übertragung anerkannt, weil sie über mehrere Neurotransmitterrezeptoren verfügen. Außerdem bilden diese Zellen ein Puffersystem, indem sie überflüssige Transmitter und Ionen aufnehmen und sie auf weitere metabolische Wege leiten (Freeman, 2010; Kettenmann *et al.*, 2011). Die Aktivierung von Astrozyten kann sich in Form von Calciumströmen ausbreiten. Sie können spontan einen Calciumanstieg verursachen, der mit der Glutamatfreisetzung korrelieren kann. Die Verbindungen zwischen Astrozyten und Oligodendrozyten in Form der Gap Junctions ermöglichen diese Ereignisse und bilden ein eigenleitendes Signalingsystem (Freeman, 2010; Kettenmann *et al.*, 2011; Kettenmann *et al.*, 2008).

Die Rolle von Astrozyten bei der Schädigung muss noch untersucht werden, es ist noch nicht klar inwieweit Astrozyten toxisch oder protektiv wirken. Es wurde jedoch gezeigt, dass Astrozyten und Mikroglia über ein komplexes Wirkungsmuster in allen

bekanntesten Krankheiten des ZNS verfügen (Kettenmann *et al.*, 2011; Kettenmann *et al.*, 2008).

## ***1.3 Protektive Mechanismen im Gehirn***

### **1.3.1 Endocannabinoid System**

#### **1.3.1.1 Endocannabinoide**

Es ist von großem Interesse, die Therapiemethoden, die die Folgen sekundärer Schädigung mildern, zu verbessern. Vor kurzem identifizierte neuroprotektive Liganden und Rezeptortypen könnten ein vielversprechenderer therapeutischer Ansatzpunkt in der Therapie der sekundären Schädigung sein. Neuroprotektive Mechanismen, die das Ausmaß der Schädigung reduzieren sollen, werden bereits während der akuten Phase in Gang gesetzt. Arbeiten aus unserer Gruppe zeigen eine signifikante Reduzierung der Nervenzellschädigung durch die Behandlung mit verschiedenen Cannabinoiden, die somit ein hohes neuroprotektives Potential besitzen (Koch *et al.*, 2011a; Koch *et al.*, 2011b; Kreutz *et al.*, 2009; Kreutz *et al.*, 2007). Die Pflanze *Cannabis sativa* wird seit über tausend Jahren als Heilpflanze eingesetzt. Die Erforschung der Cannabinoide startete in den sechziger, Anfang der siebziger Jahre des letzten Jahrhunderts. Es gelang die Isolierung von (-)-trans- $\Delta^9$ -Tetrahydrocannabinol ( $\Delta^9$ -THC), das hauptsächlich für die psychotropen Effekte der Cannabispflanze verantwortlich ist (Mechoulam *et al.*, 1970). Die Untersuchung des chemischen und pharmakologischen Profils führte zur Synthese weiterer Cannabinoide. Mit deren Hilfe wurde es im Laufe der Jahre möglich, mehrere Cannabinoid Rezeptoren zu identifizieren. Es wurde bestätigt, dass psychoaktive Cannabinoide sehr potente Liganden sowohl *in vitro* als auch *in vivo* sind und dass

die Wirkungsweise stark von der Struktur und Stereoselektivität abhängt. Die Wirkungsweise der Cannabinoide zeigt größtenteils ein einheitliches Muster. Es wird beispielweise die Adenylatzyklase über G-Protein gekoppelte Rezeptoren inhibiert (Howlett *et al.*, 2002; Pertwee *et al.*, 2010). Die Klonierung des Cannabinoid (CB) Rezeptor 1 im Jahr 1990 hat das Feld der Cannabinoidforschung deutlich beflügelt. Bisher sind zwei Cannabinoid Rezeptoren identifiziert worden. Cannabinoid (CB) 1 Rezeptor wurde von Matsuda 1990 aus cDNA der Rattengroßhirnrinden Bibliothek kloniert, CB2 wurde 1993 aus der humanen promyelozytischen leukämischen Ziellinie HL60 von Munro, Thomas & Abu-Shaar kloniert (Howlett *et al.*, 2002; Matsuda *et al.*, 1990; Munro *et al.*, 1993; Pertwee *et al.*, 2010; Piomelli, 2003).

Es folgte die Identifizierung weiterer Bestandteile des Endocannabinoidsystems (eCB-System). Der Begriff der Endocannabinoide (eCB) als intrinsische Liganden der CB Rezeptoren wurde zum ersten Mal 1994 von Di Marzo eingeführt. Heute versteht man unter dem eCB-System sowohl die lipophilen Liganden (Endocannabinoide), die an den bestimmten Rezeptortypen binden als auch die Cannabinoide synthetisierenden und abbauenden Enzyme (Di Marzo *et al.*, 1994; Di Marzo *et al.*, 1998). Die Wirkung von Endocannabinoiden wird über verschiedene Rezeptortypen vermittelt, wie CB1 und CB2. Während CB1 vor allem auf neuronalen Zellen vorkommt, ist CB2 hauptsächlich auf Immunzellen, wie Leukozyten, Makrophagen und Mikroglia zu finden (Miller *et al.*, 2008; Pertwee *et al.*, 2010; Piomelli, 2003). Es gibt auch Hinweise, dass CB2 Rezeptoren auf den Neuronen des ZNS vorkommen (Atwood *et al.*, 2010). Es wurde gezeigt, dass eCB an verschiedenen immunologischen Prozessen und in neuronalen Schaltkreisen beteiligt sind. In unterschiedlichen Modellen traumatischer Hirnverletzungen, in der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE) und NMDA-geschädigten organotypischen

hippokampalen Schnittkulturen (OHSC) wurde gezeigt, dass eCB wie Anandamid (AEA) und 2-Arachidonylglycerol (2-AG) als auch die synthetischen Cannabinoide wie R-(+)-WIN 55,212-2 Mesylat neuroprotektive Effekte medieren. Die meisten der beobachteten Effekte werden direkt über die neuronalen CB Rezeptoren vermittelt. Die CB2 Rezeptoren steuern anti-inflammatorische Effekte, die indirekt in die Prozesse der Neuroprotektion eingreifen (Eljaschewitsch *et al.*, 2006; Koch *et al.*, 2011b; Maresz *et al.*, 2007; Mechoulam *et al.*, 2007; Stella, 2010). Das eCB-System reguliert mehrere zentrale und periphere physiologische Prozesse, wie z.B. Appetit, Gedächtnis und pathologische Prozesse wie Schmerz und Inflammation. Heutzutage liegt der Fokus bei den Cannabinoiden, als potenzielle Medikamente, in der Behandlung von Übergewicht, chronischen Schmerzen, Angstzuständen und Depression (Bahr *et al.*, 2006; Long *et al.*, 2009).

Im Gehirn wirken Endocannabinoide wie 2-AG auf retrograde Art und Weise, d.h. eCB werden in exzitatorischen Neuronen postsynaptisch freigesetzt und binden an den präsynaptischen CB1 Rezeptoren, daraufhin kommt es zur Modulation der Glutamat-Freisetzung (Abb. 2). Das retrograde Signaling kann in Schnittkulturen und Zellkulturen untersucht werden, indem man die Depolarisation-induzierte Suppression der Exzitation (depolarization-induced suppression of excitation, DSE) oder Depolarisation-induzierte Suppression der Inhibition (DSI) misst. In der Anwesenheit von eCB wird die Antwort inhibiert und nach der Behandlung mit CB1 Rezeptor-Antagonisten aufgehoben (Katona *et al.*, 2008; Katona *et al.*, 2006; Straiker *et al.*, 2006; Straiker *et al.*, 2005). Ein indirektes Maß für die DSE ist das exzitatorische postsynaptische Potenzial (EPSP). EPSP ist eine vorübergehende Depolarisation der postsynaptischen Membran durch die präsynaptische Freisetzung von Neurotransmittern. Die synaptische Aktivierung von acetylcholin- und

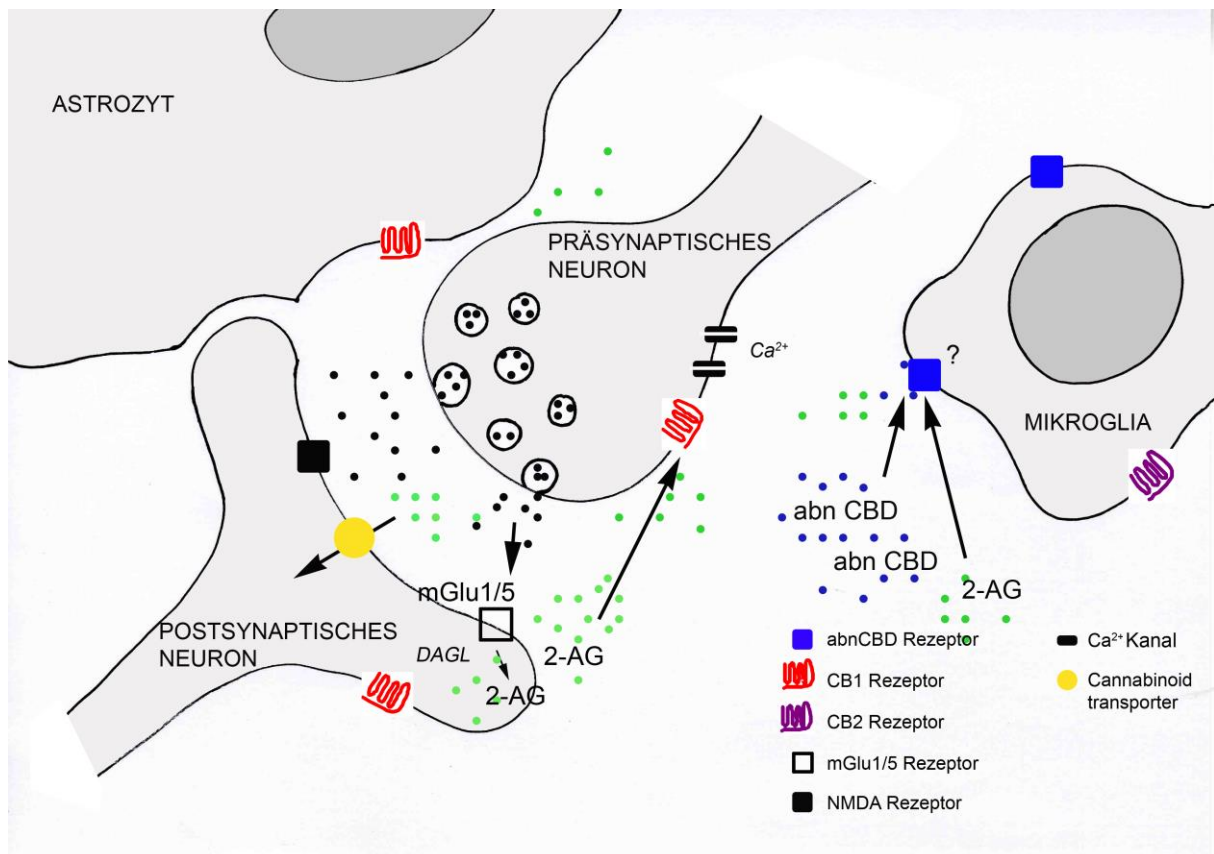
glutamatabhängigen Ionenkanälen führt zur Ausbildung des EPSP aus und kann durch eCBs moduliert werden (Straiker *et al.*, 2005; Sullivan, 1999).

### **1.3.1.2 Vorkommen und Rolle von CB Rezeptoren**

CB1 Rezeptoren kommen hauptsächlich an den terminalen Seiten von zentralen und peripheren Neuronen vor. Dort vermitteln sie die Inhibierung der kontinuierlichen Freisetzung von mehreren inhibitorischen und exzitatorischen Neurotransmittern. Mit hoher Wahrscheinlichkeit sind die CB1 Rezeptoren im ZNS die am häufigsten vorkommenden G-Protein gekoppelten Rezeptoren. Außerdem sind sie im ZNS so angeordnet, dass sie Einfluss auf mehrere wichtige Gehirnfunktionen haben. Im Hippokampus sind CB1 Rezeptoren mit GABA und Cholecystinin kolokalisiert und haben eine starke Wirkung auf die Formierung des Gedächtnisses. In den Basalganglien, im Cerebellum und im Neocortex sind die CB Rezeptoren dagegen für die Regulation der motorischen Funktionen zuständig. Aus mehreren Studien geht hervor, dass CB1 Rezeptoren nicht nur auf Neuronen, sondern auch auf Mikroglia und Astrozyten vorkommen. Ebenfalls wurde gezeigt, dass CB1 Rezeptoren im peripheren Nervensystem zu finden sind. Auf der, mit verschiedenen Organen assoziierten, glatten Muskulatur wurde demonstriert, dass CB1 Rezeptoren zusätzlich Nozizeption und Analgesie vermitteln und auch kardiovaskuläre Effekte beeinflussen (Alger *et al.*, 2011; Bab *et al.*, 2008; Howlett *et al.*, 2002; Pertwee *et al.*, 2010). Das eCB-System beeinflusst, vor allem über CB1 Rezeptoren und seine Liganden, nicht nur das Gehirn sondern auch so gut wie alle Organsysteme im Körper (Bab *et al.*, 2008). Das eCB-System ist sowohl in Adipozyten als auch in anderen peripheren Organen, die im energetischen Metabolismus eine Rolle spielen,

wie Leber und Muskeln, vorhanden. Adipogenese, Lipogenese und Glukoseaufnahme werden unter Zuhilfenahme der CB1 Rezeptoren stimuliert (Pagano *et al.*, 2008). In Lungen sind die CB1 Rezeptoren auf den Nervenfasern, die die bronchiale and bronchioläre glatte Muskelzellen innervieren, verteilt (Calignano *et al.*, 2000).

Die CB2 Rezeptoren sind auf den Immunzellen in mehreren Organen, im Skelett, zirrotischen Lebern, in arteriosklerotischen Plaques, entzündeter gastrointestinaler Schleimhaut und wie vorher erwähnt auf Gliazellen zu finden (Bab *et al.*, 2009). Die Aktivierung der CB2 Rezeptoren verändert die Zellmigration und die Freisetzung von Zytokinen sowohl im Zentralnervensystem als auch in der Peripherie (Ashton *et al.*, 2007; Maresz *et al.*, 2005; Stella, 2010). Mehrere Schlüsselkomponenten des eCB-System wurden in den Knochen identifiziert. Die physiologische Beteiligung der CB2 Rezeptoren wurde mit der Aufrechterhaltung der Knochenremodelierung assoziiert (Bab *et al.*, 2008; Bab *et al.*, 2009). CB2 Rezeptoren spielen eine bedeutende Rolle bei kardiovaskulären-, gastrointestinalen-, Leber-, Nieren-, Lungen-, Knochen-, Fortpflanzungsapparat, Haut-, neurodegenerativen und psychiatrischen Erkrankungen als auch bei Schmerzen und Tumoren (Pacher *et al.*, 2011).



**Abb.2:** Endocannabinoid vermittelte retrograde synaptische Übertragung an der glutamatergen Synapse. Das Endocannabinoid 2-Arachidonyl Glycerol (2-AG) aktiviert die CB Rezeptoren und beeinflusst dadurch sowohl die physiologischen als auch die pathologischen Prozesse im Gehirn. Exzessive präsynaptische Aktivierung zeigt sich im Anstieg der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration und resultiert in der Exozytose von Glutamat in den synaptischen Spalt und seiner Bindung an mGlu1/5 Rezeptoren an der postsynaptischen Seite. Die dadurch aktivierten intrazellulären Signalkaskaden führen zur Hydrolyse von Diacylglycerol (DAG) durch die DAG Lipase  $\alpha$  (DAGL), was zum Anstieg in der 2-AG Konzentration führt. Im nächsten Schritt bindet 2-AG an präsynaptischen CB1 Rezeptoren und führt zur Blockade von Calcium Kanälen und somit wird die synaptische Übertragung deaktiviert (Katona et al., 2008).

### 1.3.1.3 Cannabinoid Rezeptoren und ihre intrazelluläre Signalkaskaden

Im Allgemeinen umfasst die Aktivierung von G-Proteinen drei Schritte:

1. Neurotransmittermoleküle binden an Rezeptorproteine, die in der postsynaptischen Membran verankert sind.

2. Die Rezeptorproteine aktivieren die G-Proteine.
3. Die aktivierten G-Proteine aktivieren weitere Effektorproteine.

Zu den Effektorproteinen für den G-Proteingekoppelten Rezeptor gehören G-Protein-abhängige Ionenkanäle in der Membran und Enzyme, die sekundäre Botenstoffe (Second Messenger) wie z.B. zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) oder  $\text{Ca}^{2+}$  bilden und freisetzen. Second Messenger aktivieren weitere zytosolische Enzyme, die die Funktion von Ionenkanälen regulieren und den zellulären Metabolismus verändern (McCudden *et al.*, 2005; Smith *et al.*, 2010).

Der CB1 Rezeptor ist im ZNS der meistverbreitete G-Protein gekoppelte Rezeptor und zeigt eine Kopplung an zwei G-Proteine (Howlett *et al.*, 2002; Pertwee, 2006; Pertwee *et al.*, 2010). In zwei weit verbreiteten *in vitro* Assays ( $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$  binding assay und cAMP assay) wurde die Fähigkeit von CB1 und CB2 Rezeptoren zur Aktivierung von  $\text{G}_{i/o}$  Proteinen und nachfolgenden cAMP-vermittelten Prozessen nachgewiesen. Radioligand Assays und Signaltransduktions Studien wurden durchgeführt, um die Affinität der Liganden und die Mechanismen die für Cannabinoiden Effekte zuständig sind zu bestimmen (Console-Bram *et al.*, 2012).

Nach der Aktivierung des CB1 Rezeptors kommt es zu einer vorübergehenden Phospholipase C (PLC)-abhängigen Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  Konzentration, was über  $\text{G}_{i/o}$  oder  $\text{G}_q$  Proteine vermittelt wird. Darüber hinaus moduliert der CB1 Rezeptor mehrere Signalkaskaden einschließlich der Adenylatzyklase (Aktivierung/Inhibierung), p44/42 und p38 der Mitogen aktivierten Protein Kinase (MAPK- Phosphorylierung) und mehrere Ionenkanäle (Howlett *et al.*, 2010; Howlett *et al.*, 2004; Pertwee, 2006).



Die Mehrheit der zellulären Antworten auf verschiedene Stimuli wird über Kinase- und Phosphatase-Signalkaskaden vermittelt. Zu den wichtigsten Kinasen in inflammatorischen Prozessen gehören MAPK, die vier Subfamilien in Säugetierzellen einbeziehen:

- (1) Extrazelluläre Signal-regulierte Kinase (ERK 1/2, auch bekannt als p44/42 MAPK)
- (2) C-Jun N-terminal Kinase (JNKs), auch bekannt als Stress-aktivierte Protein Kinasen (SAPKs)
- (3) ERK5/big MAP Kinase 1 (BMK1)
- (4) p38 MAPKs (Koistinaho *et al.*, 2002; Roux *et al.*, 2004)

Traditionell wird p44/42 MAPK mit der Regulierung von Zellwachstum und Zelldifferenzierung assoziiert. Im Gehirn ist p44/42 in zellulären Antworten auf Stressstimuli involviert, wie zum Beispiel der Aktivierung von Glutamatrezeptoren und dem Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration. JNK wird durch verschiedene Stressstimuli (oxidativer Stress, trophische Faktoren, Zugabe von TNF $\alpha$  (Tumornekrosefaktor  $\alpha$ ) oder FasL) stimuliert. Die Signalkaskade BMK1 MAPK spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation von seruminduzierter frühzeitiger Gen (early gen) Expression über den Transkriptionsfaktor MEF2C (Koistinaho *et al.*, 2002; Roux *et al.*, 2004). p38 MAPK wird durch inflammatorische Moleküle, UV-Licht, Schock, osmotische Änderungen und mehrere trophische Faktoren aktiviert und hat vor allem Einfluss auf die Regulation des Zellzyklus, des Zellwachstums und der Zelldifferenzierung. Des Weiteren besitzt p38 MAPK vier verschiedene Isoformen, in Abhängigkeit vom zu Grunde liegenden Zelltyp, die unterschiedlich synthetisiert und reguliert werden. Die zwei verwandten Proteine p44 (ERK 1) und p42 (ERK 2) sind

im Rückenmark und im Gehirn hoch exprimiert. Die Aktivierung von p44/42 MAPK führt zur Aktivierung von nukleären Transkriptionsfaktoren und anderen zytoskelettalen und nukleären Signalproteinen. Bei inflammatorischen Prozessen wird p44/42 phosphoryliert, daraus folgt unter anderem die Aktivierung von: 1) Proteinen – z.B. Phospholipase A2; 2) nukleären Faktoren – z.B. Elk-1; 3) Promotoren z.B. fos und c-fos. Darüber hinaus ist bekannt, dass p44/42 einen Einfluss auf weitere nukleäre Faktoren, wie c-Myc, c-Jun, ATF-2 und CREB hat. Die Synthese und Freisetzung von Entzündungsmediatoren wird teilweise von MAPK gesteuert, was zur Aktivierung von Gliazellen und Degeneration von Neuronen führen kann (Bouaboula *et al.*, 1995; Howlett *et al.*, 2002; Koistinaho *et al.*, 2002; Pacher *et al.*, 2006; Pertwee *et al.*, 2010; Roux *et al.*, 2004; Turu *et al.*, 2010).

#### **1.3.1.4 Cannabinoide - CB Rezeptor Liganden**

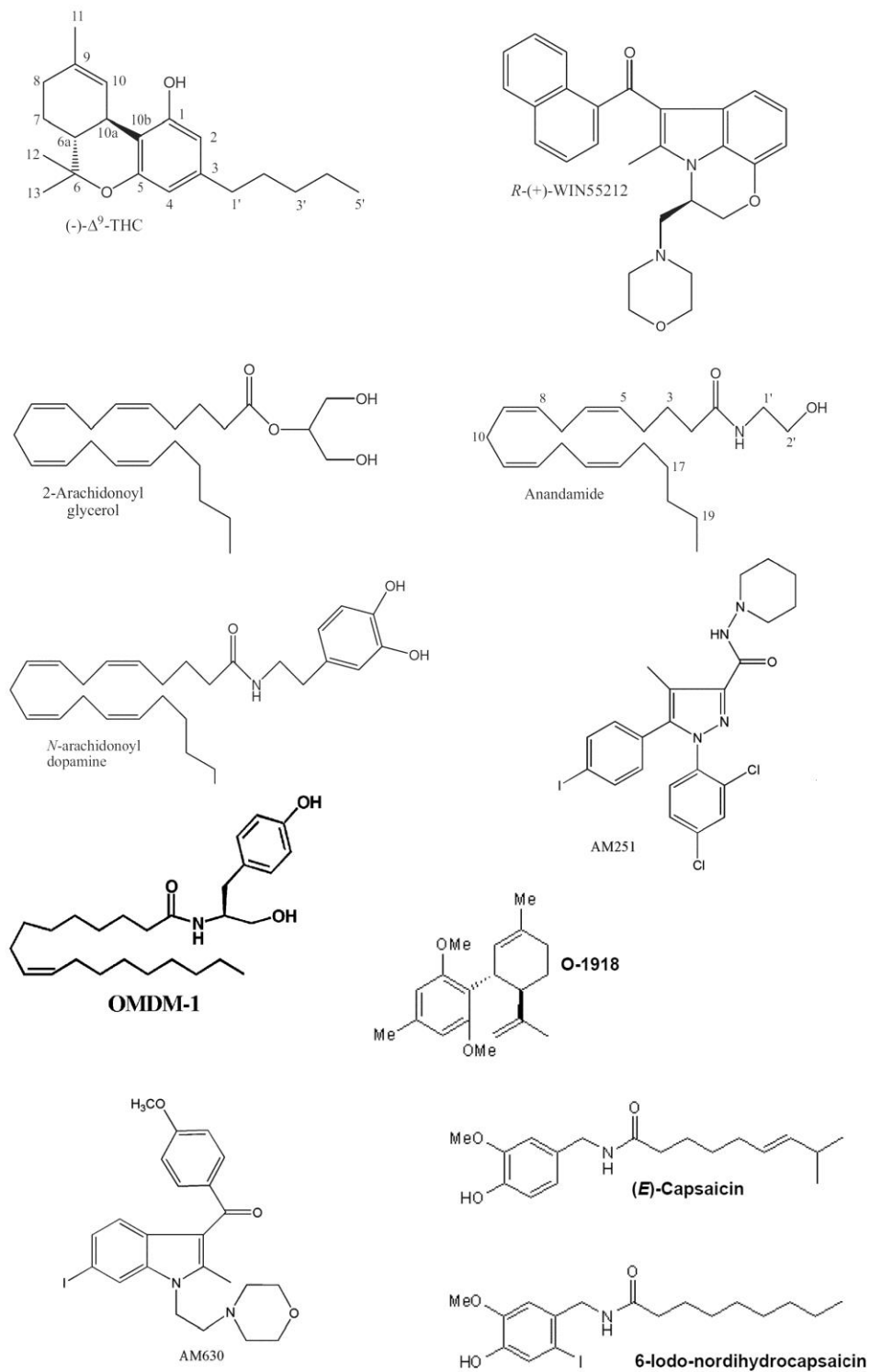
Der ersten beschriebenen endogenen Liganden für die CB Rezeptoren waren Anandamid (N-Arachidonyl ethanolamine) und 2-Arachidonyl Glycerol (2-AG) (Devane *et al.*, 1992; Howlett *et al.*, 2002; Sugiura *et al.*, 1995). Beide Agonisten gehören zu Lipiden und aus diesem Grund können sie nicht in synaptischen Vesikeln gespeichert werden, sondern werden als Antwort auf bestimmte Stimuli bei Bedarf schnell (eng. „on demand“) synthetisiert. Zu den Stimuli gehören ein intrazellulärer Calcium-Anstieg und die Aktivierung der postsynaptischen G-Protein gekoppelten Rezeptoren, unter anderem metabotropen Glutamatrezeptoren (mGluR) oder muskarinischen Acetylcholinrezeptoren 1/3 (Alger, 2012; Alger *et al.*, 2011; Devane *et al.*, 1992; Di Marzo *et al.*, 2005; Howlett *et al.*, 2002; Sugiura *et al.*, 1995).

Die Inaktivierung von Endocannabinoiden, wie AEA, 2-AG und wahrscheinlich auch NADA besteht aus drei Stufen. Zuerst erfolgt die zelluläre Aufnahme nach dem Prinzip der Diffusion und/oder mit Hilfe von Membrantransportern. Weiterhin wird das Endocannabinoid durch Fatty Acid Amide Hydrolase (FAAH), Monoacylglycerol Lipase (MAGL) und weitere Enzyme hydrolysiert. Im letzten Schritt werden die Produkte erneut verestert (re-esterification). Der Endocannabinoid Transporter wurde bis jetzt noch nicht kloniert, durch indirekte Hinweise wird jedoch vermutet, dass er existiert (Kaczocha *et al.*, 2009; Ortar *et al.*, 2003).

Im Jahr 2000 wurde gezeigt, dass NADA CB Rezeptoren aktiviert und somit zu den Endocannabinoiden gerechnet werden kann (Bisogno *et al.*, 2000).

**Table 1:** Auswahl selektiver Agonisten und Antagonisten an Cannabinoid Rezeptoren nach (Pertwee, 2005; Pertwee, 2008).

Ligand	Typ	Rezeptor (K <sub>i</sub> [nM])
Anandamid	Agonist	CB1 (61-543) CB2 (279-1940)
2-AG	Agonist	CB1 (58.3-472) CB2 (145-1400)
NADA	Agonist	CB1 (250) CB2 (12000)
R-(+)-WIN 55,212-2	Agonist	CB1 (1.89-123) CB2 (0.28-16.2)
AM251	CB1-selektiver Antagonist/ inverser Agonist	CB1 (7.49) CB2 (2290)
AM630	CB2-selektiver Antagonist/ inverser Agonist	CB1 (5152) CB2 (31.2)



**Abb.3:** Die Struktur der wichtigsten CB Rezeptorliganden und Modulatoren, die in dieser Arbeit benutzt wurden nach (Ortar et al., 2003; Pertwee, 2010; Pertwee et al., 2010).

### 1.3.1.5 NADA

N-Arachidonyl-Dopamin (NADA; 20:4 $\omega$ 6-Dopamin) ist eine nicht ausreichend untersuchte endogene Substanz, die aus Arachidonsäure synthetisiert wird und ein Dopaminmolekül in seiner Struktur besitzt. Arachidonsäure ist eine reaktive, vierfach ungesättigte Fettsäure mit 20 Kohlenstoffatomen (C<sub>20</sub>H<sub>32</sub>O<sub>2</sub>). Sie ist in kleinen Mengen in die Struktur der polaren Lipide in der Zellmembran eingebaut. Unter dem Einfluss der Phospholipase A2 kann Arachidonsäure abgespalten werden. In weiteren enzymatisch vermittelten Reaktionen wird sie unter anderem in diverse Endocannabinoide umgewandelt, die ihre Wirkung über mehrere Rezeptoren vermitteln (Piomelli, 2003).

Dopamin gehört zu den biogenen Aminen. Die ersten Schritte in der Synthese der drei körpereigenen Katecholamine Dopamin, Noradrenalin und Adrenalin sind identisch. Tyrosin wird von Nervenzellen aus dem Extrazellularraum aufgenommen und dient als Substrat. Die erste Reaktion ist die Hydroxylierung zu 3,4-Dihydroxyphenylalanin (DOPA), welche durch die Tyrosinhydroxylase (TH) katalysiert wird. Dieses Enzym bestimmt die Geschwindigkeit der Synthese. Das zweite Enzym ist die Aromatische-L-Aminosäure-Decarboxylase (L-DOPA wird zu Dopamin decarboxyliert), die man in Serotonin-Neuronen findet und den letzten Schritt in der NADA Synthese darstellt. Im Wesentlichen bauen die zwei Enzyme Monoaminoxidase (MAO) und COMT die Katecholamine ab. Die Gliazellen sind in der Lage aufgenommenes Dopamin zu metabolisieren (Bjorklund *et al.*, 2007; Missale *et al.*, 2010; Neve *et al.*, 2004).

Das nigrostriatale Dopaminsystem entspringt in der Pars compacta der Substantia nigra und hemmt im Corpus striatum GABAerge und cholinerge Interneuronen. Die

Zellkörper des mesolimbischen Dopaminsystems liegen im Mittelhirn, nahe der Substantia nigra und projizieren auf Strukturen des limbischen Systems (zum Nucleus accumbens, zum Tuberculum olfactorium, zum Corpus amygdaloideum und zur frontalen, cingulären und entorhinalen Hirnrinde) (Bjorklund *et al.*, 2007).

Die dopaminergen Neuronen sind bei der Empfindung von Lust oder Freude, beim Essen oder Trinken vermehrt aktiv. Es sind fünf Dopaminrezeptoren, D1 bis D5 beschrieben, die hauptsächlich auf Neuronen, aber auch auf den Gliazellen vorkommen. Die zuerst gefundenen D1- und D2-Rezeptoren treten weitaus häufiger auf als die später gefundenen D3- bis D5-Rezeptoren. Intrazellulär sind D1/5 Rezeptoren Gs gekoppelt während D2/3/4 eine Gi Kopplung zeigen (Bjorklund *et al.*, 2007; Kettenmann *et al.*, 2011; Missale *et al.*, 2010; Neve *et al.*, 2004).

Die Biosynthese von NADA wurde mit Hilfe eines *in vitro* und eines *in vivo* Assays von Hu *et al.* im Jahr 2009 erfolgreich beschrieben. Die enzymvermittelte Konjugation von Arachidonsäure und Dopamin (im Striatum) führt zur Synthese von NADA und ist stark von der Dopaminkonzentration abhängig (Hu *et al.*, 2009). NADA wird mit großer Wahrscheinlichkeit an Orten mit hohem Vorkommen von Dopamin synthetisiert und freigesetzt, d.h. vor allem von Neuronen in dopaminergen Nervenfasern. Diese Zellen enthalten hauptsächlich spezifische Enzyme, die notwendig sind um NADA aus metabolischen Vorstufen zu synthetisieren (Cristino *et al.*, 2008; Egertova *et al.*, 2003; Egertova *et al.*, 1998). TH und Fatty Acid Amide Hydrolase (FAAH), ein membranständiges Protein, sind regulatorische Enzyme in der NADA Biosynthese. Ob Mikroglia und Astrozyten FAAH besitzen ist noch nicht abschließend geklärt (Muccioli *et al.*, 2007). Nach Hemmung von FAAH durch URB597 oder der Deletion des FAAH Gens (in der transgenen FAAH Knockout Maus) wurde eine Konzentrationsabnahme von endogenem NADA im Striatum

beobachtet (Hu *et al.*, 2009). Nach der Inkubation von Dopamin und Anandamid in der Anwesenheit von FAAH, konnte man kleine Mengen von NADA finden. FAAH ist hauptsächlich auf Neuronen verteilt (Bisogno *et al.*, 2000; Egertova *et al.*, 2003; Egertova *et al.*, 1998; Hu *et al.*, 2009). Weitere Modelle für die NADA Biosynthese schließen N-Arachidonyl-Tyrosin (NA-Tyrosin) ein, das im Rattenhirn gefunden wurde. Diesem Modell entsprechend konnten NA-Tyrosin in NA-L-DOPA und NADA, mittels TH und DOPA Decarboxylase, umgewandelt werden. Diese Hypothese findet in der Fachwelt jedoch nur wenig Anklang (Hu *et al.*, 2009).

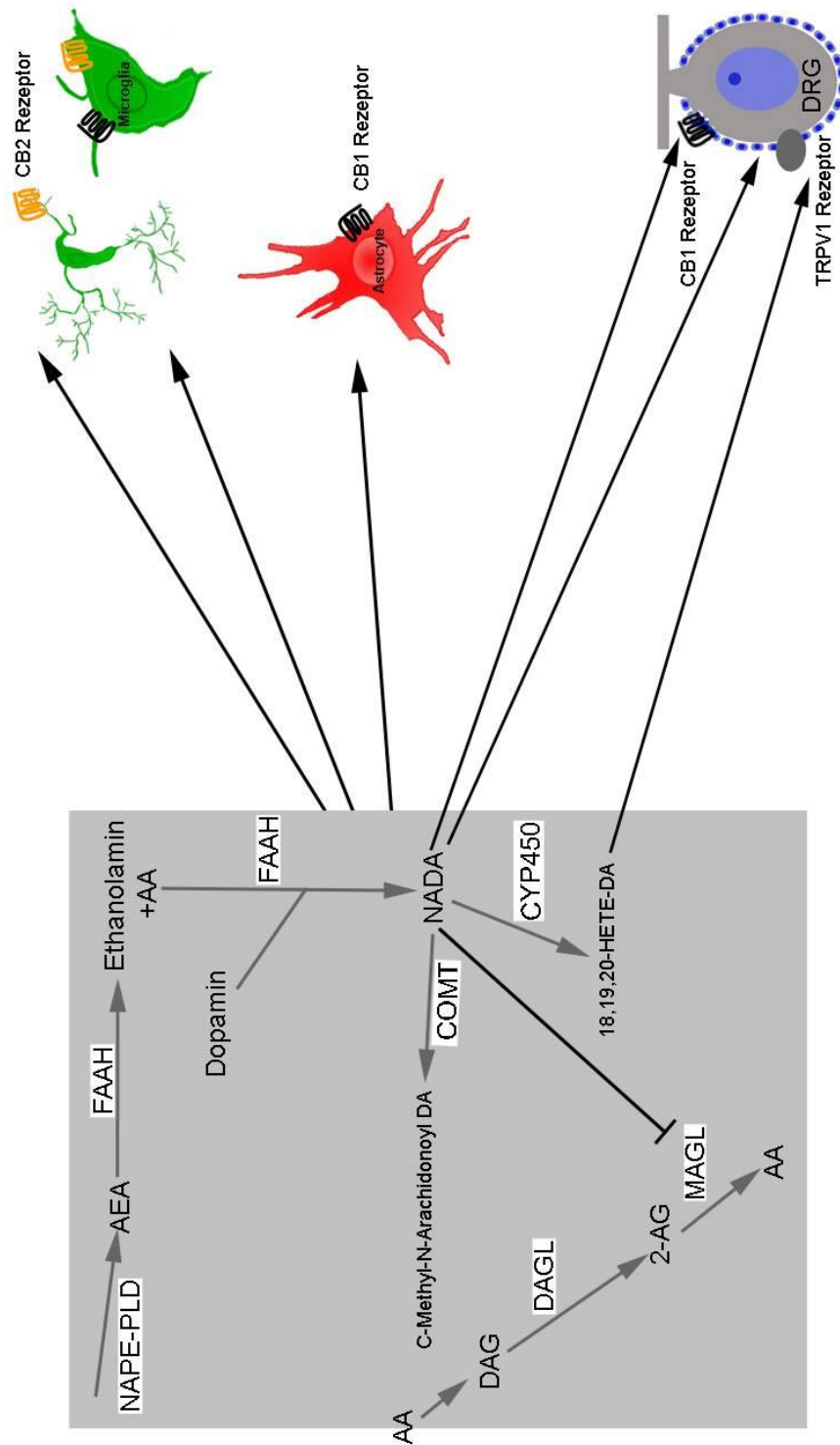
Eine interessante Beobachtung ist, dass NADA mit nur sehr geringer Zeitverzögerung von C6-Gliomzellen aufgenommen wird. Huang *et al.* haben postuliert, dass NADA ein Substrat für das die Katecholamine abbauende Enzym Catechol-O-Methyltransferase (COMT) ist. Tatsächlich wird NADA durch die COMT abhängige Methylierung inaktiviert (Cristino *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2002).

Mittels Quadropole time-of-flight Analysen konnte NADA im Striatum, Hippokampus, Cerebellum, Thalamus, Mittelhirn und in den Spinalganglien nachgewiesen werden. Im Hippokampus wurde die NADA Konzentration auf weniger als 2 pmol je Gramm Gewebe (pmol/g, Nassgewicht) bemessen (Huang *et al.*, 2002). Die Ergebnisse unterscheiden sich wesentlich von denen von Bradshaw *et al.* NADA nur im Striatum und im Hippokampus detektieren konnten (Bradshaw *et al.*, 2006). Mit Hilfe von Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung (LC-MS/MS) und LC-ESI-Triple Quadrupol-Massenspektrometrie (LC/ESI-QqQLIT) konnte NADA im menschlichen Plasma nicht gefunden werden (Balvers *et al.*, 2009; Thomas *et al.*, 2009). Weitere aktuelle Studien zeigen, dass NADA postmortal im humanen Gehirn nicht vorhanden ist (Lehtonen *et al.*, 2011).

NADA wirkt auf verschiedene Rezeptoren, vor allem CB (CB1, CB2) und den transienten Rezeptor Potenzial-Kanal vom Vanilloidrezeptortyp (TRPV)1 (Bisogno *et al.*, 2000; Huang *et al.*, 2002).

Es wurde gezeigt, dass NADA protektive und anti-oxidative Eigenschaften in Mikrogliaeinzelzellkulturen und zerebralen Neuronen besitzt (Bobrov *et al.*, 2008; Navarrete *et al.*, 2009). Gleichwohl spielt NADA eine wichtige Rolle in der Nozizeption und während der Inflammation im ZNS und in der Peripherie. NADA, als ein potenter Aktivator der TRPV1 Rezeptoren, transduziert die noxischen Hitzereize (Caterina *et al.*, 1997; Huang *et al.*, 2002; Huang *et al.*, 2006).





**Abb.4:** Biosynthese und Abbau von NADA. NADA wird aus der mehrfach ungesättigten Fettsäure Arachidonsäure (AA) synthetisiert.

### 1.3.1.6 N-Arachidonyl-Serin (ARA-S)

N-Arachidonyl-L-Serin (ARA-S) wurde im Jahr 2005 aus dem Gehirn von Rindern isoliert (Milman *et al.*, 2006). Im Gegensatz zu AEA, bindet ARA-S nur relativ schwach an CB1, CB2 oder TRPV1 Rezeptoren. Es wurde jedoch gezeigt, dass ARA-S endothelabhängige Vasodilation in mesenterialen Arterien und der abdominalen Aorta der Ratte und die Phosphorylierung von p44/42 MAPK und Protein Kinase B/Akt in kultivierten Endothelzellen vermittelt (Milman *et al.*, 2006).

ARA-S unterdrückt die Lipopolysaccharid (LPS)-induzierte Freisetzung von TNF $\alpha$  in Makrophagen bei Mäusen (Wildtyp, CB1<sup>-/-</sup> und CB2<sup>-/-</sup>). Viele von diesen Effekten sind vergleichbar mit abnCBD mediierten Effekten. Des Weiteren ist ARA-S in der Lage die neuronalen Ca<sup>2+</sup> Kanäle zu modulieren (Guo *et al.*, 2008). Calcium-aktivierte Kalium-Ionenkanäle (BKCa) werden von ARA-S direkt und unabhängig von CB Rezeptoren aktiviert. Erwähnenswert ist, dass O1918 als ein bekannter abnCBD Rezeptor Antagonist auch als BKCa Kanal Inhibitor charakterisiert wurde (Godlewski *et al.*, 2009). In Endothelzellkulturen stimuliert ARA-S die Angiogenese und Wundheilung über die Induktion des vaskulär-endothelialen Wachstumsfaktors C und Rezeptorexpression in primären humanen, dermalen mikrovaskulären Endothelzellen (primary human dermal microvaskular endothelial cells, HMVEC) (Cohen-Yeshurun *et al.*, 2011).

ARA-S wird weiterhin als ein potenter angiogener Wirkstoff und Gefäßdilator *in vitro* beschrieben und fördert die Migration von Knochenmarkszellen (Patinkin *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2010). Es gibt kontroverse Hinweise, dass ARA-S über den GPR55 Rezeptor, ein neu entdeckter orphan Cannbinoid-sensitiver Rezeptor, der 1999 isoliert und kloniert wurde, wirkt (Henstridge, 2012; Ryberg *et al.*, 2007; Zhang *et al.*,

2010). Nach der siRNA Deletion des GPR55 Rezeptors werden die vaskulären und angiogenen Effekte von ARA-S teilweise inhibiert (Zhang *et al.*, 2010), obwohl im GTPγS Binding Assay ARA-S keinen Einfluss auf die Aktivierung von GPR55 hat (Cohen-Yeshurun *et al.*, 2011). Über die Synthese von ARA-S ist wenig bekannt. ARA-S scheint einen neuroprotektiven Effekt *in vivo* bei geschlossenen Schädelhirntraumata, einem Modell der TBI (traumatic brain injury), zu besitzen, was über antiapoptotische Signalvermittlung, unter anderem durch p44/42, pAkt und Bcl-xL, vermittelt werden soll. ARA-S mildert die Caspase 3 Aktivität und mediiert Neuroprotektion, die im Gegensatz zu 2-AG vom CB1 und GPR55 Rezeptor unabhängig ist. Vielmehr steht sie mit CB2 und TRPV1 Rezeptoren und teilweise mit BK Kanälen in Beziehung (Cohen-Yeshurun *et al.*, 2011).

#### **1.3.1.7 Der Endocannabinoid Transporter Inhibitor (OMDM-1)**

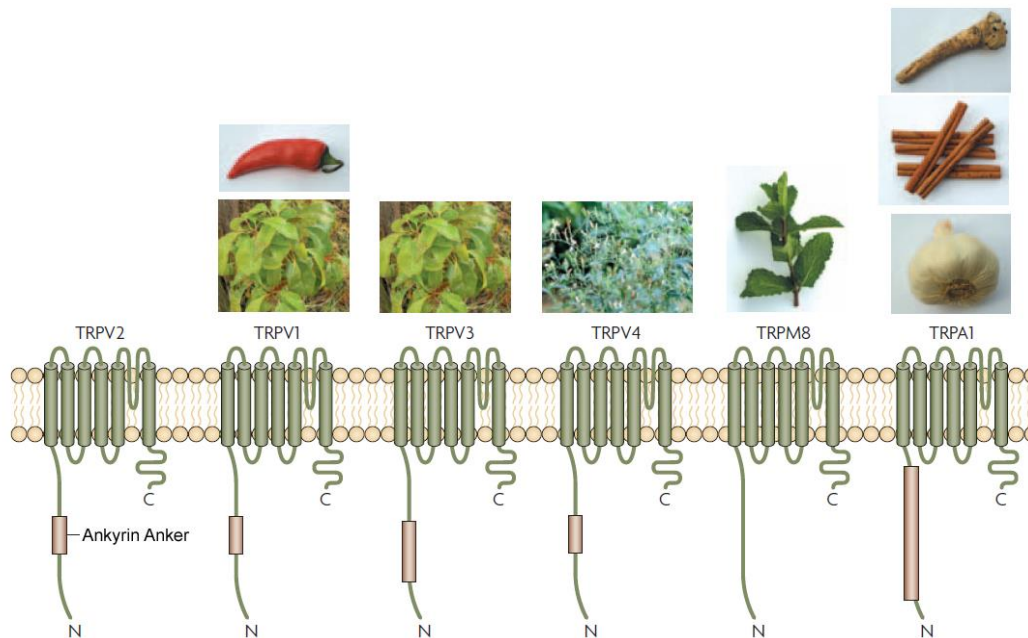
Die Existenz des Endocannabinoiden Transporters (AMT) ist zurzeit nur indirekt nachgewiesen und der AMT ist bis jetzt noch nicht kloniert (Kaczocha *et al.*, 2009; Ortar *et al.*, 2003).

Der selektive und metabolisch stabile Inhibitor der zellulären Aufnahme von AEA (*Anandamide Cellular Uptake Inhibitor*, ACU,  $K_i=2.4\pm 0.7 \mu\text{M}$ ) – OMDM-1 wurde 2003 von Ortar *et al.* synthetisiert. OMDM-1 hat eine geringe Affinität für sowohl CB1 ( $K_i=12.1\pm 1.3 \mu\text{M}$ ) als auch CB2 ( $K_i=16.2\pm 2.0 \mu\text{M}$ ) Rezeptoren. Des Weiteren hat OMDM-1 keinen Effekt auf TRPV1 Rezeptoren im intrazellulären Calcium Assay mit humanen TRPV1 - überexprimierenden Zellen ( $EC_{50}>10 \mu\text{M}$ ) und keinen Einfluss auf FAAH in N18TG2 Zellmembranen ( $K_i>50 \mu\text{M}$ ) (Fowler *et al.*, 2004; Glaser *et al.*, 2005; Ortar *et al.*, 2003).

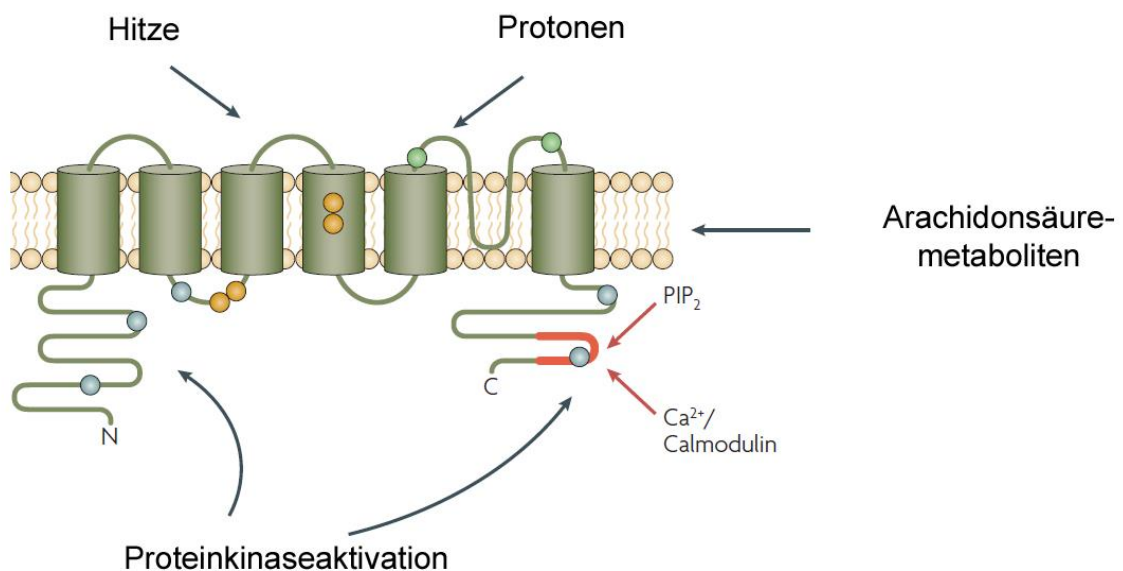
## ***1.4 Der TRPV1 Rezeptor und seine toxische Wirkung***

TRPV1 ist ein nichtselektiver  $\text{Ca}^{2+}$  permeabler Kationenkanal. Dieser Rezeptor kommt sowohl in der Peripherie als auch im Gehirn vor (Cavanaugh *et al.*, 2011; Szallasi *et al.*, 2007). Cavanaugh *et al.* haben gezeigt, dass TRPV1 nur in kleinsten Mengen im Gehirn vorkommt. Die Expression von TRPV1 wurde in den Spinalganglien und im Hypothalamus (caudal hypothalamic nucleus) nachgewiesen (Cavanaugh *et al.*, 2011; Szallasi *et al.*, 2007). Der bekannteste Ligand des TRPV1 ist Capsaicin, ein Alkaloid, das für die Schärfe in Chilischoten verantwortlich ist. Der TRPV1 Rezeptor wurde im Jahre 1997 von Caterina *et al.* zum ersten Mal kloniert (Caterina *et al.*, 1997; Szallasi *et al.*, 2007).

Bei einer pH Änderung in den sauren Bereich wird der TRPV1 Rezeptor aktiviert. Zu den Liganden für den Rezeptor gehören außer Capsaicin auch Bradykinin, NGF, Anandamid, NADA, N-Oleoyldopamin, Lipooxygenase Produkte (12-HPETE, 15-HPETE), Leukotriene  $\text{B}_4$ , Prostaglandin, Adenosin, ATP, Prokineticinen und Polyamine (Szallasi *et al.*, 2007).



**Abb. 5:** Der TRPV1 Rezeptor besitzt sechs Transmembrandomänen und eine Porenregion zwischen Segment 5 und Segment 6. TRPV1 spielt eine große Rolle bei der Nozizeption und wird direkt durch Capsaicin und hohe Temperaturen ( $>43^\circ$ ) modifiziert nach (Szallasi et al., 2007).



**Abb. 6:** Membrantopologie des TRPV1-Ionenkanals. Der Rezeptor besteht aus 6 Transmembrandomänen mit einem N- und C-terminalen Ende, die intrazellulär lokalisiert sind. Der TRPV1 Rezeptor wird durch die Hitze und Protonen aktiviert. Die Bindungsstelle für NADA befindet sich an der intrazellulären Seite des Rezeptors. Modifiziert nach (Szallasi et al., 2007).

### 1.4.1. TRPV1, NADA und Schmerzempfindung

Schmerzen werden durch mechanische, thermische oder chemische Gewebeschäden (Noxen) ausgelöst. Das Dehnen der Nozizeptormembran führt zu einer Aktivierung der mechanisch geschlossenen Ionenkanäle, sodass es zur Depolarisation und zur Entstehung von Aktionspotenzialen kommt. Zusätzlich setzen die geschädigten Zellen verschiedene Substanzen frei, die die Nozizeptoren stimulieren können. Dazu gehören Proteasen, Bradykinin, Substanz P, Serotonin, Histamin, Acetylcholin, ATP und K<sup>+</sup>-, H<sup>+</sup>- Ionen (Basbaum *et al.*, 2009; Julius *et al.*, 2001).

Die Aktivierung einer einzelnen Axonkollaterale kann die anderen Neurite eines Nozizeptors zur Ausschüttung von Substanz P veranlassen, was eine Vasodilatation bewirkt und die Freisetzung von Histamin aus den Mastzellen steigert. Die Sensibilisierung anderer Nozizeptoren durch Substanz P in den umliegenden Bereichen ist eine der Ursachen für die sekundäre Hyperalgesie. Bei Hyperalgesie ist die Reizschwelle für die Schmerzempfindung herabgesetzt, die Antwort auf schmerzhafte Reize verstärkt und es kann zum spontanen Schmerzempfinden kommen. Einige chemische Stoffe modulieren die Erregbarkeit der Nozizeptoren, so dass sie empfindlicher gegenüber thermischen und mechanischen Reizen werden. Beispiele für die sensibilisierenden Substanzen sind Bradykinin, Prostaglandine sowie Substanz P (Basbaum *et al.*, 2009; Julius *et al.*, 2001). Aus dem hochmolekularen Kininogen kann ein Nonapeptid, der wichtigste Vertreter der Kinine – Bradykinin, abgespalten werden. Bradykinin hat die typischen Eigenschaften eines Entzündungsmediators: Es erweitert die Gefäße und erhöht die Permeabilität, führt zur Leukozytenmigration, induziert Schmerz und erhöht die Sensibilität der

hitzeaktivierten Ionenkanäle. Es wird angenommen, dass die entzündungsauslösenden Effekte vor allem bei anaphylaktischen und allergischen Reaktionen eine Rolle spielen (Basbaum *et al.*, 2009; Julius *et al.*, 2001).

## ***1.5 In vitro Modelle zur Untersuchung der neuronalen Schädigung***

### **1.5.1 Modellsystem der organotypischen hippocampalen Schnittkulturen (OHSC)**

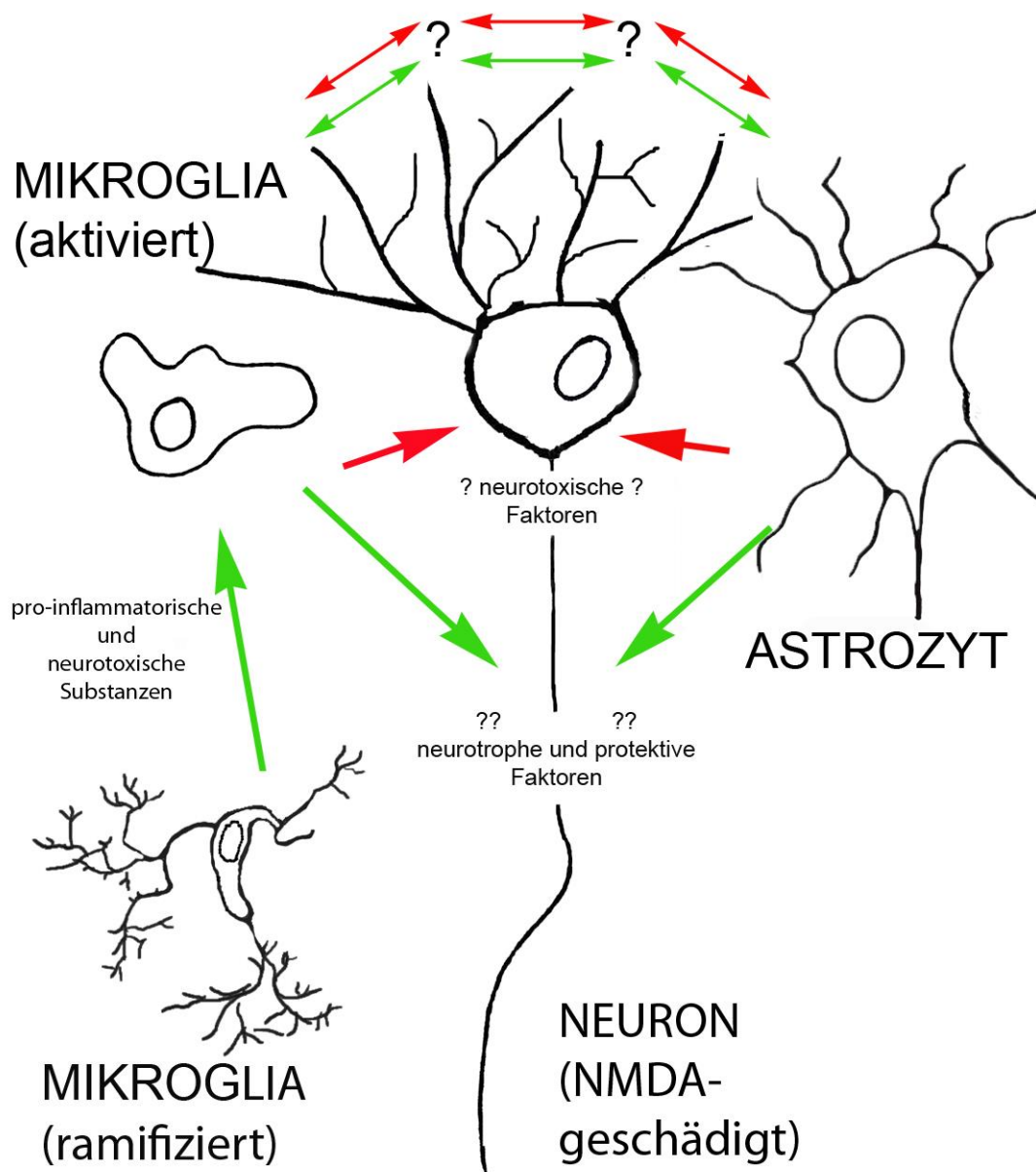
In dieser Studie wurden organotypische Schnittkulturen (OHSC) benutzt, die aus dem Hippokampus der Ratte und der Maus gewonnen wurden. Der Hippokampus ist eine zentrale Schaltstation des limbischen Systems und spielt eine wichtige Rolle im Kurzzeitgedächtnis. In OHSC findet man den Entorhinal Cortex (EC), das Prä- und Parasubikulum, das Subikulum, das Ammonshorn (CA, Cornu Ammonis), die Hilusregion (Hi) und den Gyrus dentatus (DG). Der Gyrus dentatus ist dreischichtig aus Lamina molecularis, Lamina granularis und Hilus aufgebaut. Die Lamina granularis enthält Körnerzellen, deren Dendriten bis in die Lamina molecularis reichen. Die Axone, die in den Hippokampus projizieren, werden als Moosfasern bezeichnet. Aus dem entorhinalen Cortex stammt der Tractus perforans, eine neuronale Bahn, die in Lamina molecularis des Gyrus dentatus zieht (Forster *et al.*, 2006). Nach der Präparation zeigen OHSC eine intakte Cytoarchitektur, mit einer gut erhaltenen Körnerzellschicht im Gyrus dentatus und Pyramidenzellen im Cornu Ammonis. Bei der Präparation bleiben die Faserverbindungen zwischen den Regionen intakt. In OHSC bleiben die synaptischen Schaltkreise erhalten und sie zeigen die gleiche Neurotransmitterrezeptordichte wie *in vivo* (Frotscher *et al.*, 1995; Gahwiler *et al.*, 1997). Die OHSC eignen sich für verschiedene

Fragenstellungen, in der Bezug auf neuronalen Entwicklung und Funktionen, Regeneration von Fasern, Zellmigration, Eigenschaften von Synapsen, Dynamik von neuronalen Netzwerken, Verhalten von Gliazellen unter physiologischen und pathologischen Bedingungen. Die hohe Dichte der NMDA Rezeptoren und die Expression synaptischer Plastizität macht OHSC zu einem geeigneten Model für die Untersuchungen der Exzitotoxizität. Es ist bekannt, dass zahlreiche Erkrankungen des ZNS, bei denen zum neuronalen Schaden kommt, von der Exzitotoxizität begleitet werden. Zu diesen Erkrankungen gehören unter anderem Epilepsie, Schlaganfall, posttraumatische Läsionen und neurodegenerative Erkrankungen. Mit Bezug auf neurodegenerative Krankheiten, die heutzutage gründlich untersucht werden, sind OHSC ein passendes Modellsystem, um das neuroprotektive Potential von Medikamenten in unterschiedlichen experimental hervorgerufenen Pathologien zu testen. Weiterhin ermöglichen sie die Identifikation der Zellen, über die die Medikamente wirken (Dehghani *et al.*, 2003; Förster *et al.*, 2005; Frotscher *et al.*, 1995; Noraberg *et al.*, 2005; Vogt *et al.*, 2008).

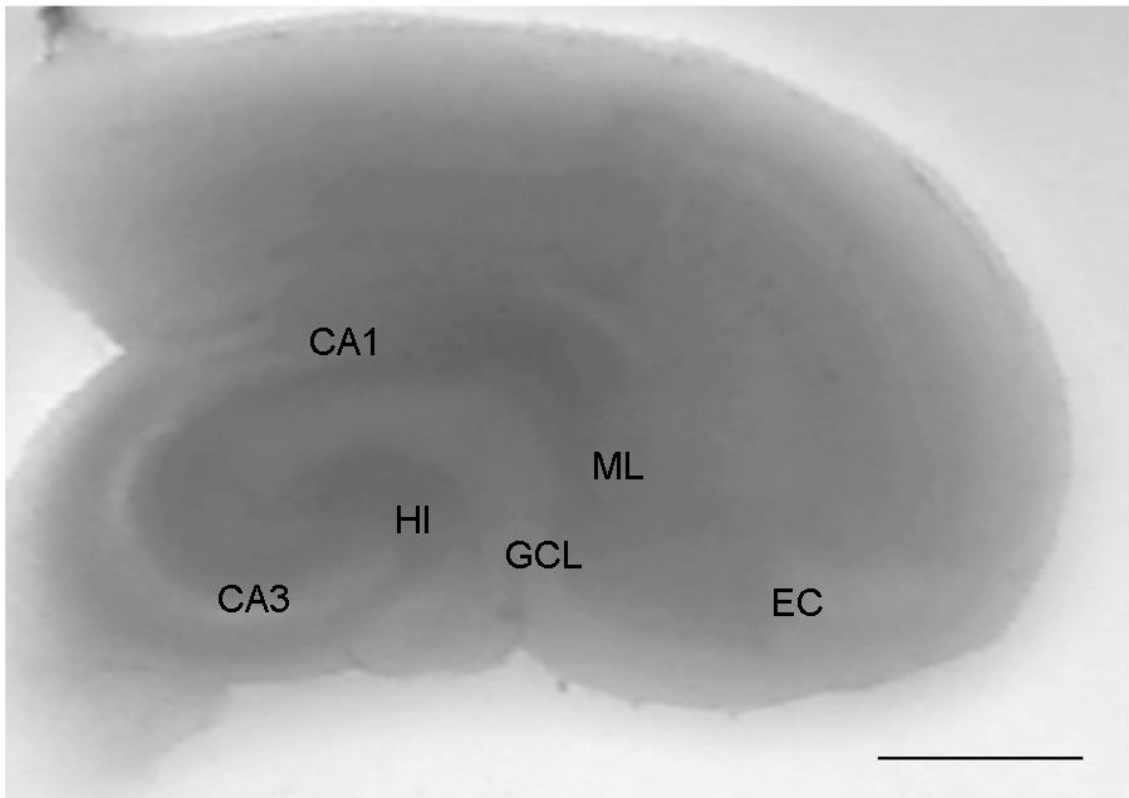
Mikroglia in OHSC ist in der inneren Schicht der OHSC ramifiziert (0 div), direkt nach der Präparation wird die Mikroglia aktiviert (3 div), was sich in deren amöboiden Morphologie zeigt. Schrittweise kehrt die Zelle in die ramifizierte Form zurück, sodass 6 Tage nach der Präparation in inneren Schichten ausschließlich ramifizierte Zellen gefunden werden. Demzufolge stellen die OHSC ein sehr gutes Model zur Untersuchung der Immunologie und Elektrophysiologie von Mikroglia, dessen Aktivierung, Verteilung, Proliferation und Funktionen unter unterschiedlichen experimentellen Bedingungen dar. Die Aktivierung von Mikroglia zeigt sich neben der Veränderungen in der Morphologie, Expression der Oberflächenmoleküle und Freisetzung von Zytokinen (Czapiga *et al.*, 1999; Dehghani *et al.*, 2003; Hailer *et al.*,



1996; Hailer *et al.*, 2005). Trauma, neurodegenerative Krankheiten oder Alterungsprozesse führen zum Verlust der Homeostase des Gehirns und rufen die rapide Aktivierung der Mikroglia hervor. Die lokale Mikroglia dichte wird in Folgedessen durch Proliferation und Migration gesteigert (Kettenmann *et al.*, 2011). In mit NMDA behandelten OHSC sind Mikroglia um die degenerierenden Neurone in GD und CA Region zusammengedrängt angeordnet. Mikroglia wird von NMDA-induzierter Zelltod wahrscheinlich Chemokinen herangezogen und migriert, wodurch man große Ansammlungen der Mikroglia in der Nähe von PI positiven Neuronen findet (Dehghani *et al.*, 2003; Hailer *et al.*, 1996; Heppner *et al.*, 1998).



**Abb.7:** Endocannabinoidgesteuerte Signalkaskade zwischen Mikroglia, Neuronen und Astrozyten nach der NMDA Schädigung. Direkt nach der Läsion ändern die Mikrogliazellen ihre Morphologie von einer ramifizierten in eine amöboide Form. Die spezifischen astrozytären und neuronalen Faktoren führen zur Aktivierung von Mikroglia.



**Abb.8:** In organotypischen hippocampalen Schnittkulturen (OHSC) lassen sich entorhinale Cortex (EC), Prä- und Parasubikulum, Subikulum, Ammonshorn (CA, Cornu Ammonis), die Hilusregion (Hi) und Gyrus dentatus (DG) unterscheiden. OHSC sind ein sehr gut untersuchtes *in-vitro* Model, um die Eigenschaften von einzelnen Neuronen, Neuronen in synaptischen Verbindungen und die Interaktionen zwischen Neuronen und Gliazellen zu studieren. Maßstab=1 mm

### 1.5.2 Einzelzellkulturen und Zelllinien

Primäre Zellkulturen aus Nagetieren gehören zu häufig benutzten Systemen, die als *in vitro* Model für viele physiologische und pathologische Prozesse eingesetzt werden. Auch immortalisierte Zelllinien, die aus verschiedenen spezifischen Geweben isoliert sind, gehören zu wertvollen Werkzeugen, mit deren Hilfe man die molekularen und zellulären Prozesse aufzuerklären versucht (Liu *et al.*, 2009).

Mikroglia und Astrozyten sind residente Zellen des ZNS, die wichtige Rolle während inflammatorischer Prozesse spielen. Die Astrozyten und Mikrogliazellkulturen werden in den Studien, die die Rolle von Gliazellen in der Ausbreitung und Abmilderung von proinflammatorischen Prozessen im ZNS bestimmen, verwendet. Zur Verbesserung des Verständnisses von pathologischen Prozessen wurde *in vitro* Kultivierung von kurz nach der Geburt aus dem Rattehirn isolierten primären Mikroglia und Astrozyten von Nagertieren benutzt (Freeman, 2010; Giulian *et al.*, 1986; Graeber *et al.*, 2010; Streit *et al.*, 2009). Es wurde gezeigt, dass die stimulierte kultivierte primäre Mikroglia die Mehrheit der bekannten physiologischen Aktionen der Mikroglia *in vivo*, wie z.B. Phagozytose, Migration und die Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen beibehält. Jedoch ist die aufwendige Herstellung primärer Mikroglia kulturen mit hohen Kosten verbunden.

Die mikroglialen Zelllinien wie BV2 finden häufig Anwendung, weil sie zahlreiche physiologische Merkmale der Mikroglia widerspiegeln (Boje *et al.*, 1992; Horvath *et al.*, 2008; Nutile-McMenemy *et al.*, 2007). Die BV2-Zelllinie wurde aus Mikroglia der Maus generiert und mit dem v-rat/c-myc Onkogen des J2 Retrovirus transfiziert (Blasi *et al.*, 1990). Diese immortalisierte Zelllinie weist die morphologischen, phänotypischen und funktionellen Eigenschaften der aktivierten Mikroglia wie die Expression von Makrophagen Antigen (MAC) 1 und MAC2, eine gesteigerte Lysozymaktivität als Antwort auf LPS Stimulation und die Regulation der NO Produktion oder IFN $\gamma$  bedingte Translokation von NF-kappaB auf (Henn *et al.*, 2009; Horvath *et al.*, 2008).

Die HT22 Zelllinie stellt eine Sublinie der HT4 Zellen dar (Liu *et al.*, 2009). Die HT4 Zelllinie wurde aus primären murinen hippocampalen Neuronen isoliert und mit dem Temperatur-abhängigen Onkogen SV (small virus)-40 T-Antigen immortalisiert

(Frederiksen *et al.*, 1988; Lendahl *et al.*, 1990; Morimoto *et al.*, 1990). Die HT4 Zellen können LTP nachahmen und werden aus diesem Grund für Studien zu Gedächtniss benutzt (Morimoto *et al.*, 1990). Im Gegensatz zu HT4 sind die HT22 Zellen glutamatsensitiv, obwohl sie keine NMDA/Glutamatrezeptoren zu exprimieren scheinen und sie verfügen über ein funktionelles cholinerges System (Liu *et al.*, 2009; Maher *et al.*, 1996).

Die HEK (Human embryonic kidney)-293 Ziellinie (Graham *et al.*, 1977) ist ein anerkanntes *in vitro* Model, in dem man die Expression rekombinanter Proteine induzieren kann. Die HEK-293 Zellen stammen aus Epithelzellen und sind in der Lage, mehrere post-translationale Modifikationen, wie z.B. Proteinfaltung durchzuführen und funktionell aktive, reife Proteine zu synthetisieren. Des Weiteren sind HEK-293 Zellen sehr gut für elektrophysiologische Untersuchungen (Patch Clamp, Voltage Clamp, Calcium Imaging) von Rezeptoren und Ionenkanälen geeignet (Thomas *et al.*, 2005).

## ***1.6 Zielsetzung und Fragestellung***

Nach Hirnverletzungen kommt es zu nicht reversiblen primären Schäden. Infolgedessen entstehen sekundäre Schäden, die durch eine schnelle und wirksame Therapie abgeschwächt werden können (Deutsche Gesellschaft für Neurochirurgie). Aus diesem Grund konzentriert man sich heutzutage auf die Suche nach wirksamen Therapien, die bei solchen Fällen eingesetzt werden können. Die folgenden Experimente sollen dazu dienen, die Wirkung des Endocannabinoids NADA auf das Absterben von Neuronen und die Population der Mikroglia und Astrozyten in OHSC nach der exzitotoxischen Schädigung zu untersuchen.

Das protektive Potential von gut untersuchten Endocannabinoiden, wie 2-AG und AEA ist im ZNS mehrfach bestätigt worden und mittlerweile anerkannt. NADA gehört zur Gruppe der Endocannabinoiden, dessen Wirkung auf die neuronale Schädigung nicht analysiert worden ist. Dabei ist es beschrieben, dass NADA über bereits bekannte Cannabinoid Rezeptoren wirkt.

Bezugnehmend auf die Rolle von NADA nach der NMDA Schädigung wurde die Hypothese aufgestellt, dass NADA dem neuronalen Schaden entgegen wirkt und Veränderungen in der Anzahl geschädigter Neurone verursacht.

Es sollte die Frage beleuchtet werden, ob durch die Aktivierung der Cannabinoid Rezeptoren durch NADA eine sekundäre Schädigung verhindert werden kann und das Ausmaß der Schädigung reduziert wird. Mit Hilfe der bekannten Antagonisten der CB Rezeptoren wurde der Frage nachgegangen welche der Rezeptoren für die Effekte verantwortlich sind.

Die Beteiligung des TRPV1 Rezeptors bei NADA mediierten Effekte wurde analysiert. Es wurde untersucht ob NADA den TRPV1 Rezeptor aktivieren kann, ob die untersuchten Zellen über funktionierende Rezeptoren verfügen und in der Peripherie beschriebene Effekte auch im ZNS existieren. Desweiteren wurde die Frage gestellt, welche Mechanismen hinter den NADA mediierten Effekten stehen. Die Signalkaskaden p38, p44/42 MAPK wurden analysiert, um die mögliche Beteiligung an NADA Effekten zu ermitteln.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Materialien, Chemikalien und Lösungen

Zellbiologische Methoden

**Tabelle 2:** Materialien

1.5 mL Reaktionsgefäße	Sarstedt AG&Co., Nümbrecht
15 mL Zentrifugenröhrchen	Greiner, Frickenhausen
50 mL Zentrifugenröhrchen	Greiner, Frickenhausen
Serologische Pipetten (5 mL, 10 mL, 25 mL)	Greiner, Frickenhausen
Sterilfilter (250 mL, 500 mL)	Corning, NY, USA
6-Lochplatte	Falcon, Becton Dickson, Heidelberg
24-Lochplatte	Falcon, Becton Dickson, Heidelberg
Petrischalen	Greiner, Frickenhausen
1 mL RNasefreie Reaktionsgefäße	Roth, Karlsruhe
2 mL RNasefreie Reaktionsgefäße	Roth, Karlsruhe
Zellkultureinsatz / Inserts	Falcon, Becton Dickson, Heidelberg
Zellkultureinsatz / Inserts	Millipore, Schwalbach

**Tabelle 3:** Zelllinien

Zelllinie BV2	von Prof. Dr. Oliver Ullrich, Universität Zürich
Zelllinie HEK-293	von Dr. Kerstin Hill, Universität Leipzig
Zelllinie HEK-293-TRPV1-YFP	von Dr. Kerstin Hill, Universität Leipzig
Zelllinie HT22	Von Prof. Dr. rer. nat. Abdelhaq Rami, Goethe Universität, Frankfurt am Main



**Tabelle 4:** Übersicht über Medien und die Zusätze, die in der Zellkultur Verwendung fanden.

Agar	Sigma Aldrich, Steinheim
Aqua bidest. (Aqua B. Braun)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Rinder-Serumalbumin (BSA)	Sigma Aldrich, Steinheim
B27	Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein
Chloroform	Merck, Darmstadt
Kresolrot, Natriumsalz	Sigma Aldrich, Steinheim
Dako Fluoreszenz Eindeckmedium	DAKO, Hamburg
DNA-Marker 100 bp DNA-Ladder	BioRad, München
GeneRuler	BioRad, München
dNTP Mix	Roche, Mannheim
Ethanol	J.T.Backer, Griesheim
Fötales Kalbserum (FKS)	Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein
Glukose	Merck, Darmstadt
Glutamin	Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein
Hank's balanced salt solution (HBSS)	Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein
Insulin	Sigma Aldrich, Steinheim
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt
Calciumchlorid-Dihydrat ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat-Heptahydrat ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	Merck, Darmstadt
Minimal essential medium (MEM)	Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein
$\beta$ -Mercaptoethanol	Sigma Aldrich, Steinheim
Natriumbikarbonat	Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogenphosphat-Monohydrat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ )	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat ( $\text{NaHCO}_3$ )	Merck, Darmstadt

Normales Pferdeserum (NHS)	Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
Penicillin-Streptomycin-Lösung	Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein
PE Puffer 10x Buffer mit MgCl <sub>2</sub>	Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, USA
Poly-L-Lysin	Sigma Aldrich, Steinheim
Salzsäure 1 M	Merck, Darmstadt
Tissue Tek	Sakura Finetek, Coeterwoude, Niederlande
Triton X 100	Sigma Aldrich , Steinheim
Trizol	Ambion, Life Technologies, Darmstadt
Trypsin/EDTA	Biochrom, Berlin
Vitamin C	Sigma Aldrich, Steinheim

***Tabelle 5: Geräte***

Elektrophoresekammer	Biorad, München
Feinwaage	Omnilab, Bremen
Gel-Dokumentationsgerät MF ChemiBIS 1.6 (WesternBlot)	Biostep, Jahnsdorf
Gel-Dokumentationsgerät (PCR)	Alpha Imager™ 2200
Inkubatoren	Heraeus, Hanau
Mikrowelle	AEG Micromat, Frankfurt
Präparierbesteck	Aesculap, Tuttlingen
pH-Meter	pH 526 WTW, Weilheim
Thermocycler	T3 Thermocycler Biometra, Göttingen
Sonifikator Sonoplus GM-2200	Bendelin, Berlin

Sterilbänke	Heraeus, Hanau
Vortex MS1 Minishaker IKA	Sigma Aldrich, Steinheim
Waage	Mettler PJ 300, Gießen
Wasserbad	GfL, Burgwedel
Zentrifugen Megafuge 1.0 Biofuge fresco	Heraeus, Hanau Heraeus, Hanau
Thermomixer	Eppendorf, Hamburg
Vibratom, Vibratom 1200 ST	St. Louis, Missouri, USA
Konfokales Laser Scanning Mikroskop	LSM 510 Meta, Zeiss, Göttingen

### **Verwendete Softwareprogramme**

GraphPad (Statistikprogramm), San Diego, USA

Adobe Photoshop, Adobe Systems, San Jose, USA

Image J, National Institutes of Health, USA

LSM Image Browser, Zeiss, Jena

MS Office, Microsoft, Redmond, USA

## 2.1.1 Verwendete Substanzen und Pufferlösungen

In folgender Tabelle sind alle Substanzen, mit denen Schnittkulturen und Einzelzellen behandelt wurden dargestellt. Die Substanzen wurden in den entsprechenden Lösungsmitteln (Ethanol/ Dimethylsulfoxid (DMSO)/ dest. H<sub>2</sub>O) gelöst und bei -20°C oder 4°C gelagert. Die Stammlösung wurde vor der Anwendung weiter in Kulturmedium verdünnt. Die maximale Lösungsmittelkonzentration betrug 0,1% (v/v).

**Tabelle 6:** Liste aller verwendeten Substanzen zur Behandlung von OHSC und Einzelzellen.

Bezeichnung	Beschreibung	Endkonzentration	Lösungsmittel
N-Arachidonyl-Dopamin (NADA)	Endocannabinoid / Endovanilloid	100 pM – 10 µM	Ethanol, Tocris
N-(Piperidin-1-yl)-5-(4-iodophenyl)-1-(2,4-dichlorophenyl)-4-methyl-1H-pyrazole-3-carboxamide (AM251)	Synthetischer CB1 Rezeptor Antagonist/ Inverser Agonist	10 µM	DMSO, Tocris
6-iodonordihydrocapsaicin (6-iodo)	Synthetischer TRPV1 Rezeptor Antagonist	1 µM	DMSO, Tocris
2-(1,3-Dimethyl-2,6-dioxo-1,2,3,6-tetrahydro-7H-purin-7-yl)-N-(4-isopropylphenyl)acetamide (HC-030031, A1)	Synthetischer TRPA1 Rezeptor Antagonist	10 µM	DMSO, Tocris
(E)-Capsaicin (Caps)	TRPV1 selektiver Agonist	10 µM	DMSO, Tocris
1,3-Dimethoxy-5-methyl-2-[(1R,6R)-3-methyl-6-(1-methylethenyl)-2-cyclohexen-1yl]benzene (O1918)	Synthetischer abnormal-cannabidiol (abnCBD) Rezeptor Antagonist	30 µM	DMSO, Tocris
Dopamine hydrochloride	Dopamin Rezeptor Agonist	0.1 µM	dest. H <sub>2</sub> O, Sigma Aldrich
Lipopolysaccharide (LPS)	Bakterielles Endotoxin	10 ng/mL	dest. H <sub>2</sub> O, Sigma Aldrich
Interferon (IFN)γ	Zytokin	10 ng/mL	Peprotech, Hamburg
Natriumhydrogenglutamat (Glutamat)	Glutamat/NMDA-Rezeptor Agonist	5 mM	dest. H <sub>2</sub> O, Sigma Aldrich

Carbachol	Strukturanaloga von Acetylcholins	100 µM	dest. H <sub>2</sub> O, Sigma Aldrich
Dinatriumclodronat 4H <sub>2</sub> O (Clodronate)	Biphosphonate	10 µg/mL	dest.H <sub>2</sub> O, Bayer Vital, Leverkusen
N-Arachidonyl-L-Serine (ARA-S)	Endocannabinoid	0.1, 1, 10, 50 (µM)	DMSO/Biozol, Eching
(s)-N-(1-,4-hydroxyphenyl)-2-hydroxyethyl) oleamide (OMDM-1)	ACU Inhibitor	0.01, 0.1, 1, 10 (µM)	DMSO/von V. Di Marzo, Neapel, Italien

Nach der Versuchsbeendigung wurden die Schnittkulturen und Zellen mit 4% (w/v) Paraformaldehyd (Sigma Aldrich) fixiert und die Zellstrukturen entsprechend mit der folgenden Tabelle aufgeführten Chemikalien visualisiert. Die Einzelzellen wurden im Proben Puffer für Western Blot, in RNase freiem Wasser (Qiagen, Hilden) für RT-PCR bei -80° gelagert oder für die elektrophysiologischen Messungen verwendet.

**Tabelle 7:** Liste aller verwendeten Lektine und Färbereagenzien

Bezeichnung	Beschreibung	Verdünnung
<i>Griffonia simplicifolia</i> Isolektin B4 (IB4), FITC konjugiert (Vector Labs, Burlingame, CA, USA)	Lektin	1:50
Propidium Iodid (PI, Sigma Aldrich)	Fluorochrom	5 µg/mL

**Tabelle 8:** Liste der Pufferlösungen für die Immunhistochemie

#### Phosphatpufferlösung (PB) 0,1 M

---

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	11.36 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2.72 g
dest. H <sub>2</sub> O	1000 mL

### **Phosphatpufferlösung (PB) 0,2 M**

---

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	22.72 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	5.44 g
dest. H <sub>2</sub> O	1000 mL

### **Phosphatpufferlösung (PBS) 0,02 M**

---

NaCl	9 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.54 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2.27 g
dest. H <sub>2</sub> O	1000 mL

### **Phosphatpufferlösung (PBST) 0.02 M + 0.3% (v/v) Triton X-100**

---

NaCl	9 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.54 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2.27 g
Triton X-100	3 mL
dest. H <sub>2</sub> O	1000 mL

Nach der Zubereitung von allen Pufferlösungen wurden sie auf einen pH-Wert zwischen 7.35 und 7.4 eingestellt.

## **2.1.2 Puffer und Gele für Western Blot Analysen**

***Tabelle 9: Puffer und Gele für Western Blot Analysen***

## **Probenpuffer**

---

Tris	2.95 g
Natriumdodecylsulfat (SDS)	6 g
Saccharose	30 g
dest. H <sub>2</sub> O	100 mL

## **1. Puffer für Sammelgel**

---

Tris	15.13 g
dest. H <sub>2</sub> O	250 mL

## **2. Puffer für Trenngel**

---

Tris	45.43 g
SDS	1 g
dest. H <sub>2</sub> O	250 mL

## **Elektrophoresepuffer**

---

Tris	3 g
Glycin	14.4 g
10% SDS	10 mL
dest. H <sub>2</sub> O	1 L

## **Laemmelipuffer**

---

Mercaptoethanol	0.28 mL
Glycerol	4 mL
1. Puffer	3.2 mL
dest. H <sub>2</sub> O	1.5 mL
10% SDS	1 mL
Bromphenolblau	1 Stück

### **Transferpuffer**

---

Glycin	2.9 g
Tris	5.8 g
SDS	0.37 g
Methanol	200 mL
dest. H <sub>2</sub> O	800 mL

### **10x Tris-Puffer**

---

Tris	60.5 g
NaCl	87.5 g
dest. H <sub>2</sub> O	1000 mL

### **Waschpuffer**

---

10xTris-Puffer	100 mL
dest. H <sub>2</sub> O	896.5 mL
Tween-20	3 mL
Triton X-100	0.5 mL

### **Stripping-Puffer**

---

10% SDS	40 mL
1. Puffer	33.33 mL
Mercapthoethanol	1.4 mL
dest. H <sub>2</sub> O	200 mL

### **10% APS**

---

Ammoniumperoxodisulfat (APS)	1g
dest. H <sub>2</sub> O	200 mL



### Trenngel 12.5% (4 Gele)

---

dest. H <sub>2</sub> O	9.9 mL
2. Puffer	7.5 mL
Tris-HCl (pH=8.8)	5 mL
30% Acrylamid	bis 12.5 mL
10% APS	90 µL

Tetramethylethyldiamin (TEMED) 20 µL, erst kurz vor Gebrauch hinzugefügt

### Sammelmigel

---

dest. H <sub>2</sub> O	6.1 mL
Tris-HCl (pH=6.8)	2.5 mL
Acrylamid	1.3 mL
10% SDS	100 µL
10% APS	50 µL

TEMED 10 µL, erst kurz vor Gebrauch hinzugefügt

**Tabelle 10:** Antikörper für Western Blot

Produkt	Spezies	Verdünnung	Hersteller
<i>Primärantikörper</i>			
B-Aktin	Maus	1:40000	Sigma Aldrich
Phospho-p44/42 MAPK	Kanninchen	1:10000	Cell Signaling
Total-p44/42 MAPK	Kanninchen	1:10000	Cell Signaling
Phospho-p38 MAPK	Kanninchen	1:1000	Cell Signaling
Total-p38 MAPK	Kanninchen	1:1000	Cell Signaling

<i>Sekundärantikörper</i>			
Garb Pox	Ziege	1:20000	Vector Labs
Garb Pox	Maus	1:2500	Vector Labs

### 2.1.3 Die Lösungen für PCR

**Tabelle 11:** *Proteinase K-Puffer*

---

H <sub>2</sub> O	450 mL
1 Mol Tris pH 8.0	5 mL
5 Mol NaCl	10 mL
0.5 Mol EDTA pH 8.0	10 mL
10 % SDS	25 mL

**Tabelle 12:** *Pink Juice*

---

2 mM Cresol	1 mL
PE Buffer	2 mL
dNTP	2 mL
60% Sucrose	4 mL
Wasser	7 mL

**Tabelle 13:** *Reaktionsansatz für die Synthese komplementärer DNA*

---

Random-Hexamerprimer (0,2 µg/µL)	1 µL
RNA	1 µg

dNTP-Mix (10 mM)	1 µL
RNase-freies Wasser	Ad 12 µL
5 x Reaktionspuffer	4 µL
Dithiothreitol (DTT)	2 µL
RNase Out (40 U/µL)	1 µL
Reverse Transkriptase (200 U/µL)	1 µL

**Tabelle 14:** Reaktionseinsatz für die PCR (Genotypisierung)

---

DNA	1 µL
Pink Juice	16 µL
H <sub>2</sub> O	1 µL
Forward Primer (10 µM)	1 µL
Reverse Primer (10 µM)	1 µL
Taq-Polymerase (1 U/µL)	1 µL

**Tabelle 15:** Reaktionseinsatz für die RT-PCR

---

cDNA	1 µL
10x Reaktionspuffer	2.5 µL
dNTP-Mix (10 mM)	2 µL
RNase-freies Wasser	Ad 25 µL
Forward Primer (10 µM)	1.25 µL
Reverse Primer (10 µM)	1.25 µL
Taq-Polymerase (1 U/µL)	1 µL

**Tabelle 16: Primerliste**

Primer	Sequenz
Genotypisierung von CB1 <sup>-/-</sup> Mäusen	
Primer G50 5' (loxP): Primer G51 3' (loxP): Primer G54-Neo-Null 3':	GCT GTC TCT GGT CCT CTT AAA GGT GTC ACC TCT GAA AAC AGA CCT ACC CGG TAG AAT TAG CTT
TRPV1 Nachweis	
Forward Primer (Trpv1 Maus): Reverse Primer (Trpv1 Maus):	AGGTGAACTGGACTACCTGGAA GCTATGCCTATCTCGAGTGCTT
Forward Primer (Trpv1 Ratte/Human): Reverse Primer (Trpv1 Ratte/Human):	AGCGAGTTCAAAGACCCAGA TTCTCCACCAAGAGGGTCAC
Forward Primer (Gapdh Maus/Ratte): Reverse Primer (Gapdh Maus/Ratte):	ATGGTGAAGGTCGGTGTGA AAGATGGTGATGGGCTTCC

### 2.1.4 Die Lösungen für die Elektrophysiologie

**Tabelle 17: Intra- und Extrazellulär-Lösungen für Patch Clamp und Extrazellulärlösung für Ca<sup>2+</sup>-Imaging-Experimente**

#### Intrazellulär-Lösung

---

CsCH <sub>3</sub> O <sub>3</sub> S	130 mM
CsCl	10 mM
EGTA	10 mM
MgCl <sub>2</sub>	5 mM
HEPES	10 mM
	pH=7.2 mit CsOH

#### Extrazellulär-Lösung

---

NaCl	140 mM
KCl	5 mM

CaCl <sub>2</sub>	2 mM
MgCl <sub>2</sub>	1 mM
Glukose	10 mM
HEPES	10 mM
	pH=7.4 mit NaOH

**Tabelle 18:** Intra- und Extrazellulär-Lösungen für EPSC Messungen

### Intrazellulär-Lösung

---

KGluconate	121.5 mM
KCl	17.5 mM
NaCl	9 mM
MgCl <sub>2</sub>	1 mM
HEPES	10 mM
EGTA	0.2 mM
MgATP	2 mM
LiGTP	0.5 mM

### Extrazellulär-Lösung

---

NaCl	119 mM
KCl	5 mM
CaCl <sub>2</sub>	2.5 mM
MgCl <sub>2</sub>	1.5 mM
Glukose	30 mM
HEPES	20 mM

## ***2.2 Versuchstiere***

Alle Tierexperimente erfolgten in Übereinstimmung mit den Richtlinien für Tierversuche nach Maßgabe der Europäischen Gemeinschaft (Direktive 86/609/EEC). Die Tiere (*Rattus norvegicus*) des Wistar Inzucht wurden von der medizinischen Forschungseinrichtung (MEZ) Universität Leipzig bezogen. CB1<sup>-/-</sup> Mäuse wurden von Prof. B.Lutz (Institut für die physiologische Chemie der Universität Mainz) zur Verfügung gestellt. Die Jungtiere wurden am Tag 7 bis 9 (Ratte) und am Tag 4 bis 5 (Maus) nach ihrer Geburt für die Schnittkulturen (postnatal 8, p8; postnatal 4, p4) durch Dekapitation getötet. Für die Einzellzellkultur erfolgten die Präparationen von Ratten am p0 oder p1. Die Haltung, Zucht und Genotypisierung der Mäuse erfolgte in MEZ vor Ort.

## ***2.3 Vorbereitungen und Medienzusammensetzung***

### **2.3.1 Die Medien zur Präparation und Kultivierung von OHSC**

Das Präparationsmedium (Ratte) wurde aus 99 mL Minimum Essential Medium (MEM) und 1 mL Glutamin hergestellt. Für die Dauer der Experimente wurde die Temperatur des Präparationsmediums bei 4°C gehalten und der pH Wert auf 7.36-7.38 eingestellt. Das Kulturmedium bestand aus 50 mL MEM, 25 mL calcium – und magnesiumhaltigem HBSS (HBSS +Ca +Mg), 25 mL normalem Pferdeserum (NHS), 2 mL Glutamin, 1 µg/mL Insulin, 7.5% (w/v) Natriumbikarbonat, 1.2 mg/mL Glukose, 1 mL Penicillin-Streptomycin und 0.8 µg/mL Vitamin C. Vor Gebrauch wurde das Kulturmedium auf 35°C erwärmt und der pH Wert auf 7.3-7.4 eingestellt.

Das Präparationsmedium (Maus) wurde aus 98 mL MEM, 1 mL Glutamin und 1 mL Penicillin-Streptomycin hergestellt. Für die Dauer der Experimente wurde die Temperatur des Präparationsmediums bei 4°C gehalten und der pH Wert auf 7.36-7.38 eingestellt. Das Kulturmedium bestand aus 47 mL MEM, 25 mL HBSS (+Ca, +Mg), 25 mL NHS, 1 mL Glutamin, 2.4 mg/mL Glukose, 1 mL Penicillin-Streptomycin. Vor Gebrauch wurde das Kulturmedium auf 35°C erwärmt und der pH Wert wurde auf 7.2-7.3 eingestellt.

### **2.3.2 Herstellung der Agarblöcke**

Die Lösung zur Herstellung der Agarblöcke setzt sich wie folgt zusammen: 725 mg NaCl; 37 mg KCl; 17 mg NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O; 49 mg MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O; 218 mg NaHCO<sub>3</sub>; 180 mg Glukose; 29 mg CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O und 5 g Agar. Nachdem die Zutaten in 100 mL dest. H<sub>2</sub>O vermischt wurden, wurde die Lösung für 30 Minuten bei 70°C auf einem Magnetrührer erhitzt und schließlich in Gewebekulturschalen (Durchmesser: 35 mm) verteilt. Die fertiggestellten Agarblöcke wurden bis zum Präparationstag bei 4°C gelagert.

## ***2.4 Präparation der organotypischen hippokampalen Schnittkulturen (OHSC)***

### **2.4.1 Vorbereitung des Arbeitsplatzes**

Zur Herstellung der OHSC wurde folgendes Präparierbesteck verwendet: zwei kleine Scheren, eine große Schere, eine feine chirurgische Pinzette, eine gebogene Pinzette, je drei chirurgische Einmalklingen (2xGröße: 11 und 1xGröße: 15), drei

Skalpellhalter, eine Rasierklinge, zwei Pasteurpipetten, bei der von einer die Spitze entfernt wurde, drei Rundfilter (Durchmesser: 55 mm). Alle benötigten Materialien wurden vor dem Gebrauch im Autoklav sterilisiert.

#### **2.4.2 Präparation der OHSC**

Zur Gewinnung der OHSC nach (Stoppini *et al.*, 1991) wurden die Gehirne von 7 -9 Tage alten Wistar Ratten beziehungsweise 4-5 Tage alten CB1<sup>-/-</sup> Mäusen verwendet. Nach der Dekapitation der Tiere wurde die Kopfhaut entfernt. Unter aseptischen Bedingungen wurde die Kalotte mit einer feinen Schere eröffnet und das Gehirn in das Präparationsmedium überführt. Eine Gewebekulturschale (Durchmesser: 35 mm) wurde mit Präparationsmedium gefüllt, zwei weitere Gewebekulturschalen wurden am Arbeitsplatz bereitgestellt und dienten dazu, das Gewebe aufzubewahren. Eine vierte Gewebekulturschale diente bis zur Überführung des Gewebes in das Kulturmedium zur Aufbewahrung der Schnitte und wurde auf Eis gestellt. Vor der Präparation der Schnittkulturen wurden auf dem Metallteller-Einsatz des Vibratoms (Typ Leica VT 1200 S, Wetzlar, Deutschland) eine zugeschnittene Stück des Agars mit Histoacryl-Kleber (Braun, Melsungen) befestigt und zwei weitere Stücke Agar zugeschnitten und nach der Befestigung des Gewebes auf dem Metallteller zur zusätzlichen Stabilisierung des Gewebes links und rechts aufgeklebt. Mit Hilfe des Vibratoms wurden 350 µM dicke Horizontalschnitte der Hippokampusregion gewonnen. Nach der Anfertigung der einzelnen Schnitte wurden diese sofort unter einem binokularen Mikroskop mit einem Skalpell zurechtgeschnitten und in dem Präparationsmedium zur Kühlung auf Eis gelegt. Im Durchschnitt konnten aus einem Rattenhirn 8-10 und aus einem Mäusehirn 3-6 Schnittkulturen gewonnen werden.



Die so gewonnenen Schnittkulturen werden nach Beendigung des Vorgangs in Zellkultureinsätze überführt und in 6-Lochplatten mit jeweils 1 mL Kulturmedium im Brutschrank bei 35° und 5% CO<sub>2</sub> in einer voll gesättigten Atmosphäre kultiviert. Bis zur Fixierung wurde jeden zweiten Tag das Kulturmedium gewechselt.

### **2.4.3 Fixierung und Markierung degenerierender Neurone und Mikrogliazellen in OHSC**

Zur Darstellung abgestorbener Neurone wurde der Farbstoff Propidium Iodid (PI) verwendet. PI ist ein fluoreszierender Farbstoff, der selektiv die Zellmembranen von geschädigten Zellen passiert und mit deren Desoxyribonukleinsäure (DNA) im Zellkern reagiert, PI markierte so die degenerierenden Neurone in OHSC. Die Fixierung der OHSC erfolgte am 9 div (*days in vitro*, Tage in Kultur) bei Ratten bzw. 14 div bei Mäusen. Zur Erfassung der neuronalen Läsionen wurde zwei Stunden vor der Fixierung PI (Endkonzentration=5 µg/mL) hinzugegeben und die Anzahl der PI positiven Neurone in den experimentellen Gruppen nach der PI Färbung bestimmt.

Die OHSC wurden anschließend kurz mit 0.1 M PB gespült und mit 4% (w/v) Paraformaldehydlösung über Nacht fixiert. Danach wurden die OHSC mit 0.1 M PBS 30 Minuten lang gespült und im Anschluss mit einem feinen Pinsel von der Membran des Einsatzes gelöst und in 0.1 M PBS transferiert. Die OHSC wurden in dieser Lösung bis auf weiteres bei 4°C aufbewahrt.

Mit Hilfe vom FITC konjugiertem Isolektin B4 (IB4) wurden Mikrogliazellen in OHSC sichtbar gemacht. Dazu wurden die fixierten OHSC mit FITC konjugierten IB4 (1:50 in 0.5 % (w/v) BSA in PBST) über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden die OHSC mit PBST (10 Minuten), dann mit dest. H<sub>2</sub>O (5 Minuten) gespült, mit dem

Fluoreszenz Eindeckmedium Dakomount (DAKO GmbH, Hamburg, Deutschland) eingedeckelt und bis zur Analyse bei 4°C aufbewahrt.

## ***2.5 Primärkulturen von Mikroglia und Astrozyten***

### **2.5.1 Medien zur Präparation und Kultivierung von Mikroglia und Astrozyten**

Als Kulturmedium diente Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM), welchem 10% (v/v) fötales Kälberserum, 1 mL Glutamin und 1 mL Penicillin-Streptomycin zugegeben wurde.

### **2.5.2 Gewinnung einer mikroglären und astrozytären Mischkultur**

Zur Gewinnung einer Primärkultur aus Astrozyten und Mikroglia musste zuerst eine Mischkultur aus den Zellen hergestellt werden. Diese wurde aus 1 Tag alten Wistar-Ratten gewonnen. Die Gehirne (i. d. 8-12 Stück) wurden unter sterilen Bedingungen entnommen und in Petrischalen überführt, in welchen calcium- und magnesiumfreies HBSS (-Ca, -Mg) bereitgestellt wurde. Dem HBSS wurde noch Vitamin E (50 µL/50 mL HBSS) hinzugegeben. Zunächst wurden die Meningen unter Zuhilfenahme optischer Kontrolle entfernt und danach das Cerebellum sowie der Hirnstamm entfernt. Das verbliebene Gewebe wurde anschließend mit HBSS (-Ca, -Mg) dreimal kurz gespült. Dann wurden jeweils zwei präparierte Gehirne zusammen in 1 mL HBSS (+Ca, +Mg) gelegt, welches 4 mg/mL Trypsin und 0.5 mg/mL DNase enthielt. Darin wurde das Gewebe zunächst für 5 Minuten bei 4°C vorverdaut. Um die Zellen aus dem Gewebe heraus zu lösen, wurde anschließend mit HBSS (-Ca, -Mg) dreimal

gespült, um dann das angedaute Gewebe auf jeweils 10 mL DNase-Lösung zu verteilen. Mit Hilfe einer Pasteurpipette wurde im nächsten Schritt eine Zellsuspension hergestellt. Die Suspension wurde bei einer Beschleunigung von 133 g bei 4°C für 10 Minuten zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurden die Überstände verworfen und die Sedimente in 1 mL Kulturmedium resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde anschließend auf mit Poly-L-Lysine (PLL)-beschichtete Kulturflaschen transferiert und mit 9 mL Kulturmedium aufgefüllt. Mediumwechsel erfolgte alle 2 Tage.

### **2.5.3 Isolierung von Mikroglia und Astrozyten**

Mikroglia wachsen nicht adhärent auf Astrozyten und lassen sich relativ einfach durch Abschütteln isolieren. Nach 10 div wurden die Kulturflaschen mit frischem Medium für mehrere Minuten leicht geschwenkt und mit Hilfe von Vibrationen Mikroglia abgelöst. Die Astrozyten blieben auf dem Flaschenboden haften und die Mikroglia befanden sich im Kulturüberstand. Die Überstände wurden bei einer Beschleunigung von 150 g für 5 Minuten bei Raumtemperatur (RT) zentrifugiert und die Sedimente mit den Mikroglia in Kulturmedium aufgenommen. Die Suspension wurde bei vorher definierter Zelldichte auf PLL beschichtete Glasplättchen in 24-Loch Platten verteilt und mit den gewünschten Stimulanzien behandelt.

Zur Gewinnung von astrozytären Einzelzellkulturen mussten zuerst die Mikroglia aus der Mischkultur entfernt werden. Als erstes erfolgte ein Mediumwechsel, anschließend das Ablösen der Mikroglia durch die vorher beschriebene Methode des Abschüttelns. Um die Astrozyten von den Kulturflaschen zu lösen, wurden die Zellen mit 10 mL calcium- und magnesiumfreiem PBS (-Ca, -Mg) gespült und dann mit 2 mL Trypsin/EDTA-Lösung für 3 Minuten bei 37° inkubiert. Danach wurde das Volumen

mit Kulturmedium auf 10 mL aufgefüllt, die Astrozyten vom Kulturflaschenboden gelöst und bei einer Beschleunigung von 200 g bei RT für 5 Minuten zentrifugiert. Im nächsten Schritt wurde das Sediment im Kulturmedium aufgenommen, der Überstand abgesaugt, die Zellzahl bestimmt und die Astrozyten auf PLL beschichtete Glasplättchen in Vertiefungen einer 24-Loch Platte oder in Vertiefungen einer 6-Loch Platte ausplattiert.

## **2.6 Gewinnung von hippokampalen Neuronen**

### **2.6.1 Medien zur Präparation und Kultivierung von hippokampalen Neuronen**

Für die Präparation wurden 3 Lösungen hergestellt. Lösung 1 bestand aus 150 mL Neurobasal Tm und 30 mg bovinem Serumalbumin (BSA). Lösung 2 wurde aus 30 mL von Lösung 1 und 30 mg Papain (Sigma Aldrich) hergestellt. Lösung 3 bestand aus 50 mL Neurobasal Tm (Gibco), 500 mg BSA und 500 mg Trypsin-Inhibitor Type II-O (Sigma Aldrich).

Das Kulturmedium (Neurobasal Medium) für die hippokampalen Neurone wurde aus 50 mL Neurobasal Tm, 150 µL Penicillin-Streptomycin, 125 µL Glutamax und 1 mL B27 hergestellt.

### **2.6.2 Isolierung von hippokampalen neuronalen Zellkulturen**

Zur Präparation wurden Wistar Ratten p0 bzw. p1 benutzt. Die Präparation basiert auf einer Methode von Brewer et al. (Brewer *et al.*, 1993). Die Gehirne wurden unter aseptischen Bedingungen entnommen und in Petrischalen überführt. Danach wurden die Hippokampi vorsichtig heraus präpariert und in eine Petrischale mit Lösung 1

überführt. Die Hippokampi wurden mit einer verjüngten Pasteurpipette vorsichtig in die Lösung 2 überführt und 10 Minuten bei 37°C in einem Wasserbad inkubiert, anschließend einmal aufgeschüttelt und weitere 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Der Lösungsüberstand wurde vorsichtig abgenommen und 1-2 mL Neurobasal Medium auf das Zellpellet gegeben. Nach vorsichtiger Trituierung wurde dem Gewebe etwas Zeit zum Absetzen (5 Minuten) gegeben und der Überstand auf Lösung 3 geschichtet. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt.

Die Zellsuspension wurde 10 Minuten bei 70 g bei RT zentrifugiert, der Überstand abgenommen, das Pellet in einer entsprechenden Menge von Neurobasal Medium resuspendiert und auf PLL beschichtete Glasplättchen in Vertiefungen einer 24-Loch Platte verteilt.

## ***2.7 Zelllinien***

Immortalisierte Zelllinien, wie BV2 (Mikroglia-Maus), HT22 (hippokampale Neuronen-Maus) und HEK293 (mit/ohne TRPV1) fanden in den Experimenten Anwendung.

### **2.7.1 Medien zur Kultivierung der Zelllinien BV2, HT22 und HEK-293, HEK-293-TRPV1**

Als Kulturmedium für BV2 und HT22 Zellen diente DMEM (Gibco) (100 mL), welchem 10% (v/v) normales Kälberserum, 1 mL Glutamin und 1 mL Penicillin-Streptomycin zugegeben wurde.

Die HEK-293 und HEK-293-TRPV1 Zellen wurden im Kulturmedium bestehend aus MEM (PAA) (100 mL), 10% (v/v) normales Kälberserum, 1 mL Glutamin und 1 mL Penicillin-Streptomycin gehalten.

## ***2.8 Experimentelle Gruppen***

### **2.8.1 Gruppeneinteilung von OHSC**

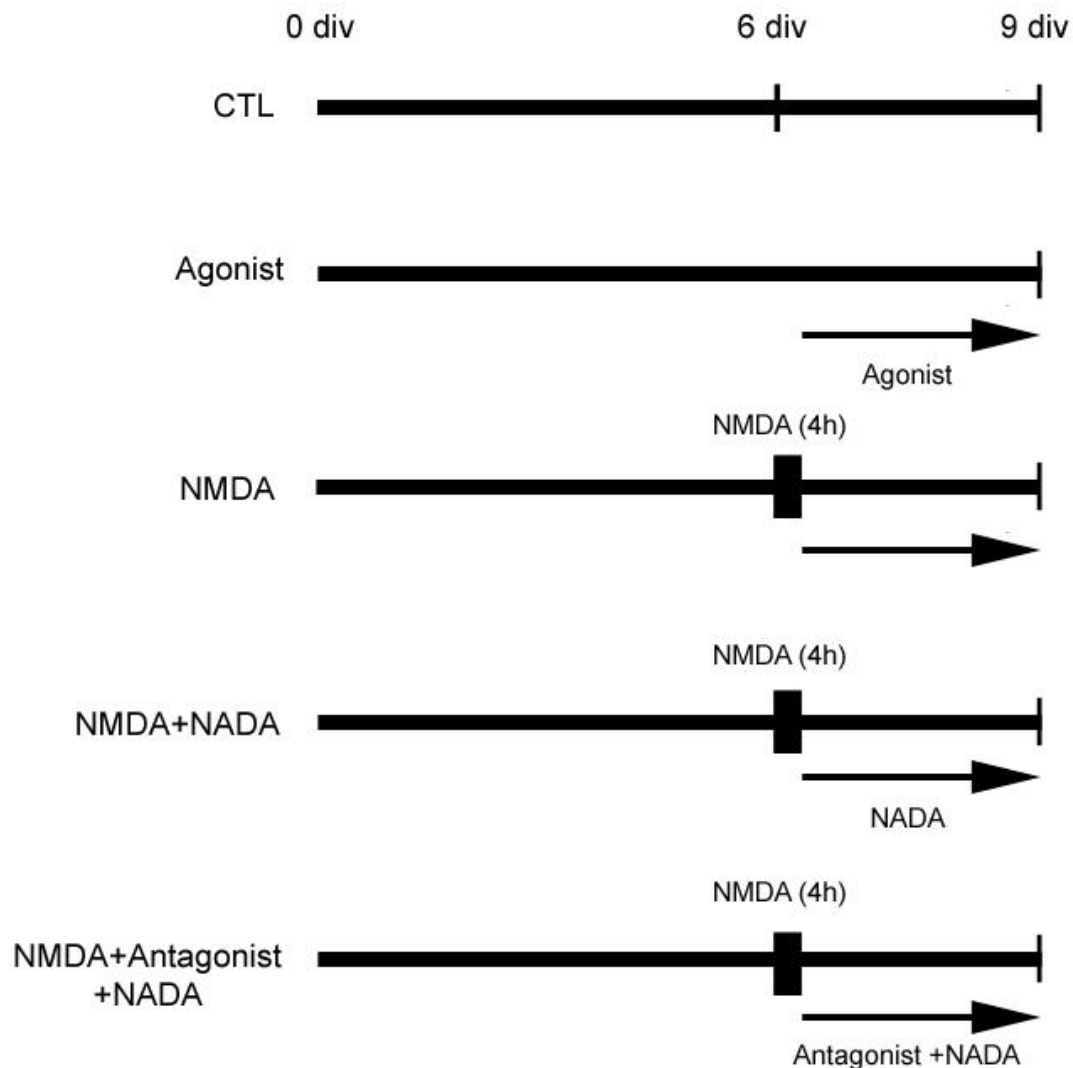
Nach der Präparation wurden die Schnittkulturen in verschiedene experimentelle Gruppen eingeteilt und wie nachfolgend beschrieben behandelt. Die experimentellen Ausführungen für die OHSC sind zusätzlich schematisch dargestellt (Abb. 9).

**CTL:** In der Kontrollgruppe wurden die OHSC vom 0. bis zum 9. div (*day in vitro*) mit Kulturmedium behandelt. Sie dient als Negativkontrolle.

**Agonist:** Bei der Agonistengruppe wurde NADA, Capsaicin oder Dopamin oder OMDM-1, ARA-S im Kulturmedium appliziert und am 9. div wurden die OHSC fixiert.

**NMDA:** Die OHSC dieser experimentellen Gruppe wurden vom 0. bis 6. div im Kulturmedium gehalten. Am 6. div wurden sie mit 50  $\mu$ M NMDA gelöst im Kulturmedium für 4 Stunden geschädigt, dann einmal mit HBSS (+Ca, +Mg) gespült und bis zur Fixierung am 9. div wieder mit Kulturmedium inkubiert. OHSC dieser Gruppe dienen als Positiv-Kontrollen.

# Behandlungsschema



**Abb. 9:** Behandlungsschema für die OHSC.

**NMDA+NADA oder andere Agonist:** OHSC wurden in diesem Fall vom 0. bis 6. div mit Kulturmedium behandelt und am 6. div mit 50  $\mu\text{M}$  NMDA für 4 Stunden geschädigt. Nach Beendigung der Schädigung wurden die OHSC einmal kurz mit HBSS (+Ca, +Mg) gespült und vom 6. div bis zur Fixierung am 9. div mit NADA oder anderen Agonisten (Capsaicin, Dopamin, ARA-S, OMDM-1) behandelt.

**NMDA+Antagonist+NADA:** Hier wurden die OHSC am 6. div zunächst 4 Stunden mit 50 µM NMDA inkubiert. Nach 4 Stunden wurden die OHSC einmal mit HBSS (+Ca, +Mg) gespült, dann für 15 Minuten mit dem Antagonisten (O1918, AM251, AM630, 6-iodo, A1) präinkubiert und anschließend bis zur Fixierung am 9. div mit entsprechenden Antagonisten und NADA behandelt.

## 2.8.2 Gruppeneinteilung von Einzelzellkulturen

Um der Fragestellung nachzugehen, ob NADA einen Calcium Einstrom verursacht, wurden die isolierten und kultivierten unbehandelten hippocampalen Neuronen (CTL), Astrozyten, Mikroglia und die kultivierten BV2, jeweils in unten aufgeführte experimentelle Gruppen unterteilt. Astrozyten, Mikroglia und BV2 Zellen wurden im Kulturmedium gehalten oder mit 10 ng/mL des bakteriellen Endotoxins Lipopolysaccharid (LPS) behandelt.

Die Astrozyten, HT22 und BV2 Zellen wurden über maximal 24 Stunden in den 6-Lochplatten in serumfreiem Kulturmedium kultiviert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen mit den gewünschten Stoffen behandelt (Tabelle 19). Die Stimulation konfluenten Zellen erfolgte pro Wert und Zeitpunkt in einem Kompartiment der 6-Lochplatte.

Es wurde untersucht, ob NADA mit und ohne zusätzliche Stimulation die intrazelluläre MAPK Signalkaskaden beeinflusst (siehe Tabelle 19).

**Tabelle 19:** Versuchsplan für die Einzelzellen

Zellen	Stimuli
<i>Calcium Imaging</i>	
Hippokampale Neurone	CTL



Astrozyten	CTL LPS (10 ng/mL)
Mikroglia	CTL LPS (10 ng/mL)
BV2	CTL LPS (10 ng/mL)
<i>Western Blot</i>	
Astrozyten	CTL NADA (1 nM) LPS (10 ng/μL) IFNγ (10 ng/mL) LPS+NADA IFNγ+NADA LPS+IFNγ LPS+IFNγ+NADA
BV2	CTL LPS (10 ng/μL) NADA (1 nM) NADA+LPS
HT22	CTL NADA (1 nM) Carbachol (100 μM) Glutamat (5 mM) NADA+Carbachol NADA + Glutamat

## ***2.9 Patch-Clamp-Experimente an HEK-293-TRPV1 Zellen***

Die Erhebung der Patch-Clamp-Daten sowie die Bestimmung der  $[Ca^{2+}]_i$  erfolgte in Kooperation mit Dr. Robert Kraft (Universität Leipzig, Carl-Ludwig-Institut für Physiologie). Die Messungen wurden von Dr. Kraft durchgeführt.

Mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik können die Eigenschaften der Ionenkanäle charakterisiert werden (Numberger *et al.*, 1996; Sakmann *et al.*, 2009).

Für diese Arbeit wurde die Whole-Cell-Konfiguration eingesetzt. Alle Messungen erfolgten bei 20-22°C. Die Zellen auf dem Deckglas wurden in der Messkammer in die Extrazellulär-Lösung, die permanent mit einer Rate von 5 mL/Min perfundiert wurde, gelegt. Unter optischer Kontrolle mittels eines inversen Mikroskops wurde auf die Zelloberfläche eine feine Glaspipette aufgesetzt. Nachdem ein kleines Membranfragment eingesaugt wurde, wurde die Zellmembran durchbrochen und die intrazelluläre Lösung in das Zytoplasma verteilt. Die Ströme wurden mit Hilfe eines EPC-8 Verstärkers (HEKA; Lambrecht) bei einer Filterfrequenz von 1 kHz gemessen. Die Digitalisierung erfolgte bei 5 kHz unter Verwendung der pCLAMP Software (Version 8.0, Axon Instruments, Burlingame, CA, USA). Die Whole-Cell-Ströme wurden durch Spannungsrampen (alle 2 s) von -100 bis +100 mV (400 ms Zeitdauer) bei einem Haltepotential von 0 mV ausgelöst. Die Applikation von NADA sowie Capsaicin erfolgte mittels Badperfusion.

## ***2.10 In vitro Calcium-Imaging***

Die untersuchten Zellen wurden mit einem fluoreszierenden Indikatorfarbstoff (Fura-2-AM) beladen, dessen Fluoreszenzeigenschaften sich in Abhängigkeit vom Bindungszustand von Calciumionen ändern.

Die  $[Ca^{2+}]_i$  wurden in BV2 Zellen sowie in kultivierten primären Mikroglia, Astrozyten und hippocampalen Neuronen gemessen. Alle Zellen wurden in der Extrazellulär-Lösung mit 5  $\mu$ M Fura-2-AM (Molecular Probes, Leiden, The Netherlands) und 0.01% (v/v) Pluronic F127 für 30 Minuten (BV2 Zellen, hippocampalen Neuronen) oder 60 Minuten (primäre Mikrogliazellen, Astrozyten) bei 20-22°C beladen. Anschließend wurden die Zellen mit Wellenlängen von 340 und 380 nm belichtet sowie die entsprechenden Änderungen der Fluoreszenzintensivität bei 510 nm gemessen.

## ***2.11 Messung des exzitatorischen postsynaptischen Stroms (EPSC) in autaptischen hippocampalen Neuronen***

Die Erhebung der Voltage-Clamp-Daten erfolgte in Kooperation mit Dr. Alex Straiker (Department of Psychological and Brain Sciences, Indiana University, Bloomington, IN, USA). Die entsprechenden Messungen wurden von Dr. Straiker durchgeführt.

Wenn ein Neuron auf dem entsprechenden Trägermaterial, einer Mikroinsel, wächst, ist es in der Lage, die Synapsen (Autapsen) zwischen dem eigenen Axon und eigenen Dendriten zu formen (Bekkers *et al.*, 1991; Straiker *et al.*, 2005). Autapsen besitzen die gleiche Struktur und Funktion wie Synapsen, dadurch sind autaptische Neuronen für die Untersuchung der synaptischen Transmission geeignet (Bekkers *et al.*, 1991; Straiker *et al.*, 2009; Straiker *et al.*, 2005). Nachdem die Spannung an der

Membran autaptischer hippocampaler Neurone angelegt wurde, wurden die daraus resultierenden Ströme gemessen.

Die Whole-Cell Voltage-Clamp-Registrierung wurde mit einem Axopatch 200A Verstärker (Axon Instruments) bei RT durchgeführt. Der schnelle Lösungsaustausch (zirka 2 mL/min) in der Badkammer ermöglichte eine schnelle Applikation und Entfernung der Stimuli. Die Lösungen wurden als Stock vorbereitet und entsprechend im Lösungsmittel verdünnt und direkt am gleichen Tag verbraucht.

Die Pipetten verfügten über 1.8-3 M $\Omega$  Widerstand. Entsprechend dem standardisiertem Simulationsprotokoll wurde das Membranpotential bei -70 mV gehalten und exzitatorische postsynaptische Ströme (EPSC) wurden alle 20 Sekunden durch eine 1 ms andauernde Depolarisation hervorgerufen. Die damit erzeugte Kurve bestand aus einem kurzen Artefakt mit der Abnahme in der EPSC, was die einwärts gerichteten Natriumströme repräsentierte und den darauffolgenden langsameren EPSC. Die Ladung der gemessenen EPSC (pC) wurde berechnet, die der Menge der Ausgeschütteten Neurotransmitter proportional ist. Das DSE wurde durch eine 1-10 Sekunden andauernde Depolarisation (auf 0 mV) hervorgerufen.

## ***2.12 Genotypisierung der CB1<sup>-/-</sup> Mäuse***

Die CB1<sup>-/-</sup> Mäuse wurden im Laufe der konditionalen Mutagenese hergestellt. Der erste Schritt bestand in der Generierung von geflochten Mäusen, bei der die sogenannte „Region of interest“ auf beiden Seiten von LoxP flankiert wird. Ein gefloxtetes CB1 DNA Segment, das zwischen LoxP Segmenten liegt, wird ausgeschnitten, wenn in den Zellen Cre Rekombinase vorhanden ist. Auf diese Art

und Weise entstand die CB1<sup>-/-</sup> Mauslinie, die in folgender Arbeit benutzt wurde (Marsicano *et al.*, 2003; Marsicano *et al.*, 2002).

### **2.12.1 DNA Extraktion aus Schwanzbiopsien**

Die Schwanzbiopsien der p0 Mäuse wurden nach der Tätowierung entnommen und mit 500 µL Proteinase K Puffer und 25 µL Proteinase K über Nacht bei 55°C auf dem Schüttler inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Proben zusammen mit 250 µL 6 M NaCl 1 bis 2 Minuten gevortext und 10 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend folgte die Zentrifugation bei 2500 g für 10 Minuten. Der Überstand wurde verworfen und 500 µL 70%iger Ethanol zu den Proben gegeben. Im nächsten Reinigungsschritt wurden die Proben bei 20000 g für 5 Minuten zentrifugiert und bei RT getrocknet. Das DNA-Pellet wurde in 100 µL TE-Puffer gelöst und über Nacht bei 4°C gehalten.

### **2.12.2 Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wird zur selektiven *in vitro* Vervielfältigung von Ausgangs-DNA (template DNA) eingesetzt.

Die DNA-Sequenz wurde aus 3 zyklisch wiederholten Schritten vervielfältigt. Zunächst wurde durch kurze Erwärmung auf 95°C denaturiert, danach erfolgte die Hybridisierung (Annealing) einzelsträngiger DNA-Bereiche (optimale Temperatur für die Primer). Die DNA wurde dann durch die thermostabile DNA-Polymerase bei 72°C elongiert. Nach Beendigung der Zyklen erfolgt ein finaler Elongationsschritt, um partiell verlängerte PCR-Produkte zu vervollständigen.

Am Tag nach der DNA-Extraktion wurde der Reaktionsansatz entsprechend Tabelle 14 zusammen pipetiert und die PCR-Reaktion wie in der Tabelle 20 durchgeführt. Die Sequenz der Primers wurde in Tabelle 16 aufgelistet.

**Tabelle 20:** Die Schrittfolge für die PCR (Genotypisierung)

Ratte			
Schritt	Zeit	Temperatur	Zahl der Zyklen
Finale Denaturierung	3 Minuten	95°C	1
Denaturierung	30 Sekunden	95°C	35
Hybridisierung	30 Sekunden	58°C	1
Elongation	60 Sekunden	72°C	1
Finale Elongation	7 Minuten	72°C	1

### 2.12.3 Agarose-Gelelektrophorese

Die amplifizierten PCR-Produkte wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert. Die Agarose-Gelelektrophorese wird zur Trennung und Identifizierung von DNA-Fragmenten mit einer Länge von 0,1 bis 25 kb benutzt. Die Agarosekonzentration wird je nach Größe der DNA-Fragmente ausgewählt. In dieser Arbeit wurde 1% (w/v) Agarose benutzt, 1 mg Agarose wurde in 100 mL TBE-Puffer (Tis-Borat-EDTA-Puffer) unter Erhitzen in der Mikrowelle gelöst. Kühle die Lösung auf 60°C, wurden 10 µL GelRed (Biotium) hinzugefügt, die Lösung in eine Gieß-Kammer gefüllt und ein Probenkamm eingesetzt. Nach Erstarren der Agarose wurde das Gel in eine Elektrophorese-Kammer mit TBE-Puffer überführt. Die aufgetragene Probenmenge betrug 10 µL. Als Referenz diente ein Größenstandard-Mix (0.1-10 kB), von dem 800

ng aufgetragen wurden. Die Elektrophorese erfolgte bei 80 V. Anschließend wurden die DNA-Banden unter UV-Licht mittels Alpha Imager™ 2200 elektronisch dokumentiert.

Die Ergebnisse wurden wie folgt interpretiert:

---

CB1<sup>+/-</sup> (het) doppelte Bande 413 bp/ 342 bp

CB1<sup>+/+</sup> (wt) obere Bande 423 bp

CB1<sup>-/-</sup> (ko) untere Bande 342 bp

## ***2.13 Reverse Transkription und Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)***

Bei der RT-PCR wird auf das mRNA-Template komplementäre DNA (cDNA) synthetisiert, was als Substrat für die vorher beschriebene PCR dient. Diese Methode wird benutzt, um die Genexpression und Transkription in isolierter Gesamt-RNA nachzuweisen.

### **2.13.1 Isolierung von messenger RNA (mRNA)**

Das geerntete Zellpellet einer stationären Kultur aus einer Kulturflasche oder 6-Lochplatte oder einem Gewebestück, wie OHSC oder Spinalganlien (DRG) vom Maus wurde mit PBS (-Ca, -Mg) gespült und jeweils in 1ml *TRIZOL RNA Pure* überführt, sonifiziert, bei 9000 g für 10 Minuten (4°C) zentrifugiert und für 5 Minuten bei RT inkubiert. Anschließend wurden 200 µL Chloroform zugesetzt, die Ansätze kräftig geschüttelt und für 3 Minuten bei RT inkubiert. Nach erfolgter Zentrifugation

bei 16000 g für 15 Minuten bei 4°C wurde die RNA-haltige wässrige Phase mit 500 µL Isopropanol gefällt und mit 750 µL Ethanol gewaschen.

Die Konzentrationsbestimmung der extrahierten RNA aus gewonnenen Zellen und Gewebestücken erfolgte über die Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von  $\lambda=260$  nm ( $OD_{260}$ ) in einem UV/VIS-Spektrometer unter Verwendung einer Quarzküvette (10 mm Schichtdicke). Die Berechnung wurde dann unter Einbezug der Verdünnung und einem für RNA-spezifischen Multiplikationsfaktors von 40 vorgenommen.

$$C[\mu\text{g}/\mu\text{l}] = OD_{260} \times \text{Verdünnung} \times 40$$

Das Verhältnis der optischen Dichte der Probe bei 260 und 280 nm liefert die Informationen über die Reinheit der RNA.

### **2.13.2 Synthese komplementärer DNA**

Die RNA wurde nach Zugabe der Random-Hexamerprimer, des dNTP-Mixes und des RNase freien Wassers bei 65°C für 5 Minuten denaturiert. Der Reaktionsansatz wurde auf Eis abgekühlt, herunterzentrifugiert und mit 5 x Reaktionspuffer, Dithiothreitol (DTT) und RNase Out versetzt und für 2 Minuten bei 37°C inkubiert. Danach wurde SuperScript™ II Reverse Transkriptase hinzugegeben und für 50 Minuten bei 37°C inkubiert, die Synthese wurde durch Deaktivierung der Transkriptase für 15 Minuten bei 70°C gestoppt.

### **2.13.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)**

Im nächsten Schritt wurde der Reaktionsansatz (Tabelle 15) zusammenpipettiert und die PCR-Reaktion wie in der Tabelle 20 durchgeführt.



Als PCR-Kontrolle wurde Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase (GAPDH) Gen, als ``House keeping Genes`` bestimmt.

**Table 21:** Die Schrittfolge für die PCR-Reaktion

Schritt	Zeit	Temperatur	Zahl der Zyklen
Finale Denaturierung	5 Minuten	95°	1
Denaturierung	60 Sekunden	95°	34
Hybridisierung	30 Sekunden	58° (Maus) 61° (Ratte)	1
Elongation	30 Sekunden	72°	1
Finale Elongation	10 Minuten	72°C	1

#### 2.13.4 Gelelektrophorese und Färbung

Die amplifizierten PCR-Produkte wurden mittels Agarose-Elektrophorese in einem 1%iger Gel analysiert.

#### 2.14 Western Blot Analyse

Mit Hilfe der SDS-Gelelektrophorese können die Proteine aus Zellen nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Die isolierten Proteine werden auf eine Nitrozellulosemembran transferiert, um sie mit spezifischen Antikörpern nachzuweisen und quantitative Aussagen zu erhalten.

### **2.14.1 Extraktion von Gesamtprotein**

Um die Unterschiede bei intrazellulären Signalwegen zu untersuchen, wurden die Zellen nach Absaugen des Kulturmediums zu Beginn des Experiments (0 Stunden), 30 Minuten, 2 Stunden, 6 Stunden und 24 Stunden danach im Probenpuffer (50 µL) lysiert und in 1,5 mL Reaktionsgefäße überführt. Das Zellextrakt wurde dreimal über 3 Sekunden mit Hilfe eines ultraschall Sonifiziers (Sonoplus GM-2200, Bandelin, Berlin, Germany) homogenisiert. Danach wurden die Proben eingefroren oder direkt zur Proteinbestimmung verwendet.

### **1.14.2 Proteinbestimmung mit Protein Assay Kit**

Um die gleiche Menge an Protein auf das Gel aufzutragen, wurde das Protein mit dem Pierce BCA Protein Assay Kit quantifiziert. Das Kit kombiniert die Bildung des Biuret-Protein-Kupfer-Komplexes in alkalischer Lösung. Die Umwandlung zu einem farbigen Reaktionsprodukt (Bicinchoninsäure) wird für die Detektion und die Quantifizierung benutzt, dessen Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von  $\lambda=562$  nm liegt.

Je 25 µL einer Probe wurden mit 200 µL BCA Lösung 30 Minuten bei 30°C inkubiert. Die Messung der Absorption wurde in 96 Lochplatten bei  $\lambda=562$  nm durchgeführt und die Proteinstandardkurve wurde nach der Absorption der BSA Verdünnungsreihe berechnet.

### **2.14.3 Gelelektrophorese**

Mittels Gelelektrophorese werden die Proteine nach ihrem Molekulargewicht getrennt. Die Elektrophorese wird 10 bis 15 Minuten bei 90 V und über 30 Minuten bei 160 V durchgeführt.

Die Proteine wurden auf eine Membran übertragen und mit den entsprechenden Antikörpern (Tabelle 10) inkubiert. Die Membran wurde zweimal mit Waschpuffer gewaschen und für 30 Minuten bei Raumtemperatur im Rotiblock (Roth) auf dem Schüttler inkubiert. Der Primärantikörper wurde im Rotiblock verdünnt und die Membranen dreimal für 10 Minuten in Waschpuffer gewaschen und anschließend für 60 Minuten bei RT mit Meerrettichperoxidase (*Horseradish peroxidase*, HRP) gekoppeltem sekundärem Antikörper (auch im Rotiblock gelöst) inkubiert. Im Anschluss daran wurde die Membran dreimal für 10 Minuten mit Waschpuffer gewaschen, auf eine Folie gelegt und mit dem ECL Kit (Amersham Place, Little Chalfont, UK) visualisiert.

## ***2.15 Datenanalyse und Auswertung***

### **2.15.1 Bestimmung von Zellzahl mit Hilfe des Konfokalmikroskops (CLSM)**

Die OHSC wurden mit Hilfe eines konfokalen Laserscanningmikroskops (LSM 510 Meta, Zeiss, Göttingen) untersucht. Um die durch IB4 markierten Mikroglia zu visualisieren wurde monochromatisches Licht der Wellenlänge von  $\lambda=488$  nm, zusammen mit einem dichroischen Spiegel (FT 488/543) und einem Emissions-Bandpassfilter für Wellenlängen von  $\lambda=505$  bis  $\lambda=530$  nm, eingesetzt. Um die PI positive degenerierte Neurone zu visualisieren, wurde monochromatisches Licht der Wellenlänge von  $\lambda=543$  nm, zusammen mit einem dichroischem Spiegel (FT

488/543) und einen Emissions-Bandpassfilter für Wellenlängen  $\lambda=585$  bis  $\lambda=615$  nm eingesetzt. Die Aufnahmen mit dem Konfokalmikroskop wurden mit 160 facher Vergrößerung aufgenommen. Mit Hilfe eines Piezokristalls wurden die Proben schrittweise in z-Richtung bewegt und die OHSC in 2  $\mu\text{m}$  breiten Intervallen gerastert, wobei Aufnahmen mit einem 16- und 40- fach Objektiv angefertigt wurden. Die OHSC wurden verblindet, erst nach der Auswertung wurden die Präparate zu den Gruppen zugeordnet. Die Auswertung der PI und IB4 positiven Zellen erfolgte manuell. In sechs mittleren optischen Schnitten des Gyrus dentatus wurden die Zellen in der Körnerzellschicht (GCL) des Gyrus dentatus gezählt. Die quantitative Auswertung erfolgte in jeder dritten optischen Schnittebene, um zu verhindern, dass Zellen doppelt gezählt werden (Dehghani *et al.*, 2003).

### **2.15.2 Western Blot**

Die Blots wurden mit der Hilfe von Image J ausgewertet.

### **2.15.3 Statistik**

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe von GraphPad Prism Software. Die Anzahl der PI positiven Neurone wurde für jede experimentelle Gruppe, bestehend aus mindestens 3 Tieren pro Konzentration berechnet. Der ANOVA (*one way analysis of variance*, Einweganalyse der Varianz) Test wurde benutzt um zu testen, ob die Anzahl der PI positiven Neuronen und IB4 positiven Mikroglia, EPSC oder die Aktivierung der MAPK in der verschiedenen Gruppen statistisch signifikant sind ( $p < 0.05$ ). Wenn signifikante Unterschiede detektiert wurden, kam es zur Anwendung eines multiplen Vergleichstests, der sogenannte Dunnet Test. Mittelwerte der Anzahl der positiven Zellen in nicht geschädigten mit NADA behandelten OHSC wurden mit

den Kontrollmittelwerten verglichen. NMDA-geschädigte OHSC, die mit NADA, Dopamin oder Capsaicin behandelt wurden, wurden mit OHSC verglichen, die mit NMDA geschädigt wurden. Weiterhin wurden NMDA-geschädigte OHSC, die mit Antagonisten für TRP Kanäle oder CB Rezeptoren behandelt und zusätzlich mit NADA inkubiert wurden, mit OHSC verglichen, die lediglich mit NADA und NMDA behandelt wurden. Zusätzlich wurde der Bonferroni Test durchgeführt um Änderungen in mehrfachbehandelten Gruppen oder bei verschiedenen NADA Konzentrationen zu analysieren. Die Bonferroni Methode erlaubt es, vergleichende Aussagen zu treffen und Konfidenzintervalle zu bestimmen, während sie gleichzeitig einen allgemeinen Konfidenzoeffizienten ausgibt. Die Daten wurden mit der jeweiligen Standardabweichung angegeben (SEM).

### 3. Ergebnisse

#### ***3.1 Protektive Wirkung von NADA auf Neurone und aktivierte Mikroglia in NMDA geschädigten OHSC***

In ungeschädigten OHSC blieben die Neuronen gut erhalten und es waren nur vereinzelte PI positive Neurone (1.58/GCL, Abb. 10A, 10B) in der Körnerzellschicht (GCL) im Gyrus dentatus (GD) zu sehen. Mikroglia wurde vor allem in der Molekularschicht lokalisiert und zeigte eine ramifizierte Morphologie. In der GCL des GD waren nur wenige IB4 positive Mikroglia (9.31/GCL, Abb. 10A, 10C) auffindbar. Die Behandlung mit 1 nM NADA hatte keinen Einfluss auf die Anzahl der PI positiven neuronalen Nuclei (0.97/GCL,  $p > 0.05$  vs. CTL, Abb. 10B) und der IB4 positive Mikroglia (9.37/GCL,  $p > 0.05$  vs. CTL, Abb. 10C). Ein signifikanter Anstieg in der Anzahl der PI positiven Neuronen (101.8/GCL, Abb. 10B) und IB4 positiven Mikroglia (53.88/GCL, Abb. 10C) wurde durch die NMDA Behandlung verursacht.

Die Behandlung von NMDA-geschädigten OHSC mit NADA verschiedener Konzentrationen (0.1 pM, 1 pM, 100 pM, 1 nM, 10 nM, 100 nM, 1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M oder 50  $\mu$ M) zeigt eine konzentrationsabhängige Reduktion der Anzahl von PI positiven Neuronen in einer inversen gaußschen Dosis-Wirkungskurve mit signifikanten Werten zwischen 100 pM und 10  $\mu$ M im Vergleich zu OHSC, die ausschließlich mit NMDA behandelt wurden (NMDA+0.1 pM NADA: 95.39/GCL,  $p > 0.05$ ; NMDA+1 pM NADA: 96.22/GCL,  $p > 0.05$ ; NMDA+100 pM NADA: 66.98/GCL,  $p < 0.05$ ; NMDA+1 nM NADA: 65.14/GCL,  $p < 0.05$ ; NMDA+10 nM NADA: 58.16/GCL,  $p < 0.05$ ; NMDA+100 nM NADA: 59.42/GCL,  $p < 0.05$ ; NMDA+1  $\mu$ M NADA: 63.04/GCL,  $p < 0.05$ ; NMDA+10  $\mu$ M NADA: 70.51/GCL,  $p < 0.05$ ; NMDA+50  $\mu$ M NADA: 93.57/GCL,  $p > 0.05$ ; alle vs. NMDA entsprechend, Abb. 10B).

In geschädigten OHSC verursachte NADA eine Reduktion der Anzahl der IB4 positiven Mikroglia bei Konzentrationen von 1 nM und 1µM (NMDA+0.1 pM NADA: 60.42/GCL,  $p>0.05$ ; NMDA+1 pM NADA: 33.34/GCL  $p>0.05$ ; NMDA+100 pM NADA: 50.64/GCL,  $p>0.05$ ; NMDA+1 nM NADA: 42.63/GCL,  $p<0.05$ ; NMDA+10 nM NADA: 41.55/GCL,  $p>0.05$ ; NMDA+100 nM NADA: 47.08/GCL,  $p>0.05$ ; NMDA+1 µM NADA: 40.53/GCL,  $p<0.05$ ; NMDA+10 µM NADA: 43.24/GCL,  $p>0.05$ ; NMDA+50 µM NADA:  $p>0.05$ ; alle vs. NMDA entsprechend, Abb. 10C).

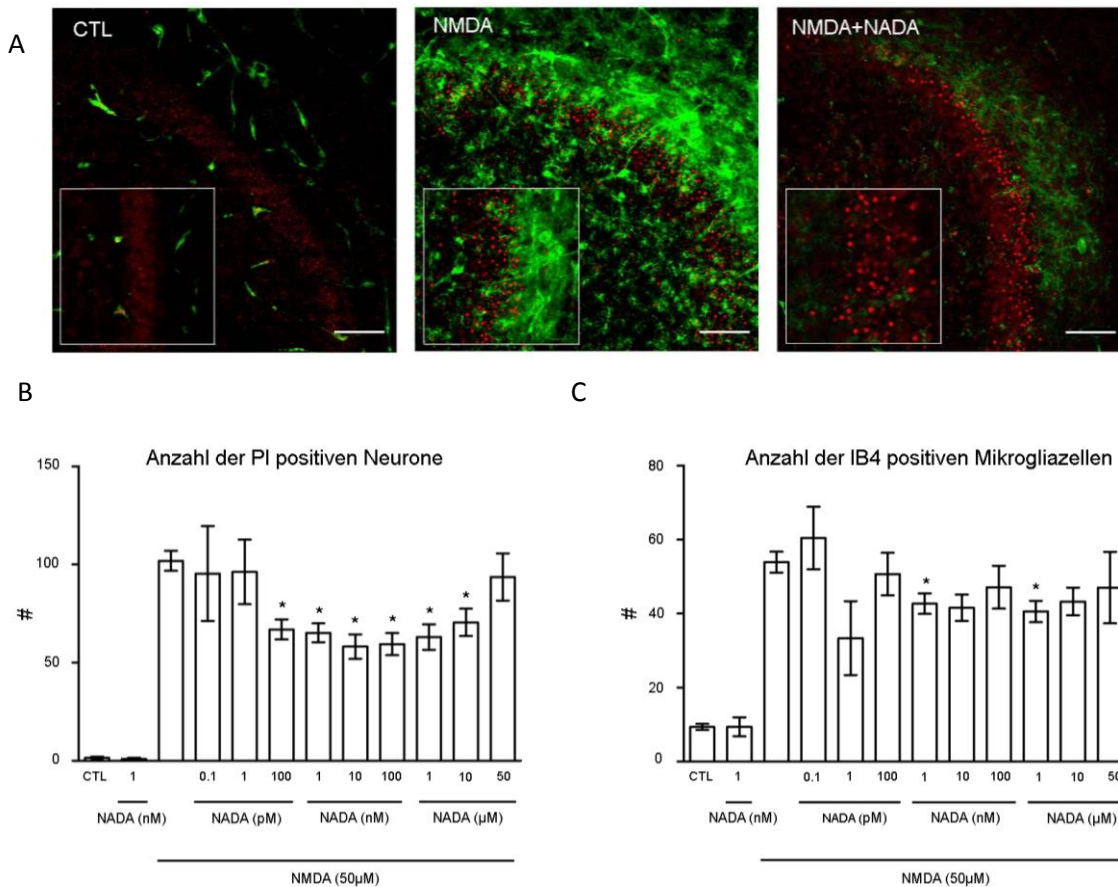
**Tabelle 22:** Die Anzahl der PI positiven Neurone in GCL des GD nach der Behandlung mit NADA.

Experimentelle Gruppe	Zellzahl/GCL	Statistik	n=
CTL	1,58		80
NADA	0.97	$p>0.05$ vs. CTL	11
NMDA	101,8		85
NMDA+0.1 pM NADA	95,39	$p>0.05$ vs. NMDA	9
NMDA+1 pM NADA	96,22	$p>0,05$ vs. NMDA	6
NMDA+100 pM NADA	66,89	$p<0.05$ vs. NMDA	32
NMDA+1 nM NADA	65,14	$p<0.05$ vs. NMDA	61
NMDA+10 nM NADA	58,16	$p<0.05$ vs. NMDA	23
NMDA+100 nM NADA	59,42	$p<0.05$ vs. NMDA	31
NMDA+1 µM NADA	63,04	$p<0.05$ vs. NMDA	34
NMDA+10 µM NADA	70,51	$p<0.05$ vs. NMDA	34
NMDA+50 µM NADA	93,57	$p>0.05$ vs. NMDA	2

**Tabelle 23:** Die Anzahl der IB4 positiven Mikroglia in GCL des GD nach der Behandlung mit NADA.

Experimentelle Gruppe	Zellzahl/GCL	Statistik	n=
CTL	9,31		80
NADA	9,37	$p > 0.05$ vs. CTL	11
NMDA	53,88		85
NMDA+0.1 pM NADA	60,42	$p > 0.05$ vs. NMDA	9
NMDA+1 pM NADA	33,34	$p > 0.05$ vs. NMDA	6
NMDA+100 pM NADA	50,64	$p > 0.05$ vs. NMDA	32
NMDA+1 nM NADA	42,63	$p < 0.05$ vs. NMDA	61
NMDA+10 nM NADA	41,55	$p > 0.05$ vs. NMDA	23
NMDA+100 nM NADA	47,08	$p > 0.05$ vs. NMDA	31
NMDA+1 $\mu$ M NADA	40,53	$p < 0.05$ vs. NMDA	34
NMDA+10 $\mu$ M NADA	43,24	$p > 0.05$ vs. NMDA	34
NMDA+50 $\mu$ M NADA	47,00	$p > 0.05$ vs. NMDA	2





**Abb.10:** NADA vermittelte Neuroprotektion und Reduktion der Anzahl von IB4 positiven Mikrogliazellen in NMDA geschädigten OHSC.

**A:** OHSC gefärbt mit PI (degenerierende Neurone) und IB4 (Mikroglia). (CTL) In den Kontrollschnitten blieben die Neurone gut erhalten, eine sehr geringe Anzahl an PI positiven Neuronen und IB4 positiven Mikroglia war zu beobachten. (NMDA) Die Ansammlung der PI positiven Zellen und Mikroglia in der GCL des GD fand sich nach NMDA Behandlung. (NMDA+NADA) Im Vergleich zu NMDA-behandelten OHSC, beobachtete man hier eine Reduzierung der PI positiven Neurone und IB4 positiven Mikroglia in der untersuchten Region. Maßstab=50  $\mu$ M

**B-C:** Statistische Analyse (One Way ANOVA folgend mit Bonferroni Test für multiple Vergleiche)

**B:** Nach der Inkubation mit Kontrollmedium oder NADA allein waren kaum PI positiven Zellen zu sehen. Die NMDA-Behandlung führte zu einem signifikanten Anstieg der PI positiven Zellen. Die Anzahl der PI positiven Neurone wurde im Vergleich zu NMDA-Kontrolle deutlich im Konzentrationsbereich zwischen 100 pM und 10  $\mu$ M ( $p < 0.05$ ) reduziert.

**C:** In der OHSC, die nur mit NADA behandelt wurden, beobachtete man sehr wenig IB4 positive Zellen. Nach der NMDA Schädigung kam es zu einem rapiden Anstieg der IB4 positiven Mikroglia. Nach Zugabe von 1 nM und 1  $\mu$ M NADA zu NMDA-behandelten OHSC wurde die Anzahl der IB4 positiven Zellen signifikant reduziert ( $p > 0.05$ ). Fehlerbalken=SEM

### **3.2 Abhängigkeit NADA vermittelter Neuroprotektion vom CB1 Rezeptor**

Die Vorbehandlung der OHSC mit dem CB1 Antagonist AM251 (10  $\mu$ M), gefolgt von der gleichzeitigen Applikation von AM251 und 1 nM NADA hat die signifikante Reduzierung von PI positiven Neuronen aufgehoben (93.39/GCL,  $p < 0.05$  vs. NMDA+1 nM NADA, Abb. 11A), aber hatte keinen Einfluss auf die Anzahl der IB4 positiven Mikroglia (34.85/GCL,  $p > 0.05$  vs. NMDA+1 nM NADA, Abb. 11B).

Die durch 10  $\mu$ M NADA induzierte Abnahme der Anzahl der PI positiven Neuronen in NMDA behandelten OHSC, wurde nicht durch die Applikation von AM251 blockiert (65.69/GCL,  $p > 0.05$  vs. NMDA+10  $\mu$ M NADA, Abb. 11A). Die gleichzeitige Applikation von AM251 und 10  $\mu$ M NADA hat die Anzahl der IB4 positiven Mikroglia verglichen mit OHSC, die nur mit 10  $\mu$ M NADA behandelt wurden, nicht beeinflusst (28.06/GCL,  $p > 0.05$  vs. NMDA+10  $\mu$ M NADA, Abb. 11B).

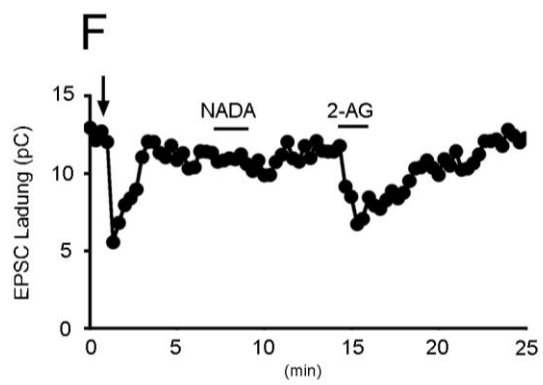
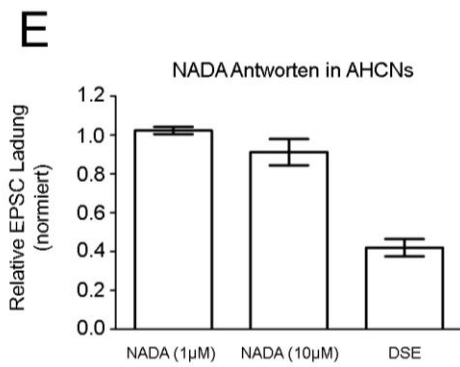
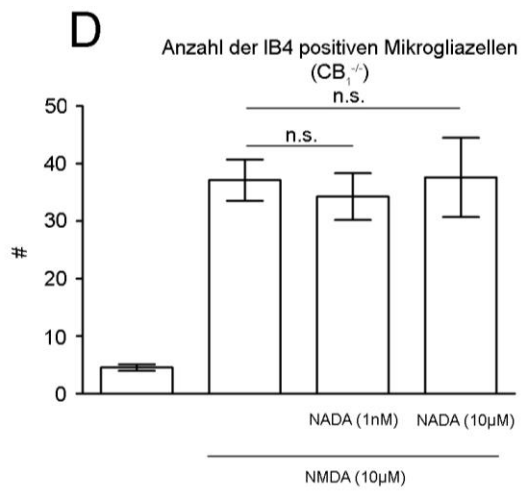
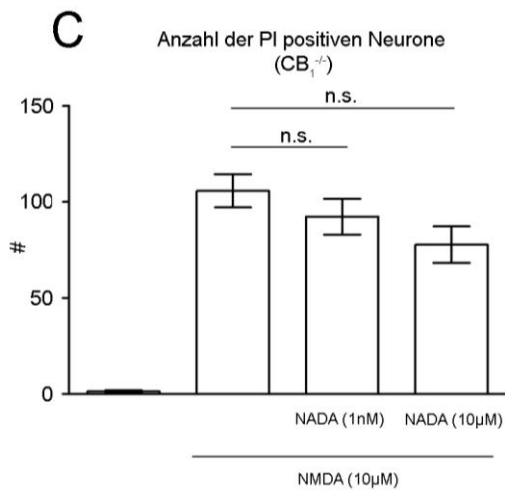
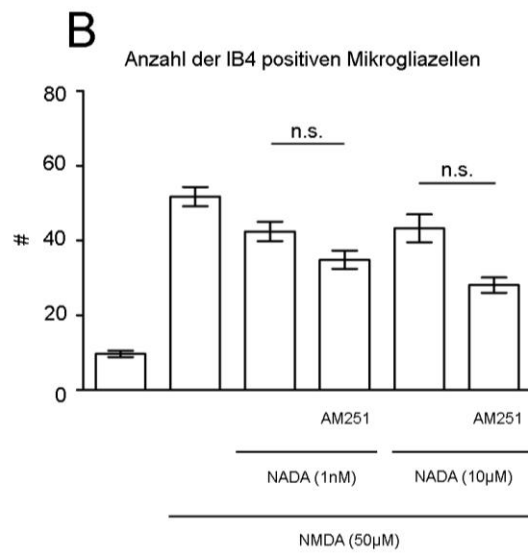
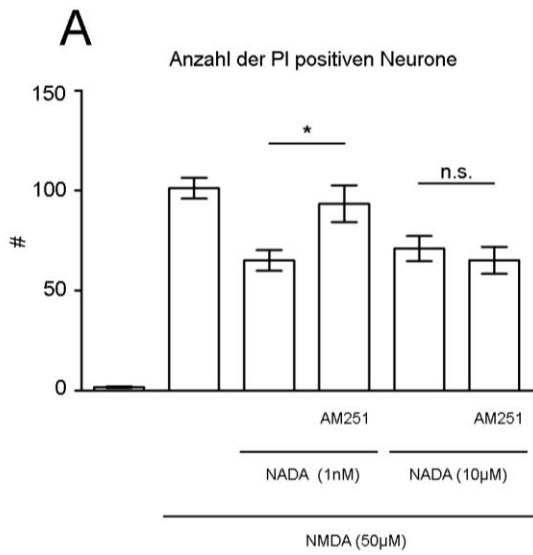
Die CB1<sup>-/-</sup> Mäuse (Marsicano *et al.*, 2003; Marsicano *et al.*, 2002) wurden von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. B. Lutz (Institut für Physiologie der Universität Mainz) im Rahmen einer Kooperation zur Verfügung gestellt.

In nicht geschädigten OHSC (CTL) von CB1<sup>-/-</sup> Mäusen waren nur wenige PI positive Zellen (1.25/GCL, Abb. 11C) und IB4 positive Mikroglia (4.54/GCL, Abb. 11D) zu sehen. Ein großer Anstieg bei PI positiven Neuronen (105.8/GCL, Abb. 11C) und IB4 positiven Mikroglia (37.12/GCL, Abb. 11D) wurde nach Zugabe von 10  $\mu$ M NMDA in der GCL beobachtet.

Die Behandlung von NMDA-geschädigten CB1<sup>-/-</sup> OHSC mit NADA der Konzentrationen 1 nM und 10  $\mu$ M führten zu keinen signifikanten Änderungen in der Anzahl von PI positiven Neuronen (NMDA+NADA: 1 nM: 92.30/GCL; 10  $\mu$ M:

77.76/GCL, Abb. 11C) und IB4 positiven Mikroglia (NMDA+NADA: 1 nM: 34.36/GCL; 10  $\mu$ M: 37.61/GCL, Abb. 11D).

Um zu analysieren, ob NADA das retrograde Signaling über neuronale CB1 Rezeptoren beeinflusst, wurden Experimente mit autaptischen hippocampalen Neuronen in Kooperation mit Alex Straiker (Department of Psychological and Brain Sciences, Gill Center for Biomolecular Medicine, Bloomington) durchgeführt (Straiker *et al.*, 2005). Die Inhibierung von EPSC durch kurze (3 Sekunden) Depolarisation ist ein indirektes Maß für die retrograde Übertragung, die als DSE bezeichnet wird. Die autaptischen hippocampalen Neuronen wurden auf die endogene basale Endocannabinoid Signalgebung getestet (Abb. 11E, F). Nach der Behandlung mit NADA (1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M) wurden die EPSCs in autaptischen Neuronen nicht inhibiert (1  $\mu$ M:  $1.02 \pm 0.02$ , n=6; 10  $\mu$ M:  $0.91 \pm 0.07$ , n=5,  $p < 0.01$  für beide 1  $\mu$ M und 10  $\mu$ M NADA im Vergleich zu DSE: Abb.11E, F). Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass NADA keinen inhibitorischen Einfluss auf die neuronale Übertragung in autaptischen hippocampalen neuronalen Zellen über CB1 Rezeptoren besitzt.



**Abb. 11:** NADA mediierte Neuroprotektion wurde in OHSC über CB1 Rezeptoren vermittelt. A-D: Statistische Analyse (one-way Anova Test und Dunnett Test - multipler Vergleichstest). Bestimmung von signifikanten Unterschieden zwischen den Mittelwerten einer NMDA-Kontrollgruppe und den verbleibenden Behandlungsgruppen (PI positive Neuronen und IB4 positive Mikroglia).

A: Der Einfluss des CB1 Rezeptor Antagonisten AM251 auf degenerierte Neuronen in NADA (1 nM, 10  $\mu$ M) behandelten NMDA geschädigten OHSC. Während AM251 den Effekt von 1 nM NADA ( $p < 0.05$ ) blockierte, wurde die Protektion von 10  $\mu$ M NADA nicht aufgehoben ( $p > 0.05$ ).

B: Der Einfluss des CB1 Rezeptor Antagonisten AM251 auf aktivierte Mikrogliazellen in mit NADA (1 nM, 10  $\mu$ M) behandelten NMDA- geschädigten OHSC. Nach der Applikation von NADA (1 nM, 10  $\mu$ M) wurde keine signifikante Änderung der Zahl der IB4 positiven Mikroglia beobachtet ( $p > 0.05$ ).

C: Die Behandlung von NMDA-geschädigten CB1<sup>-/-</sup> OHSC mit NADA (1 nM, 10  $\mu$ M) führte zu keiner signifikanten Änderung in der Anzahl der PI positiven Neuronen bei beiden getesteten Konzentrationen (1 nM NADA, 10  $\mu$ M NADA ( $p > 0.05$ )).

D: NADA (1 nM, 10  $\mu$ M) hatte keine Wirkung auf die Anzahl von IB4 positiven Mikroglia ( $p > 0.05$ ) in NMDA-geschädigten CB1<sup>-/-</sup> OHSC.

E: NADA hatte keinen inhibitorischen Einfluss auf CB1 Rezeptor in autaptischen hippocampalen Neuronen (AHCNs). Verglichen mit elektrisch induzierten DSE, hatte die Applikation von 1  $\mu$ M und 10  $\mu$ M NADA keine inhibitorische Wirkung auf die EPSCs.

F: Ein Musterzeitverlauf von EPSCs in autaptischen Neuronen zeigte die durch Depolarisation induzierte DSE (Pfeil). Beim CB1 Agonist (2-AG) wurde die EPSC Inhibierung beobachtet, diese fehlte bei NADA.

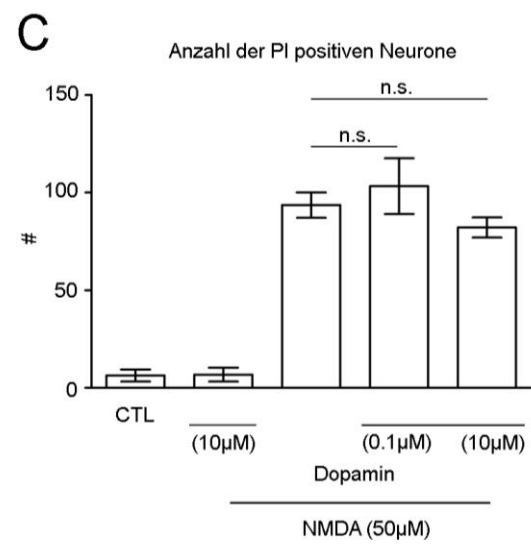
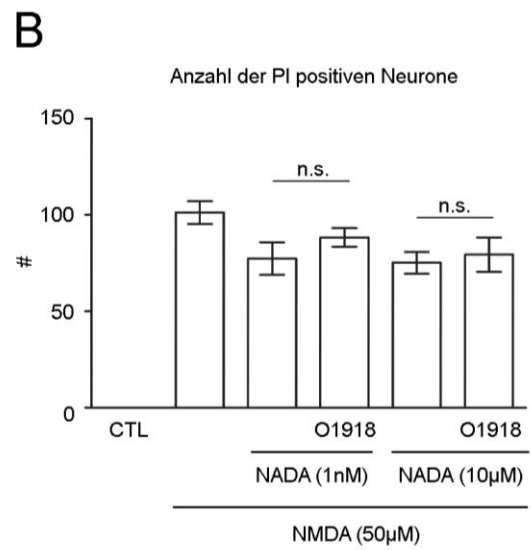
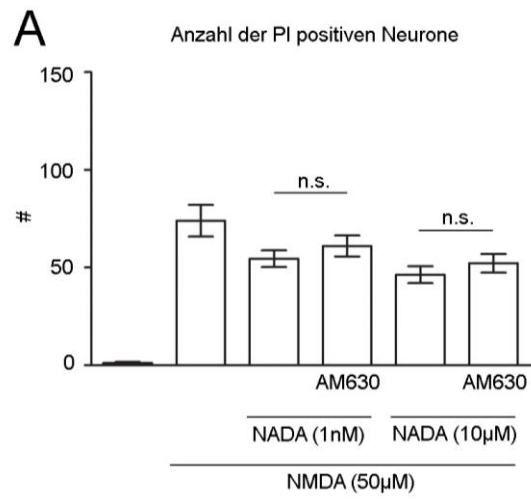
Fehlerbalken=SEM, n.s.=nicht signifikant

### **3.3 Einfluss von CB2, abnCBD und Dopamin Rezeptoren auf die NADA mediierte Neuroprotektion.**

Um festzustellen, ob die Aktivierung von CB2 Rezeptoren in NADA mediierten Effekten involviert ist, wurde AM630, ein potenter CB2 Antagonist, benutzt. Zu den NMDA geschädigten OHSC, die bereits mit NADA (1 nM, 10  $\mu$ M) behandelt wurden, wurde AM630 (10  $\mu$ M) hinzugefügt. Die Anzahl der PI positiven Neurone blieb nach der Inkubation mit AM630 unverändert ( $p > 0.05$ ) (NMDA+AM630+NADA: 1 nM: 61.02/KZS; 10  $\mu$ M: 52.20/GCL, Abb. 12A).

Um die Frage zu beantworten, ob die Effekte von NADA über abnCBD Rezeptoren vermittelt sein könnten, wurden NMDA und NADA behandelte OHSC mit 30  $\mu\text{M}$  O1918 inkubiert. Die Reduzierung der Anzahl von PI positiven Neuronen nach NADA Behandlung wurde durch O1918 nicht aufgehoben (NMDA+O1918+NADA: 1 nM: 88.30/GCL; 10  $\mu\text{M}$ : 79.32/GCL,  $p>0.05$ , Abb. 12B).

Da NADA eine funktionelle Dopamingruppe besitzt, die an Dopamin Rezeptoren binden kann, wurde Dopamin (0.1  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ ) allein zu exzitotoxisch geschädigten OHSC hinzugegeben. Die alleinige Behandlung mit Dopamin hatte keine Änderung der Anzahl von PI positiven Neuronen in der GCL des GD zur Folge (10  $\mu\text{M}$ : 6.73/GCL,  $p>0.05$  Abb. 12C). Die Hinzugabe von 0.1  $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{M}$  Dopamin hatte keinen signifikanten Effekt auf die Anzahl von PI positiven Neuronen ( $p>0.05$ ) nach der NMDA Schädigung (NMDA+Dopamin: 0.1  $\mu\text{M}$ : 109.16/GCL; 10  $\mu\text{M}$ : 82.10/GCL,  $p>0.05$ , Abb.12C).



**Abb.12:** Die NADA medierte Neuroprotektion war weder CB2, abnCBD, noch Dopamin Rezeptor – sensitiv. A-C: Statistische Analyse der Mittelwerte der PI positiven Neuronen.

A: AM630 (10  $\mu$ M) hat die Reduktion der Anzahl der PI positiven Neuronen nicht beeinflusst.

B: O1918 (30  $\mu$ M) hatte keinen Einfluss auf die Reduktion der Anzahl der PI positiven Neurone in NMDA geschädigten OHSC.

C: Dopamin (0.1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M) hat keine Wirkung auf die Zahl der PI positiven Neurone in NMDA behandelten OHSC.

Fehlerbalken=SEM, n.s.= nicht signifikant

### **3.4 TRPV1 ist nicht in die NADA-vermittelte Neuroprotektion involviert**

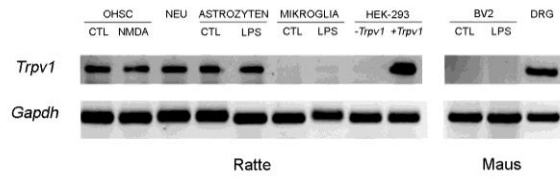
#### **3.4.1 Vorkommen von TRPV1 auf mRNA-Ebene**

Die Expression des *Trpv1* Rezeptors wurde in OHSC, hippocampalen Neuronen, Astrozyten, Mikroglia und BV2 Zellen analysiert. *Trpv1* Expression wurde in unbehandelten und mit NMDA geschädigten OHSC, in Einzelzellkulturen aus hippocampalen Neuronen und primären, nicht stimulierten und mit LPS stimulierten Astrozyten und in den Spinalganglien (DRG) von Mäusen gefunden. *Trpv1* konnte nicht in unbehandelten und mit LPS stimulierter primärer Mikroglia aus Ratten und in BV2 Zellen nachgewiesen werden. In Spinalganglien (DRG) von Mäusen wurde bereits ein funktionell aktiver TRPV1 nachgewiesen. Als positive und negative Kontrollen werden entsprechend mit dem TRPV1 Rezeptor transfizierten und die nicht transfizierten HEK-293 Zellen benutzt (Abb. 13A).

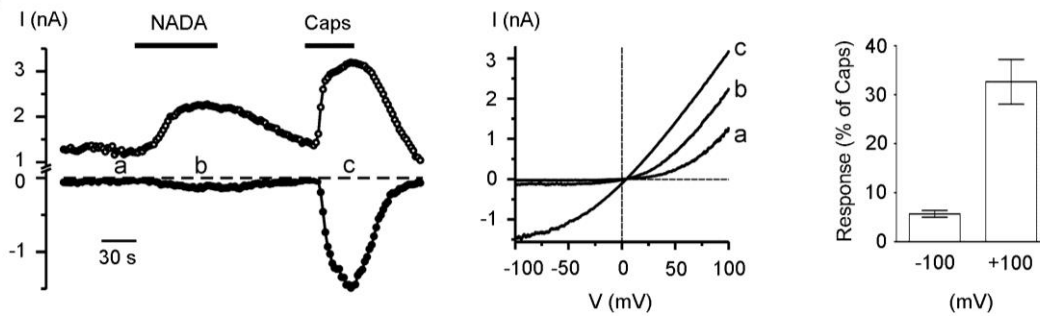


**A**

OHSC, Zellen	Trpv1-mRNA
OHSC (CTL)	+
OHSC (NMDA)	+
Hippokampale Neuronen (CTL)	+
Astrozyten (CTL)	+
Astrozyten (LPS)	+
Mikroglia (CTL)	-
Mikroglia (LPS)	-
HEK-293	-
HEK-293-TRPV1	+
BV2 (CTL)	-
BV2 (LPS)	-
DRG	+



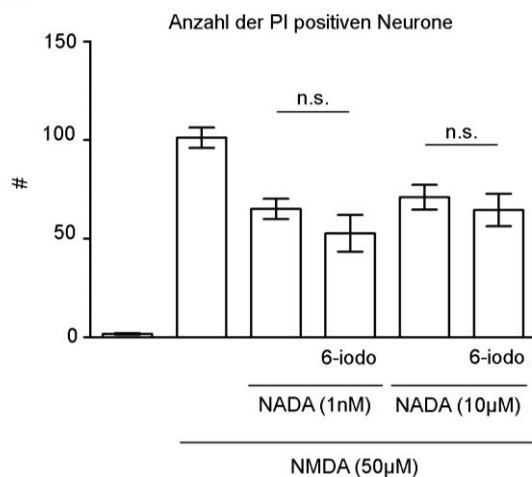
**B**



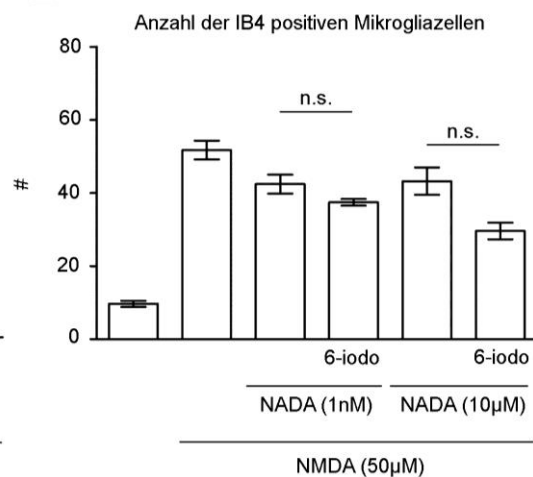
**C**

Zellen	10µM NADA	10µM Capsaicin	CTL (100µM UDP or ATP)	CTL (50mM KCl)
hippokampale Neuronen (CTL)	-	-	-	+
Astrozyten (CTL)	-	-	+	-
Astrozyten (LPS)	-	-	+	-
Mikroglia (CTL)	-	-	+	-
Mikroglia (LPS)	-	-	+	-
BV2 (CTL)	-	-	+	-
BV2 (LPS)	-	-	+	-

**D**



**E**



**Abb. 13.** Der TRPV1 Rezeptor ist nicht in die NADA mediierter Neuroprotektion involviert.

*A: Die Verteilung der Trpv1 mRNA in OHSC der Ratte, primären Astrozyten und Mikroglia der Ratte, BV2 Zelllinie und Spinalganglien der Maus. Trpv1 mRNA wurde in unbehandelten Kontroll- (CTL) OHSC, NMDA-geschädigten OHSC, unbehandelten Primärneuronen aus dem Hippokampus (NEU) und unbehandelten (CTL) oder LPS stimulierten primären Astrozytenkulturen (AST) detektiert. In unbehandelten (CTL) oder LPS stimulierten primären Mikroglia der Ratte (MG) und der murinen BV2 Zelllinie war keine Trpv1 mRNA nachzuweisen. Nicht transfizierte HEK-293 Zellen wurden als Negativkontrolle für den TRPV1 Primer der Ratte benutzt. Die stabil mit Trpv1 transfizierten HEK-293 Zellen und die murinen Spinalganglien dienten als Positivkontrollen für beide Primer.*

*B: NADA (10  $\mu$ M) und Capsaicin (10  $\mu$ M) induzierten Ganzzellströme in HEK-293-TRPV1 Zellen. Der zeitliche Verlauf (links) der Ströme bei -100 mV bis +100 mV wurde aus dem Antworten auf Spannungsrampen (-100 mV- +100 mV) ermittelt. Rechts: Mittelwerte von NADA induzierten Strömen (als % der Antworten auf Capsaicin) bei Spannungen von -100 mV bis + 100 mV.*

*C: Die wesentlichen Ergebnisse der Calcium Imaging Experimente von verschiedenen stimulierten und nicht stimulierten primären Zellen (Astrozyten, Mikroglia) und BV2 Zellen. Sowohl Capsaicin als auch NADA verursachten keine Calciumantwort in primären hippocampalen Neuronen, behandelten und LPS-stimulierten Primärenzellkulturen (Astrozyten, Mikroglia) und BV2 Zellen. UDP oder ATP (jeweils 100  $\mu$ M) induzierten einen Calciumanstieg in Astrozyten, Mikroglia und BV2 Zellen. KCl (50 mM) wurde als Positivkontrolle für die hippocampalen Neurone benutzt.*

*D, E: Statistische Analyse (One-Way ANOVA mit Dunnett Test) der Mittelwerte von PI und IB4 positiven Zellen.*

*D: In NMDA behandelten OHSC reduzierte die Zugabe von 1 nM oder 10  $\mu$ M NADA die Zahl der PI positiven Neuronen, dieser Effekt wurde nach der Inkubation mit 1  $\mu$ M 6-iodonordihydrocapsaicin (6-iodo) nicht aufgehoben ( $p > 0.05$ ).*

*E: NADA mediierte Senkung der IB4 positiven Mikrogliazellen in NMDA geschädigten OHSC wurde von 6-iodonordihydrocapsaicin nicht beeinflusst ( $p > 0.05$ ). Fehlerbalken=SEM, n.s.= nicht signifikant*

### **3.4.2 NADA ist ein potenter Agonist für den TRPV1 Rezeptor**

Dieser Versuchsteil wurde in Kooperation mit Dr. Robert Kraft (Universität Leipzig, Carl-Ludwig-Institut für Physiologie) durchgeführt.

Die Stromantworten von HEK-293-TRPV1 Zellen wurden im Whole-Cell-Modus nach extrazellulärer Applikation von NADA oder Capsaicin (Caps) gemessen. TRPV1 vermittelte einwärts und auswärts Ströme wurden in HEK-293-TRPV1 Zellen durch

Badperfusion von NADA (10  $\mu\text{M}$ ) oder Caps (10  $\mu\text{M}$ ) evoziert. Es wurde gezeigt, dass NADA ein potenter Agonist für diesen Rezeptor ist (Abb. 13 B).

### **3.4.3 Funktionelle Aktivität von TRPV1**

Dieser Versuchsteil wurde in Kooperation mit Dr. Robert Kraft (Universität Leipzig, Carl-Ludwig-Institut für Physiologie) durchgeführt.

Das Ziel dieser Untersuchungen war es, durch die Messung der intrazellulären Calciumkonzentration mittels Fura-2, Aussagen über die Wirkungsweise von NADA bzw. Capsaicin auf die verschiedenen Zelltypen, die in OHSC vorkommen, zu treffen. Diese Fragestellung diente als Ausgangspunkt für mehrere detaillierte Untersuchungen, die das Cross-talking zwischen TRPV1 Rezeptor und anderen Rezeptoren aufklären sollte.

Im Verlauf eines Experimentes wurde die Änderung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  Konzentration  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  über die gemessene Fluoreszenzintensität (ratio F340/F380) von Fura-2 dargestellt. Bei konsistenter Aktivierung von TRPV1 sollte ein Calciumeinstrom auslösbar sein, der durch eine Erhöhung der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  feststellbar wäre. Wenn man annimmt, dass die untersuchten Zelltypen diesen Rezeptor besitzen, kann man die Erhöhung des  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  in Form eines kurzfristigen Anstiegs der Ratio F340/F380 sehen. Bei Neuronen war lediglich ein Anstieg in der Ratio F340/380 nach der KCl Applikation zu beobachten, Gliazellen zeigten eine Reaktion auf den Kontrollstimulus ATP. Die Fluoreszenzintensität änderte sich nach der Gabe von NADA oder Capsaicin jedoch nicht (Abb. 13C).

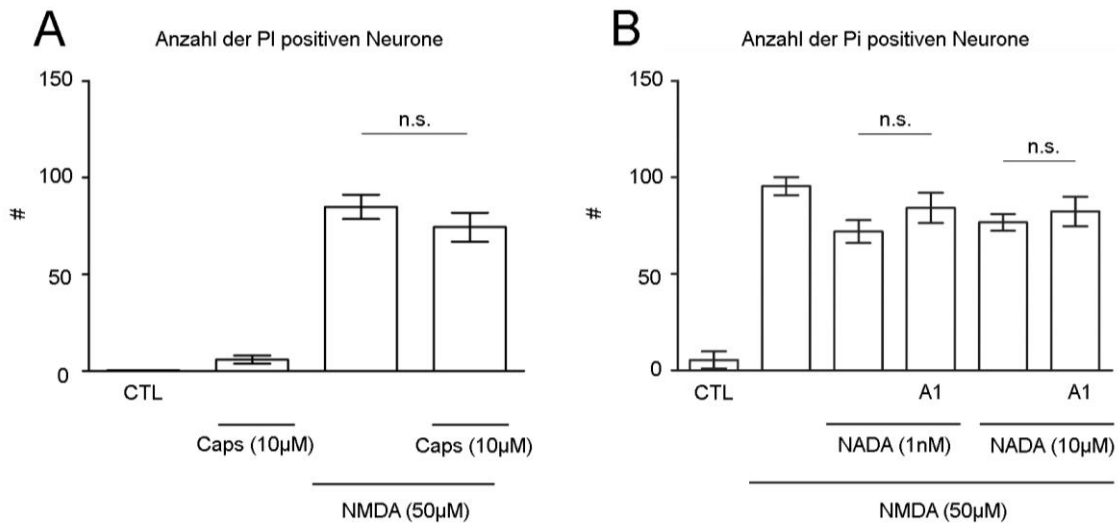
Der Nachweis von TRPV1 auf Proteinebene war nicht möglich, da sich alle Antikörper (abcam: VR1 antibody: ab10295 aus Meerschweinchen; Chemicon/Millipore: AB5566 aus Meerschweinchen; Neuromics: GP14100 aus Meerschweinchen) in Testversuchen als unspezifisch erwiesen.

#### **3.4.4 Capsaicin und 6-iodonordihydrocapsaicin haben keinen Einfluss auf die unbehandelten und geschädigten OHSC**

Um zu testen, ob TRPV1 Rezeptoren in der NADA vermittelten Neuroprotektion und bei der Reduktion der Anzahl der Mikroglia involviert sind, wurden NMDA-geschädigte OHSC mit dem TRPV1 Antagonisten 6-iodonordihydrocapsaicin (6-iodo, 1  $\mu$ M) präinkubiert und dann entsprechend mit der Kombination von 1  $\mu$ M 6-iodo und 1  $\mu$ M NADA oder 1  $\mu$ M 6-iodo und 10  $\mu$ M NADA behandelt. 6-iodo hat die Anzahl der PI positiven Neurone (NMDA+1  $\mu$ M 6-iodo+1  $\mu$ M NADA: 52.69/GCL,  $p>0.05$  vs. NMDA+1nM NADA; NMDA+1  $\mu$ M 6-iodo+10  $\mu$ M NADA: 64.48/GCL,  $p>0.05$  vs. NMDA+10  $\mu$ M NADA, Abb. 13D) und IB4 positiven Mikroglia (NMDA+1  $\mu$ M 6-iodo+1 nM NADA: 37.45/GCL,  $p>0.05$  vs. NMDA+1nM NADA; NMDA+1  $\mu$ M 6-iodo+10  $\mu$ M NADA: 29.60/GCL,  $p>0.05$  vs. NMDA+10  $\mu$ M NADA, Abb. 13E) in OHSC im Vergleich mit 1  $\mu$ M oder 10  $\mu$ M NADA nicht beeinflusst.

Die nur mit Capsaicin (10  $\mu$ M) behandelten OHSC wiesen fast kaum PI positiven Neuronen auf (5.83/GCL  $p>0.05$  vs. CTL, Abb. 14A). Die Applikation von 10  $\mu$ M Capsaicin zu NMDA-geschädigten OHSC hatte keinen Einfluss auf die Anzahl von PI positiven Neuronen (74.35/GCL vs. NMDA, Abb. 14A), verglichen zu NMDA-geschädigten OHSC. Die NADA-vermittelte Reduktion der Anzahl von PI positiven Neuronen wurde nicht durch die Blockade des TRPA1 Rezeptors durch den Antagonisten HC-030031 (A1, 10  $\mu$ M) (NMDA+10  $\mu$ M A1+1 nM NADA: 71.91/GCL,

$p > 0.05$  vs. NMDA+1 nM NADA; NMDA+10  $\mu$ M A1+10  $\mu$ M NADA: 82.31/GCL,  $p > 0.05$  vs. NMDA+10  $\mu$ M NADA, Abb. 14B) beeinflusst.



**Abb.14:** TRPV1 und TRPA1 waren nicht in die NADA medierte Neuroprotektion involviert. A-B: zeigt die statistische Analyse (One Way ANOVA und Dunnett Test) der Mittelwerte von PI positiven und IB4 positiven Zellen.

A: Nach der Zugabe von 10  $\mu$ M Capsaicin (Caps) zu ungeschädigten OHSC war kein Effekt zu sehen. Die NMDA verursachte Schädigung blieb unverändert, trotz Behandlung mit Capsaicin.

B: Verglichen mit NMDA geschädigten OHSC hatte die Inkubation mit 1  $\mu$ M A1 (HC-030031) auf die Reduzierung der Anzahl von PI positiven Neuronen keinen Einfluss.

SEM=Fehlerbalken, n.s.= nicht signifikant

### 3.5 Signalkaskaden, die in der NADA Neuroprotektion involviert sind

Für eine bessere Analyse des Zeitverlaufs sind die Daten auf zwei unterschiedliche Arten dargestellt. Zum einen in Abhängigkeit von der Behandlung mit entsprechenden Stimuli, zum anderen als Zeitreihe. Das Verhältnis der phosphorylierten Form zum Gesamtprotein von MAPK, wurde um die Vergleichbarkeit zwischen den unterschiedlichen Gruppen zu verbessern, auf die absolute Aktinmenge normiert.

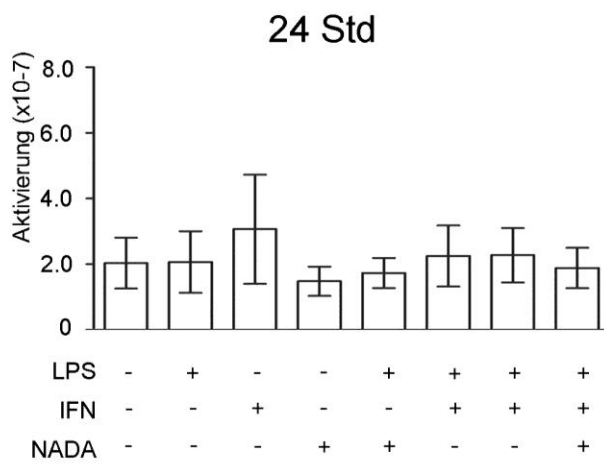
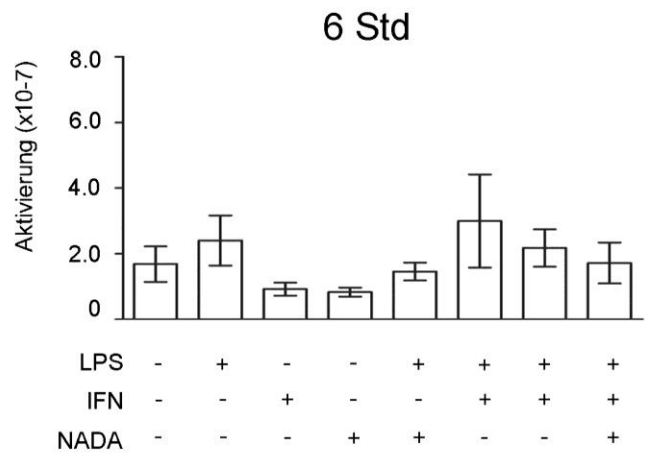
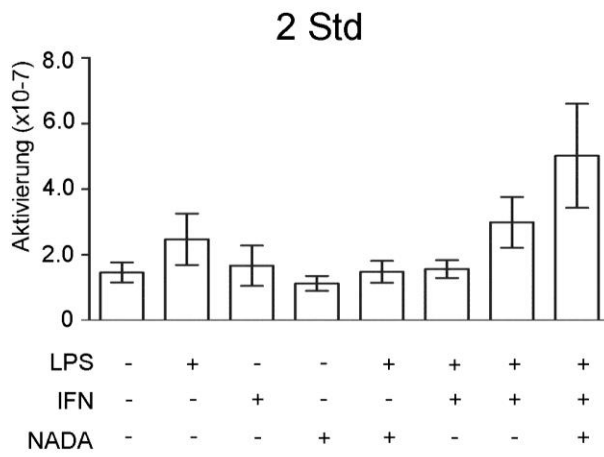
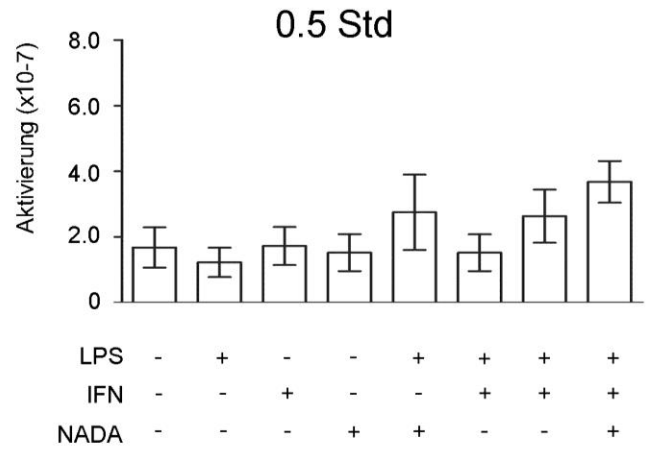
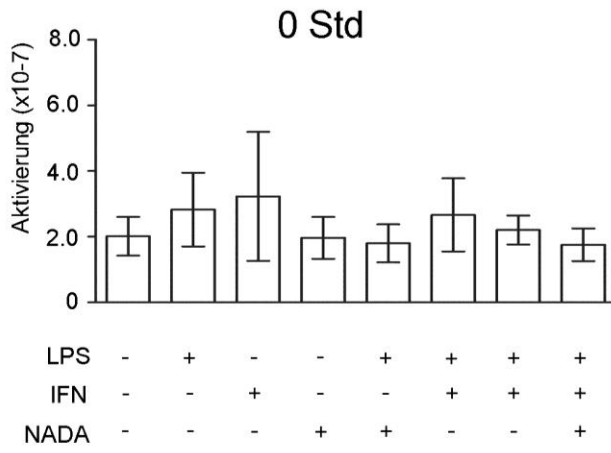
NADA hat in den untersuchten Zeiträumen (30 Min, 2 Std., 6 Std. und 24 Std.) keinen Einfluss auf die Aktivierung von p38 und p44/42 MAPK in stimulierten und nicht stimulierten HT22 Zellen, BV2 Zellen und Astrozyten (Tabelle 24). Die entsprechenden Mittelwerte aus mindestens 4 unabhängigen Experimenten wurden in der Tabelle dargestellt. Alle Mittelwerte wurden mit Hilfe des One-Way ANOVA und Bonferroni Test überprüft. In den Blots werden die Proben mit Aktin-Antikörpern inkubiert, um die experimentellen Gruppen vergleichbar zu halten. Bei gleicher Proteinkonzentration ist der Vergleich der Banden-Intensitäten innerhalb einer Gruppe und zwischen anderen Gruppen auch für die anderen verwendeten Antikörper gestattet.

**Tabelle 24:** Einfluss von NADA auf die Signalwege in stimulierten und nicht-stimulierten HT22, BV2 Zellen und Astrozyten. Der Aktivierungszustand des p38 und p44/42 MAPK Proteins wurde als Mittelwert von mindestens drei Experimenten dargestellt. Unter Aktivierung versteht man das Verhältnis zwischen phosphorylierter Form und Gesamtprotein von MAPK, welche auf Aktinmenge normiert wurde.

Experimentelle Gruppe	Aktivierung des Proteins Mittelwert $\times 10^{-7}$									
	p38					p44/42				
	0	30	2	6	24	0	30	2	6	24
Astrozyten										
CTL	2.011	1.681	1.462	1.683	2.031	4.070	1.511	2.923	2.137	3.364
LPS	2.822	1.228	2.473	2.401	2.065	2.533	1.775	2.698	2.037	2.714
IFN $\gamma$	3.227	1.724	1.669	0.922	3.065	2.027	1.889	1.858	9.542	2.317
LPS+IFN $\gamma$	1.962	1.524	1.127	0.829	1.480	1.718	2.674	1.388	1.554	2.064
LPS+NADA	1.797	2.752	1.484	1.458	1.729	1.302	1.736	1.994	1.354	1.901
IFN $\gamma$ +NADA	2.663	1.522	1.566	2.996	2.249	1.799	1.988	1.707	1.427	1.822
LPS+IFN $\gamma$ +NADA	1.752	3.681	5.019	1.717	1.882	1.338	2.310	2.201	3.160	2.002

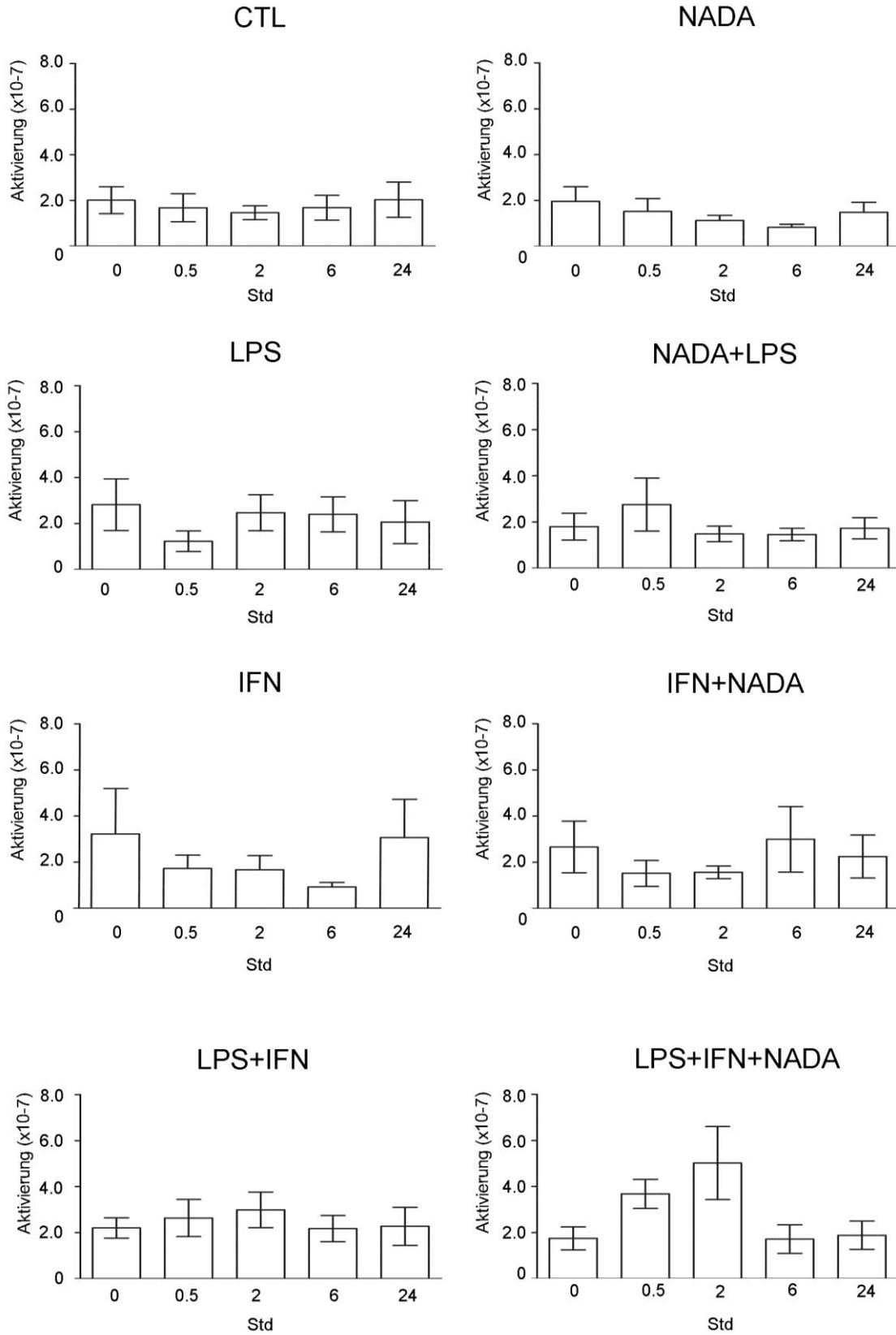
HT22										
CTL	1.197	5.232	2.041	8.715	1.731	1.962	1.208	1.643	1.771	1.959
NADA	13.43	0.3229	1.295	0.9841	1.410	3.174	0.9092	0.9978	1.575	1.642
Glutamate	2.904	0.5177	2.103	1.174	13.65	1.641	0.8147	1.190	1.312	1.270
Carbachol	4.282	7.093	1.532	1.106	1.613	2.224	0.8404	1.184	2.548	1.408
Glutamate+NADA	4.484	0.5588	1.792	0.9877	11.47	1.827	8.320	1.074	1.324	1.161
Carbachol+NADA	4.198	0.5522	2.105	1.100	1.352	1.827	0.6828	0.9568	1.957	1.577
BV2										
CTL	7.578	8.157	8.537	2.839	1.851	1.718	1.976	1.155	2.620	1.802
NADA	2.834	6.548	4.798	1.093	2.389	1.653	1.560	1.205	2.695	1.521
LPS	1.012	2.124	1.471	2.505	2.304	1.719	2.675	2.008	2.770	2.265
LPS+NADA	3.671	2.412	1.078	2.504	1.660	1.113	2.628	1.580	2.714	1.917

A



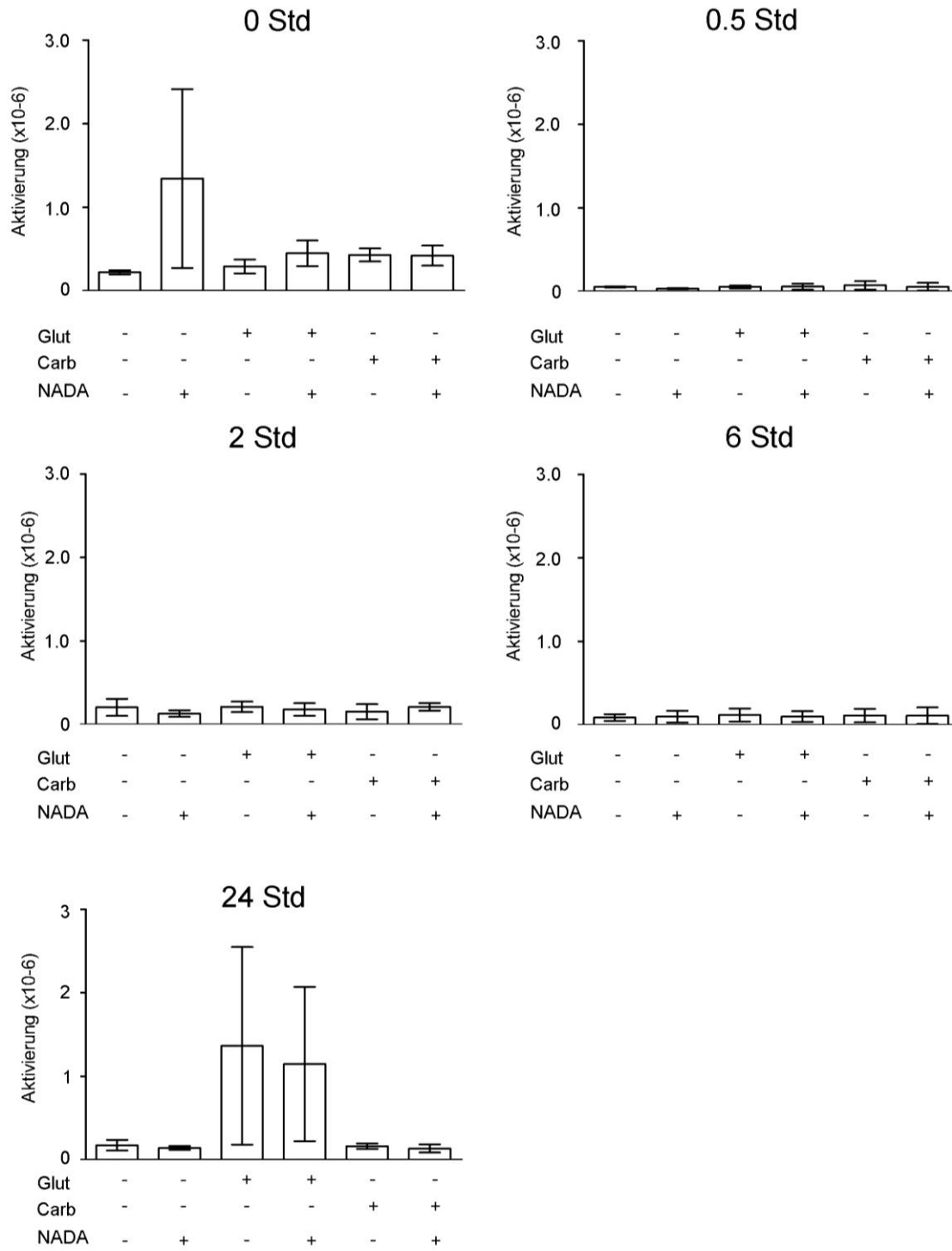


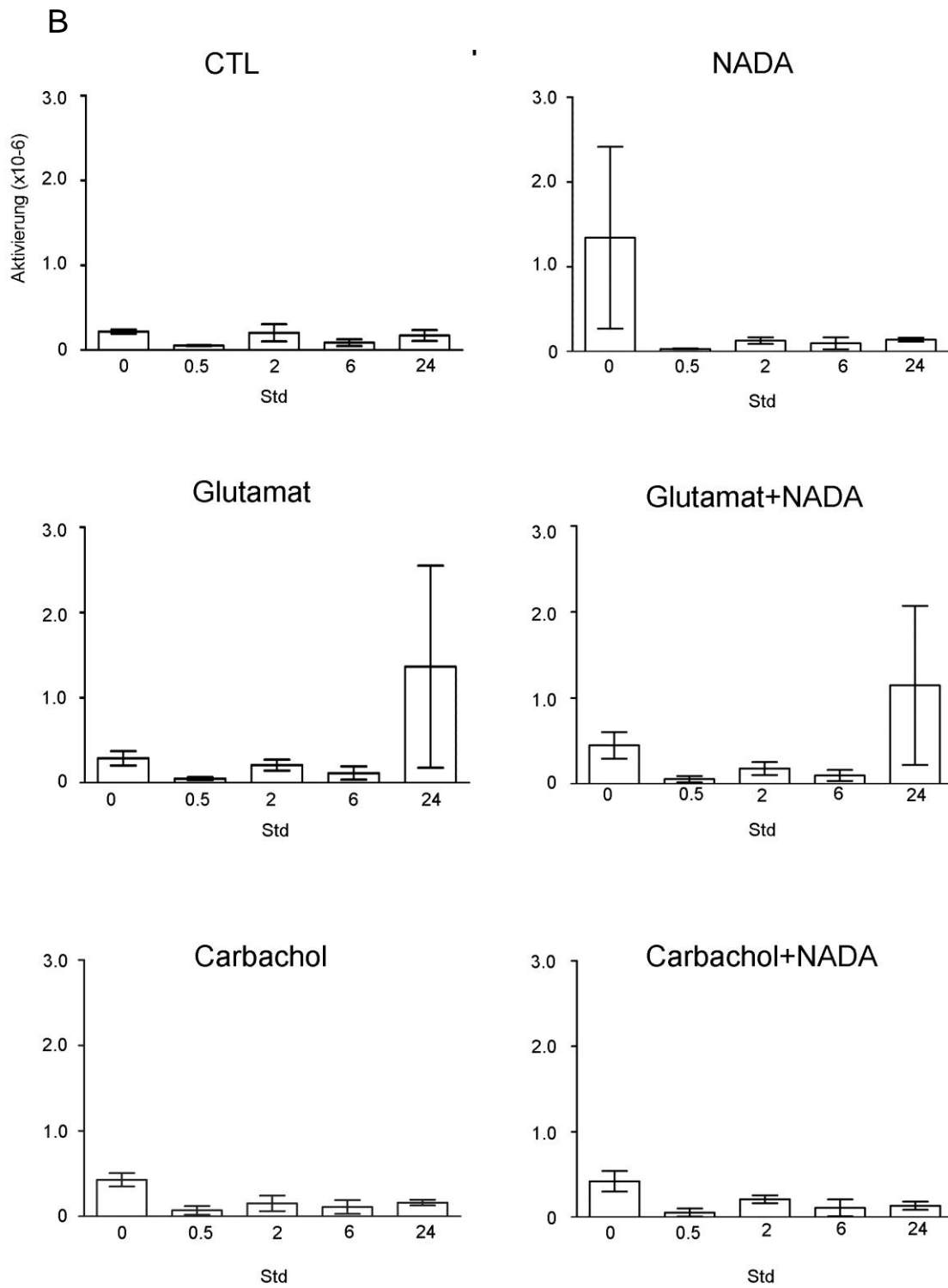
**B**



**Abb.15:** Die Mittelwerte der Verhältnisse zwischen phosphorylierter Form zum Gesamtprotein von p38 MAPK normiert auf die Aktinmenge in primären Astrozyten. A-B: Statistische Analyse (One Way folgend mit multiplen Bonferroni Test). In den Blots mit phosphorylierter Form zum Gesamtprotein von p38 MAPK erkennt man keinen signifikanten Unterschied im Zeitverlauf (A) zwischen den Gruppen (B). Sowohl in der Kontrollgruppe (CTL) als auch nach der Zugabe von NADA, LPS, IFN, LPS zusammen mit IFN und LPS zusammen mit NADA, INF zusammen mit NADA, LPS zusammen mit IFN und NADA ist das Signal von ähnlicher Intensität, weshalb man vermuten kann, dass die Stimuli keinen Effekt auf die Expression von phosphorylierter Form und Gesamtprotein von p38 MAPK in Astrozyten hatten. Fehlerbalken=SEM

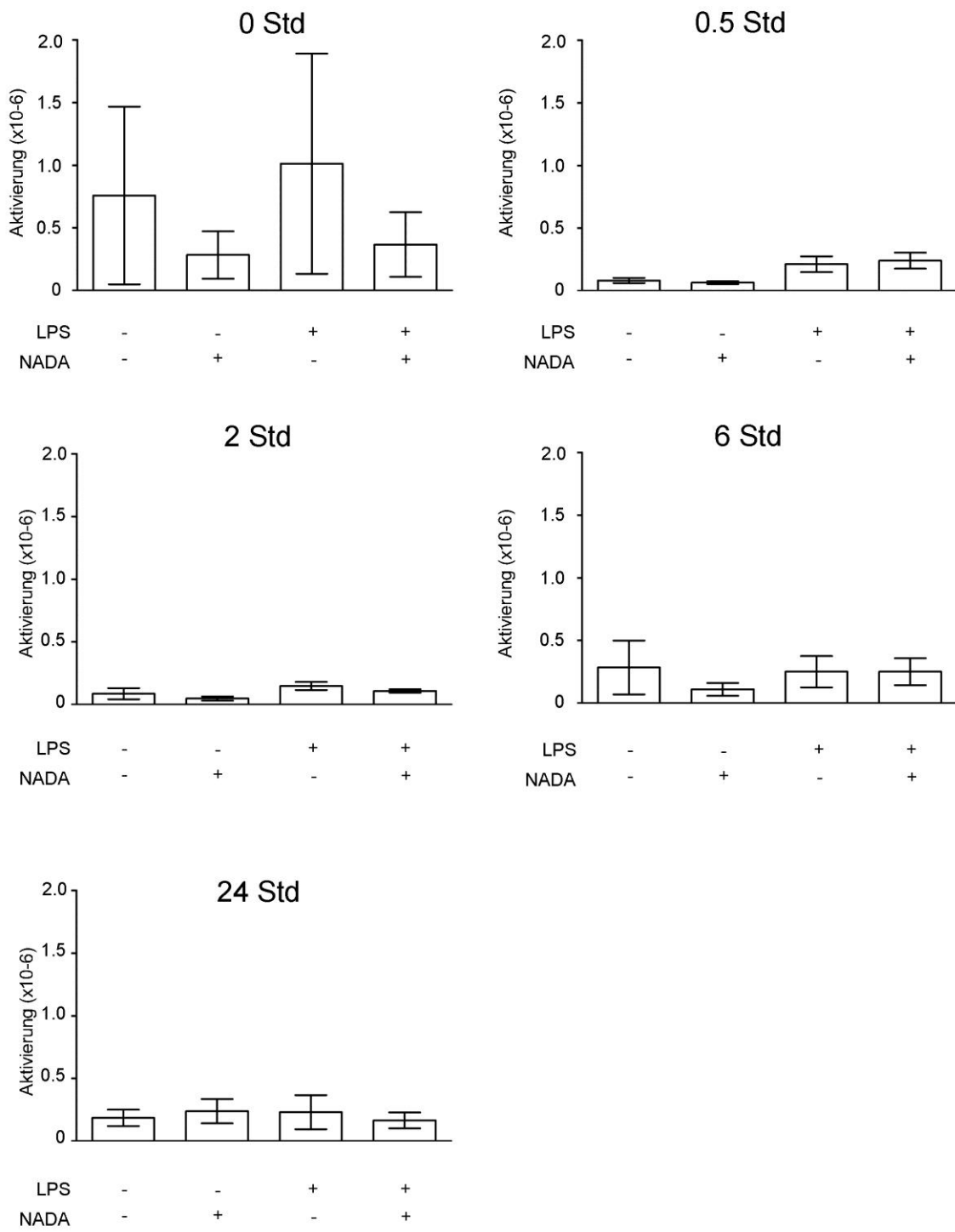
A

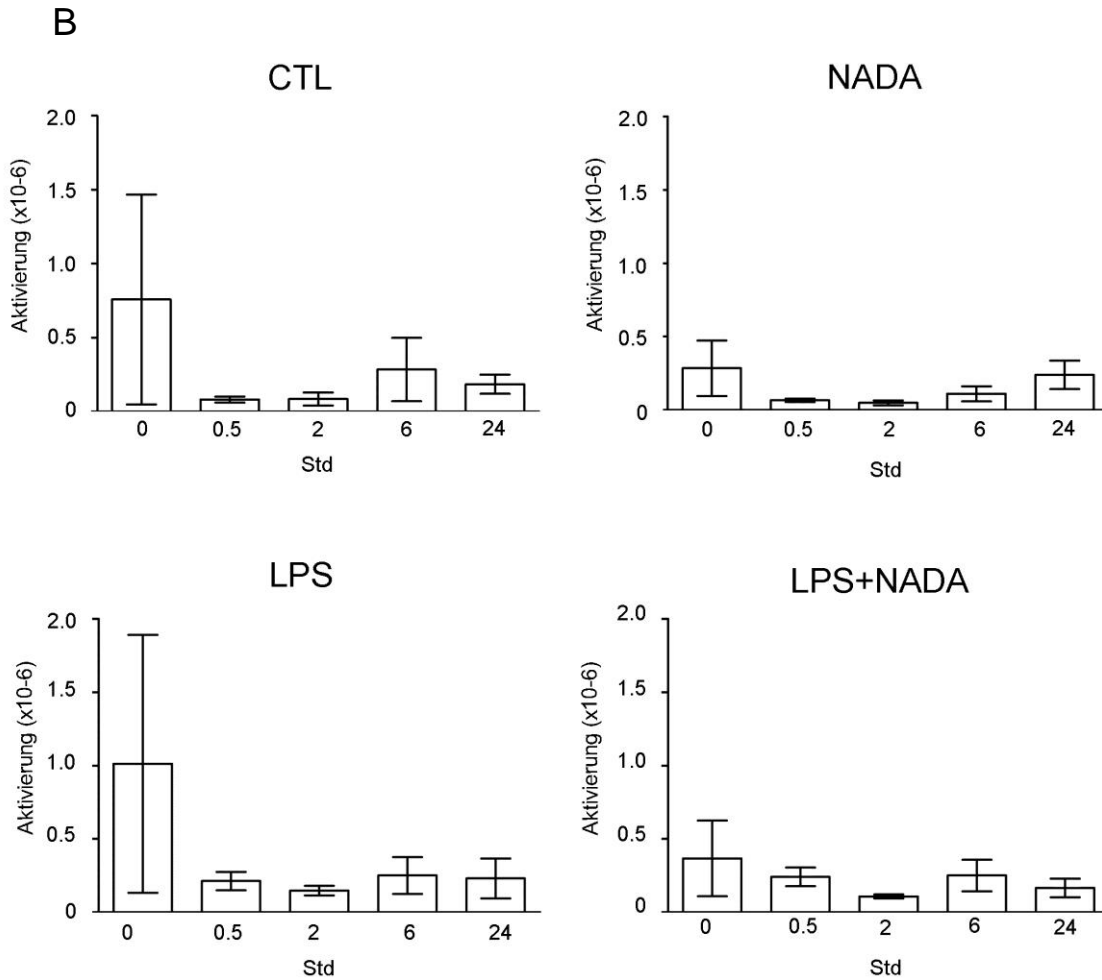




**Abb.16:** Die Mittelwerte der Verhältnisse zwischen phosphorylierter Form zum Gesamtprotein von p38 MAPK normiert auf die Aktinmenge in HT22 Zellen. A-B: Statistische Analyse (One Way mit multiplen Bonferroni Test). In den Blots mit phosphorylierter Form und Gesamtprotein von p38 MAPK erkennt man keinen signifikanten Unterschied im Zeitverlauf (A) zwischen den Gruppen (B). Sowohl in der Kontrollgruppe als auch nach der Zugabe von NADA, Glutamat, Carbachol, Glutamat zusammen mit NADA, Carbachol zusammen mit NADA verändert sich die Signalintensivität nur gering, weshalb man vermuten kann, dass die Stimuli keinen Effekt auf die Expression von phosphorylierter Form und Gesamtprotein von p38 MAPK in HT22 Zellen haben. Nicht signifikant  $p > 0.05$ . Fehlerbalken=SEM

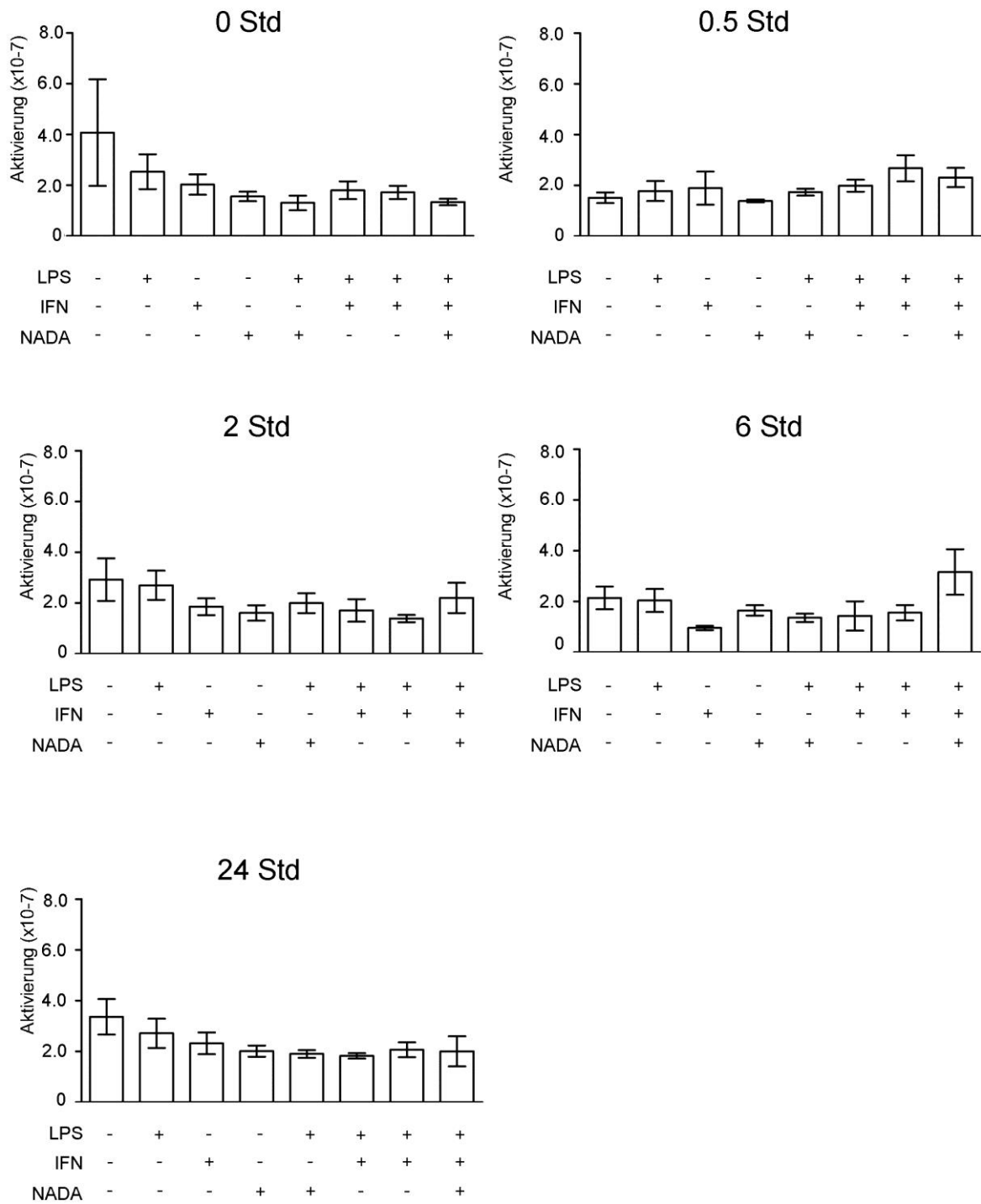
A



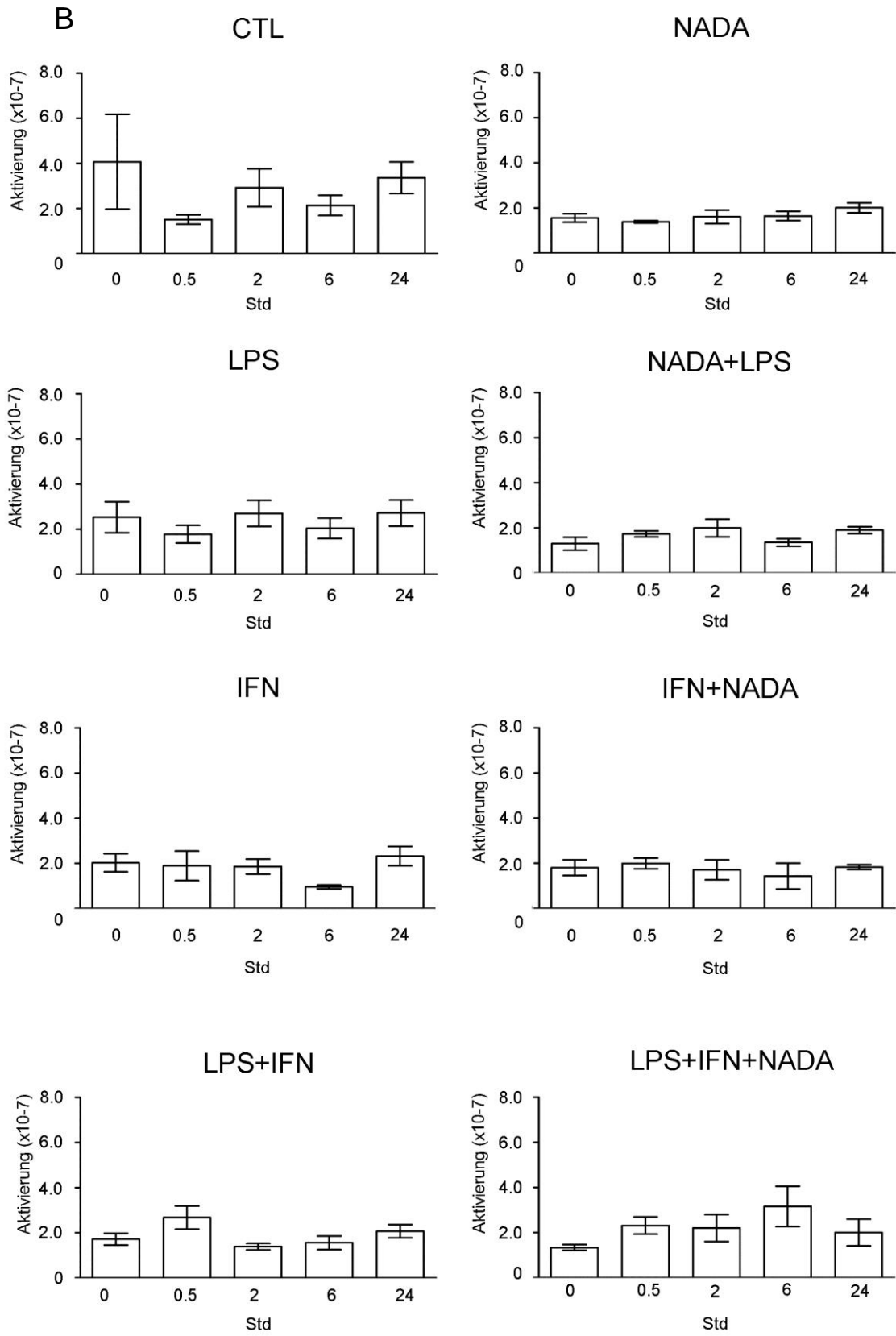


**Abb.17:** Die Mittelwerte der Verhältnisse zwischen phosphorylierter Form zum Gesamtprotein von p38 MAPK normiert auf die Aktinmenge in BV2 Zellen. A-B: Statistische Analyse (One Way mit multiplen Bonferroni Test). In den Blots mit phosphorylierter Form und Gesamtprotein von p38 MAPK erkennt man keinen signifikanten Unterschied im Zeitverlauf (A) zwischen den Gruppen (B). Sowohl in der Kontrollgruppe (CTL) als auch nach der Zugabe von NADA, LPS, LPS zusammen mit NADA ist das Signal von ähnlicher Intensität, weshalb man vermuten kann dass die Stimuli keinen Effekt auf die Expression von phosphorylierter Form und Gesamtprotein von p38 MAPK in BV2 Zellen haben. Fehlerbalken=SEM

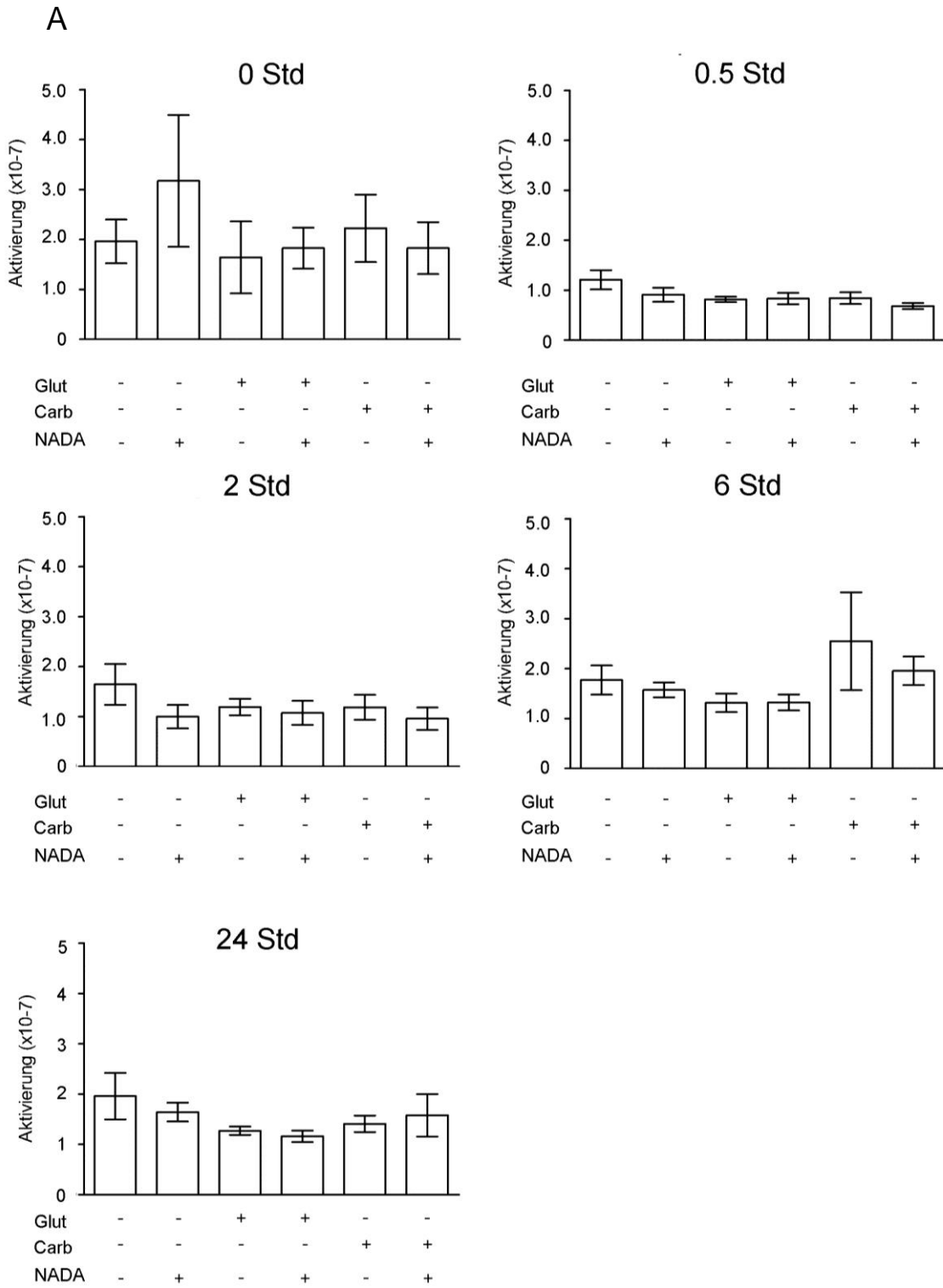
A



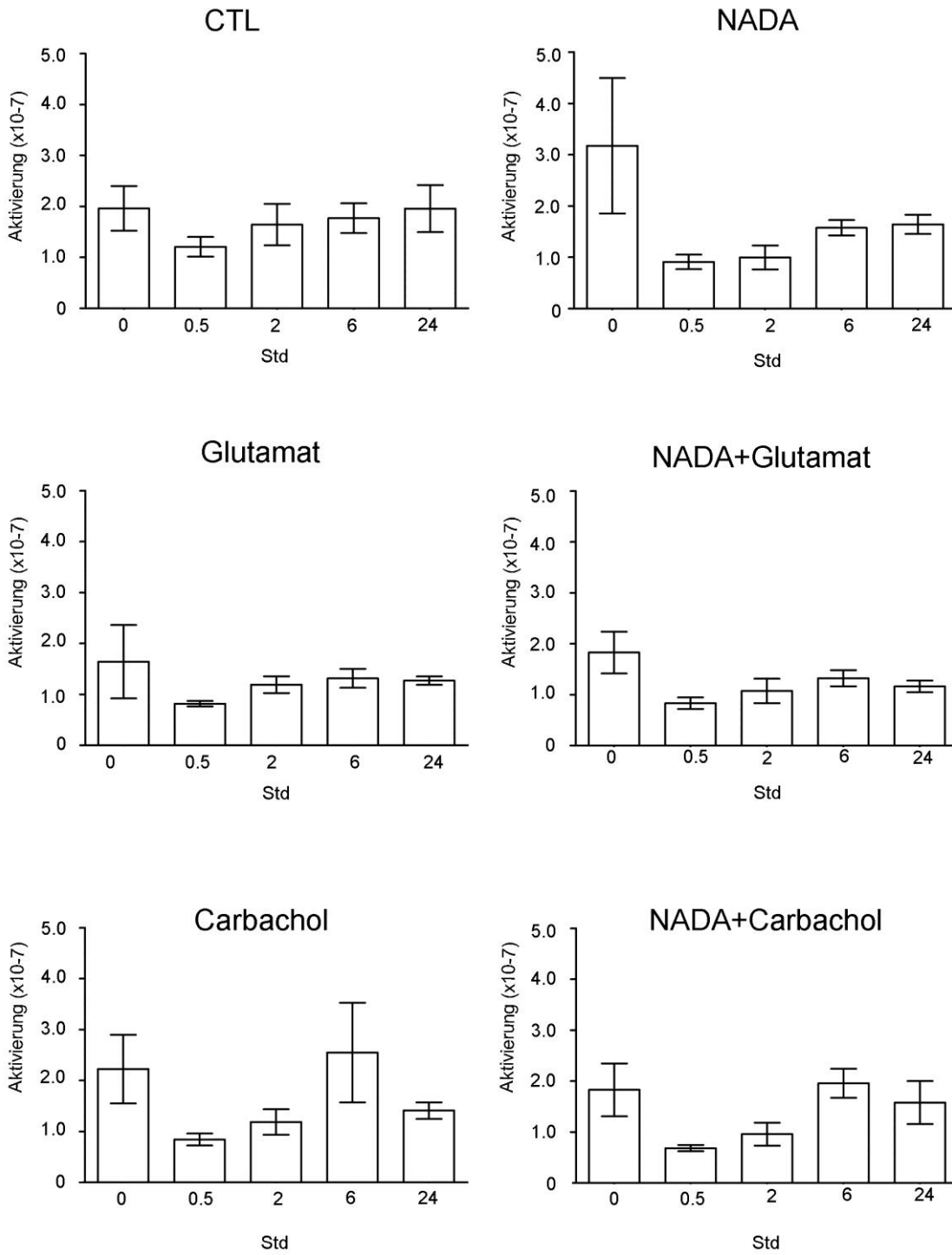




**Abb.18:** Die Mittelwerte der Verhältnisse zwischen phosphorylierter Form zum Gesamtprotein von p44/42 MAPK normiert auf die Aktinmenge in primären Astrozyten. A-B: Statistische Analyse (One Way folgend mit multiplen Bonferroni Test). In den Blots mit phosphorylierter Form zum Gesamtprotein von p44/42 MAPK erkennt man keinen signifikanten Unterschied im Zeitverlauf (A) zwischen den Gruppen (B). Sowohl in der Kontrollgruppe (CTL) als auch nach der Zugabe von NADA, LPS, IFN, LPS zusammen mit IFN und LPS zusammen mit NADA, IFN zusammen mit NADA, LPS zusammen mit IFN und NADA ist das Signal von ähnlicher Intensität, weshalb man schließen kann, dass die Stimuli keinen Effekt auf die Expression von phosphorylierter Form und Gesamtprotein von p44/42 MAPK in Astrozyten hatten. Fehlerbalken=SEM

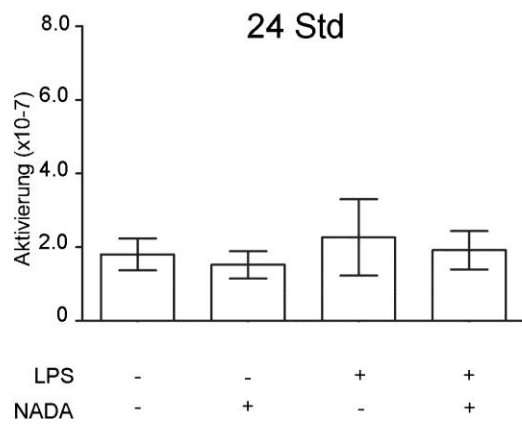
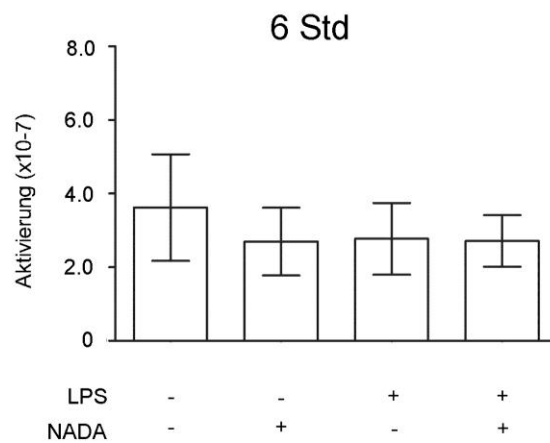
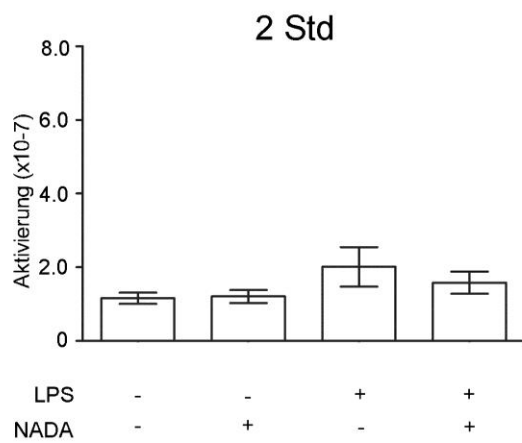
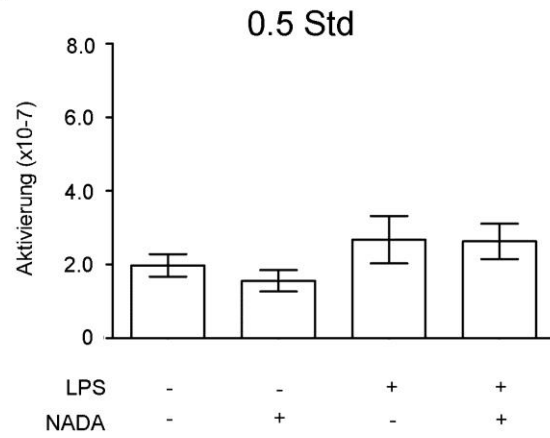
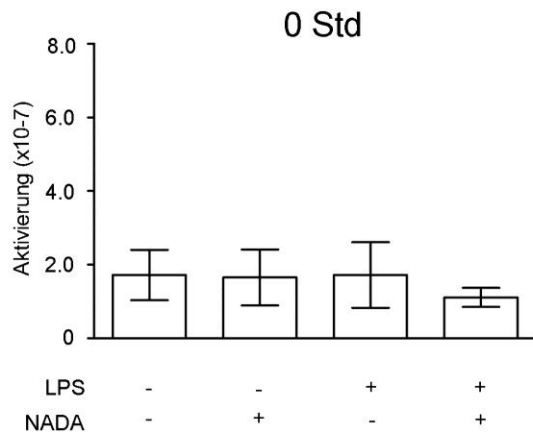


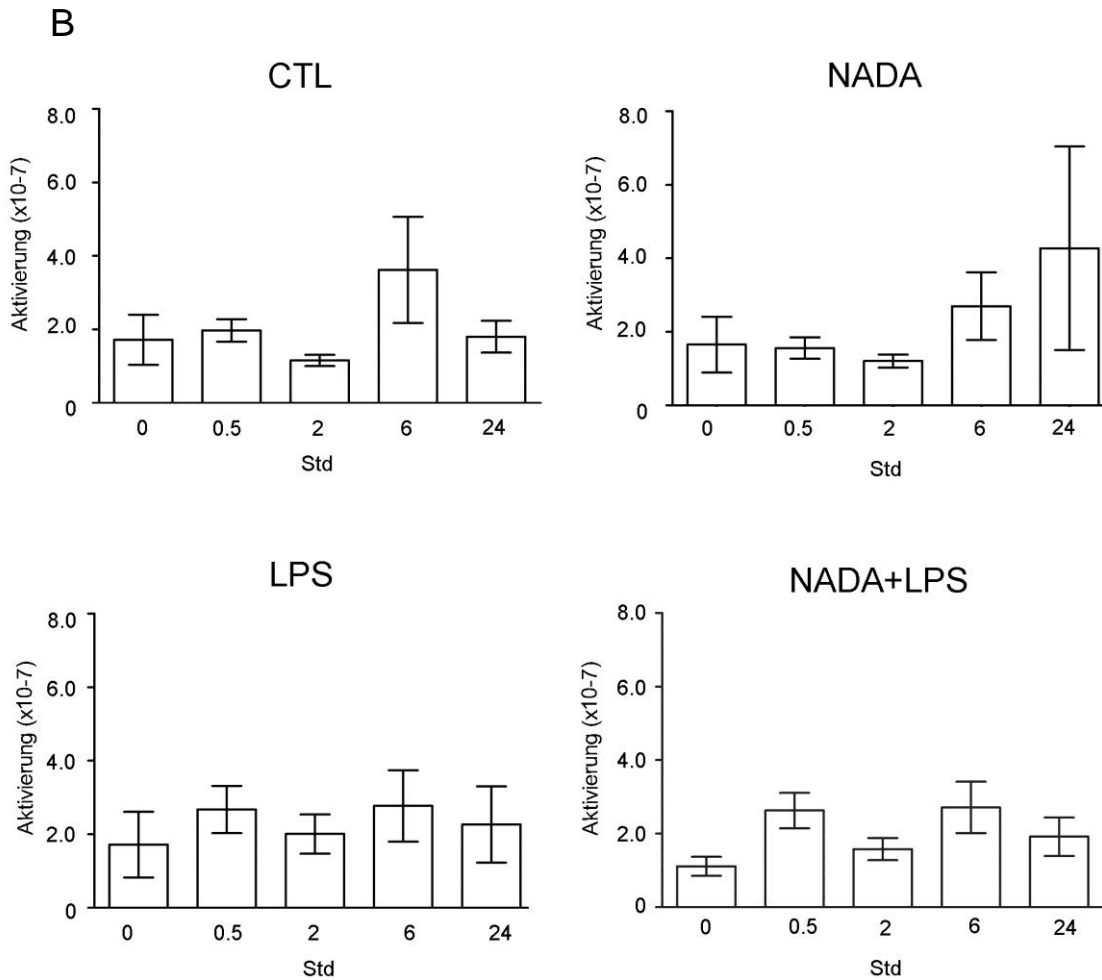
B



**Abb.19:** Die Mittelwerte der Verhältnisse zwischen phosphorylierter Form zum Gesamtprotein von p44/42 MAPK normiert auf die Aktinmenge in HT22 Zellen. A-B: Statistische Analyse (One Way mit multiplen Bonferroni Test). In den Blots mit phosphorylierter Form und Gesamtprotein von p44/42 MAPK erkennt man keinen signifikanten Unterschied im Zeitverlauf (A) zwischen den Gruppen (B). Sowohl in der Kontrollgruppe (CTL) als auch nach der Zugabe von NADA, Carbachol, Glutamat, Carbachol zusammen mit NADA, Glutamat zusammen mit NADA ist die Signalintensivität nahezu unverändert. Diese Stimuli zeigten keinen Effekt auf die Expression von phosphoryliertem Form und Gesamtprotein von p44/42 MAPK in HT22 Zellen. Fehlerbalken=SEM

A





**Abb.20:** Die Mittelwerte der Verhältnisse zwischen phosphorylierter Form zum Gesamtprotein von p44/42 MAPK normiert auf die Aktinmenge in BV2 Zellen. A-B: Statistische Analyse (One Way mit multiplen Bonferroni Test). In den Blots mit phosphorylierter Form und Gesamtprotein von p44/42 MAPK erkennt man keinen signifikanten Unterschied im Zeitverlauf (A) zwischen den Gruppen (B). Sowohl in der Kontrollgruppe (CTL) als auch nach der Zugabe von NADA, LPS und LPS+NADA wird der Signal nahezu konstanter Intensivität detektiert, weshalb man vermuten kann, dass die Stimuli keinen Effekt auf die Expression von phosphorylierter Form zum Gesamtprotein von p44/42 MAPK in BV2 Zellen haben.

Fehlerbalken=SEM

### **3.7 ARA-S allein steigert die Anzahl der IB4 positiven Mikroglia in GCL des GD.**

In ungeschädigten OHSC blieben die Neuronen gut erhalten und es waren nur vereinzelte PI positive Neurone (2.56/GCL, Abb. 20A) und IB4 positive Mikroglia (18.91/GCL, Abb. 20B) in der Körnerzellschicht im Gyrus dentatus zu sehen. Nach der Behandlung mit ARA-S allein blieb die Anzahl der PI positiven Neuronen (17.71/GCL, Abb. 20A) unverändert, die Anzahl der IB4 positiven Zellen dagegen ist stark gestiegen (67.93/GCL, Abb. 20B,  $p < 0.05$  vs. CTL). Nach der NMDA Schädigung kam es zu einem signifikanten Anstieg in der Anzahl der PI positiven Neuronen (74.46/GCL, Abb. 20A) und IB4 positiven Mikroglia (81.06/GCL, Abb. 20B). Nach der Behandlung mit ARA-S von NMDA-geschädigten OHSC kam es zur Reduzierung in der Anzahl der PI positiven Neuronen (NMDA+0.01  $\mu$ M ARA-S: 46.73/GCL; NMDA+1  $\mu$ M ARA-S: 56.29/GCL; NMDA+10  $\mu$ M ARA-S: 52.02/GCL; NMDA+50  $\mu$ M: 55.46/GCL; Abb. 20A) und keiner signifikanten Änderung in der Anzahl der IB4 positiven Mikroglia (NMDA+0.01  $\mu$ M ARA-S: 76.35/GCL; NMDA+1  $\mu$ M ARA-S: 53.58/GCL; NMDA+10  $\mu$ M ARA-S: 86.77/GCL; NMDA+50  $\mu$ M: 80.48/GCL; Abb. 20B).

**Tabelle 25:** Anzahl der PI positiven Neurone in GCL des GD nach der Behandlung mit ARA-S.

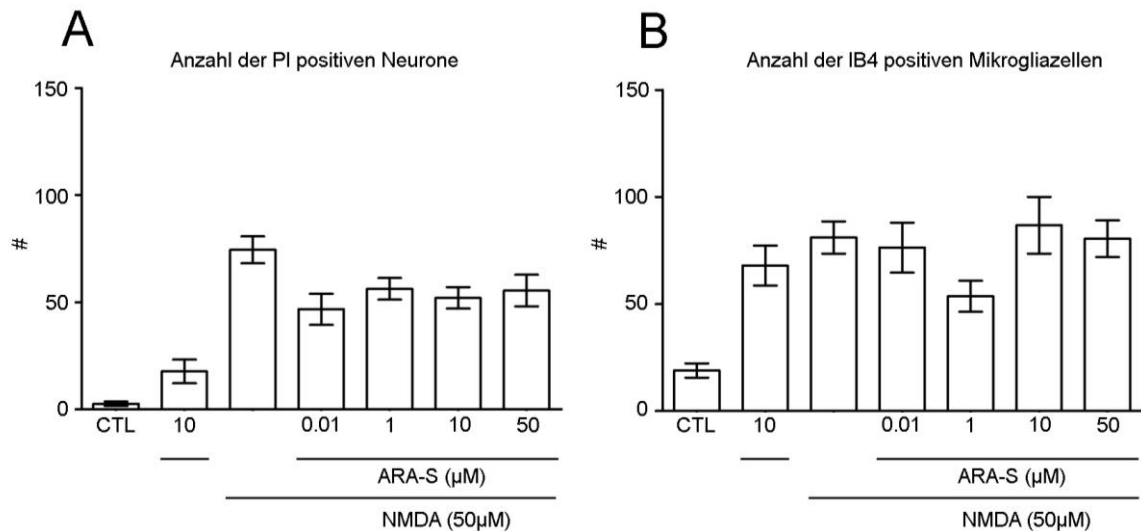
Experimentelle Gruppe	Zellzahl/GCL	Statistik	n=
CTL	2.562		17
10 $\mu$ M ARA-S	17.71	$p > 0.05$ vs. CTL	8
NMDA	74.46		13
NMDA+0.01 $\mu$ M ARA-S	46.73	$p > 0.05$ vs. NMDA	12
NMDA+1 $\mu$ M ARA-S	56.29	$p > 0.05$ vs. NMDA	17
NMDA+10 $\mu$ M ARA-S	52.02	$p > 0.05$ vs. NMDA	14



NMDA+50 $\mu$ M ARA-S	55.46	$p > 0.05$ vs. NMDA	12
-----------------------	-------	---------------------	----

**Tabelle 26:** Anzahl der IB4 positiven Mikroglia in GCL des GD nach der Behandlung mit ARA-S.

Experimentelle Gruppe	Zellzahl/GCL	Statistik	n=
CTL	18.91		19
10 $\mu$ M ARA-S	67.93	$p < 0.05$ vs. CTL	5
NMDA	81.06		18
NMDA+0.01 $\mu$ M ARA-S	76.35	$p > 0.05$ vs. NMDA	15
NMDA+1 $\mu$ M ARA-S	53.58	$p > 0.05$ vs. NMDA	16
NMDA+10 $\mu$ M ARA-S	86.77	$p > 0.05$ vs. NMDA	14
NMDA+50 $\mu$ M ARA-S	80.48	$p > 0.05$ vs. NMDA	14



**Abb.21:** Statistische Analyse der Mittelwerte von PI positiven Neuronen und IB4 positiven Mikroglia nach der Behandlung mit ARA-S (One Way Test mit Dunnet Test)

### **3.8 OMDM-1**

Um festzustellen, ob die Blockierung des AMT zu Änderungen in der Anzahl der degenerierenden PI positiven Neurone unter Kontrollbedingungen und nach der NMDA Schädigung führt, wurde OMDM-1 benutzt.

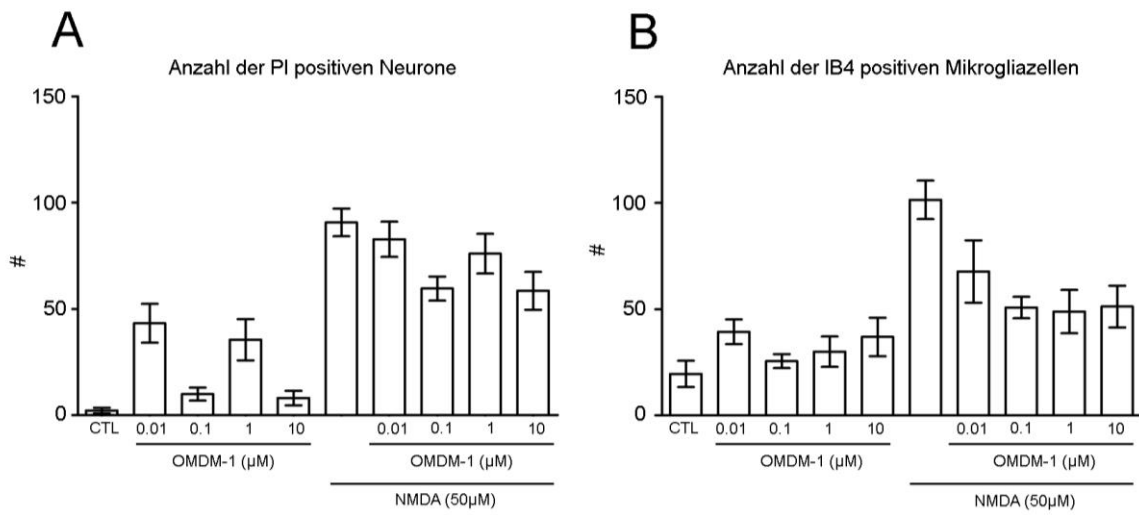
In ungeschädigten OHSC waren nur vereinzelte PI positive Neurone (2.167/GCL, Abb. 21C) und IB4 positive Mikroglia (35.11/GCL, Abb. 21D) in der Körnerzellschicht im Gyrus dentatus zu finden. Nach der Behandlung mit OMDM-1 allein hat sich die Anzahl der PI positiven Neuronen nicht geändert (0.01  $\mu$ M OMDM-1: 43.22/GCL,  $p < 0.05$  vs. CTL; 0.1  $\mu$ M OMDM-1: 9.907/GCL,  $p > 0.05$  vs. CTL; 1  $\mu$ M OMDM-1: 35.48,  $p < 0.05$  vs. CTL; 10  $\mu$ M OMDM-1: 8.037,  $p > 0.05$  vs. CTL; Abb. 21C), die Anzahl der IB4 positiven Zellen blieb auf dem Kontrollniveau (0.01  $\mu$ M OMDM-1: 39.29/GCL,  $p > 0.05$  vs. CTL; 0.1  $\mu$ M OMDM-1: 25.50/GCL,  $p > 0.05$  vs. CTL; 1  $\mu$ M OMDM-1: 30,  $p > 0.05$  vs. CTL; 10  $\mu$ M OMDM-1: 36.92,  $p > 0.05$  vs. CTL; Abb. 21D). Nach der NMDA Schädigung kam es zu einem signifikanten Anstieg in der Anzahl der PI positiven Neuronen (90.72/GCL, Abb. 21C) und IB4 positiven Mikroglia (96.35/GCL, Abb. 21 B). Nach der Applikation von OMDM-1 zu den NMDA-geschädigten OHSC blieb die Anzahl der PI positiven Neuronen unverändert (NMDA+0.01  $\mu$ M OMDM-1: 82.78/GCL,  $p > 0.05$  vs. NMDA; NMDA+0.1  $\mu$ M OMDM-1: 59.58/GCL,  $p < 0.05$  vs. NMDA; 1  $\mu$ M OMDM-1: 76.02/GCL,  $p > 0.05$  vs. NMDA; 10  $\mu$ M OMDM-1: 58.52/GCL,  $p < 0.05$  vs. NMDA; Abb. 21C) und diese Behandlung führte zu keiner signifikanten Änderung in der Anzahl der IB4 positiven Mikroglia (NMDA+0.01  $\mu$ M OMDM-1: 67.72/GCL,  $p > 0.05$  vs. NMDA; NMDA+0.1  $\mu$ M OMDM-1: 50.72/GCL,  $p < 0.05$  vs. NMDA; 1  $\mu$ M OMDM-1: 48.87/GCL,  $p < 0.05$  vs. NMDA; 10  $\mu$ M OMDM-1: 51.25/GCL,  $p < 0.05$  vs. NMDA; Abb. 21D).

**Tabelle 27:** Die Anzahl der PI positiven Neuronen in GCL des GD nach der Behandlung mit OMDM-1.

Experimentelle Gruppe	Zellzahl/GCL	Statistik	n=
CTL	2.17		12
0.01 $\mu$ M OMDM-1	43.22	$p < 0.05$ vs. CTL	9
0.1 $\mu$ M OMDM-1	9.91	$p > 0.05$ vs. CTL	18
1 $\mu$ M OMDM-1	35.48	$p < 0.05$ vs. CTL	16
10 $\mu$ M OMDM-1	8.04	$p > 0.05$ vs. CTL	18
NMDA	90.72		19
NMDA+0.01 $\mu$ M OMDM-1	82.78	$p > 0.05$ vs. NMDA	13
NMDA+0.1 $\mu$ M OMDM-1	59.58	$p < 0.05$ vs. NMDA	18
NMDA+1 $\mu$ M OMDM-1	76.02	$p > 0.05$ vs. NMDA	16
NMDA+10 $\mu$ M OMDM-1	58.52	$p < 0.05$ vs. NMDA	11

**Tabelle 28:** Die Anzahl der IB4 positiven Mikroglia in GCL des GD nach der Behandlung mit OMDM-1.

Experimentelle Gruppe	Zellzahl/GCL	Statistik	n=
CTL	19.50		7
0.01 $\mu$ M OMDM-1	39.29	$p > 0.05$ vs. CTL	7
0.1 $\mu$ M OMDM-1	25.50	$p > 0.05$ vs. CTL	15
1 $\mu$ M OMDM-1	30.00	$p > 0.05$ vs. CTL	12
10 $\mu$ M OMDM-1	36.92	$p > 0.05$ vs. CTL	8
NMDA	101.4		10
NMDA+0.01 $\mu$ M OMDM-1	67.72	$p > 0.05$ vs. CTL	7
NMDA+0.1 $\mu$ M OMDM-1	50.72	$p < 0.05$ vs. NMDA	13
NMDA+1 $\mu$ M OMDM-1	48.87	$p < 0.05$ vs. NMDA	13
NMDA+10 $\mu$ M OMDM-1	51.25	$p < 0.05$ vs. NMDA	6



**Abb. 22:** Statistische Analyse der Mittelwerten von PI positiven Neuronen und IB4 positiven Mikroglia nach der Behandlung mit OMDM-1 (One Way mit Dunnet Test).

## 4. Diskussion

Traumatische Verletzungen des Gehirns (TBI) stellen ein großes medizinisches und sozioökonomisches Problem dar. TBI und deren Folgen zählen zu den häufigsten Ursachen für Tod und Invalidität bei jüngeren Menschen. Die primäre Schädigung löst eine Kaskade von Ereignissen aus, die durch molekulare und zelluläre Reaktionen zu einer sekundären Schädigung führen. Zu den Hauptmerkmalen der ischämischen und traumatischen Gehirnverletzungen gehören Exzitotoxizität, oxidativer Stress und die aktive inflammatorische Antwort. Sie führen zur Synthese und Akkumulation von Endocannabinoiden, die multipotente antioxidative, vasodilatorische und antiinflammatorische Eigenschaften besitzen. Endocannabinoide, die zum neuroprotektiven und neuroregenerativen System des ZNS gehören, verursachen eine Verminderung und Abschwächung des initialen Schadens (Shohami *et al.*, 2011). Die der primären folgende sekundäre Schädigung kann sich über mehrere Stunden oder Tage entwickeln (Haddad *et al.*, 2012). Da bislang keine effektive Therapie der neuronalen Schädigung existiert, konzentriert sich die Patientenversorgung auf symptomische Behandlungen. Durch die Optimierung der Sauerstoffversorgung vom Gehirn und in der Peripherie, was sowohl durch die Kontrolle des Blutdrucks und der Durchblutung als auch durch chirurgische Eingriffe, wie die Behebung der TBI-Ursache, beziehungsweise die Entfernung von zerstörtem Gewebe geschehen können, können weitere Schäden vermieden werden (National Institute of Neurological Disorders and Stroke). Leider existiert kein wirksames Medikament, mit dem direkt nach einer primären Schädigung die Patienten behandelt werden können. Die Endocannabinoide scheinen das Potential zu besitzen, die sekundäre Schädigung zu verhindern.

In den vorliegenden Untersuchungen wurde das neuroprotektive Potential von Endocannabinoiden, vor allem NADA und ARA-S, sowie dem Modulator OMDM-1, welcher in den Metabolismus von Endocannabinoiden eingreift, bestimmt. Ziel der vorliegenden Studie war es, die potentiellen neuroprotektiven Effekte von NADA und dessen Wirkungsweise in OHSC zu untersuchen und die beteiligten intrazellulären Signalkaskaden zu charakterisieren. Für diese Fragestellung wurden organotypische hippocampale Schnittkulturen gewählt, die eine *in vivo* Situation widerspiegeln, jedoch keine peripheren Immunzellen wie Makrophagen oder Lymphozyten besitzen. Dieses Model ermöglicht die Analyse der intrinsischen Mechanismen nach der Schädigung, die durch Zugabe von NMDA in OHSC ausgelöst werden. In OHSC führt die Applikation von NMDA zu ausgeprägter Exzitotoxizität, welche den Mechanismen den TBI *in vitro* sehr ähnlich ist.

#### ***4.1 Endocannabinoide als intrinsische Protektoren***

Endocannabinoide haben unter anderem einen protektiven Effekt auf die Zellen des ZNS in den unterschiedlichen Läsionsmodellen, wie Ischämie, TBI, Schlaganfälle und Exzitotoxizität (Karanian *et al.*, 2005a; Karanian *et al.*, 2005b; Marsicano *et al.*, 2003; Nagayama *et al.*, 1999; Panikashvili *et al.*, 2001; Shen *et al.*, 1998; Sinor *et al.*, 2000; Wallace *et al.*, 2002). Da NADA erst vor kurzem als endogener Stoff identifiziert wurde, stellte man hier die Hypothese auf, dass NADA, ähnlich wie andere Cannabinoide, z.B. 2-AG, WIN 55,212-2, abnCBD und AEA, neuroprotektive Eigenschaften besitzt (Bisogno *et al.*, 2000; Eljaschewitsch *et al.*, 2006; Huang *et al.*, 2002; Koch *et al.*, 2011b; Kreutz *et al.*, 2007; Maresz *et al.*, 2007; Mechoulam *et al.*, 2007; Panikashvili *et al.*, 2001; Sinor *et al.*, 2000; Sun *et al.*, 2007).

Sowohl unter physiologischen als auch unter pathologischen Umständen mediiieren Endocannabinoide im Gehirn verschiedene Prozesse. Im Gegensatz zu den klassischen Neurotransmittern, werden Endocannabinoide nicht in Vesikeln gespeichert, sondern als Antwort auf bestimmte Stimuli bei Bedarf gebildet (Di Marzo *et al.*, 1994; Piomelli, 2003; Scotter *et al.*, 2010; Stella *et al.*, 1997). Der Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  Konzentration ist ein intrazellulärer Trigger für die Biosynthese von Endocannabinoiden. Zu den Endocannabinoiden, die im Gehirn produziert werden, gehören unter anderem 2-AG und AEA. Die Konzentration von 2-AG ist annähernd 200 mal höher als die von AEA, jedoch sind die Expressionsmuster in den unterschiedlichen Arealen ähnlich mit höchsten Werten im Hirnstamm, Striatum und Hippokampus und mit niedrigsten im Cortex, Diencephalon und Kleinhirn (Bahr *et al.*, 2006; Shohami *et al.*, 2011). Die Endocannabinoidkonzentration steigt als Antwort auf gezielte Stimulation oder auf pathologische Ereignisse wie Kainatsäure induzierte Anfälle, Glutamat-induzierte Exzitotoxizität und Trauma- an (Bahr *et al.*, 2006; Bisogno *et al.*, 1999; Bradshaw *et al.*, 2006; Di Marzo *et al.*, 2000; Giuffrida *et al.*, 2004; Hansen *et al.*, 2001; Hohmann *et al.*, 2005; Maccarrone *et al.*, 2003; Marsicano *et al.*, 2003; Marsicano *et al.*, 2002; Panikashvili *et al.*, 2001). Der Fakt, dass das eCB-System nach solchen Ereignissen aktiviert wird, deutet darauf hin, dass von Endocannabinoiden vermittelte Signalwege zu einem kompensatorischen Behebungsmechanismus gehören und die Neurone schützen (Shen *et al.*, 1998; Shohami *et al.*, 2011). Im Modell des NMDA geschädigten OHSC, wurde bereits gezeigt, dass 2-AG, PEA, WIN und abnCBD neuroprotektive Eigenschaften besitzen und die Überlebensrate der Neurone steigern (Koch *et al.*, 2011a; Koch *et al.*, 2011b; Kreutz *et al.*, 2009; Kreutz *et al.*, 2007).

#### **4.1.1 Klinische Anwendung von Cannabinoiden**

Es ist bekannt, dass Endocannabinoide mehrere physiologische und pathologische Funktionen modulieren. Auf diesen Mechanismen beruht die Anwendung der Endocannabinoide bei diversen Krankheitsbildern.

Zurzeit sind drei auf Cannabis basierende Medikamente im klinischen Einsatz, Cesamet (Nabilone, ein synthetisches Derivat des THC), Marinol (Dronabinol, synthetisches THC) und Sativex (Kombination aus THC und Cannabidiol). Cesamet und Marinol werden als Antiemetikum während der Chemotherapie eingesetzt. Sativex ist bei Patienten mit Multipler Sklerose und bei Patienten mit zentralen Schmerzen und Spastiken wirksam. Darüber hinaus spricht das neuroprotektive, antiinflammatorische und antitumorale Potential der Cannabinoide für sich als vielversprechendes Therapeutikum (Downer, 2011; Wang *et al.*, 2008; World Drug Report, 2011).

#### ***4.2 NADA ist ein neuartiges, neuroprotektives, aber zugleich wenig untersuchtes Endocannabinoid***

NADA wurde im Jahr 2000 erstmalig synthetisiert. Im nanomolaren Konzentrationsbereich wirkt es auf CB und TRPV1 Rezeptoren, verfügt dabei jedoch über eine höhere Selektivität für CB1 als für CB2 Rezeptoren (Bisogno *et al.*, 2000; Huang *et al.*, 2002). Zwei Jahre nach erstmaliger Synthese wurde NADA zum ersten Mal aus dem Hirngewebe isoliert und in höheren Konzentrationen im Striatum und Hippokampus (1.75 pmol/g Nassgewicht) gemessen (Bradshaw *et al.*, 2006; Huang *et al.*, 2002). Bis heute sind keine Daten über NADA Konzentration im Liquor und im



Serum verfügbar. Die hier verwendeten NADA Konzentrationen sind mit endogenen Konzentrationen von anderen Endocannabinoiden vergleichbar.

**Tabelle 29:** Die potentiellen Interaktionen von NADA mit unterschiedlichen Rezeptoren und Enzymen.

Enzym/ Rezeptor	Effekt	Konzentration	Messsystem	Referenz
p112 LO	Inhibitor	IC <sub>50</sub> =150±5nM	Activity Assay	(Prusakiewicz <i>et al.</i> , 2007)
TRPV1	Aktivator	K <sub>d</sub> =5.49±0.68 µM EC <sub>50</sub> =40±6 nM (Human) EC <sub>50</sub> =48±7 nM (Ratte)	[ <sup>3</sup> H]RTX Binding Assay, Calcium Imaging; HEK-293-TRPV1; CHO-CB1	(Huang <i>et al.</i> , 2002; Toth <i>et al.</i> , 2003)
TRPM8	Antagonist	Submicromolar	HEK-293 transfiziert mit TRPM8 Rezeptor (human)	(De Petrocellis <i>et al.</i> , 2007)
CB1	Agonist	pEC <sub>50</sub> =6.15±0.09 K <sub>i</sub> =0.25±0.13 (0.8 µM) K <sub>i</sub> =250 nM	Bindungsassay, Gehirn der Ratte; [ <sup>3</sup> H]SR141716A Binding Assay (Ratte)	(Bisogno <i>et al.</i> , 2000; Huang <i>et al.</i> , 2002)
CB2	Agonist	K <sub>i</sub> =12.0±4.0 µM	Bindungsassay, Milz der Ratte	(Bisogno <i>et al.</i> , 2000)
abnCBD	O1918 antagonistisierend	pEC <sub>50</sub> =6.39±0.12 µM	kleine mesenterische Venen der Ratte	(O'Sullivan <i>et al.</i> , 2004)
MAGL	Inhibitor	pIC <sub>50</sub> =6.11±0.086 I <sub>50</sub> =0.78 µM	NPA Assay; radiochemische Assay	(Bjorklund <i>et al.</i> , 2010)
FAAH	Inhibitor	IC <sub>50</sub> =19-100 µM	N18TG2 Zellen	(Bisogno <i>et al.</i> , 2000)
PPARγ	Agonist	1-20 µM	GW9662 (1µM), vasorelaxierende Effekte	(O'Sullivan, 2007)
Dopamin Rezeptor 1	Keine Affinität	0.1-10 µM	Gehirnmembranenisolation der Ratte	(Bisogno <i>et al.</i> , 2000)
Dopamin Rezeptor 2	Keine Affinität	0.1-10 µM	Proliferation von MCF-7 Zellen wurde nicht bei D2 Antagonist (Haloperidol) beeinflusst; Gehirnmembranenisolation	(Bisogno <i>et al.</i> , 2000; Huang <i>et al.</i> , 2002)

			der Ratte	
spannungsges- teuerte Natriumkanäle	Inhibitor	EC <sub>50</sub> =21µM	Binding Assay (Maus)	(Duan <i>et al.</i> , 2008)

Nachdem im Jahr 2008 gezeigt wurde, dass NADA den oxidativen Stress in kultivierten Kleinhirnneuronen reduziert (Bobrov *et al.*, 2008), wurde in dieser Arbeit die Hypothese aufgestellt und überprüft, ob NADA protektive Effekte auf das Überleben der degenerierenden Neurone hat. Die vorliegenden Befunde liefern einen ersten Hinweis für die neuroprotektive Wirkung von NADA. Die Konzentrationsabhängigkeit scheint einer Gaußschen Verteilung zu genügen. Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob die beobachteten Effekte direkt über neuronale CB1 Rezeptoren oder indirekt über gliöse Rezeptoren vermittelt werden. NADA besitzt eine antioxidative und antiinflammatorische Wirkung in Mikrogliaeinzelzellkulturen (Navarrete *et al.*, 2009; Navarrete *et al.*, 2010). Die Anzahl der IB4 positiven Mikroglia in OHSC ist nach der NADA Zugabe zu NMDA geschädigten OHSC gesunken, jedoch korreliert diese Wirkung nicht mit den neuroprotektiven Effekten. Die beobachtete Protektion kann direkt über Neurone oder über Astrozyten vermittelt werden oder Mechanismen einschließen, die mit Änderungen in der Anzahl der Mikroglia nicht einhergehen.

#### ***4.3 Mechanismen der NADA medierter Aktion und Beteiligung von CB Rezeptoren***

Nachdem in dieser Untersuchung dargelegt wurde, dass NADA sowohl in niedrigen als auch in höheren Konzentration neuroprotektiv wirkt, wurde der Fokus auf den

Mechanismus gelegt. Es ist bekannt, dass NADA ein potenter Agonist für die CB1 Rezeptoren, die in hohem Maße im Hippokampus exprimiert werden, ist (Bisogno *et al.*, 2000). Mit Hilfe des CB1 Rezeptor Antagonists - AM251 wurde geprüft, ob NADA medierte Effekte über diesen Rezeptor vermittelt werden. Die Neuroprotektion von 1 nM NADA konnte erfolgreich mittels AM251 blockiert werden. Der protektive Effekt von NADA in einer hohen Dosis (10 µM) wurde jedoch nicht beeinflusst, was darauf schließen lässt, dass weitere Rezeptoren oder intrazelluläre Signalwege beteiligt sein könnten. NADA beeinträchtigt in höheren Konzentrationen die anderen Komponenten des eCB-Systems, wie FAAH und MAGL, als entscheidende abbauende Enzyme. Sowohl FAAH und MAGL sind im Hilus und in der Lamina molecularis des GD zu finden (Egertova *et al.*, 2003; Egertova *et al.*, 1998; Ludanyi *et al.*, 2011; Tsou *et al.*, 1998).

Bjorklund *et al.* haben gezeigt, dass die MAGL Aktivität nach NADA Zugabe signifikant gehemmt wurde. Diese Ergebnisse wurden mit Hilfe zweier Experimente gewonnen: Im ersten Test wurde die rekombinante humane MAGL (Zelllysat und das gereinigte Enzym) und 4-Nitrophenylacetat (NPA) als Substrat benutzt. Im zweiten eine radiochemische Aktivitätsmessungen im Gewebeextrakt aus dem Rattenhirn und 2-Oleoylglycerol verwendet (Bjorklund *et al.*, 2010). Die Blockade eines oder beider Enzyme fördert den Anstieg der AEA und der 2-AG Konzentration in OHSC. In früheren Arbeiten wurde gezeigt, dass 2-AG im Gegensatz zu AEA eine neuroprotektive Wirkung in OHSC nach der NMDA Schädigung hat und dass 2-AG über abnCBD Rezeptoren, die auf Mikroglia vorkommen, wirkt (Kreutz *et al.*, 2009; Kreutz *et al.*, 2007). Es wurde ebenfalls gezeigt, dass NADA im mikromolaren Bereich über eine MAGL Blockade zum Anstieg der 2-AG Konzentration führen kann. Zusätzlich hat O1918, ein selektiver abnCBD Antagonist, die vasorelaxanten Effekte

von NADA inhibiert und somit die Hinweise auf die Beteiligung des abnCBD Rezeptors geliefert (O'Sullivan *et al.*, 2004). Allerdings konnte in dieser Arbeit nicht gezeigt werden, dass die Effekte von NADA direkt über abnCBD Rezeptoren vermittelt werden, da die NADA medierte Protektion nach Zugabe von O1918 unverändert blieb.

Um die NADA vermittelte Aktivierung von CB1 Rezeptoren zu charakterisieren, wurden Experimente mit autaptischen hippocampalen Neuronen durchgeführt. Auf der Grundlage, dass die klassischen Endocannabinoide DSE und DSI an glutamatergen bzw. an GABAergen Neuronen beeinflussen, wurden die Experimente mit NADA im Modell der autaptischen hippocampalen Neurone durchgeführt (Straiker *et al.*, 2005). In diesen elektrophysiologischen Untersuchungen hat NADA in den Konzentrationen 1  $\mu$ M und 10  $\mu$ M keinen Einfluss auf die exzitatorische synaptische Übertragung. Dieser Befund lässt die Folgerung zu, dass NADA seine Effekte anders als 2-AG entfaltet und seine Wirkungen in NMDA-geschädigten OHSC von Calciumsignalwegen unabhängig sind.

NADA ist ein Ligand für die CB2 Rezeptoren. Die Affinität dieser Bindung ist viel schwächer als die CB1-Rezeptoraffinität (Bisogno *et al.*, 2000). Die CB2 Rezeptoren kommen vor allem auf Immunzellen vor und sind zum größten Teil in der Peripherie vorhanden (Howlett *et al.*, 2002; Klein *et al.*, 2003; Pertwee, 1997). Es wurde gezeigt, dass CB2 Rezeptoren auch in der Nozizeption involviert sind (Anand *et al.*, 2009). Saunders *et al.* haben beschrieben, dass der NADA vermittelter Tod von mononukleären Zellen des peripheren Blutes TRPV1 und CB2 Rezeptor abhängig war (Saunders *et al.*, 2009). Die zweite Arbeit, die Hinweise auf CB2– medierte NADA Aktionen beschreibt, untersuchte Seeigelembryonen. Im Jahr 2009 hat Buznikov *et al.* beschrieben, dass die Behandlung mit NADA einen Einfluss auf die

Entwicklung von Seeigelembryonen hat, indem es die Störungen in der Entwicklung, die von AM630, einem CB2 Antagonist und SB366791, einem TRPV1 Antagonist verursacht wurden, verhinderte (Buznikov *et al.*, 2010).

Auch Dopamin allein hatte keinen Einfluss auf die NMDA Schädigung in OHSC, was in unserer Arbeit die Beteiligung von Dopamin Rezeptoren auszuschließen erlaubt.

#### ***4.4 Effekte und Bedeutung von NADA an TRPV1: TRPV1 ist nicht bei NADA vermittelten Effekten involviert.***

NADA mediert in der Peripherie mehrere Effekte, die zum Großteil über TRPV1 Rezeptoren vermittelt werden (Davies *et al.*, 2010; Grabiec *et al.*, 2012; Huang *et al.*, 2002; Sagar *et al.*, 2004; Saunders *et al.*, 2009). Daher wurde die Beteiligung von TRPV1 Rezeptoren an den neuronalen Schädigungsprozessen analysiert.

In den hier durchgeführten Experimenten sollte nun die Wirkung des TRPV1-Agonisten und Antagonisten auf die NADA-medierte Neuroprotektion nach NMDA-Schädigung untersucht werden. Dazu wurde die Anzahl der PI positiven Neurone bestimmt. Trotz mehrerer Hinweise kommt TRPV1 im funktionellen Zustand in OHSC nicht vor. In der Literatur finden sich unterschiedliche Aussagen zur TRPV1 Expression im Gehirn. Diese widersprüchlichen Ergebnisse sind auf die Verwendung von ungeeigneten Antikörpern und der Nutzung unphysiologischer NADA Konzentrationen zurückzuführen.

Die Verteilung von TRPV1 Rezeptor ist umstritten. mRNA für den TRPV1 Rezeptor wurde in sensorischen Fasern und in verschiedenen Gehirnteilen, die größten Mengen im limbischen System, Striatum, Hypothalamus, thalamischen Kern, Substantia nigra, in Bereichen der Formatio reticularis, Cerebellum und anderen Regionen nachgewiesen (Caterina *et al.*, 1997; Mezey *et al.*, 2000; Roberts *et al.*,

2004; Steenland *et al.*, 2006; Szallasi *et al.*, 2007). Im Gegensatz dazu haben Cavanaugh *et al.* eindeutige Beweise geliefert, dass TRPV1 in allen untersuchten Hirnregionen bei Menschen, Mäusen und Ratten sehr schwach exprimiert wird. Cavanaugh *et al.* haben verschiedene voneinander unabhängige Techniken, unter anderem RT-PCR, *in situ* Hybridisierung, Calcium Imaging und mikroskopische Analyse von Gewebeschnitten von genmodifizierten Mäusen verwendet. Die TRPV1 Rezeptoren wurden in Spinalganglien, auf Cajal Retzius Zellen im Hippokampus und in kaudalen Kerngebieten des Hypothalamus nachgewiesen (Cavanaugh *et al.*, 2011). Cho und Valtschanoff (2008) haben gezeigt, dass TRPV1 in Neuronen synthetisiert und dann über Axone, die in der Haut und anderen Geweben und Organen enden, transportiert wird (Cho *et al.*, 2008). In der vorliegenden Arbeit wurde zuerst geprüft, ob die TRPV1 Rezeptoren in den Zellen der OHSC exprimiert werden. Es konnte festgestellt werden, dass in OHSC, Astrozyten und Neuronen mRNA für TRPV1 Rezeptoren vorhanden war, aber keine funktionell aktiven Rezeptoren exprimiert wurden. In OHSC kommt mRNA für den TRPV1 Rezeptor vor, aber der Rezeptor ist funktionell nicht aktiv. Der klassische Weg über einen Calcium Anstieg nach der Zugabe von Capsaicin in den untersuchten Zellen wurde nicht beobachtet. Man kann daraus schlussfolgern, dass TRPV1 in OHSC im funktionellen Zustand nicht vorkommt und keine Rolle in der NMDA Schädigung spielt. In mit dem TRPV1 Vektor transfizierten HEK-293 Zellen wurde gezeigt, dass sowohl für den humanen, als auch für den TRPV1 Rezeptor der Ratte, NADA ein Agonist mit vergleichbarer Potenz und Wirksamkeit wie Capsaicin ( $EC_{50}=50$  nM) ist. In früheren Arbeiten wurde eine equi-potente Wirksamkeit von NADA und Capsaicin in Spinalganglien gefunden (Huang *et al.*, 2002; Toth *et al.*, 2003). In unseren Experimenten führte die Applikation von Capsaicin und NADA zu einem

Calciumstrom in HEK-293-TRPV1. NADA scheint daher ein Agonist des TRPV1 zu sein, der jedoch nicht so potent wie Capsaicin wirkt. Im Whole-Cell Patch Clamp war der ausgelöste Strom nach der NADA Applikation (10  $\mu$ M) deutlich kleiner als in Gegenwart von Capsaicin (10  $\mu$ M). In Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen zeigten die elektrophysiologischen Untersuchungen in den Spinalganglien, isolierten Meerschweinchen Bronchien und Harnblasen die gleichen Effekte (Harrison *et al.*, 2003). In der Peripherie vermittelte NADA vasorelaxante Effekte über die Aktivierung von TRPV1 und CB1 Rezeptoren in kleinen mesenterialen Gefäßen (O'Sullivan *et al.*, 2004). Auch die NADA Metaboliten (Abbauprodukte der Cytochrom P450) aktivieren den TRPV1 Rezeptor, jedoch mit geringerer Potenz als NADA (Rimmerman *et al.*, 2009).

Weiterhin zeigten Premkumar *et al.*, dass NADA (10  $\mu$ M) den Strom in Spinalganglien und in *Xenopus* Eizellen, die den Rezeptor besaßen, verstärkt hat (Huang *et al.*, 2002; Premkumar *et al.*, 2004; Sagar *et al.*, 2004). Dieser Effekt wurde mit Hilfe des PKC Inhibitors, Bisidoylemaleimide, aufgehoben. Genauso wie Capsaicin wirkte NADA auf den TRPV1 Rezeptor und aktivierte die PKC Kaskade (Premkumar *et al.*, 2004). Interessanterweise konnte nach intrazellulärer Applikation von NADA ein 30-mal höheres Signal gemessen werden, was darauf hindeutete, dass NADA an die intrazelluläre Seite des Rezeptors bindet (Price *et al.*, 2004).

Die Aktivierung der TRPV1 Rezeptors kann toxische Effekte vermitteln. Capsaicin in hohen Konzentrationen induziert die Degeneration von allen Zellen, die TRPV1 Rezeptoren besitzen (Chard *et al.*, 1995; Szallasi *et al.*, 2007). Des Weiteren wurde in humanen Neuron-ähnlichen stabil mit TRPV1 Rezeptoren transfizierten Zellen gezeigt, dass ein durch 5  $\mu$ M NADA vermittelter Zelltod, mit Hilfe eines TRPV1 Antagonisten gehemmt wurde (Davies *et al.*, 2010). Über die TRPV1

Rezeptoraktivierung induziert NADA das Absterben von Neuroblastomazellen und humanen peripheren mononukleären Blutzellen (Davies *et al.*, 2010; Saunders *et al.*, 2009).

Über die Wirkung und Effekte von NADA im ZNS gibt es kontroverse Meinungen. Es wurde gezeigt, dass NADA in hippocampalen Schnittkulturen der Ratte, über TRPV1 Rezeptoren die GABAerge Transmission verstärkt und so die Form der synaptischen Kurzzeitplastizität (Paired-Pulse Depression) beeinflusst (Huang *et al.*, 2002). Cavanaugh *et al.* zeigten jedoch, dass TRPV1 im Hippokampus nicht vorkommt (Cavanaugh *et al.*, 2011). Weiterhin führte NADA zur CB1-vermittelten Reduzierung der GABAergen und glutamatergen Transmission und TRPV1-vermittelter Stimulation von glutamaterger Transmission in dopaminergen Neuronen der Substantia nigra der Ratte (Marinelli *et al.*, 2007).

Wie kürzlich gezeigt, wurde der TRPA1 Rezeptor durch die Zugabe von WIN 55-212,2 aktiviert. Diese Aktivierung verstärkte die exzitotoxische Schädigung (Koch *et al.*, 2011b). Die NADA vermittelte Neuroprotektion wurde jedoch durch die Behandlung mit dem TRPA1 Antagonisten nicht beeinflusst.

Eine Intraperitonealinjektion von NADA (10 mg/kg) in Mäusen induzierte eine Hypothermie, Inhibition der Lokomotion und Angst assoziiertes Verhalten, Bewegungsunfähigkeit und Senkung der rektalen Temperatur (Bisogno *et al.*, 2000). Des Weiteren hatte die exogene Gabe von NADA bei Frettchen eine antimimetische Wirkung, welche von AM251 aufgehoben wurde. NADA (2mg/kg) reduzierte auch das Putz- und das Leckverhalten bei diesen Tieren (Sharkey *et al.*, 2007).



#### 4.4.1 Einfluss von NADA auf die Schmerzvermittlung

NADA besitzt sowohl Eigenschaften von Endocannabinoiden, als auch von Endovanilloiden. Die beiden Gruppen spielen eine wichtige Rolle in der Modulation des Schmerzes und der Inflammation über die Aktivierung der CB1 und TRPV1 Rezeptoren. Es wurde postuliert, dass Endovanilloide wie AEA oder NADA an der Entwicklung des neuropathischen Schmerzens und der inflammatorischen Hyperalgesie beteiligt sind (Jhaveri *et al.*, 2007; Julius *et al.*, 2001). Zusätzlich zu den beschriebenen *in vitro* Effekten, hatte NADA gegensätzliche Effekte auf die Schmerzmodulation über CB1 und TRPV1 Rezeptoren (Huang *et al.*, 2002; Sagar *et al.*, 2004).

Eine Intraperitonealinjektion von NADA (10 mg/kg) in Mäusen induzierte Analgesie im Hot Plate Test (Bisogno *et al.*, 2000). Intradermale Applikation dagegen ( $EC_{50}=1.5\pm 0.3 \mu\text{g}$ ) induzierte TRPV1-vermittelte thermale Hyperalgesie in Ratten (Huang *et al.*, 2002). Einer aktuellen Studie zufolge hat die intrathekale Applikation von NADA dosisabhängig antihyperalgesische Effekte im inflammatorischen Schmerzmodell. Dieser Effekt wurde durch den TRPV1 Antagonist (AMG9810) bei niedrigen und hohen NADA Konzentrationen und durch den CB1 Antagonist (AM251) bei hohen NADA Dosen aufgehoben (Farkas *et al.*, 2011). NADA spielt bei der Schmerzvermittlung eine Rolle und verursacht nozizeptives Verhalten während der Applikation (Price *et al.*, 2004).

Sowohl CB1 als auch TRPV1 Rezeptoren kommen auf den Spinalganglionneuronen und in Neuronen des Ganglion trigeminale vor. Die Aktivierung beider Rezeptoren führt zur Hyperalgesie (Agarwal *et al.*, 2007; Bridges *et al.*, 2003; Cortright *et al.*, 2001; Hohmann *et al.*, 1999; Price *et al.*, 2003; Price *et al.*, 2005). Zusätzlich zum

bereits dargestellten Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  Konzentration über die CB1 Rezeptoren, erhöht NADA die Depolarisation der Zellmembran über die TRPV1 Rezeptoren (Huang *et al.*, 2002; Sagar *et al.*, 2004). NADA vermittelt die TRPV1-abhängige Freisetzung von Substanz P und CGRP in dorsalen Rückenmarkschnitten der Ratte (Huang *et al.*, 2002).

In TG Neuronen von TRPV1<sup>-/-</sup> Mäusen hatte NADA keinen direkten Einfluss auf den Calciumeinstrom (Roberts *et al.*, 2008). Es wurde beschrieben, dass NADA die Freisetzung von Peptiden (Substanz P und CGRP) in Schnittkulturen der Ratte und aus dem Hinterhorn des Rückenmarks TRPV1 abhängig auslösen kann, was zu neurogenen Entzündungen führt (Basbaum *et al.*, 2009; Huang *et al.*, 2002; Julius *et al.*, 2001; Price *et al.*, 2004). Weiterhin wurde die Wirkung von NADA nach der Behandlung mit einem FAAH Inhibitor (URB597) und einem AMT Inhibitor (UCM707) aufgehoben (Millns *et al.*, 2006).

Alle diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass NADA im rezeptiven Feld einer Nervenzelle eine komplexe Wirkungsweise auf die sensorischen Neurone hat, die sich wahrscheinlich mit den CB1 und TRPV1 Rezeptoren auf der primären afferenten Fasern und unterschiedlichen molekularen Mechanismen erklären lässt (Sagar *et al.*, 2004).

#### ***4.5 Beteiligung der Signalkaskaden***

Die intrazellulären Signalwege der Endocannabinoide im Gehirn sind immer noch nicht komplett erforscht und verstanden. In den Zellen, die sowohl endogene als auch rekombinante CB1 Rezeptoren exprimieren, wurde die MAPK Aktivierung über diese Rezeptoren beobachtet (Bouaboula *et al.*, 1995; Daigle *et al.*, 2008;

*Derkinderen et al., 2001; Galve-Roperh et al., 2002; Howlett et al., 2010; Sanchez et al., 1998; Valjent et al., 2001; Wartmann et al., 1995*). Wenig ist darüber bekannt, welche intrazellulären Signalwege von NADA aktiviert oder inhibiert werden. Um zu prüfen, ob die NADA mediierten Effekte mit der Aktivierung von p38 und p44/42 MAPK korreliert sind, wurden an beiden Zelllinien, HT22 und BV2 und Astrozyten immunchemische Analysen durchgeführt.

Die hippokampale Zelllinie HT22, die mikrogläre Zelllinie BV2 und primäre Astrozyten wurden verwendet, um die bei der NADA Applikation auftretenden Effekte näher zu analysieren. Dabei wurden HT22 Zellen aufgrund ihren cholinergen und glutamatergen Eigenschaften mit Carbachol, Glutamat und NADA, BV2 mit LPS und NADA, Astrozyten mit IFN $\gamma$ , LPS und NADA stimuliert, was die Schädigung nachahmen und die Aktivierung der Zellen bewirken sollte. Lipopolysaccharid (LPS) ist eine Zellmembrankomponente Gram negativer Bakterien und gilt als ein sehr starker Aktivator von p38 und p44/42 (Koistinaho *et al.*, 2002; Roux *et al.*, 2004). IFN $\gamma$  wird von Lymphozyten produziert und verstärkt die immunologische Antwort von Astrozyten, die durch andere Faktoren ausgelöst wird (John *et al.*, 2003). Es wurde gezeigt, dass sowohl p38 als auch p44/42 MAPK in Mikrogliazellen bei neurodegenerativen Erkrankungen, wie Morbus Alzheimer, Parkinson, bei amyotropher Lateralersklerosis in phosphoryliertem Zustand vorkommen. Die phosphorylierte Form von p44/42 MAPK wurde nach exzitotoxischer Schädigung in Neuronen und Gliazellen gefunden (Bouaboula *et al.*, 1995; Johnson *et al.*, 2002; Koistinaho *et al.*, 2002; Roux *et al.*, 2004; Yoon *et al.*, 2006). Im Hippokampus wurde gezeigt, dass p44/42 MAPK in der synaptischen Plastizität, JNK3 der Exzitotoxizität und p38 MAPK bei der LTD eine Rolle spielen (Bolshakov *et al.*, 2000; Derkinderen *et al.*, 1999; Derkinderen *et al.*, 2001). Die Signalwege, die die Neuroprotektion

mediieren sind nicht bekannt. Es gibt Hinweise, dass der MAPK Signalweg in Cannabinoid-medierte Aktionen involviert ist. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass NADA in BV2, HT22 Zellen und Astrozyten nach 30 Min, 2, 6 und 24 Stunden zu keiner Expressionsänderung führt.

Die Phosphorylierung der MAPK wurde durch mehrere Stimuli und Signalwege verursacht und ist stark vom Zelltyp abhängig. Der p44/42 MAPK Signalweg dagegen fördert die synaptische Aufrechterhaltung und das Überleben der Zellen (Bahr *et al.*, 2006; Bonni *et al.*, 1999; Marsicano *et al.*, 2003). In den untersuchten Zellen, die in OHSC vorkommen, waren mit und ohne Stimulation keine Änderungen in der p44/42 MAPK sichtbar. Das stabile AEA Analog R-Methanandamid aktivierte dagegen p44/42 MAPK in der OHSC und die Effekte wurden erfolgreich mittels AM281, einer CB1 Antagonist blockiert (Karanian *et al.*, 2005a). Mit Hilfe der stabil mit CB1 transfizierten CHO (CHO-CB1) Zellen, sowie in humanen Brustkrebszellen und im Hippokampus wurde gezeigt, dass die Behandlung mit Endocannabinoiden eine zeit- und dosisabhängige Aktivierung der p44/42 MAPK verursacht. Zusätzlich sind die Effekte Pertussis Toxin abhängig und wurden mit Hilfe der CB1 Antagonisten inhibiert (Daigle *et al.*, 2008; Derkinderen *et al.*, 2001; Melck *et al.*, 1999). Das Maximum der Aktivierung wurde in zwei Publikationen nach 5-6 min beobachtet (Bouaboula *et al.*, 1995; Daigle *et al.*, 2008). In primären Astrozyten scheinen die Effekte von NADA nicht über p44/42 MAPK vermittelt zu sein, obwohl für die Astrozytomzellen und CHO-CB1 gezeigt wurde, dass CB1 Stimulation Phosphatidylinositol 3 Kinase (PI3K) und pAkt (PKB) und weiterhin Raf-1, MEK und p44/42 aktiviert (Galve-Roperh *et al.*, 2002; Gomez del Pulgar *et al.*, 2000; Howlett *et al.*, 2010; Sanchez *et al.*, 1998). Die Aktivierung der MAPK über die CB1 Rezeptoren wurde mit mehreren Wachstumsfaktorrezeptoren und Tyrosinkinasen assoziiert

(Howlett *et al.*, 2010). Die Exzitoxizität *in vivo* (i.p. Injektion von Kainatsäure) aktivierte im Hippokampus mehrere Kinasen, inklusive p44/42 MAPK (Marsicano *et al.*, 2003). Die Aktivierung der p44/42 MAPK nach der THC Behandlung hat ihr Maximum 20 Minuten nach der Injektion erreicht und war D1 und CB1 abhängig und Gi/o Protein unabhängig (Valjent *et al.*, 2001). NADA war in der Lage, in den Jurkat Zellen die Phosphorylierung der JNK und p38 MAPK, aber nicht p44/42 MAPK, zu verursachen. Unabhängig von CB und TRPV1 Rezeptoren vermittelte NADA anti-HIV1 Aktivität (Sancho *et al.*, 2005; Sancho *et al.*, 2004). Außerdem inhibierte NADA die Proliferation und Migration in aktivierten primären Kupferzellen, was im Wound Healing Assay gezeigt wurde. Der für diese Effekte zuständige Mechanismus soll die Inhibierung der p44/42 MAPK Phosphorylierung, die nach der Zugabe von FBS auftritt, sein (Wojtalla *et al.*, 2012).

Der p38 MAPK Signalweg spielt eine protektive Rolle bei Ischämie und besitzt antitumorale Eigenschaften bei Gliomen (Derkinderen *et al.*, 2001; Galve-Roperh *et al.*, 2002; Howlett *et al.*, 2010; Nagayama *et al.*, 1999). In Mäusen und Ratten steigern AEA und 2-AG die Phosphorylierung von p38 MAPK, was Hinweise lieferte, dass NADA mit seiner ähnlichen Struktur auch dazu in der Lage ist. Die erwähnten Ergebnisse deuteten darauf hin, dass die Endocannabinoide über die CB1 Rezeptoren die p38 MAPK Phosphorylierung mediierten (Howlett *et al.*, 2010). Bei unseren Analysen war NADA nicht in der Lage, p38 MAPK zu aktivieren weder in stimulierten HT22, BV2 noch in Astrozyten. In humanen venösen Endothelzellen, in OHSC der Ratte und Maus wurde p38 MAPK durch AEA, 2-AG, synthetische Cannabinoide und THC dagegen aktiviert. Die Effekte auf p38 MAPK wurden über CB1 Rezeptoren vermittelt, was mit Hilfe des CB1 Antagonisten, SR141716A und CB1<sup>-/-</sup> Mäusen bestätigt wurde (Derkinderen *et al.*, 2001; Howlett *et al.*, 2010; Liu *et*

*al.*, 2000). Hingegen zeigten Navarrete et al. dass NADA in B.end5 Zellen p38 MAPK aktiviert, was in der Stabilisierung der mRNA für COX-2 und der Akkumulation von COX-2 Proteinen resultierte und Dopaminrezeptor abhängig war (Navarrete *et al.*, 2010).

Es ist nötig, die molekularen Mechanismen, die hinter den NADA mediierten Aktionen stehen, zu verstehen, da NADA eindeutig Immunprozesse beeinflusst. Es sollen noch weitere Untersuchungen der intrazellulären Signalwege, die die NMDA-Schädigung in OHSC verhindern, durchgeführt werden.

#### ***4.6 Anstieg der Anzahl der Mikroglia in GD des OHSC durch ARA-S Behandlung***

In jüngerer Vergangenheit wurden mehrere Endocannabinoide identifiziert, zu den bislang wenig Daten existieren. N-Arachidonyl-L-Serin (ARA-S) sollte den endogenen Liganden für abnCBD Rezeptor darstellen und eine neuroprotektive Wirkung aufweisen (Cohen-Yeshurun *et al.*, 2011). Um zu klären, ob ARA-S im NMDA geschädigten OHSC ebenfalls zu einer Protektion wie durch 2-AG bzw. abnCBD führt, wurde die Applikation von ARA-S in geschädigten OHSC durchgeführt.

Strukturell hat ARA-S eine starke Ähnlichkeit mit AEA und wurde erstmalig aus dem Gehirn vom Ratten isoliert (Milman *et al.*, 2006). Trotz der geringen Bindungsaffinität zu CB1 und CB2 Rezeptoren, sind die ARA-S Effekte ähnlich wie bei einer Stimulation mit klassischen Cannabinoiden (Chen *et al.*, 2000; Golech *et al.*, 2004; Milman *et al.*, 2006; Shohami *et al.*, 2011). Es wird vermutet, dass ARA-S, an GPR55, GPR12 und GPR35 bindet, und eine Affinität zu GPR18 vorhanden ist (Shohami *et al.*, 2011). Die Affinität zum GPR18 Rezeptor soll vom

Expressionsniveau abhängen und das Verhalten von ARA-S erklären (McHugh *et al.*, 2010).

ARA-S verursachte eine Endothelium abhängige arterielle Vasodilatation und stimulierte die Phosphorylierung sowohl von p44/42 MAPK als auch von pAkt in kultivierten Endothelzellen (Milman *et al.*, 2006; Shohami *et al.*, 2011). Zu den weiteren intrazellulären Signalwegen, über die ARA-S wirkt, gehört unter anderem die Aktivierung der pAkt (Phosphorylierung). Die ARA-S vermittelte Abschwächung der apoptotischen Prozesse war im Modell des geschlossenen Schädel-Hirn-Traumas nach 24 Stunden und 48 Stunden zu beobachten. ARA-S reduzierte in diesem Modell das Ödem und die Läsion. Diese Befunde stimmen mit denen von Milman *et al.* (2006) überein, die nach ARA-S Behandlung eine Endothel abhängige Vasodilatation, ein vasoprotektives Potential über die Phosphorylierung von p44/42 MAPK und Akt in Endothelzellen und eine LPS-induzierte Hemmung der TNF Produktion fanden (Milman *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2010). ARA-S inhibierte auch die Migration der hämatopoetischen Zellen (Milman *et al.*, 2006).

In der vorliegenden Arbeit war ARA-S nicht neuroprotektiv, hat jedoch den Anstieg der Mikrogliaanzahl unter Kontrollbedingungen im GCL im Gyrus dentatus verursacht. Auf welche Weise die Effekte verursacht wurden ist noch unbekannt. ARA-S gesteuerte veränderte Gliazellen Migration könnte unsere Ergebnisse erklären.

#### **4.9 OMDM-1**

Die Art und Weise wie AEA in die Zellen aufgenommen wird, ist nach wie vor stark umstritten. Es wird sowohl über Zusammenhänge mit einfacher Diffusion, als auch über membranproteinabhängige Prozesse spekuliert. Viele kinetische Studien zeigen

Pro- und Kontraargumente für die Existenz der Membrantransporter unter unterschiedlichen Konditionen. In den letzten Jahren wurden mehrere Inhibitoren des AEA Transports synthetisiert und getestet. Viele von ihnen inhibierten auch andere Enzyme, wie FAAH und aktivierten mehrere Rezeptoren. OMDM-1 ist ein Endocannabinoid Transporter (AMT) Blocker und wurde in RBL-2H3 ( $IC_{50}=2.4\pm 0.7 \mu M$ ) (Ortar *et al.*, 2003) und C6 Gliomazellen ( $IC_{50}>20 \mu M$ ) (Fowler *et al.*, 2004) getestet. Für den Inhibitor von AMT, OMDM-1, wurde eine geringe Affinität für die folgenden Rezeptorsubtypen und Enzyme gezeigt: FAAH ( $IC_{50}>50 \mu M$ ;  $IC_{50}>100$ ), CB1 ( $K_i=12100\pm 1300 \text{ nM}$ ), CB2 ( $K_i>10000 \text{ nM}$ ) und TRPV1 ( $K_i>10000 \text{ nM}$ ) (Fowler *et al.*, 2004; Glaser *et al.*, 2005; Ortar *et al.*, 2003). OMDM-1 appliziert in RBL-2H3 Zellen (ohne BSA) inhibierte die selektive AEA Akkumulation schon 5 Minuten nach der Zugabe. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass OMDM-1 (0.01  $\mu M$ , 1  $\mu M$ ) allein einen schädigenden Einfluss auf das Überleben von Neuronen im GCL des GD in OHSC hatte. Nach der NMDA Schädigung blieb die Anzahl degenerierender Neuronen trotz der Applikation des Inhibitors unverändert. Obwohl vermutet wurde, dass sich nach der AMT Blockade mehr AEA im intrazellulären Raum befindet und an CB Rezeptoren bindet, was potenziell neuroprotektiv sein könnte, war keine Protektion zu sehen (Veldhuis *et al.*, 2003).

Bekannte AMT Inhibitoren, wie UCM707 und OMDM-2, besitzen das therapeutische Potenzial als schmerzmilderndes Medikament eingesetzt zu werden oder gegen die Spastik bei Multipler Sklerose zu wirken. OMDM-1 hat keinen Einfluss auf motorinhibitorische Effekte, OMDM-2 dagegen scheint zur Steigerung der AEA-induzierten Analgesie zu führen (Glaser *et al.*, 2005). In männlichen Wistar Ratten hatte OMDM-1 (1.5 und 10 mg/kg i.p.) keine lokomotorischen Effekte und keine Effekte im Hot Plate Test, wenn der Stoff allein oder in Kombination mit 2 mg/kg AEA



appliziert wurde. In Mäusen inhibierte 4mg/kg i.v. OMDM-1 die Spastik in der chronischen rückfälligen experimentellen allergischen Encephalomyelitis, einem Modell der Multiple Sklerosis (de Lago *et al.*, 2004; Fowler *et al.*, 2004; Glaser *et al.*, 2005; Ortar *et al.*, 2003). Die Fähigkeit der AMT Inhibitoren, die Cannabinoiden-ähnliche Verhaltenseffekte zu mediieren scheinen zu implizieren, dass es einen allgemeinen Endocannabinoid medierten Mechanismus gibt (Glaser *et al.*, 2005). Im Jahr 2011 wurde FLAT (FAAH-like anandamide transporter) als eine wichtige molekulare Komponente des AEA Transports in Neuronen und Astrozyten beschrieben (Fu *et al.*, 2012). Es wird vermutet, dass OMDM-1 mit dem Transporter interagiert und zwischen den beiden Molekülen ein enger funktioneller Zusammenhang besteht.

Alle erwähnten Befunde deuten daraufhin, dass AEA induzierte und CB1 medierte Effekte auf das Verhalten auch durch die AMT Inhibition erzeugt werden können (Glaser *et al.*, 2005). Die lipophile Natur von Endocannabinoiden, wie AEA, erlaubt die Diffusion durch die Plasmamembran, kann aber auch eine unspezifische Bindung zu Zellen verursachen. Die hydrophoben Eigenschaften von AEA schließen jedoch die Existenz eines Transmembrantransporters nicht aus (Glaser *et al.*, 2005). Es ist schwierig, die Daten für lipophile Stoffe zwischen den Laboren zu vergleichen, da die Vorbereitung der Proben und die Assaybedingungen, aber auch die zelltypabhängige Expression von AMT, FAAH oder intrazellulären Bindungsproteine, unterschiedlich sind. Diese und andere Faktoren können die zelluläre Aufnahme beeinflussen (Glaser *et al.*, 2005). Die Benutzung von Medien mit Serum, aber auch des komplexen OHSC Modell können andere mögliche Erklärungen für fehlende Effekte in unserem Modell sein. Es ist nicht klar, warum OMDM-1 allein schädigend wirkte.

## 5. Zusammenfassung

Schädigungen des Zentralnervensystems führen häufig zu schweren irreversiblen Schäden, die die Betroffenen vor große körperlichen und psychischen Herausforderungen stellen. Auf zellulärer Ebene ist bekannt, dass das Gehirn über protektive Mechanismen verfügt, die zwar nach der Schädigung aktiviert werden deren Potential jedoch nicht ausreicht, um den Schaden einzudämmen. Das Endocannabinoidsystem wurde mehrfach als ein solches protektives System bei ZNS Läsionen beschrieben. Zu den klassischen und gut untersuchten Endocannabinoiden (eCBs) wie Anandamid oder 2-AG kommen im Gehirn mehrere eCBs vor, deren physiologische und pathologische Bedeutung schwer einzuordnen ist. Das N-Arachidonyl-Dopamin (NADA) gehört zu dieser Gruppe und wirkt über bereits bekannte Cannabinoid Rezeptoren.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Wirkung von NADA auf das Überleben der Körnerzellen im Gyrus dentatus im Modell der organotypischen hippocampalen Schnittkulturen (OHSC) untersucht. Weiterhin wurden die beteiligten Rezeptoren und die intrazellulären Signalkaskaden an neuronalen und glösen Primärkulturen sowie Zelllinien analysiert. Nach der NMDA Schädigung kam es zum massiven Absterben der Neurone und einer deutlichen Zunahme der Zahl von Mikrogliazellen. NADA (100 pM-10 µM) hemmte den Prozess der neuronalen Schädigung und führte bei 1 nM und 1 µM zum Rückgang der Mikrogliaanzahl in geschädigten OHSC. Weiterführende Analysen ergaben, dass NADA Effekte über den Cannabinoid (CB)<sub>1</sub> Rezeptor mediiert. Sowohl die abnCBD, CB<sub>2</sub>, TRPV<sub>1</sub> und TRPA<sub>1</sub> Rezeptoren als auch -als struktureller Bestandteil des NADA waren an den Wirkungen nicht beteiligt. Es ist bekannt, dass der TRPV<sub>1</sub> Rezeptor eine große Rolle bei NADA mediierten

Effekten in der Peripherie spielt. Das Vorkommen bzw. die funktionelle Aktivität des TRPV1 im ZNS ist Gegenstand kontroverser Diskussionen. TRPV1 konnte auf mRNA Ebene in organotypischen hippokampalen Schnittkulturen (OHSC), Astrozyten, hippokampalen Neuronen und DRG (Spinalganglien) nachgewiesen werden. Mittels Calcium Imaging und Elektrophysiologie konnte an HEK293-TRPV1 Zellen NADA als Agonist des TRPV1 bestätigt werden. In allen untersuchten Zellen war jedoch die Funktionstüchtigkeit des TRPV1 Rezeptors mittels Calcium Imaging Messungen nicht nachweisbar.

Im nächsten Schritt wurde geprüft, welche der klassischen mit dem Endocannabinoidsystem assoziierten Signalkaskaden an der NADA vermittelten Protektion teilnehmen. Die Signalkaskaden p38 und p44/42 MAPK wurden in den stimulierten und nichtstimulierten Zellen durch NADA nicht beeinflusst.

NADA gehört somit zur Gruppe der neuroprotektiv wirkenden Endocannabinoide, welches seine Effekte über den CB1 Rezeptor vermittelt. Im Schädigungsmodell des OHSC spielt der TRPV1 Rezeptor keine Rolle. Weitere intrazelluläre Signalkaskaden, wie der PLC Weg, bedürfen einer weitergehenden Analyse bezüglich ihrer Involvierung in NADA-vermittelte Effekte.

## 6. Abbildungsverzeichnis und Tabellen

<b>Abb. 1:</b> Primäre und sekundäre Schädigung. Der Mechanismus des sekundären Schadens im Gehirn nach (Loane und Faden, 2010).....	13
<b>Abb. 2:</b> Endocannabinoid vermittelte retrograde synaptische Übertragung an der glutamatergen Synapse.....	23
<b>Abb. 3:</b> Die Struktur der wichtigsten CB Rezeptorliganden nach ( <a href="http://www.tocris.com">www.tocris.com</a> ; Ortar et al., 2003; Pertwee et al., 2010b].....	28
<b>Abb. 4:</b> Biosynthese und Abbau von NADA. NADA wird aus mehrfach ungesättigten Fettsäure, Arachidonsäure (AA) synthetisiert.....	33
<b>Abb. 5:</b> Der TRPV1 Rezeptor besitzt sechs Transmembrandomänen und eine Porenregion zwischen Segment 5 und Segment 6. TRPV1 spielt eine große Rolle bei der Nozizeption und wird direkt durch Capsaicin und hohe Temperaturen aktiviert (>43°) modifiziert nach (Szalasi et al., 2007).....	37
<b>Abb. 6:</b> Membrantopologie des TRPV1-Ionenkanals. Der Rezeptor besteht aus 6 Transmembrandomänen mit einem N- und C- terminalen Ende, die intrazellulär lokalisiert sind [modifiziert nach Szalasi et al., 2007].....	37
<b>Abb. 7:</b> Endocannabinoidgesteuerte Signalkaskade zwischen Mikroglia, Neuronen und Astrozyten nach der NMDA Schädigung.....	42
<b>Abb. 8:</b> In organotypischen hippokampalen Schnittkulturen (OHSC) lassen sich entorhinale Cortex (EC), Prä- und Parasubikulum, Subikulum, Ammonshorn (CA, Cornu Ammonis), Hilusregion (Hi) und Gyrus dentatus (DG) unterscheiden.....	43
<b>Abb. 9:</b> Behandlungsschema für die OHSC.....	71
<b>Abb. 10:</b> NADA vermittelte Neuroprotektion und Reduktion der Anzahl von IB4 positiven Mikrogliazellen in NMDA geschädigten OHSC.....	89
<b>Abb. 11:</b> NADA mediierte Neuroprotektion ist über CB1 Rezeptor in OHSC vermittelt.....	92
<b>Abb. 12:</b> Die NADA mediierte Neuroprotektion war weder CB2, noch abnCBD, noch Dopamin Rezeptor – sensitive.....	95
<b>Abb. 13:</b> TRPV1 Rezeptor ist nicht involviert in NADA medierter Neuroprotektion..	97
<b>Abb. 14:</b> TRPV1 und TRPA1 sind in nicht NADA medierte Neuroprotektion involviert.....	101
<b>Abb.15:</b> Die Mittelwerte der Verhältnisse zwischen phosphorylierter Form zum Gesamtprotein von p38 MAPK normiert auf die Aktinmenge in primären Astrozyten.....	104
<b>Abb.16:</b> Die Mittelwerte der Verhältnisse zwischen phosphorylierter Form zum Gesamtprotein von p38 MAPK normiert auf die Aktinmenge in HT22 Zellen.....	107

**Abb.17:** Die Mittelwerte der Verhältnisse zwischen phosphorylierter Form zum Gesamtprotein von p38 MAPK normiert auf die Aktinmenge in BV2 Zellen..... 110

**Abb.18:** Die Mittelwerte der Verhältnisse zwischen phosphorylierter Form zum Gesamtprotein von p44/42 MAPK normiert auf die Aktinmenge in primären Astrozyten..... 112

**Abb.19:** Die Mittelwerte der Verhältnisse zwischen phosphorylierter Form zum Gesamtprotein von p44/42 MAPK normiert auf die Aktinmenge in HT22 Zellen..... 115

**Abb.20:** Die Mittelwerte der Verhältnisse zwischen phosphorylierter Form zum Gesamtprotein von p44/42 MAPK normiert auf die Aktinmenge in BV2 Zellen..... 118

**Abb.21:** Statistische Analyse der Mittelwerten von PI positiven Neuronen und IB4 positiven Mikroglia nach der Behandlung mit ARA-S (One Way Test mit Dunnet Test)..... 121

**Abb.22:** Statistische Analyse der Mittelwerten von PI positiven Neuronen und IB4 positiven Mikroglia nach der Behandlung mit OMDM-1 (One Way mit Dunnet Test)..... 124

<b>Tabelle 1:</b> Auswahl selektiver Agonisten und Antagonisten an Cannabinoid Rezeptoren nach (Pertwee et al., 2005; Pertwee et al., 2008).....	27
<b>Tabelle 2:</b> Materialien.....	48
<b>Tabelle 3:</b> Zelllinien.....	48
<b>Tabelle 4:</b> Übersicht über Medien und die Zusätze, die in der Zellkultur Verwendung fanden.....	49
<b>Tabelle 5:</b> Geräte.....	50
<b>Tabelle 6:</b> Liste aller verwendeten Substanzen zur Behandlung von OHSC und Einzelzellen.....	52
<b>Tabelle 7:</b> Liste aller verwendeten Lektine und Färbereagenzien.....	53
<b>Tabelle 8:</b> Liste der Pufferlösungen für die Immunhistochemie.....	53
<b>Tabelle 9:</b> Puffer und Gele für Western Blot Analysen.....	54
<b>Tabelle 10:</b> Antikörper für Western Blot.....	57
<b>Tabelle 11:</b> Proteinase K Puffer.....	58
<b>Tabelle 12:</b> Pink Juice.....	58
<b>Tabelle 13:</b> Reaktionsansatz für die Synthese komplementärer DNA.....	58
<b>Tabelle 14:</b> Reaktionseinsatz für die PCR (Genotypisierung).....	59
<b>Tabelle 15:</b> Reaktionseinsatz für die RT-PCR.....	59
<b>Tabelle 16:</b> Primerliste.....	60
<b>Tabelle 17:</b> Intra- und Extrazellulär-Lösungen für Patch Clamp und Extrazellulärlösung für Ca <sup>2+</sup> -Imaging-Experimente.....	60
<b>Tabelle 18:</b> Intra- und Extrazellulär-Lösungen für EPSC Messungen.....	61
<b>Tabelle 19:</b> Versuchsplan für die Einzelzellen.....	72
<b>Tabelle 20:</b> Die Schrittfolge für die PCR Reaktion (Genotypisierung).....	78
<b>Tabelle 21:</b> Die Schrittfolge für die PCR-Reaktion.....	81
<b>Tabelle 22:</b> Die Anzahl der PI positiven Neurone in GCL des GD nach der Behandlung mit NADA.....	87
<b>Tabelle 23:</b> Die Anzahl der IB4 positiven Mikroglia in GCL des GD nach der Behandlung mit NADA.....	88
<b>Tabelle 24:</b> Einfluss von NADA auf die Signalwege in stimulierten und nicht-stimulierten HT22, BV2 Zellen und Astrozyten. ....	103
<b>Tabelle 25:</b> Anzahl der PI positiven Neurone in GCL des GD nach der Behandlung mit ARA-S.....	120

**Tabelle 26:** Anzahl der IB4 positiven Mikroglia in GCL des GD nach der Behandlung mit ARA-S..... 121

**Tabelle 27:** Die Anzahl der PI positiven Neuronen in GCL des GD nach der Behandlung mit OMDM-1 ..... 123

**Tabelle 28:** Die Anzahl der IB4 positiven Mikroglia in GCL des GD nach der Behandlung mit OMDM-1 ..... 123

**Tabelle 29:** Die potentiellen Interaktionen von NADA mit uinterschiedlichen Rezeptoren und Enzymen..... 129

## 7. Danksagung

Ich möchte herzlich Herrn Prof. Faramarz Dehghani für die Überlassung des Themas dieser Arbeit und die ausgezeichnete fachliche und menschliche Betreuung der letzten 4 Jahren danken. Lieber Faramarz danke für deine Geduld und Ruhe, ohne deine Ideen und Hilfe wäre ich nie so weit gekommen. Danke für alle guten Worte und auch für deine Kritik.

Vielen Dank an Herrn Dr. Marco Koch, der mich eingearbeitet hat, immer gute Vorschläge für mich hatte und seine Erfahrung mit mir geteilt hat. Vielen Dank für zahlreiche Vorschläge beim Verfassen der Arbeit.

Herrn Prof. Manfred Schubert-Zsilavecz danke ich für seine externe Betreuung. Er und seine Arbeitsgruppe haben mich während des Praktikums ins wissenschaftliche Arbeiten eingeführt und mich zur Promotion motiviert.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Robert Kraft, der die elektrophysiologischen Messungen durchgeführt hat und immer zu wissenschaftlichen Auseinandersetzungen bereit war.

Vielen Dank an Dr. Alex Straker von der Indiana University in Bloomington für die Messungen an autaptischen Neuronen, zahlreichen Vorschläge und hilfreichen Diskussionen.

Herrn Prof. Dr. Ingo Bechmann, dem Institutsleiter, in dessen Labor diese Arbeit entstand danke ich für die hervorragende Unterstützung. Ohne die exzellente technische Ausstattung wäre die Durchführung dieser Arbeit nicht denkbar gewesen.

Ich danke auch Herrn Prof. Dr. H.-W. Korf, Leiter des Instituts für Anatomie der Goethe Universität in Frankfurt, in dem ich meine Promotion begonnen habe.

Ich möchte mich herzlich bei den wunderbaren MTAs bedanken, bei meinen lieben Freunden, Chalid Ghadban und Dana Tschierske. Liebe Constanze Hobusch, Angela Ehrlich und Claudia Merkwitz ihr seid spitze und ward immer hilfsbereit. Keine Färbung, kein Western Blot und kein PCR waren vor euch sicher.

Phillip Pieroh und Alexandra Antonietti möchte ich für geduldiges Lesen und korrigieren meiner Doktorarbeit und viele lustige Labormomente danken.

Vielen Dank an alle Mitarbeiter der Institute für Anatomie in Leipzig und Frankfurt.

Herzlich für die Unterstützung und Verständnis danke ich Tim Hohmann, Barbara Grabiec, Anna Grabiec, Mateusz Umstädter und Bogdan Grabiec und allen lieben Freunden, auch denen die mittlerweile weit weg sind.



## **8. Lebenslauf**

## 9.Literaturverzeichnis

Agarwal N, Pacher P, Tegeder I, Amaya F, Constantin CE, Brenner GJ, *et al.* (2007). Cannabinoids mediate analgesia largely via peripheral type 1 cannabinoid receptors in nociceptors. *Nat Neurosci* **10**(7): 870-879.

Alger BE (2012). Endocannabinoids at the synapse a decade after the Dies Mirabilis (29 March 2001): what we still do not know. *J Physiol*.

Alger BE, Kim J (2011). Supply and demand for endocannabinoids. *Trends Neurosci* **34**(6): 304-315.

Anand P, Whiteside G, Fowler CJ, Hohmann AG (2009). Targeting CB2 receptors and the endocannabinoid system for the treatment of pain. *Brain Res Rev* **60**(1): 255-266.

Ashton JC, Glass M (2007). The cannabinoid CB2 receptor as a target for inflammation-dependent neurodegeneration. *Curr Neuropharmacol* **5**(2): 73-80.

Atwood BK, Mackie K (2010). CB2: a cannabinoid receptor with an identity crisis. *Br J Pharmacol* **160**(3): 467-479.

Bab I, Zimmer A (2008). Cannabinoid receptors and the regulation of bone mass. *Br J Pharmacol* **153**(2): 182-188.

Bab I, Zimmer A, Melamed E (2009). Cannabinoids and the skeleton: from marijuana to reversal of bone loss. *Ann Med* **41**(8): 560-567.

Bahr BA, Karanian DA, Mankanji SS, Makriyannis A (2006). Targeting the endocannabinoid system in treating brain disorders. *Expert Opin Investig Drugs* **15**(4): 351-365.

Balvers MG, Verhoeckx KC, Witkamp RF (2009). Development and validation of a quantitative method for the determination of 12 endocannabinoids and related compounds in human plasma using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **877**(14-15): 1583-1590.

Basbaum AI, Bautista DM, Scherrer G, Julius D (2009). Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell* **139**(2): 267-284.

Bekkers JM, Stevens CF (1991). Excitatory and inhibitory autaptic currents in isolated hippocampal neurons maintained in cell culture. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(17): 7834-7838.

Bisogno T, Berrendero F, Ambrosino G, Cebeira M, Ramos JA, Fernandez-Ruiz JJ, *et al.* (1999). Brain regional distribution of endocannabinoids: implications for their biosynthesis and biological function. *Biochem Biophys Res Commun* **256**(2): 377-380.

Bisogno T, Melck D, Bobrov M, Gretskaya NM, Bezuglov VV, De Petrocellis L, *et al.* (2000). N-acyl-dopamines: novel synthetic CB(1) cannabinoid-receptor ligands and inhibitors of anandamide inactivation with cannabimimetic activity in vitro and in vivo. *Biochem J* **351 Pt 3**: 817-824.

Bjorklund A, Dunnett SB (2007). Dopamine neuron systems in the brain: an update. *Trends Neurosci* **30**(5): 194-202.

Bjorklund E, Noren E, Nilsson J, Fowler CJ (2010). Inhibition of monoacylglycerol lipase by troglitazone, N-arachidonoyl dopamine and the irreversible inhibitor JZL184: comparison of two different assays. *Br J Pharmacol* **161**(7): 1512-1526.

Blasi E, Barluzzi R, Bocchini V, Mazzolla R, Bistoni F (1990). Immortalization of murine microglial cells by a v-raf/v-myc carrying retrovirus. *J Neuroimmunol* **27**(2-3): 229-237.

Bobrov MY, Lizhin AA, Andrianova EL, Gretskaya NM, Frumkina LE, Khaspekov LG, *et al.* (2008). Antioxidant and neuroprotective properties of N-arachidonoyldopamine. *Neurosci Lett* **431**(1): 6-11.

Boje KM, Arora PK (1992). Microglial-produced nitric oxide and reactive nitrogen oxides mediate neuronal cell death. *Brain Res* **587**(2): 250-256.

Bolshakov VY, Carboni L, Cobb MH, Siegelbaum SA, Belardetti F (2000). Dual MAP kinase pathways mediate opposing forms of long-term plasticity at CA3-CA1 synapses. *Nat Neurosci* **3**(11): 1107-1112.

Bonni A, Brunet A, West AE, Datta SR, Takasu MA, Greenberg ME (1999). Cell survival promoted by the Ras-MAPK signaling pathway by transcription-dependent and -independent mechanisms. *Science* **286**(5443): 1358-1362.

Bouaboula M, Poinot-Chazel C, Bourrie B, Canat X, Calandra B, Rinaldi-Carmona M, *et al.* (1995). Activation of mitogen-activated protein kinases by stimulation of the central cannabinoid receptor CB1. *Biochem J* **312 ( Pt 2)**: 637-641.

Bradshaw HB, Rimmerman N, Krey JF, Walker JM (2006). Sex and hormonal cycle differences in rat brain levels of pain-related cannabimimetic lipid mediators. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **291**(2): R349-358.

Brewer GJ, Torricelli JR, Evege EK, Price PJ (1993). Optimized survival of hippocampal neurons in B27-supplemented Neurobasal, a new serum-free medium combination. *J Neurosci Res* **35**(5): 567-576.

Bridges D, Rice AS, Egertova M, Elphick MR, Winter J, Michael GJ (2003). Localisation of cannabinoid receptor 1 in rat dorsal root ganglion using in situ hybridisation and immunohistochemistry. *Neuroscience* **119**(3): 803-812.

Buznikov GA, Nikitina LA, Bezuglov VV, Francisco ME, Boysen G, Obispo-Peak IN, *et al.* (2010). A putative 'pre-nervous' endocannabinoid system in early echinoderm development. *Dev Neurosci* **32**(1): 1-18.

Calignano A, Katona I, Desarnaud F, Giuffrida A, La Rana G, Mackie K, *et al.* (2000). Bidirectional control of airway responsiveness by endogenous cannabinoids. *Nature* **408**(6808): 96-101.

Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D (1997). The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* **389**(6653): 816-824.

Cavanaugh DJ, Chesler AT, Jackson AC, Sigal YM, Yamanaka H, Grant R, *et al.* (2011). Trpv1 reporter mice reveal highly restricted brain distribution and functional expression in arteriolar smooth muscle cells. *J Neurosci* **31**(13): 5067-5077.

Chard PS, Bleakman D, Savidge JR, Miller RJ (1995). Capsaicin-induced neurotoxicity in cultured dorsal root ganglion neurons: involvement of calcium-activated proteases. *Neuroscience* **65**(4): 1099-1108.

Chen HS, Lipton SA (2006). The chemical biology of clinically tolerated NMDA receptor antagonists. *J Neurochem* **97**(6): 1611-1626.

Chen Y, McCarron RM, Ohara Y, Bembry J, Azzam N, Lenz FA, *et al.* (2000). Human brain capillary endothelium: 2-arachidonoglycerol (endocannabinoid) interacts with endothelin-1. *Circ Res* **87**(4): 323-327.

Cho WG, Valtschanoff JG (2008). Vanilloid receptor TRPV1-positive sensory afferents in the mouse ankle and knee joints. *Brain Res* **1219**: 59-65.

Cohen-Yeshurun A, Trembovler V, Alexandrovich A, Ryberg E, Greasley PJ, Mechoulam R, *et al.* (2011). N-arachidonoyl-L-serine is neuroprotective after traumatic brain injury by reducing apoptosis. *J Cereb Blood Flow Metab* **31**(8): 1768-1777.

Console-Bram L, Marcu J, Abood ME (2012). Cannabinoid receptors: nomenclature and pharmacological principles. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*.

Cortright DN, Crandall M, Sanchez JF, Zou T, Krause JE, White G (2001). The tissue distribution and functional characterization of human VR1. *Biochem Biophys Res Commun* **281**(5): 1183-1189.

Cristino L, Starowicz K, De Petrocellis L, Morishita J, Ueda N, Guglielmotti V, *et al.* (2008). Immunohistochemical localization of anabolic and catabolic enzymes for anandamide and other putative endovanilloids in the hippocampus and cerebellar cortex of the mouse brain. *Neuroscience* **151**(4): 955-968.

Czapiga M, Colton CA (1999). Function of microglia in organotypic slice cultures. *J Neurosci Res* **56**(6): 644-651.

Daigle TL, Kearn CS, Mackie K (2008). Rapid CB1 cannabinoid receptor desensitization defines the time course of ERK1/2 MAP kinase signaling. *Neuropharmacology* **54**(1): 36-44.

Davies JW, Hainsworth AH, Guerin CJ, Lambert DG (2010). Pharmacology of capsaicin-, anandamide-, and N-arachidonoyl-dopamine-evoked cell death in a homogeneous transient receptor potential vanilloid subtype 1 receptor population. *Br J Anaesth* **104**(5): 596-602.

de Lago E, Ligresti A, Ortar G, Morera E, Cabranes A, Pryce G, *et al.* (2004). In vivo pharmacological actions of two novel inhibitors of anandamide cellular uptake. *Eur J Pharmacol* **484**(2-3): 249-257.

De Petrocellis L, Starowicz K, Moriello AS, Vivese M, Orlando P, Di Marzo V (2007). Regulation of transient receptor potential channels of melastatin type 8 (TRPM8): effect of cAMP, cannabinoid CB(1) receptors and endovanilloids. *Exp Cell Res* **313**(9): 1911-1920.

Dehghani F, Hischebeth GT, Wirjatijasa F, Kohl A, Korf HW, Hailer NP (2003). The immunosuppressant mycophenolate mofetil attenuates neuronal damage after excitotoxic injury in hippocampal slice cultures. *Eur J Neurosci* **18**(5): 1061-1072.

Derkinderen P, Enslin H, Girault JA (1999). The ERK/MAP-kinases cascade in the nervous system. *Neuroreport* **10**(5): R24-34.

Derkinderen P, Ledent C, Parmentier M, Girault JA (2001). Cannabinoids activate p38 mitogen-activated protein kinases through CB1 receptors in hippocampus. *J Neurochem* **77**(3): 957-960.

Deutsche Gesellschaft für Neurochirurgie <http://www.dgnc.de/index.html>.

Devane WA, Hanus L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, Griffin G, *et al.* (1992). Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science* **258**(5090): 1946-1949.

Di Marzo V, De Petrocellis L, Bisogno T (2005). The biosynthesis, fate and pharmacological properties of endocannabinoids. *Handb Exp Pharmacol*(168): 147-185.

- Di Marzo V, Fontana A, Cadas H, Schinelli S, Cimino G, Schwartz JC, *et al.* (1994). Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. *Nature* **372**(6507): 686-691.
- Di Marzo V, Hill MP, Bisogno T, Crossman AR, Brotchie JM (2000). Enhanced levels of endogenous cannabinoids in the globus pallidus are associated with a reduction in movement in an animal model of Parkinson's disease. *FASEB J* **14**(10): 1432-1438.
- Di Marzo V, Melck D, Bisogno T, De Petrocellis L (1998). Endocannabinoids: endogenous cannabinoid receptor ligands with neuromodulatory action. *Trends Neurosci* **21**(12): 521-528.
- Downer EJ (2011). Cannabinoids and innate immunity: taking a toll on neuroinflammation. *ScientificWorldJournal* **11**: 855-865.
- Duan Y, Zheng J, Nicholson RA (2008). Inhibition of [<sup>3</sup>H]batrachotoxinin A-20 $\alpha$ -benzoate binding to sodium channels and sodium channel function by endocannabinoids. *Neurochem Int* **52**(3): 438-446.
- Egertova M, Cravatt BF, Elphick MR (2003). Comparative analysis of fatty acid amide hydrolase and cb(1) cannabinoid receptor expression in the mouse brain: evidence of a widespread role for fatty acid amide hydrolase in regulation of endocannabinoid signaling. *Neuroscience* **119**(2): 481-496.
- Egertova M, Giang DK, Cravatt BF, Elphick MR (1998). A new perspective on cannabinoid signalling: complementary localization of fatty acid amide hydrolase and the CB1 receptor in rat brain. *Proc Biol Sci* **265**(1410): 2081-2085.
- Eljaschewitsch E, Witting A, Mawrin C, Lee T, Schmidt PM, Wolf S, *et al.* (2006). The endocannabinoid anandamide protects neurons during CNS inflammation by induction of MKP-1 in microglial cells. *Neuron* **49**(1): 67-79.
- Farkas I, Tuboly G, Benedek G, Horvath G (2011). The antinociceptive potency of N-arachidonoyl-dopamine (NADA) and its interaction with endomorphin-1 at the spinal level. *Pharmacol Biochem Behav* **99**(4): 731-737.
- Förster E, Bartos M, Zhao S, Poindron P, Piguet P (2005). New methods for Culturing Cells from Nervous Tissues. Hippocampal Slice Cultures. *Bio Valley Monogr. Basel, Karger* **1**: 1-11.
- Forster E, Zhao S, Frotscher M (2006). Laminating the hippocampus. *Nat Rev Neurosci* **7**(4): 259-267.
- Fowler CJ, Tiger G, Ligresti A, Lopez-Rodriguez ML, Di Marzo V (2004). Selective inhibition of anandamide cellular uptake versus enzymatic hydrolysis--a difficult issue to handle. *Eur J Pharmacol* **492**(1): 1-11.

Frederiksen K, Jat PS, Valtz N, Levy D, McKay R (1988). Immortalization of precursor cells from the mammalian CNS. *Neuron* **1**(6): 439-448.

Freeman MR (2010). Specification and morphogenesis of astrocytes. *Science* **330**(6005): 774-778.

Frotscher M, Zafirov S, Heimrich B (1995). Development of identified neuronal types and of specific synaptic connections in slice cultures of rat hippocampus. *Prog Neurobiol* **45**(6): vii-xxviii.

Fu J, Bottegoni G, Sasso O, Bertorelli R, Rocchia W, Masetti M, *et al.* (2012). A catalytically silent FAAH-1 variant drives anandamide transport in neurons. *Nat Neurosci* **15**(1): 64-69.

Gahwiler BH, Capogna M, Debanne D, McKinney RA, Thompson SM (1997). Organotypic slice cultures: a technique has come of age. *Trends Neurosci* **20**(10): 471-477.

Galve-Roperh I, Rueda D, Gomez del Pulgar T, Velasco G, Guzman M (2002). Mechanism of extracellular signal-regulated kinase activation by the CB(1) cannabinoid receptor. *Mol Pharmacol* **62**(6): 1385-1392.

Giuffrida A, Leweke FM, Gerth CW, Schreiber D, Koethe D, Faulhaber J, *et al.* (2004). Cerebrospinal anandamide levels are elevated in acute schizophrenia and are inversely correlated with psychotic symptoms. *Neuropsychopharmacology* **29**(11): 2108-2114.

Giulian D, Baker TJ (1986). Characterization of amoeboid microglia isolated from developing mammalian brain. *J Neurosci* **6**(8): 2163-2178.

Glaser ST, Kaczocha M, Deutsch DG (2005). Anandamide transport: a critical review. *Life Sci* **77**(14): 1584-1604.

Godlewski G, Offertaler L, Osei-Hyiaman D, Mo FM, Harvey-White J, Liu J, *et al.* (2009). The endogenous brain constituent N-arachidonoyl L-serine is an activator of large conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels. *J Pharmacol Exp Ther* **328**(1): 351-361.

Golech SA, McCarron RM, Chen Y, Bembry J, Lenz F, Mechoulam R, *et al.* (2004). Human brain endothelium: coexpression and function of vanilloid and endocannabinoid receptors. *Brain Res Mol Brain Res* **132**(1): 87-92.

Gomez del Pulgar T, Velasco G, Guzman M (2000). The CB1 cannabinoid receptor is coupled to the activation of protein kinase B/Akt. *Biochem J* **347**(Pt 2): 369-373.

Grabiec U, Koch M, Kallendrusch S, Kraft R, Hill K, Merkwitz C, *et al.* (2012). The endocannabinoid N-arachidonoyldopamine (NADA) exerts neuroprotective effects after

excitotoxic neuronal damage via cannabinoid receptor 1 (CB(1)). *Neuropharmacology* **62**(4): 1797-1807.

Graeber MB, Streit WJ (2010). Microglia: biology and pathology. *Acta Neuropathol* **119**(1): 89-105.

Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* **36**(1): 59-74.

Guo J, Williams DJ, Ikeda SR (2008). N-arachidonoyl L-serine, a putative endocannabinoid, alters the activation of N-type Ca<sup>2+</sup> channels in sympathetic neurons. *J Neurophysiol* **100**(2): 1147-1151.

Haddad SH, Arabi YM (2012). Critical care management of severe traumatic brain injury in adults. *Scand J Trauma Resusc Emerg Med* **20**: 12.

Hailer NP, Jarhult JD, Nitsch R (1996). Resting microglial cells in vitro: analysis of morphology and adhesion molecule expression in organotypic hippocampal slice cultures. *Glia* **18**(4): 319-331.

Hailer NP, Vogt C, Korf HW, Dehghani F (2005). Interleukin-1beta exacerbates and interleukin-1 receptor antagonist attenuates neuronal injury and microglial activation after excitotoxic damage in organotypic hippocampal slice cultures. *Eur J Neurosci* **21**(9): 2347-2360.

Hansen HH, Schmid PC, Bittigau P, Lastres-Becker I, Berrendero F, Manzanares J, *et al.* (2001). Anandamide, but not 2-arachidonoylglycerol, accumulates during in vivo neurodegeneration. *J Neurochem* **78**(6): 1415-1427.

Harrison S, De Petrocellis L, Trevisani M, Benvenuti F, Bifulco M, Geppetti P, *et al.* (2003). Capsaicin-like effects of N-arachidonoyl-dopamine in the isolated guinea pig bronchi and urinary bladder. *Eur J Pharmacol* **475**(1-3): 107-114.

Henn A, Lund S, Hedtjarn M, Schratzenholz A, Porzgen P, Leist M (2009). The suitability of BV2 cells as alternative model system for primary microglia cultures or for animal experiments examining brain inflammation. *ALTEX* **26**(2): 83-94.

Henstridge CM (2012). Off-Target Cannabinoid Effects Mediated by GPR55. *Pharmacology* **89**(3-4): 179-187.

Heppner FL, Skutella T, Hailer NP, Haas D, Nitsch R (1998). Activated microglial cells migrate towards sites of excitotoxic neuronal injury inside organotypic hippocampal slice cultures. *Eur J Neurosci* **10**(10): 3284-3290.



Hohmann AG, Herkenham M (1999). Cannabinoid receptors undergo axonal flow in sensory nerves. *Neuroscience* **92**(4): 1171-1175.

Hohmann AG, Suplita RL, Bolton NM, Neely MH, Fegley D, Mangieri R, *et al.* (2005). An endocannabinoid mechanism for stress-induced analgesia. *Nature* **435**(7045): 1108-1112.

Horvath RJ, Nutile-McMenemy N, Alkaitis MS, Deleo JA (2008). Differential migration, LPS-induced cytokine, chemokine, and NO expression in immortalized BV-2 and HAPI cell lines and primary microglial cultures. *J Neurochem* **107**(2): 557-569.

Howlett AC, Barth F, Bonner TI, Cabral G, Casellas P, Devane WA, *et al.* (2002). International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacol Rev* **54**(2): 161-202.

Howlett AC, Blume LC, Dalton GD (2010). CB(1) cannabinoid receptors and their associated proteins. *Curr Med Chem* **17**(14): 1382-1393.

Howlett AC, Breivogel CS, Childers SR, Deadwyler SA, Hampson RE, Porrino LJ (2004). Cannabinoid physiology and pharmacology: 30 years of progress. *Neuropharmacology* **47 Suppl 1**: 345-358.

Hu SS, Bradshaw HB, Benton VM, Chen JS, Huang SM, Minassi A, *et al.* (2009). The biosynthesis of N-arachidonoyl dopamine (NADA), a putative endocannabinoid and endovanilloid, via conjugation of arachidonic acid with dopamine. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **81**(4): 291-301.

Huang SM, Bisogno T, Trevisani M, Al-Hayani A, De Petrocellis L, Fezza F, *et al.* (2002). An endogenous capsaicin-like substance with high potency at recombinant and native vanilloid VR1 receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(12): 8400-8405.

Huang SM, Walker JM (2006). Enhancement of spontaneous and heat-evoked activity in spinal nociceptive neurons by the endovanilloid/endocannabinoid N-arachidonoyldopamine (NADA). *J Neurophysiol* **95**(2): 1207-1212.

Jhaveri MD, Richardson D, Chapman V (2007). Endocannabinoid metabolism and uptake: novel targets for neuropathic and inflammatory pain. *Br J Pharmacol* **152**(5): 624-632.

John GR, Lee SC, Brosnan CF (2003). Cytokines: powerful regulators of glial cell activation. *Neuroscientist* **9**(1): 10-22.

Johnson GL, Lapadat R (2002). Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science* **298**(5600): 1911-1912.

Julius D, Basbaum AI (2001). Molecular mechanisms of nociception. *Nature* **413**(6852): 203-210.

- Kaczocha M, Glaser ST, Deutsch DG (2009). Identification of intracellular carriers for the endocannabinoid anandamide. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(15): 6375-6380.
- Karanian DA, Brown QB, Makriyannis A, Bahr BA (2005a). Blocking cannabinoid activation of FAK and ERK1/2 compromises synaptic integrity in hippocampus. *Eur J Pharmacol* **508**(1-3): 47-56.
- Karanian DA, Brown QB, Makriyannis A, Kosten TA, Bahr BA (2005b). Dual modulation of endocannabinoid transport and fatty acid amide hydrolase protects against excitotoxicity. *J Neurosci* **25**(34): 7813-7820.
- Katona I, Freund TF (2008). Endocannabinoid signaling as a synaptic circuit breaker in neurological disease. *Nat Med* **14**(9): 923-930.
- Katona I, Urban GM, Wallace M, Ledent C, Jung KM, Piomelli D, *et al.* (2006). Molecular composition of the endocannabinoid system at glutamatergic synapses. *J Neurosci* **26**(21): 5628-5637.
- Kettenmann H, Hanisch UK, Noda M, Verkhratsky A (2011). Physiology of microglia. *Physiol Rev* **91**(2): 461-553.
- Kettenmann H, Verkhratsky A (2008). Neuroglia: the 150 years after. *Trends Neurosci* **31**(12): 653-659.
- Klein TW, Newton C, Larsen K, Lu L, Perkins I, Nong L, *et al.* (2003). The cannabinoid system and immune modulation. *J Leukoc Biol* **74**(4): 486-496.
- Koch M, Kreutz S, Bottger C, Benz A, Maronde E, Ghadban C, *et al.* (2011a). Palmitoylethanolamide protects dentate gyrus granule cells via peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$ . *Neurotox Res* **19**(2): 330-340.
- Koch M, Kreutz S, Bottger C, Grabiec U, Ghadban C, Korf HW, *et al.* (2011b). The cannabinoid WIN 55,212-2-mediated protection of dentate gyrus granule cells is driven by CB1 receptors and modulated by TRPA1 and Cav 2.2 channels. *Hippocampus* **21**(5): 554-564.
- Koistinaho M, Koistinaho J (2002). Role of p38 and p44/42 mitogen-activated protein kinases in microglia. *Glia* **40**(2): 175-183.
- Kreutz S, Koch M, Bottger C, Ghadban C, Korf HW, 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**(3): 286-294.

Kreutz S, Koch M, Ghadban C, Korf HW, 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**(1): 246-257.

Lau A, Tymianski M (2010). Glutamate receptors, neurotoxicity and neurodegeneration. *Pflugers Arch* **460**(2): 525-542.

Lehtonen M, Storvik M, Malinen H, Hyytia P, Lakso M, Auriola S, *et al.* (2011). Determination of endocannabinoids in nematodes and human brain tissue by liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **879**(11-12): 677-694.

Lendahl U, McKay RD (1990). The use of cell lines in neurobiology. *Trends Neurosci* **13**(4): 132-137.

Liu J, Gao B, Mirshahi F, Sanyal AJ, Khanolkar AD, Makriyannis A, *et al.* (2000). Functional CB1 cannabinoid receptors in human vascular endothelial cells. *Biochem J* **346 Pt 3**: 835-840.

Liu J, Li L, Suo WZ (2009). HT22 hippocampal neuronal cell line possesses functional cholinergic properties. *Life Sci* **84**(9-10): 267-271.

Loane DJ, Faden AI (2010). Neuroprotection for traumatic brain injury: translational challenges and emerging therapeutic strategies. *Trends Pharmacol Sci* **31**(12): 596-604.

Long JZ, Li W, Booker L, Burston JJ, Kinsey SG, Schlosburg JE, *et al.* (2009). Selective blockade of 2-arachidonoylglycerol hydrolysis produces cannabinoid behavioral effects. *Nat Chem Biol* **5**(1): 37-44.

Ludanyi A, Hu SS, Yamazaki M, Tanimura A, Piomelli D, Watanabe M, *et al.* (2011). Complementary synaptic distribution of enzymes responsible for synthesis and inactivation of the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol in the human hippocampus. *Neuroscience* **174**: 50-63.

Maccarrone M, Gubellini P, Bari M, Picconi B, Battista N, Centonze D, *et al.* (2003). Levodopa treatment reverses endocannabinoid system abnormalities in experimental parkinsonism. *J Neurochem* **85**(4): 1018-1025.

Maher P, Davis JB (1996). The role of monoamine metabolism in oxidative glutamate toxicity. *J Neurosci* **16**(20): 6394-6401.

Malenka RC, Bear MF (2004). LTP and LTD: an embarrassment of riches. *Neuron* **44**(1): 5-21.

- Maresz K, Carrier EJ, Ponomarev ED, Hillard CJ, Dittel BN (2005). Modulation of the cannabinoid CB2 receptor in microglial cells in response to inflammatory stimuli. *J Neurochem* **95**(2): 437-445.
- Maresz K, Pryce G, Ponomarev ED, Marsicano G, Croxford JL, Shriver LP, *et al.* (2007). Direct suppression of CNS autoimmune inflammation via the cannabinoid receptor CB1 on neurons and CB2 on autoreactive T cells. *Nat Med* **13**(4): 492-497.
- Marinelli S, Di Marzo V, Florenzano F, Fezza F, Viscomi MT, van der Stelt M, *et al.* (2007). N-arachidonoyl-dopamine tunes synaptic transmission onto dopaminergic neurons by activating both cannabinoid and vanilloid receptors. *Neuropsychopharmacology* **32**(2): 298-308.
- Marsicano G, Goodenough S, Monory K, Hermann H, Eder M, Cannich A, *et al.* (2003). CB1 cannabinoid receptors and on-demand defense against excitotoxicity. *Science* **302**(5642): 84-88.
- Marsicano G, Wotjak CT, Azad SC, Bisogno T, Rammes G, Cascio MG, *et al.* (2002). The endogenous cannabinoid system controls extinction of aversive memories. *Nature* **418**(6897): 530-534.
- Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein MJ, Young AC, Bonner TI (1990). Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature* **346**(6284): 561-564.
- McCudden CR, Hains MD, Kimple RJ, Siderovski DP, Willard FS (2005). G-protein signaling: back to the future. *Cell Mol Life Sci* **62**(5): 551-577.
- McHugh D, Hu SS, Rimmerman N, Juknat A, Vogel Z, Walker JM, *et al.* (2010). N-arachidonoyl glycine, an abundant endogenous lipid, potently drives directed cellular migration through GPR18, the putative abnormal cannabidiol receptor. *BMC Neurosci* **11**: 44.
- Mechoulam R, Shani A, Edery H, Grunfeld Y (1970). Chemical basis of hashish activity. *Science* **169**(3945): 611-612.
- Mechoulam R, Shohami E (2007). Endocannabinoids and traumatic brain injury. *Mol Neurobiol* **36**(1): 68-74.
- Melck D, Rueda D, Galve-Roperh I, De Petrocellis L, Guzman M, Di Marzo V (1999). Involvement of the cAMP/protein kinase A pathway and of mitogen-activated protein kinase in the anti-proliferative effects of anandamide in human breast cancer cells. *FEBS Lett* **463**(3): 235-240.
- Mezey E, Toth ZE, Cortright DN, Arzubi MK, Krause JE, Elde R, *et al.* (2000). Distribution of mRNA for vanilloid receptor subtype 1 (VR1), and VR1-like immunoreactivity, in the central nervous system of the rat and human. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(7): 3655-3660.

Miller AM, Stella N (2008). CB2 receptor-mediated migration of immune cells: it can go either way. *Br J Pharmacol* **153**(2): 299-308.

Millns PJ, Chimenti M, Ali N, Ryland E, de Lago E, Fernandez-Ruiz J, *et al.* (2006). Effects of inhibition of fatty acid amide hydrolase vs. the anandamide membrane transporter on TRPV1-mediated calcium responses in adult DRG neurons; the role of CB receptors. *Eur J Neurosci* **24**(12): 3489-3495.

Milman G, Maor Y, Abu-Lafi S, Horowitz M, Gallily R, Batkai S, *et al.* (2006). N-arachidonoyl L-serine, an endocannabinoid-like brain constituent with vasodilatory properties. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(7): 2428-2433.

Missale C, Fiorentini C, Collo G, Spano P (2010). The neurobiology of dopamine receptors: evolution from the dual concept to heterodimer complexes. *J Recept Signal Transduct Res* **30**(5): 347-354.

Morimoto BH, Koshland DE, Jr. (1990). Excitatory amino acid uptake and N-methyl-D-aspartate-mediated secretion in a neural cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**(9): 3518-3521.

Muccioli GG, Xu C, Odah E, Cudaback E, Cisneros JA, Lambert DM, *et al.* (2007). Identification of a novel endocannabinoid-hydrolyzing enzyme expressed by microglial cells. *J Neurosci* **27**(11): 2883-2889.

Munro S, Thomas KL, Abu-Shaar M (1993). Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature* **365**(6441): 61-65.

Nagayama T, Sinor AD, Simon RP, Chen J, Graham SH, Jin K, *et al.* (1999). Cannabinoids and neuroprotection in global and focal cerebral ischemia and in neuronal cultures. *J Neurosci* **19**(8): 2987-2995.

National Institute of Neurological Disorders and Stroke [www.ninds.nih.gov](http://www.ninds.nih.gov).

Navarrete CM, Fiebich BL, de Vinuesa AG, Hess S, de Oliveira AC, Candelario-Jalil E, *et al.* (2009). Opposite effects of anandamide and N-arachidonoyl dopamine in the regulation of prostaglandin E and 8-iso-PGF formation in primary glial cells. *J Neurochem* **109**(2): 452-464.

Navarrete CM, Perez M, de Vinuesa AG, Collado JA, Fiebich BL, Calzado MA, *et al.* (2010). Endogenous N-acyl-dopamines induce COX-2 expression in brain endothelial cells by stabilizing mRNA through a p38 dependent pathway. *Biochem Pharmacol* **79**(12): 1805-1814.

Neve KA, Seamans JK, Trantham-Davidson H (2004). Dopamine receptor signaling. *J Recept Signal Transduct Res* **24**(3): 165-205.

Noraberg J, Poulsen FR, Blaabjerg M, Kristensen BW, Bonde C, Montero M, *et al.* (2005). Organotypic hippocampal slice cultures for studies of brain damage, neuroprotection and neurorepair. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* **4**(4): 435-452.

Numberger M, Draguhn A (eds) (1996). *Patch-Clamp Technik*. Spektrum Akademischer Verlag: Heidelberg/Berlin/Oxford

Nutile-McMenemy N, Elfenbein A, Deleo JA (2007). Minocycline decreases in vitro microglial motility, beta1-integrin, and Kv1.3 channel expression. *J Neurochem* **103**(5): 2035-2046.

O'Sullivan SE (2007). Cannabinoids go nuclear: evidence for activation of peroxisome proliferator-activated receptors. *Br J Pharmacol* **152**(5): 576-582.

O'Sullivan SE, Kendall DA, Randall MD (2004). Characterisation of the vasorelaxant properties of the novel endocannabinoid N-arachidonoyl-dopamine (NADA). *Br J Pharmacol* **141**(5): 803-812.

Ortar G, Ligresti A, De Petrocellis L, Morera E, Di Marzo V (2003). Novel selective and metabolically stable inhibitors of anandamide cellular uptake. *Biochem Pharmacol* **65**(9): 1473-1481.

Pacher P, Batkai S, Kunos G (2006). The endocannabinoid system as an emerging target of pharmacotherapy. *Pharmacol Rev* **58**(3): 389-462.

Pacher P, Mechoulam R (2011). Is lipid signaling through cannabinoid 2 receptors part of a protective system? *Prog Lipid Res* **50**(2): 193-211.

Pagano C, Rossato M, Vettor R (2008). Endocannabinoids, adipose tissue and lipid metabolism. *J Neuroendocrinol* **20 Suppl 1**: 124-129.

Panikashvili D, Simeonidou C, Ben-Shabat S, Hanus L, Breuer A, Mechoulam R, *et al.* (2001). An endogenous cannabinoid (2-AG) is neuroprotective after brain injury. *Nature* **413**(6855): 527-531.

Patinkin D, Milman G, Breuer A, Fride E, Mechoulam R (2008). Endocannabinoids as positive or negative factors in hematopoietic cell migration and differentiation. *Eur J Pharmacol* **595**(1-3): 1-6.

Pertwee RG (2010). Cannabinoid Receptor Ligands: Tocris.

Pertwee RG (2005). Inverse agonism and neutral antagonism at cannabinoid CB1 receptors. *Life Sci* **76**(12): 1307-1324.

Pertwee RG (2008). Ligands that target cannabinoid receptors in the brain: from THC to anandamide and beyond. *Addict Biol* **13**(2): 147-159.

Pertwee RG (1997). Pharmacology of cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Pharmacol Ther* **74**(2): 129-180.

Pertwee RG (2006). The pharmacology of cannabinoid receptors and their ligands: an overview. *Int J Obes (Lond)* **30 Suppl 1**: S13-18.

Pertwee RG, Howlett AC, Abood ME, Alexander SP, Di Marzo V, Elphick MR, *et al.* (2010). International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXIX. Cannabinoid receptors and their ligands: beyond CB(1) and CB(2). *Pharmacol Rev* **62**(4): 588-631.

Piomelli D (2003). The molecular logic of endocannabinoid signalling. *Nat Rev Neurosci* **4**(11): 873-884.

Poeck K, Hacke W (eds) (2006). *Neurologie*. Springer Berlin Heidelberg.

Pozzo Miller LD, Mahanty NK, Connor JA, Landis DM (1994). Spontaneous pyramidal cell death in organotypic slice cultures from rat hippocampus is prevented by glutamate receptor antagonists. *Neuroscience* **63**(2): 471-487.

Premkumar LS, Qi ZH, Van Buren J, Raisinghani M (2004). Enhancement of potency and efficacy of NADA by PKC-mediated phosphorylation of vanilloid receptor. *J Neurophysiol* **91**(3): 1442-1449.

Price TJ, Helesic G, Parghi D, Hargreaves KM, Flores CM (2003). The neuronal distribution of cannabinoid receptor type 1 in the trigeminal ganglion of the rat. *Neuroscience* **120**(1): 155-162.

Price TJ, Patwardhan A, Akopian AN, Hargreaves KM, Flores CM (2004). Modulation of trigeminal sensory neuron activity by the dual cannabinoid-vanilloid agonists anandamide, N-arachidonoyl-dopamine and arachidonoyl-2-chloroethylamide. *Br J Pharmacol* **141**(7): 1118-1130.

Price TJ, Patwardhan AM, Flores CM, Hargreaves KM (2005). A role for the anandamide membrane transporter in TRPV1-mediated neurosecretion from trigeminal sensory neurons. *Neuropharmacology* **49**(1): 25-39.

Prusakiewicz JJ, Turman MV, Vila A, Ball HL, Al-Mestarihi AH, Di Marzo V, *et al.* (2007). Oxidative metabolism of lipoamino acids and vanilloids by lipoxygenases and cyclooxygenases. *Arch Biochem Biophys* **464**(2): 260-268.

Rebola N, Srikumar BN, Mulle C (2010). Activity-dependent synaptic plasticity of NMDA receptors. *J Physiol* **588**(Pt 1): 93-99.

Rimmerman N, Bradshaw HB, Basnet A, Tan B, Widlanski TS, Walker JM (2009). Microsomal omega-hydroxylated metabolites of N-arachidonoyl dopamine are active at recombinant human TRPV1 receptors. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **88**(1-2): 10-17.

Roberts JC, Davis JB, Benham CD (2004). [3H]Resiniferatoxin autoradiography in the CNS of wild-type and TRPV1 null mice defines TRPV1 (VR-1) protein distribution. *Brain Res* **995**(2): 176-183.

Roberts LA, Ross HR, Connor M (2008). Methanandamide activation of a novel current in mouse trigeminal ganglion sensory neurons in vitro. *Neuropharmacology* **54**(1): 172-180.

Roux PP, Blenis J (2004). ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol Mol Biol Rev* **68**(2): 320-344.

Ryberg E, Larsson N, Sjogren S, Hjorth S, Hermansson NO, Leonova J, *et al.* (2007). The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor. *Br J Pharmacol* **152**(7): 1092-1101.

Sagar DR, Smith PA, Millns PJ, Smart D, Kendall DA, Chapman V (2004). TRPV1 and CB(1) receptor-mediated effects of the endovanilloid/endocannabinoid N-arachidonoyl-dopamine on primary afferent fibre and spinal cord neuronal responses in the rat. *Eur J Neurosci* **20**(1): 175-184.

Sakmann B, Neher E (eds) (2009). *Single-Channel Recording*. Springer Berlin Heidelberg

Sanchez C, Galve-Roperh I, Rueda D, Guzman M (1998). Involvement of sphingomyelin hydrolysis and the mitogen-activated protein kinase cascade in the Delta9-tetrahydrocannabinol-induced stimulation of glucose metabolism in primary astrocytes. *Mol Pharmacol* **54**(5): 834-843.

Sancho R, de la Vega L, Macho A, Appendino G, Di Marzo V, Munoz E (2005). Mechanisms of HIV-1 inhibition by the lipid mediator N-arachidonoyldopamine. *J Immunol* **175**(6): 3990-3999.

Sancho R, Macho A, de La Vega L, Calzado MA, Fiebich BL, Appendino G, *et al.* (2004). Immunosuppressive activity of endovanilloids: N-arachidonoyl-dopamine inhibits activation of the NF-kappa B, NFAT, and activator protein 1 signaling pathways. *J Immunol* **172**(4): 2341-2351.

Saunders CI, Fassett RG, Geraghty DP (2009). Up-regulation of TRPV1 in mononuclear cells of end-stage kidney disease patients increases susceptibility to N-arachidonoyl-dopamine (NADA)-induced cell death. *Biochim Biophys Acta* **1792**(10): 1019-1026.



Scotter EL, Abood ME, Glass M (2010). The endocannabinoid system as a target for the treatment of neurodegenerative disease. *Br J Pharmacol* **160**(3): 480-498.

Sharkey KA, Cristino L, Oland LD, Van Sickle MD, Starowicz K, Pittman QJ, *et al.* (2007). Arvanil, anandamide and N-arachidonoyl-dopamine (NADA) inhibit emesis through cannabinoid CB1 and vanilloid TRPV1 receptors in the ferret. *Eur J Neurosci* **25**(9): 2773-2782.

Shen M, Thayer SA (1998). The cannabinoid agonist Win55,212-2 inhibits calcium channels by receptor-mediated and direct pathways in cultured rat hippocampal neurons. *Brain Res* **783**(1): 77-84.

Shohami E, Cohen-Yeshurun A, Magid L, Algali M, Mechoulam R (2011). Endocannabinoids and traumatic brain injury. *Br J Pharmacol* **163**(7): 1402-1410.

Sinor AD, Irvin SM, Greenberg DA (2000). Endocannabinoids protect cerebral cortical neurons from in vitro ischemia in rats. *Neurosci Lett* **278**(3): 157-160.

Smith TH, Sim-Selley LJ, Selley DE (2010). Cannabinoid CB1 receptor-interacting proteins: novel targets for central nervous system drug discovery? *Br J Pharmacol* **160**(3): 454-466.

Steenland HW, Ko SW, Wu LJ, Zhuo M (2006). Hot receptors in the brain. *Mol Pain* **2**: 34.

Stella N (2010). Cannabinoid and cannabinoid-like receptors in microglia, astrocytes, and astrocytomas. *Glia* **58**(9): 1017-1030.

Stella N, Schweitzer P, Piomelli D (1997). A second endogenous cannabinoid that modulates long-term potentiation. *Nature* **388**(6644): 773-778.

Stoppini L, Buchs PA, Muller D (1991). A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. *J Neurosci Methods* **37**(2): 173-182.

Straiker A, Mackie K (2009). Cannabinoid signaling in inhibitory autaptic hippocampal neurons. *Neuroscience* **163**(1): 190-201.

Straiker A, Mackie K (2006). Cannabinoids, electrophysiology, and retrograde messengers: challenges for the next 5 years. *AAPS J* **8**(2): E272-276.

Straiker A, Mackie K (2005). Depolarization-induced suppression of excitation in murine autaptic hippocampal neurones. *J Physiol* **569**(Pt 2): 501-517.

Streit WJ, Xue QS (2009). Life and death of microglia. *J Neuroimmune Pharmacol* **4**(4): 371-379.

Sugiura T, Kondo S, Sukagawa A, Nakane S, Shinoda A, Itoh K, *et al.* (1995). 2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. *Biochem Biophys Res Commun* **215**(1): 89-97.

Sullivan JM (1999). Mechanisms of cannabinoid-receptor-mediated inhibition of synaptic transmission in cultured hippocampal pyramidal neurons. *J Neurophysiol* **82**(3): 1286-1294.

Sun Y, Alexander SP, Garle MJ, Gibson CL, Hewitt K, Murphy SP, *et al.* (2007). Cannabinoid activation of PPAR alpha; a novel neuroprotective mechanism. *Br J Pharmacol* **152**(5): 734-743.

Szallasi A, Cortright DN, Blum CA, Eid SR (2007). The vanilloid receptor TRPV1: 10 years from channel cloning to antagonist proof-of-concept. *Nat Rev Drug Discov* **6**(5): 357-372.

Tator CH, Fehlings MG (1991). Review of the secondary injury theory of acute spinal cord trauma with emphasis on vascular mechanisms. *J Neurosurg* **75**(1): 15-26.

Thomas A, Hopfgartner G, Giroud C, Staub C (2009). Quantitative and qualitative profiling of endocannabinoids in human plasma using a triple quadrupole linear ion trap mass spectrometer with liquid chromatography. *Rapid Commun Mass Spectrom* **23**(5): 629-638.

Thomas P, Smart TG (2005). HEK293 cell line: a vehicle for the expression of recombinant proteins. *J Pharmacol Toxicol Methods* **51**(3): 187-200.

Thurman DJ, Alverson C, Dunn KA, Guerrero J, Sniezek JE (1999). Traumatic brain injury in the United States: A public health perspective. *J Head Trauma Rehabil* **14**(6): 602-615.

Toth A, Kedei N, Wang Y, Blumberg PM (2003). Arachidonyl dopamine as a ligand for the vanilloid receptor VR1 of the rat. *Life Sci* **73**(4): 487-498.

Tsou K, Nogueron MI, Muthian S, Sanudo-Pena MC, Hillard CJ, Deutsch DG, *et al.* (1998). Fatty acid amide hydrolase is located preferentially in large neurons in the rat central nervous system as revealed by immunohistochemistry. *Neurosci Lett* **254**(3): 137-140.

Turu G, Hunyady L (2010). Signal transduction of the CB1 cannabinoid receptor. *J Mol Endocrinol* **44**(2): 75-85.

Valjent E, Pages C, Rogard M, Besson MJ, Maldonado R, Caboche J (2001). Delta 9-tetrahydrocannabinol-induced MAPK/ERK and Elk-1 activation in vivo depends on dopaminergic transmission. *Eur J Neurosci* **14**(2): 342-352.

Van Dongen E (ed) (2009). *Biology of NMDA Receptor*. CRC Press: Boca Raton (FL).

Veldhuis WB, van der Stelt M, Wadman MW, van Zadelhoff G, Maccarrone M, Fezza F, *et al.* (2003). Neuroprotection by the endogenous cannabinoid anandamide and arvanil against in

vivo excitotoxicity in the rat: role of vanilloid receptors and lipoxygenases. *J Neurosci* **23**(10): 4127-4133.

Vogt C, Hailer NP, Ghadban C, Korf HW, Dehghani F (2008). Successful inhibition of excitotoxic neuronal damage and microglial activation after delayed application of interleukin-1 receptor antagonist. *J Neurosci Res* **86**(15): 3314-3321.

Wallace MJ, Martin BR, DeLorenzo RJ (2002). Evidence for a physiological role of endocannabinoids in the modulation of seizure threshold and severity. *Eur J Pharmacol* **452**(3): 295-301.

Wang T, Collet JP, Shapiro S, Ware MA (2008). Adverse effects of medical cannabinoids: a systematic review. *CMAJ* **178**(13): 1669-1678.

Wartmann M, Campbell D, Subramanian A, Burstein SH, Davis RJ (1995). The MAP kinase signal transduction pathway is activated by the endogenous cannabinoid anandamide. *FEBS Lett* **359**(2-3): 133-136.

Wojtalla A, Herweck F, Granzow M, Klein S, Trebicka J, Huss S, *et al.* (2012). The endocannabinoid N-arachidonoyl dopamine (NADA) selectively induces oxidative stress-mediated cell death in hepatic stellate cells but not in hepatocytes. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **302**(8): G873-887.

World Drug Report (2011). [http://www.unodc.org/documents/data-and-analysis/WDR2011/World\\_Drug\\_Report\\_2011\\_ebook.pdf](http://www.unodc.org/documents/data-and-analysis/WDR2011/World_Drug_Report_2011_ebook.pdf).

Yoon S, Seger R (2006). The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions. *Growth Factors* **24**(1): 21-44.

Zhang X, Maor Y, Wang JF, Kunos G, Groopman JE (2010). Endocannabinoid-like N-arachidonoyl serine is a novel pro-angiogenic mediator. *Br J Pharmacol* **160**(7): 1583-1594.